

Особенности болевого стресса на фоне введения нейротензина у крыс с токсическим повреждением серотонинергических структур мозга

Н.П. Шугалев, А.В. Ставровская, А.С. Ольшанский, Н.Г. Ямщикова, Е.В. Калинович

Научный центр неврологии РАМН, Москва

Целью исследования было выяснение влияния нейротензина на реализацию двигательных реакций пассивного избегания и последствий болевого стресса у крыс с повреждением серотонинергических структур мозга. Показано, что введение избирательного нейротоксина 5,7-дигидрокситриптамина в дорзальное ядро шва усиливало, а введение в черную субстанцию, наоборот, ослабляло воспроизведение пассивных оборонительных реакций у крыс. В условиях последствия болевого стресса введение нейротоксина в указанные образования мозга вызывало разнонаправленные изменения двигательной активности крыс и их поведения в приподнятом Х-образном лабиринте. Микроинъекции нейротензина в черную субстанцию и хвостатые ядра ослабляли эффекты нейротоксина и, таким образом, повышали адаптивный характер оборонительного поведения крыс с дефицитом функции серотонинергических нейронов. Ослабление негативного влияния болевого стресса на поведение животных на фоне действия нейротензина может быть проявлением анксиолитических свойств этого пептида и указывать на его протекторное значение в условиях эмоционального стресса.

Ключевые слова: нейротензин, нейротоксин, дофамин, серотонин, черная субстанция, условный рефлекс активного избегания, поведение.

В последние годы интерес исследователей привлекают нейрофизиологические механизмы, лежащие в основе индивидуальной устойчивости к развитию патологических последствий стресса. Предметом дискуссии является потенциальная роль серотонина в развитии тревожности, которая представляет один из негативных синдромов, возникающих в условиях эмоционально-стрессовых состояний. Существуют две противоположные гипотезы, согласно одной из которых, серотонин способствует, а согласно другой – наоборот, препятствует развитию тревожности [8]. В пользу последней точки зрения свидетельствует высокая эффективность селективных ингибиторов обратного захвата серотонина при лечении тревожных расстройств. Кроме того, высказана гипотеза о двойственной роли серотонина, согласно которой он увеличивает тревожность, действуя на структуры переднего мозга, но подавляет через действие в дорзальном околосредоводном сером веществе [14]. Из вышесказанного следует, что для предупреждения развития тревожного состояния необходимо комплексное влияние на серотонинергические структуры на уровне различных образований мозга. В соответствии с нашими собственными [7] и некоторыми литературными данными [11] такое влияние на серотонинергические структуры может оказывать нейротензин.

Функция нейротензина в ЦНС осуществляется в тесной связи с дофаминергической системой и поэтому может

быть вовлечена в заболевания, в основе патогенеза которых лежат нарушения регуляции дофаминергической передачи. К таким заболеваниям относятся шизофрения, наркомания и болезнь Паркинсона [9]. Нейроны, продуцирующие нейротензин, и их проекции широко распределены в ЦНС, что объясняет широкий диапазон эффектов этого пептида. Наиболее высокие концентрации нейротензина выявлены в областях, связанных с дофаминергическими проекциями, таких как хвостатое ядро, скорлупа и прилежащее ядро [16]. В среднем мозге наибольшее число нейротензин-позитивных клеток определяется в вентральной области покрышки и черной субстанции [20]. Подавляющее большинство дофаминергических нейронов в этих образованиях экспрессируют нейротензиновые рецепторы, с преобладанием подтипа NT_1 [12]. В пределах стриатума NT_1 нейротензиновые рецепторы расположены на дофаминергических, глутаматергических и ГАМК-ергических аксонах, а NT_2 рецепторы – на глиальных клетках. Введение нейротензина в вентральную область покрышки или черную субстанцию вызывает увеличение высвобождения дофамина в прилежащем ядре или хвостатых ядрах. Очевидно, это объясняется уменьшением способности дофаминовых D_2 рецепторов оказывать пресинаптическое торможение на уровне тел и дендритов дофаминергических нейронов, а также увеличением скорости их разрядов [24].

В дополнение к широко изученному взаимодействию нейротензина с дофаминергической системой существуют

данные, свидетельствующие о его взаимодействии с серотонинергическими нейронами ядер шва [17]. Например, подведение нейротензина к этим нейронам вызывает увеличение скорости разряда, и этот эффект блокируется антагонистом нейротензина SR48692 [10]. Функциональная роль нейротензина в ядре шва, возможно, связана с модуляцией некоторых из известных функций серотонинергической системы, включая обусловленные стрессом реакции [9].

Цель данного исследования — анализ поведенческих эффектов нейротензина у контрольных животных и животных с повреждением серотонинергических структур. В работе определяли изменения воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания, а также особенности последствий болевой стимуляции на поведение крыс после введения нейротензина в различные образования мозга.

Методы исследования

Работа проводилась на белых крысах-самцах массой 250–300 г, которые содержались в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, а также естественном чередовании суточной освещенности. Содержание животных и проведение экспериментов осуществляли в соответствии с международными правилами "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". Эффективность пассивного оборонительного поведения оценивали по величине латентного периода перехода крыс из ярко освещенной камеры в темную камеру, в которой животные накануне получали сильное электрическое раздражение (2 мА, 3 с). Если крысы в течение 3 мин. не заходили в темную камеру, их возвращали в клетку. Тестирование таких реакций проводили в течение 4 дней после предъявления электрического раздражения. Сразу после болевой раздражения проводили тестирование двигательной активности крыс в "открытом поле" в течение 3 мин. Учитывали число пересеченных квадратов и количество стоек. Затем крыс помещали в Х-лабиринт, где в течение 3 мин. оценивалось поведение животных по следующим параметрам: предпочтение открытого (ОР) или закрытого (ЗР) рукавов в начале эксперимента, латентный период захода и время пребывания в ОР и ЗР. Регистрация поведения осуществлялась с помощью web-видеокамеры.

Крысам вживляли металлические направляющие канюли билатерально в черную субстанцию (преимущественно в компактную часть) и в хвостатые ядра, а также одну канюлю в дорзальное ядро шва. Использовали следующие стереотаксические координаты [11] от брегмы, средней линии и от поверхности мозга соответственно: черная субстанция — 4,2, 1,9, 7,0; хвостатые ядра — 1,0, 2,5, 4,5; дорзальное ядро шва — 7,0, 1,8, 5,5 (под углом 15 градусов). Канюли фиксировались на черепе с помощью двух винтов и зубного акрила. Хирургическую операцию проводили под анестезией с помощью внутривенного введения кетамина (50 мг/кг) и бензодиазепаина (5 мг/кг).

Повреждение серотонинергических структур осуществляли с помощью локального введения в черную субстанцию или дорзальное ядро шва селективного нейротоксина — 5,7-дигидрокситриптамина в дозе 7 мкг в 0,7 мкл 0,05%-ного раствора аскорбиновой кислоты.

При определении влияния внутримозговых микроинъекций нейротензина на выработку условного рефлекса пассивного избегания вещества вводили за 7 мин. до предъявления электрического: раздражения. Процедура экспери-

мента была следующей: в хвостатые ядра или черную субстанцию билатерально вводили 2,5 мкг нейротензина в 1,0 мкл физиологического раствора. Контрольным животным вводили только физиологический раствор в том же объеме. Для микроинъекций использовали металлическую иглу, выступающую на 1 мм из кончика направляющей канюли и соединенную переходной трубкой с микрошприцем. Инъекцию осуществляли вручную со скоростью 1 мкл/мин. Иглу оставляли в направляющей канюле в течение 2 мин., а затем ее удаляли и заменяли металлическим мандреном. Перед нанесением болевого раздражения определяли латентный период входа животных в темный отсек экспериментальной камеры. Тестирование оборонительных реакций проводили через 24, 48, 72 часа после болевого раздражения. По окончании экспериментов проводили морфологический контроль положения кончиков канюль в мозге крыс на срезах, окрашенных по Нислю. При статистической обработке данных поведенческих экспериментов использовали непараметрический метод Вилкоксона (Манна–Уитни). Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Исследование показало, что микроинъекции нейротоксина 5,7-дигидрокситриптамина в дорзальное ядро шва и в черную субстанцию мозга оказывали разное влияние на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания. На рис. 1 (А и Б) видно, что контрольные животные в течение трех дней после нанесения болевого раздражения либо не заходили в темный отсек камеры, либо заходили с большим латентным периодом. Введение нейротоксина в дорзальное ядро шва (рис. 1А) облегчало воспроизведение условного рефлекса, что сопровождалось развитием негативного эмоционального состояния. У крыс при помещении их в экспериментальную камеру наблюдались одышка, голосовые реакции и дефекация. Инъекции этим животным нейротензина в черную субстанцию ослабляли воспроизведение рефлекса и проявление негативных эмоциональных реакций. У крыс, которым вводили нейротоксин в черную субстанцию, латентный период реакций пассивного избегания был существенно короче, чем у контрольных животных. Введение нейротензина в хвостатые ядра таким животным инвертировало эффект нейротоксина и восстанавливало воспроизведение рефлекса.

Последствие болевой стимуляции на поведение животных проявлялось в угнетении двигательной активности контрольных крыс в "открытом поле" (рис. 2). Эффекты введения нейротензина в черную субстанцию (рис. 2А) и хвостатые ядра (рис. 2Б) заключались в ослаблении угнетения горизонтальной активности крыс после болевой стимуляции. Действие нейротоксина после введения в указанные образования мозга было разнонаправленным: у крыс с нейротоксическим повреждением дорзального ядра шва болевая стимуляция не вызывала снижения двигательной активности, а у крыс с повреждением черной субстанции двигательная активность после болевой стимуляции значительно снижалась. Введение нейротензина в черную субстанцию и хвостатые ядра инвертировало эффекты нейротоксина: в первом случае двигательная активность снижалась так же, как у контрольных животных, а во втором — действие нейротензина сопровождалось существенным ослаблением угнетающего влияния болевой стимуляции на двигательную активность животных.

Тестирование поведения крыс в приподнятом Х-лабиринте после болевой стимуляции (рис. 3) показало, что введение нейротоксина в черную субстанцию мозга приводило к резкому уменьшению времени пребывания животных в открытых рукавах. Введение нейротензина в хвостатые ядра мозга предупреждало развитие последствий болевой стимуляции у этих животных.

Обсуждение

В проведенном исследовании повреждение серотонинергических нейронов с помощью локального введения избирательного нейротоксина 5,7-дигидрокситриптамина в дорзальное ядро шва усиливало воспроизведение пассивных оборонительных реакций и вызывало негативное эмоциональное состояние животных. Биохимическое исследование показало [4], что действие токсина сопровождается снижением концентрации серотонина и его метаболита, 5-оксиндолюксусной кислоты, в хвостатых ядрах. Введение крысам нейротензина в черную субстанцию с повреждением серотонинергических нейронов вызывало резкое ослабление воспроизведения рефлекса и выраженности негативных эмоциональных реакций. Введение 5,7-дигидроксит-

риптамина в черную субстанцию в меньшей степени ослабляло воспроизведения условного рефлекса. На уровне черной субстанции действие нейротоксина, очевидно, связано с частичным повреждением окончаний серотонинергических нейронов и развитием компенсаторных процессов. Последние сглаживают выраженность признаков дефицита функции серотонинергических структур. Введение этим животным нейротензина в хвостатые ядра мозга ослабляло эффект нейротоксина и приводило к частичному восстановлению воспроизведения рефлекса. Таким образом, в обоих случаях нейротензин противодействовал развитию эффекта нейротоксина.

Поведенческие эффекты нейротензина зависят от места его введения в ЦНС. На уровне стриатума эти эффекты в значительной степени связаны с угнетающим влиянием на дофаминергические структуры [13]. Большая часть нейротензиновых рецепторов расположена на пресинаптических дофаминовых терминалях [22]. Также известно, что нейротензин, введенный в стриатум, поглощается терминалями и ретроградно транспортируется в дофаминергические нейроны черной субстанции [19]. Возможно, такой механизм вовлекается в развитие эффектов нейротензина при его введении в хвостатые ядра мозга оперированных животных.

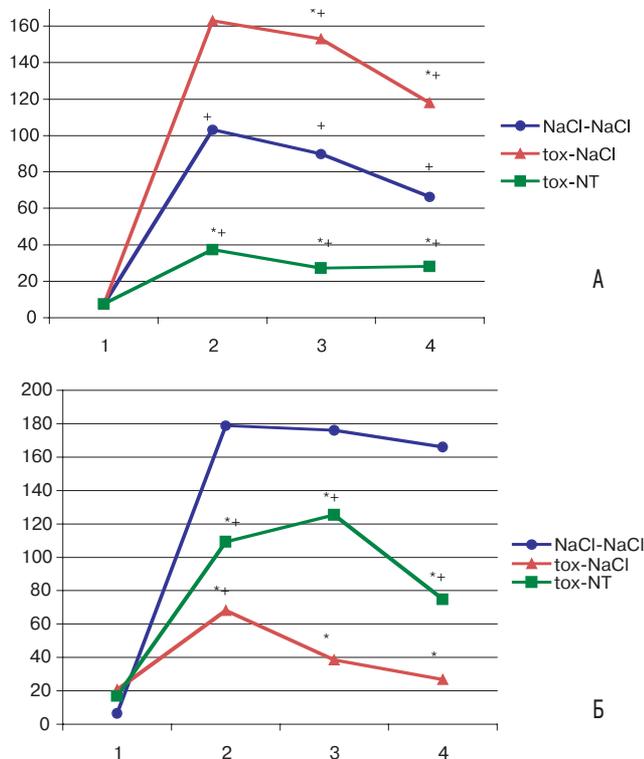


рис. 1: Латентный период реакций пассивного избегания у крыс с нейротоксическим повреждением дорзального ядра шва после микроинъекции нейротензина в черную субстанцию (А) и у крыс с нейротоксическим повреждением черной субстанции после микроинъекции нейротензина в хвостатые ядра (Б)

По оси ординат: время (с); по оси абсцисс: 1 – фон, 2, 3, 4 – сразу, через 24 и 48 часов после болевого воздействия соответственно; + – различия с фоновыми значениями; * – различия между группами (при $p \leq 0,05$). NT – нейротензин, tox – токсин. Здесь и на других рисунках: NaCl-NaCl – крысы без нейротоксического повреждения и микроинъекций нейротензина; NT-NaCl – крысы без нейротоксического повреждения, но после микроинъекции нейротензина; NaCl-tox – крысы с нейротоксическим повреждением, но без микроинъекций нейротензина; NT-tox – крысы с нейротоксическим повреждением после микроинъекций нейротензина.

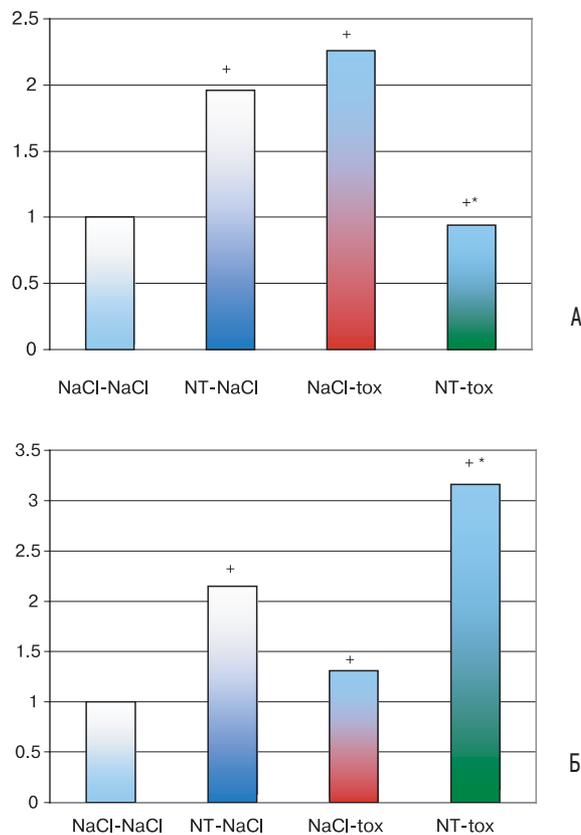


рис. 2: Двигательная активность в «открытом поле» сразу после нанесения болевого воздействия у крыс с нейротоксическим повреждением дорзального ядра шва после микроинъекции нейротензина в черную субстанцию (А) и у крыс с нейротоксическим повреждением черной субстанции после микроинъекции нейротензина в хвостатые ядра (Б)

По оси ординат: число пересеченных квадратов (в относительных единицах – за единицу принята двигательная активность контрольных животных без нейротоксического повреждения и микроинъекций нейротензина); + – различия с фоновыми значениями; * – различия между группами (при $p \leq 0,05$).

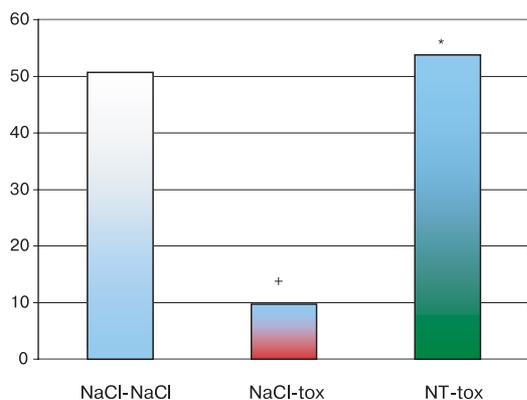


рис.3: Время нахождения в открытых рукавах приподнятого Х-лабиринта крыс с нейротоксическим повреждением черной субстанции, получивших микроинъекции нейротензина в хвостатые ядра сразу после нанесения им болевого воздействия
По оси ординат: время (с).

Действие нейротензина в пределах черной субстанции может быть связано со стимулирующим действием на тела дофаминергических нейронов и блокадой сомато-дендритных ауторецепторов [13, 22]. Блокада дофаминовых D2 ауторецепторов в пределах черной субстанции приводит к увеличению синтеза и высвобождения дофамина из терминалей. Кроме того, введение нейротензина в вентральную область покрышки и черную субстанцию мозга усиливает подкрепляющие свойства психостимуляторов [7, 21]. Исходя из указанного выше, можно предположить, что участие нейротензина в механизмах подкрепления способствует ослаблению негативного эмоционального состояния крыс в условиях оборонительного поведения.

Вместе с тем в черной субстанции эффект нейротензина может быть связан с воздействием не только на дофаминергические, но также на серотонинергические структуры. Существуют данные [1, 3], свидетельствующие о вовлечении дофамина и серотонина в регуляцию двух различных процессов, обеспечивающих воспроизведение условной реакции пассивного избегания. Предполагается, что вовлечение дофамина больше связано с нейронными механизмами информационного процесса, определяющего стратегию поведения, а серотонина – с эмоциогенными механиз-

мами памяти. Хорошо известна роль серотонина в механизмах устойчивости животных к стрессу [2, 15]. В литературе существуют свидетельства того, что поведение животных с долгосрочным дефицитом серотонина может быть более чувствительным к аверсивным ситуациям [14]. Нами показано [6], что введение агониста серотониновых 5-HT_{1A}-рецепторов – вещества 8-ОН-ДРАТ – в черную субстанцию, как и введение нейротензина, вызывало резкое ослабление реакций избегания, тогда как после введения в дорзальное ядро шва действие препаратов было противоположным. Было также показано, что у животных, которым в начале процесса обучения вводили нейротензин в черную субстанцию, наблюдалось повышение концентрации серотонина и его метаболита 5-оксииндолуксусной кислоты в хвостатых ядрах мозга. Исходя из данных литературы [3], указанные различия эффектов нейротензина следует объяснить тем, что в черной субстанции его влияние может быть обусловлено действием на постсинаптические, а в дорзальном ядре шва – на сомато-дендритные серотониновые ауторецепторы. Разнонаправленный характер влияния нейротензина на серотонинергические структуры на разных уровнях мозга обеспечивает поддержание баланса взаимодействия дофамин- и серотонинергических систем мозга в механизмах регуляции адаптивного поведения.

Проведенное исследование показало, что повреждение серотонинергических структур дорзального ядра шва и черной субстанции мозга вызывало разнонаправленные изменения воспроизведения пассивных оборонительных реакций, двигательной активности и поведения крыс в приподнятом Х-образном лабиринте. В условиях последствия болевого стресса микроинъекции нейротензина в черную субстанцию и хвостатые ядра мозга ослабляли эффекты нейротоксина и, таким образом, повышали адаптивный характер оборонительного поведения крыс с дефицитом функции серотонинергических нейронов. Ослабление негативного влияния болевого стресса на поведение животных на фоне действия нейротензина может быть проявлением анксиолитических свойств этого нейропептида и указывать на его протекторное значение в условиях эмоционального стресса.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 06-04-48799).

Список литературы

1. Дубровина Н.И., Попова Е.В., Ильющенок Р.Ю. Компенсаторно-восстановительные эффекты квинпиrolа при угашении условного навыка и амнезии у мышей с альтернативными стереотипами поведения. Эксперим. клин. фармакология 2001; 64: 13–16.
2. Исмаилова Х.Ю., Семенова Т.П., Искандерова М.Д., Фаст А.Е. Особенности влияния тафцина на поведение и на уровень биогенных аминов мозга крыс с различной устойчивостью к акустическому стрессу. Журн. высш. нервн. деят. 1998; 48: 1043–1050.

3. Молодцова Г.Ф. Различная роль дофамина и серотонина в процессе воспроизведения условной реакции пассивного избегания у крыс. Журн. высш. нервн. деят. 2006; 56: 242–246.
4. Ставровская А.В., Шугалев Н.П., Хартманн Г. О функциональном значении влияния нейротензина на серотонинергические структуры мозга. В сб.: Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга. М., 2005: 262–265.
5. Федотова Ю.О., Сапронов Н.С. Поведенческие эффекты L-триптофана и p-хлорфенилаланина после адреналэктомии или введения дексаметазона у крыс. Журн. высш. нервн. деят. 2002; 52: 609–617.

6. Шугалев Н.П., Ставровская А.В., Ольшанский А.С. и др. О серотонинергических механизмах влияния нейротензина на поведения пассивного избегания у крыс. Журн. высш. нервн. деят. 2007; 57: 341–346.
7. Шугалев Н.П., Хартманн Г., Кертеш Е. Последствие микроинъекций нейротензина в черную субстанцию мозга на условные двигательные реакции крыс с повреждением серотонинергических нейронов. Журн. высш. нервн. деят. 2003; 53: 802–807.
8. Argyropoulos S.V., Sandford J.J., Nutt D.J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: pharmacological treatments of anxiety. Pharmacol Ther. 2000; 88: 213–227.
9. Binder E.B., Kinkead B., Owens M.J. et al. Neurotensin and dopamine interactions. Pharmacol. Rev. 2001; 53: 453–456.
10. Corley K.S., Phan T.H., Daugherty W.P. et al. Stress induced activation of median raphe serotonergic neurons in rats is potentiated by neurotensin antagonist, SR48692. Neurosci. Lett. 2002; 319: 1–14.
11. Dilts R.P., Novitzki M.R., Phan T.H. et al. Neurotensin inhibits the activation of midbrain serotonergic neurons produced by random inescapable sound. Brain Res. 1996; 742: 294–298.
12. Fassio A., Evans G., Grisshammer R. et al. Distribution of neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. Neuropharmacology 2000; 39: 1430–1442.
13. Fuxe K., O'Connor W., Antonelli T. Evidence for substrate of neuronal plasticity based on pre- and postsynaptic neurotensin-dopamine receptor interaction in the neostriatum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1992; 89: 5591–5594.
14. Graeff F.G. On serotonin and experimental anxiety. Psychopharmacology 2002; 163: 467–476.
15. Grahm R., Will M., Hammack S. Activation of serotonin immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. Brain Res. 1999; 826: 35–43.
16. Jennes L., Stumpf W.E., Kalivas P.W. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. J. Comp. Neurol. 1982; 210: 211–224.
17. Jolash T., Aghajanian G.K. Neurotensin and the serotonergic system. Progr. Neurobiol. 1997; 52: 455–458.
18. Jolicoeur F.B., Gagne M.A., Rivest R. et al. Atypical effect-like behavioral of neurotensin. Brain Res. Bul. 1993; 32: 487–491.
19. Landuron P.M. Functional consequences of retrograde axonal transport of receptor-bound neurotensin. Trends Pharmacol. Sci. 1995; 16: 338–343.
20. Levant B., Nemeroff C.B. Further studies on the modulation of regional brain neurotensin concentration by antipsychotic drugs: focus on haloperidol and BMY 14802. J. Pharmacol. Exp. Therap. 1992; 262: 348–355.
21. Rompre P.P. Psychostimulant-like effect of central microinjection of neurotensin on brain stimulation reward. Peptides 1995; 16: 1417–1420.
22. Shi W.X., Bunney B.S. Effects of neurotensin on midbrain dopamine neurones: are they mediated by formation of neurotensin-dopamine complex. Synapse 1991; 9: 157–164.
23. Wang Q.P., Guan J.L., Nakai Y. Synaptic relations of neurotensinergic neurons in dorsal raphe nucleus. Peptides 1995; 16: 1421–1427.
24. Werkman T.R., Kruse C.G., Nievelstein H. et al. Neurotensin attenuates the quinpirol-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area. Neuroscience 2000; 95: 417–423.

Peculiarities of painful stress after neurotensin administrations in rats with toxic damage of serotonergic brain structures

N.P. Shugalev, A.V. Stavrovskaja, A.S. Olshanskij, N.G. Yamshikova, E.V. Kalinovich

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Key words: neurotensin, neurotoxin, dopamine, serotonin, substantia nigra, passive avoidance conditioning, behavior.

The purpose of this study was to elucidate the influence of neurotensin on realization of locomotor reactions of passive avoidance and painful stress after-actions in rats with lesion of serotonergic brain structures. It was shown that administration of selective neurotoxin, 5,7-dihydroxytryptamine, into raphe dorsalis nucleus enhanced, while administration into substantia nigra, on the contrary, weakened reproduction of passive defence reactions at rats. In painful stress after-action the neurotoxin administration into the specified brain formations

caused different-directed changes of locomotor activity of rats and its behaviour in the elevated X-maze. Neurotensin microinjections into substantia nigra and nuclei caudatus weakened neurotensin effects and, thus, increased adaptive character of defensive behaviour in rats with deficit of serotonergic neuron function. Alleviation, by neurotensin, of negative influence of painful stress on animal behaviour can be manifestation of anxiolytic properties of this neuropeptide and specify its protective role in emotional stress.