

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

СПОСОБНОСТЬ ЦИНКА ВОССТАНАВЛИВАТЬ УСЛОВНЫЙ РЕФЛЕКС ИЗБЕГАНИЯ, НАРУШЕННЫЙ У КРЫС ВНУТРИСТРИАРНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ПИКРОТОКСИНА

*А.Ф. Якимовский **

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова;
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ. В хронических экспериментах на крысах изучено влияние длительной питьевой нагрузки ацетатом цинком на эффекты введения в неостриатум крыс антагониста ГАМК-А рецепторов пикротоксина (2 мкг). Нагрузка цинком существенно не влияла на параметры пикротоксин-индуцированного хорео-миоклонического гиперкинеза (аналога гиперкинеза при хорее Гентингтона у человека), но способствовала восстановлению у крыс нарушенного условно-рефлекторного избегательного поведения. Эффективность зависела от величины нагрузки цинком: у животных, потреблявших цинка больше, восстановление когнитивных функций происходило быстрее.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цинк, пикротоксин, неостриатум, избегательное поведение, гиперкинез.

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая значимость эссенциального микроэлемента – цинка исследована достаточно хорошо. Показана роль цинка как социо-экологического фактора (Marcellini et al., 2006; Скальная, 2013). В последнее время к общепризнанной функции цинка как структурно-функционального участника ферментативных превращений и активной части металлопротеинов добавилась его нейробиологическая роль. Установлено (Fredrickson et al., 2000), что ионизированный цинк выделяется как ко-медиатор в синапсах центральной нервной системы (ЦНС) (главным образом – возбуждающих глутаматергических синапсах) и активно влияет на состояние нервных клеток (Smart et al., 2004; Mott, Dingleline, 2011), регулируя их возбудимость и функциональную активность. В научную лексику даже введен термин «глутинкергический» нейрон (Bitanirve, Cunningham, 2009), отражающий единство металла и медиаторной системы мозга.

Модель дисфункции подкорковых систем мозга, вызываемая многократным введением в ростальный неостриатум блокатора ГАМК-А рецепторов пикротоксина (Якимовский, 1993; 1998), воспроизводит финальные стадии хорей Гентингтона у человека, при которых драматически нарушается баланс тормозно-возбудительных процессов. Так как при указанной патологии доказано нарушение кальциевого гомеостаза, одним из путей её коррекции может быть применение

антагонистов кальциевых каналов (как лиганд-, так и потенциал-зависимых). В наших исследованиях на крысах, на модели нарушенного двигательного поведения в виде пикротоксинового гиперкинеза, была продемонстрирована эффективность хлорида цинка, введенного в неостриатум вместе с пикротоксином (Якимовский, Степанов, 2010), причем его антигиперкиногенное действие зависело от дозы микроэлемента.

В данной работе исследуется влияние пероральной питьевой нагрузки цинком на нарушения у крыс условно-рефлекторного избегательного, свободного двигательного поведения и на экстрапиримидный гиперкинез, вызываемые многократным введением в неостриатум пикротоксина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с животными базировалась на принципах Хельсинской Декларации в редакции 2002 г. и в соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова», 2002 г.

В эксперименте использованы 34 белые крысы-самцы линии Вистар массой 250 г с выработанным условным рефлексом активного избегания в челночной камере (размером 650×550×300 мм), разделенной на освещенную и затемненную половины, через проволочный пол которой подается электрический ток силой 1 мА. Крысы обучались покидать затемненную половину не позднее 10 с момента действия условного раздражителя (тон 7000 Гц). У крыс добивались выработки навыка не

* Адрес для переписки:

Якимовский Андрей Федорович
E-mail: jakim2010@gmail.com

ниже 80% уровня правильных ответов (отношение в процентах правильно выполненных реакций к общему числу предъявляемых условных раздражителей). При последующем ежедневном тестировании за опыт подавали 10 сочетаний условного и безусловного раздражителей с промежутком 30–40 с. В установке «открытое поле» (ящик с квадратным дном, расчерченным на 16 квадратов 165×165 мм) оценивали спонтанную двигательную активность (пересечение границ квадратов пола) и исследовательское поведение (количество поднятий на задние лапы). После трёх дней адаптации к новым условиям и угашения реакции на новизну проводили два контрольных теста, данные которых (в качестве фоновых) использовались для последующей статистической обработки. Время тестирования в «открытом поле» – 3 мин. Каждому из животных под нембуталовым наркозом (40–60 мг/кг) в область роstralного отдела неостриатума по стереотаксическим координатам (роstralнее брегмы на 1,0–1,5 мм, латеральнее средней линии черепа на 2,0–2,5 мм и вентральнее его поверхности на 6,0–6,5 мм) вживляли гибкие микроинъекторы, заполненные раствором вещества на 15–20 инъекций. Способ введения описан ранее (Якимовский, 1988; 1993; 1998).

Контрольной группе (11 животных) инъекцировали стерильный апиrogenный физиологический раствор (0,9%-ный раствор хлорида натрия) на котором приготавливались все растворы тестируемых препаратов. Объем одной инъекции (во всех опытных группах) составлял 1 мкл. В двух опытных группах исследовалось влияние на поведение крыс 2 мкг блокатора ГАМК-А рецепторов пикротоксина («Serva», Германия). введенного двусторонне в роstralный стриатум: у крыс без питьевой нагрузки цинком (первая опытная группа – 11 животных) и у крыс, которым в потребляемую воду добавлялся ацетат цинка (вторая опытная группа – 12 животных). Ацетат был выбран по органолептическим причинам – он не обладает горьким привкусом. В течение двух недель, предшествующих основному эксперименту, в процессе выработки условного рефлекса вода в поилках постепенно (с повышением концентрации) заменялась на раствор ацетата цинка. Рабочим был 10%-ный раствор. С началом опытов после операции имплантации канюль крысы помещались в индивидуальные клетки, производилась оценка потребления микроэлемента. Питьевое поведение крыс существенно варьировало (от 5–10 мл до 35–40 мл в сутки) – у разных особей и в разные дни. Пищевой рацион был стандартным и включал в себя как сухие (комбикорм), так и сочные (овощи) корма. Пищевые продукты с повышенным содержанием цинка (морепродукты, мясо цыплят, сыр и прочее) были из рациона исключены.

Эксперименты начинали через 2–3 дня после операции. Ежедневно в течение 15 дней производили микроинъекции. Тестирование поведения проводили с промежутком в 1–3 дня. Опыты на-

чинали через 15 мин после очередной инъекции: вначале животных помещали в «открытое поле», а затем проводили тестирование в «челночной камере», по итогам которого оценивали успешность реализации рефлекса (отношение своевременных переходов на светлую половину камеры к общему числу подаваемых условных раздражителей в процентах) и его латентный период (время в секундах от момента подачи условного раздражителя до исполнения навыка). После прекращения микроинъекций эксперименты продолжали еще в течение 11 дней (у второй опытной группы нагрузка цинка продолжалась), исследовалась возможная динамика восстановления нарушенных двигательных функций.

По окончании опытов проводился морфологический контроль локализации канюль. У всех животных кончики канюль располагались в области неостриатума (животные с иной локализацией канюль выбраковывались и полученные на них данные в публикации не представлены). При статистическом анализе рассчитывались средние арифметические значения по группе животных, стандартные ошибки и стандартные отклонения. Показатели в очередной день инъекций сравнивали с показателями той же группы животных до вживления канюль и с показателями в соответствующий день экспериментов у крыс контрольной группы, а также производили сравнение показателей первой и второй опытных групп. Значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента, различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У животных контрольной группы с микроинъекциями физиологического раствора (рисунок, а) в первый день введения наблюдалось снижение реализации условного рефлекса избегания (возрастало число ошибок – крысы не покидали опасную половину челночной камеры за положенные 10 с), но это не привело к изменениям, которые достоверно отличались от данного показателя до начала опытов. Интенсивность спонтанной двигательной активности «в открытом поле» у них не изменялась, двигательных девиаций не было.

Эффекты внутристриарного введения пикротоксина (первая опытная группа) описаны в наших предыдущих публикациях (Якимовский, 1993; 1998). У этих крыс не только в период микроинъекций, но и после их окончания нарушалась реализация избегательного условно-рефлекторного навыка (рисунок, б), спонтанная двигательная активность по тесту в «открытом поле» достоверно увеличивалась. Но главным в эффектах пикротоксина является хореомиоклонический гиперкинез (неконтролируемые стереотипные движения различных частей тела), основные характеристики которого совпадают с таковыми при хоре Гентингтона у человека. Гиперкинез воспроизводился у всех крыс первой опытной группы, ла-

тентный период его возникновения (время от микроинъекции до первых его проявлений) составил в среднем по группе $9,6 \pm 4,2$ мин. Он начинался с мелких подергиваний головы или лапы, их частота и амплитуда увеличивалась, движения становились целостными, и у части животных они охватывали всё тело. Такая генерализация гиперкинеза воспроизводится у половины животных. Средняя продолжительность гиперкинеза в первый день эксперимента составляла $88,4 \pm 27,7$ мин.

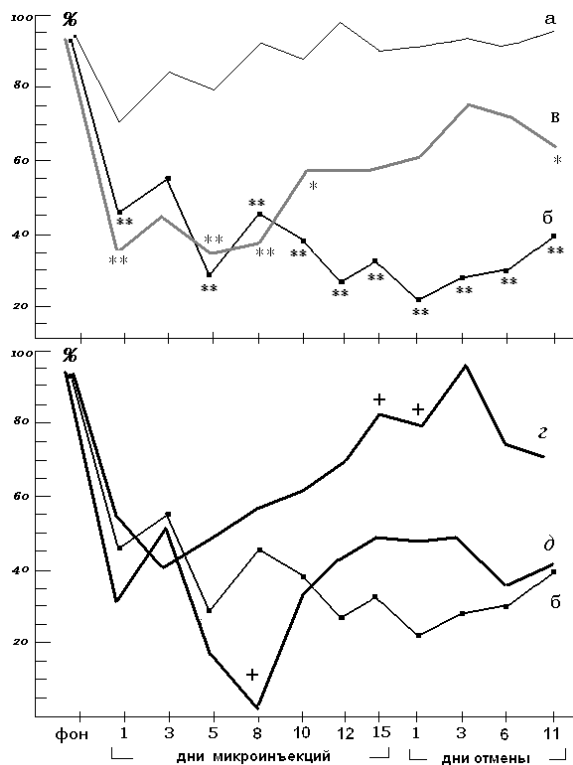


Рисунок. Динамика показателя точности реализации условного рефлекса активного избегания у крыс в челночной камере на фоне хронического введения в ростральный неостриатум 1 мкл физиологического раствора (а), 2 мкг пикротоксина без (б) и с потреблением (в) крысами ацетата цинка с водой; у крыс с относительно высоким (г) и низким (д) потреблением ацетата цинка с водой.

По оси абсцисс – дни опытов (фон, период введения препарата и период после его отмены); по оси ординат – число выполненных условно-рефлекторных актов к общему числу предъявленных за опыт условных раздражителей (в процентах). Случаи достоверных отличий показателя (сравнение двух рядов по Стьюденту) по сравнению с группой с введением физиологического раствора: * – $p = 0,05$, ** – $p = 0,01$; ± – $p = 0,05$ (по сравнению с группой с пикротоксином без потребления цинка)

Питьевая нагрузка цинком у крыс второй экспериментальной группы не предотвращала нарушение реализации условно-рефлекторного навыка, вызываемое пикротоксином. Но в конце цикла микроинъекций (а тем более после их прекращения) навык у этих крыс восстанавливался (рисунок, в). Снижалась и гиперактивность в тесте «открытое поле». Вместе с тем в среднем по группам животных, потреблявших цинк, и у крыс без такой нагрузки статистический анализ не выявил достоверных отличий в параметрах рефлекса. Одна из причин – выраженная вариабельность у особей, как самих параметров поведения, так и количества потреблённого цинка, зависящего от объема выпитой за сутки воды.

Для выявления возможной зависимости эффекта от степени нагрузки цинком (суточной дозы ацетата цинка) среди 12 животных второй опытной группы были выделены подгруппы, различающиеся по стабильности питьевого поведения и, следовательно, – по величине потреблённого ацетата цинка. В первую подгруппу (со стабильным и более высоким потреблением цинка), было отнесено 4 крысы, во вторую (с низким и нерегулярным потреблением цинка) – 5 крыс. За 15 дней микроинъекций в первой подгруппе потребление цинка составило в среднем $38 \pm 3,0$ мг, во второй – $23 \pm 5,0$ мг ($p = 0,01$). Показатель остальных крыс (третья, «средняя группа» – их данные отдельно не анализировались) составил $31,6 \pm 1,5$ мг.

Сравнительный анализ показателей условно-рефлекторной активности животных с высоким и низким потреблением цинка выявил определённые различия в динамике восстановления избегательного поведения. Представленные на рисунке графики (рисунок, г и д), позволяют выделить в этой динамике несколько периодов. В первые дни опытов различий между сравниваемыми подгруппами не было. В последующие дни (второй период, 5–8-е дни микроинъекций) в подгруппе животных, активно потреблявших цинк (рисунок, г), начинается восстановление нарушенной условно-рефлекторной деятельности, в то время как у подгруппы животных с низким потреблением цинка (рисунок, д), наблюдается её понижение вплоть до полной потери условно-рефлекторного навыка (8-й день опытов). В последующий, третий период, охватывающий последние дни микроинъекций пикротоксина и дни после их прекращения, у крыс с высоким потреблением цинка условно-рефлекторный навык восстанавливается, в то время как у второй подгруппы его реализация так и остаётся на низком уровне.

Таким образом, обнаружена зависимость динамики восстановления нарушенного условно-рефлекторного навыка от уровня потребления крысами цинка с водой. В отношении показателей гиперкинеза, вызываемого пикротоксином, влияния цинка оказались более слабыми. Латентный период гиперкинеза в среднем по второй опытной

группе увеличивался ($13,4 \pm 6,1$ мин), но его длительность возросла ($106,6 \pm 47,5$ мин). Длительность стадии генерализации хотя и имела тенденцию к сокращению, но была зарегистрирована у большего числа животных, чем в группе с микроинъекциями одного пикротоксина. Характерного для микроинъекций пикротоксина повышения спонтанной двигательной активности у данных животных не наблюдалось, но статистической достоверности и здесь получено не было. Но главное другое: сравнительный анализ параметров гиперкинеза по подгруппам существенных различий между ними не выявил.

Итак, потребление цинка крысами существенно не повлияло на пикротоксиновый гиперкинез, а в отношении условно-рефлекторной (когнитивной) деятельности влияние микроэлемента зависело от уровня его потребления, а значит (гипотетически) и от его уровня в организме. Корреляция уровня содержания цинка в организме и показателей ментальной, когнитивной сферы человека исследуется достаточно интенсивно. Одним из косвенных доказательств указанной роли цинка являются данные (Brewer et al., 2010) о его существенном понижении в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера, при которой когнитивные нарушения входят в неврологический статус, и при болезни Паркинсона, в варианте её течения, сопровождающимся дементностью. В то же время колориметрическое определение цинка в плазме крови испытуемых с депрессивным статусом (но без органических поражений мозга) не выявило таковой корреляции (Irmish et al., 2010). Авторы исследования считают, что сдвиги в содержании цинка напрямую с нарушениями психики не связаны, носят вторичный характер и отражают процессы, затрагивающие деятельность печени, точнее – нарушения в обмене жирных кислот. Не получено чёткого ответа и в исследованиях корреляции диетологической нагрузки цинком, его содержания в плазме крови и когнитивной дефектностью у лиц старше 69 лет – жителей четырёх стран Европы (Marcellini et al., 2006). Зарегистрировано несоответствие высокой или низкой алиментарной нагрузки цинком (высокой – во Франции и Италии, низкой – в Польше и Греции) с его уровнем в крови испытуемых и «психологической дементностью», характерной для пожилого возраста. Тем не менее авторы этого масштабного исследования (853 пробанда) считают, что тесты на память и депрессию хуже выполнялись именно у лиц с пониженным содержанием цинка в плазме крови. Не внесли ясность и исследования, проведённые в другом регионе (Иран) на лицах молодого возраста (студентки ВУЗа), демонстрирующих положительный тест на депрессивность (Amani et al., 2010). Эти и многие другие исследования (ценность и научность которых не подвергается сомнению) актуализируют вопрос – что следует понимать под высоким и низким потреблением цинка, где допустимые границы его нор-

мы, константы для человека. В этом смысле приходится согласиться с мнением авторов концептуальной статьи о нейробиологической роли цинка, назвавших его «чёрной лошадкой» (Bitanhirve, Cunningham, 2009).

Ранее нами было показано, что гипергиногенное действие пикротоксина снижалось при введении хлорида цинка непосредственно в стриатум только в случае применения самой низкой дозы цинка – 100 нг (Якимовский, Степанов, 2010). Увеличение концентрации цинка не влияло на эффекты пикротоксина, а вызываемая им повышенная спонтанная гиперактивность в «открытом поле» даже усиливалась. Сравнение эффектов внутримозгового и системного введения цинка весьма условно. Сорбция цинка в желудочно-кишечном тракте зависит от целого ряда факторов, которые трудно учесть, тем более при многодневном приёме микроэлемента. Следует помнить и о том, что нагрузка цинком способна вызвать цепочку взаимосвязанных сдвигов, например, в обмене меди – значимого для мозга металла. Очевидно одно: влияние цинка на поведение зависит от дозы и режима его введения.

ВЫВОДЫ

1. Потребление крысами ацетата цинка с водой способствует восстановлению условного рефлекса избегания, нарушенного внутристриарным введением антагониста ГАМК-А рецепторов пикротоксина.
2. У животных с более интенсивным потреблением ацетата цинка его положительное влияние на когнитивные функции было выражено в большей степени.
3. Параметры пикротоксин-индуцированного хорео-миоклонического гиперкинеза под влиянием питьевой нагрузки ацетатом цинка существенно не менялись.

ЛИТЕРАТУРА

- Скальная М.Г. Макро- и микроэлементы в питании жителей Москвы // Микроэлементы в медицине. 2013. Т. 14. № 3. С. 18–24.
- Якимовский А.Ф. Миоклонический гиперкинез, вызываемый повторным введением в неостриатум крыс пикротоксина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. Т. 114. № 1. С. 7–9.
- Якимовский А.Ф. Способ длительного локального воздействия на нейромедиаторные системы ядер головного мозга // Физиологический журнал СССР. 1988. Т. 74. № 3. С. 745–751.
- Якимовский А.Ф. Функциональная специализация медиаторных систем как основа полифункциональности неостриатума // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 9. С. 906–912.
- Якимовский А.Ф., Степанов И.И. Влияние хлорида цинка на пикротоксиновый гиперкинез зависит от его

концентрации в растворе, инъецируемом в неостриатум крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 12. С. 604–606.

Amani R, Saeidi S, Nazari Z, Nematpour S. Correlation between dietary zinc intakes and its serum levels with depression scales in young female student // *Biol Trace Elem Res.* 2010, 137(2):150–158.

Bitanhirwe B.K., Cunningham M.G. Zinc: the brains dark horse // *Synapse.* 2009, 63(11):1029–1049.

Brewer G.J., Kanzer S.H., Zimmerman E.A., Molho E.S., Celmins D.F., Heckman S.M., Dick R. Subclinical zinc deficiency in Alzheimer's disease and Parkinson's disease // *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2010, 25(7):572–575.

Frederickson Ch.J., Suh S.W., Silva D., Frederickson C.J., Thompson R.D. Importance of zinc in the central nervous

system: the zinc-containing neuron // *J Nutr.* 2000, 130(5):1471S–1483S.

Irmish G., Schlaefke D., Richter J. Zinc and fatty acids in depression // *Neurochem Res.* 2010, 35(9):1376–1383.

Marcellini F., Giuli C., Papa R., Gagliardi Dedoussis G., Herbein G., Fulop T., Monti D., Rink L., Jajte J., Mocchegiani E. Zinc status, psychological and nutritional assessment in old people recruited in five European countries: zincage study // *Biogerontology.* 2006, 7:339–345.

Mott D.D., Dingleline R. Unraveling the role of zinc in memory // *PNAS.* 2011, 108(8):3103–3104.

Smart T.G., Hosie A.M., Miller P.S. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity // *Neuroscientist.* 2004, 10(5):432–442.

THE ABILITY OF ZINC TO RECOVER CONDITIONED AVOIDANCE REFLEX, DISTURBED BY INTRASTRIATAL INJECTION OF PICROTOXIN IN RATS

A.F. Yakimovskii

I.P. Pavlov First Saint Petersburg Medical University, L'va Tolstogo str. 6/8, St.-Petersburg 197022, Russia;
Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, St.-Petersburg, Russia

ABSTRACT. Chronic experiments were performed on rats to study the influence of prolonged treatment by acetic zinc drink on effects of intrastriatal microinjections of picrotoxin (2 mcg), which is an antagonist of GABA-A receptors (the main inhibitory transmitter system). The agent was injected in a volume of 1 ml daily; control animals received physiological saline. The performance of spontaneous (including pathological) and conditioned reflex motor behavior (active avoidance reflex in a shuttle box in rats were registered. Picrotoxin produced smaller negative effects on performance of the reflex, though rats showed clear imperative movements in the form of choreomyoclonic hyperkinesia. Zinc treatment did not influence the picrotoxin-induced choreo-mioclonic hyperkinesia (human Huntington disease hyperkinesia analog) significantly, but did improved conditioned avoidance behavior in rats. The efficacy was depending on zinc treatment intensity: animals with more zinc consumption (38 ± 3.0 mg per 15 days) demonstrated faster recovery of the cognitive functions, than rats with less zinc consumption (23 ± 5.0 mg per 15 days, $p = 0.01$). The significance of the zinc as an important neurobiological factor for cognitive and motor activity of the basal ganglia is discussed.

KEYWORDS: zinc, picrotoxin, neostriatum, avoidance behavior, hyperkinesia.

REFERENCES

- Skalnaya M.G.* // *Trace Elements in Medicine (Moscow).* 2013, 14(3):18–24 (in Russ.).
- Yakimovskii A.F.* // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 1993, 114(1):7–9 (in Russ.).
- Yakimovskii A.F.* // *Fiziologicheskii zhurnal SSSR.* 1988, 74(3):745–751 (in Russ.).
- Yakimovskii A.F.* // *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova.* 1998, 84(9):906–912 (in Russ.).
- Yakimovskii A.F., Stepanov I.I.* // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2010, 150(12):604–606 (in Russ.).
- Amani R, Saeidi S, Nazari Z, Nematpour S.* // *Biol Trace Elem Res.* 2010, 137(2):150–158.
- Bitanhirwe B.K., Cunningham M.G.* // *Synapse.* 2009, 63(11):1029–1049.
- Brewer G.J., Kanzer S.H., Zimmerman E.A., Molho E.S., Celmins D.F., Heckman S.M., Dick R.* // *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2010, 25(7):572–575.
- Frederickson Ch.J., Suh S.W., Silva D., Frederickson C.J., Thompson R.D.* // *J Nutr.* 2000, 130(5):1471S–1483S.

Irmish G., Schlaefke D., Richter J. // Neurochem Res. 2010, 35(9):1376–1383.

Marcellini F, Giuli C., Papa R., Gagliardi Dedoussis G., Herbein G., Fulop T., Monti D., Rink L., Jajte J., Mocchegiani E. // Biogerontology. 2006, 7:339–345.

Mott D.D., Dingledine R. // PNAS. 2011, 108(8):3103–3104.

Smart T.G., Hosie A.M., Miller P.S. // Neuroscientist. 2004, 10(5):432–442.