

На правах рукописи

Сидорова Юлия Владимировна

ИССЛЕДОВАНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ НАРУШЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ
ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАТОЛОГИИ И РАЗРАБОТКА
ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Волгоград, 2018

Работа выполнена на кафедре фармакологии и клинической фармакологии имени профессора И. В. Комиссарова ГОО ВПО Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г.Донецк

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор **Абрамец Игорь Игоревич**, ГОО ВПО Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова.

Официальные оппоненты:

Воронина Татьяна Александровна, заслуженный деятель науки, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

Покровский Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России.

Ведущее учреждение: ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится: «_____» _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Волгоград, пл. Павших бойцов, д.1
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автореферат разослан «_____» _____ 2018г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаёва

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Буквально до середины 90-х годов прошедшего столетия считали, что только некоторые болезни (гипертоническая болезнь, язвенная болезнь, бронхиальная астма и некоторые другие) сопровождаются психо-эмоциональными расстройствами. В настоящее время весь спектр заболеваний считают «психосоматическими» [Коркина М.В., 2009; Burstein B et al., 2006; Öztürk, A., 2016]. У 30% больных пациентов, обращающихся к врачу общей практики, отмечаются симптомы депрессии; примерно 20% госпитализированных больных можно поставить диагноз ипохондрического невроза [Olver J. S., Norwood M. J., 2012; Olver, J. S., 2013].

Природа психо-эмоциональных нарушений при соматических заболеваниях неоднородна. В первом приближении можно выделить, по крайней мере, две их причины. Во-первых, это нарушения, связанные с патогенетическими механизмами заболевания. При сахарном диабете и гиперкортизолемии выявлены дефекты возбуждающей глутаматергической синаптической передачи в мозге [Sapolski R., 2009; Nicolaidis, N. C., 2015]. При воспалительных заболеваниях нарушается обмен моноаминов в мозге [Mulder T., Schwartz E., 2007; Shapiro, P. A., 2005]. Нарушение баланса оварийных гормонов вызывает повреждение основного тормозного механизма головного мозга – ГАМК-ергического торможения [Maguire S., Mody I., 2008; Richardson-Jones, 2011]. Во-вторых, любое заболевание является стрессогенным фактором. Вызываемое стрессом возмущение в системе гомеостаза организма запускает механизмы активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), являющейся одним из важнейших звеньев стабилизации последнего [De Kloet E., 2005; Price J. L., Drevets W. C., 2010; Абрамец И.И., 2014]. Происходящее при этом усиление секреции и рост уровней глюкокортикоидов в крови и мозге способствует активации глюкокортикоидных рецепторов [Хлебникова, Н.Н., 2013; Muller N., 2007]. Последние наиболее плотно локализованы в нейронах лимбических структур мозга - префронтальной коре, миндалевидном комплексе, стриатуме, гиппокампе. Воздействие гормонов стресса на лимбические структуры кардинальным образом меняет их функциональную активность и это обуславливает нарушения эмоциональных и когнитивных процессов [Pittenger C., Duman R., 2010; Duivis, H. E., 2013].

То обстоятельство, что нарушения когнитивных и эмоциональных процессов при соматических заболеваниях имеет двойственную – специфическую и стрессогенную природу, затрудняет их лечение. Основная группа лекарств, используемых для лечения соматических заболеваний, средства патогенетической терапии. Если их использовать в самом начале заболевания, они могут предотвратить развитие эмоциональных и когнитивных расстройств. Если же заболевание длится порядка 2-4 недель, то в мозге возникают морфо-функциональные изменения, своеобразная «память болезни», которая слабо подвергается затуханию и на которую средства патогенетической терапии не оказывают существенного влияния [Artola A., 2008]. Эти факты и определяют цель исследования - изучить изменения релейных и пластических свойств синапсов проекционных нейронов медиальной префронтальной коры при моделировании патологии, исследовать влияния на эти изменения и нарушения поведения лекарственных веществ, воздействующих на патогенез, и психофармакологических средств.

Степень разработанности проблемы

Нейрохимические и нейрофизиологические особенности формирования когнитивных, эмоциональных и мотивационных нарушений при различных соматических заболеваниях интенсивно начали разрабатываться в конце 90-х – первом пятилетии 2000-х

годов. Наиболее полно эта проблема разработана для хронической, в первую очередь, нейропатической боли [Frank, M. G., 2015; Stahl, S., 2004]. Это позволило разработать относительно эффективные способы предупреждения и лечения хронической боли. Другие соматические заболевания – сахарный диабет, хроническое асептическое воспаление – характеризуются многофакторным влиянием на лимбические структуры головного мозга, причем отдельные аспекты этих воздействий изучены достаточно полно, а другие исследованы недостаточно [Shapiro, P. A., 2005; Trudeau, F., 2004; Zakrutnyi, R. D., 2014]. При моделировании указанных видов патологии на животных доминируют исследования на уровне поведения и лишь в отдельных работах исследовали изменения на нейрональном или синаптическом уровнях [Минохин, К. В., 2012; Можейко, Л.А., 2013]. Практически отсутствуют экспериментальные исследования, в которых на одних и тех же животных сопоставлялись вызываемые патологией изменения, как на уровне поведения, так и на нейрональном и синаптическом уровнях [Абрамец И. И., 2014; Литвиненко И.В., 2013], что затрудняет разработку медикаментозной их коррекции.

Цели исследования

Изучить влияние психотропных лекарственных средств на процессы синаптической передачи в коре при экспериментальных патологиях.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние используемых психотропных средств на изменения фоновой межнейронной синаптической передачи в префронтальной коре при моделировании соматической патологии.
2. Изучить влияния применяемых лекарственных средств на нарушения развития длительных потенциации и депрессии синаптической передачи в префронтальной коре на фоне исследуемой патологии.
3. Выяснить влияние используемых лекарственных веществ на нарушения поведения – рост депрессивности и тревоги, замедление воспроизведения навыка обучения – при моделируемой патологии.
4. С помощью корреляционного анализа влияний исследуемых лекарственных веществ на синаптические процессы в коре и поведенческие реакции оценить роль синаптических процессов в нарушениях поведенческих реакций при моделировании патологии.
5. Проанализировать способность выбранных лекарственных средств ослаблять нарушения синаптических процессов и поведенческих реакций при моделировании патологии, как потенциальную возможность их клинического использования.

Научная новизна исследования

Показано, что нарушения пластических свойств глутаматергических синапсов проекционных нейронов медиальной префронтальной коры определяют возрастание уровня депрессивности, наблюдаемое при моделировании на крысах сахарного диабета, хронического воспаления и длительного воздействия дексаметазона. Эти синаптические механизмы не играют существенной роли при повышении уровня тревожности в условиях моделирования хронического воспаления, хотя при моделировании сахарного диабета и хроническом воздействии дексаметазона они участвуют в формировании данной поведенческой реакции. Установлено также, что нарушения синаптической пластичности определяют ухудшение воспроизведения навыков обучения.

Показано, что в условиях моделирования сахарного диабета, хронического воспаления и воздействия дексаметазона нарушения поведения качественно одинаковы и различаются лишь количественно. Однако нейронные механизмы, приводящие к их

развитию, не тождественны, что затрудняет фармакологическую коррекцию нарушений поведения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенных исследований позволят оценить нейрохимические и нейрофизиологические механизмы центральных структур лимбической системы – медиальной префронтальной коры и гиппокампа – участвующих в формировании когнитивных и эмоциональных процессов и их нарушения, приводящие к психическим расстройствам при моделировании соматических заболеваний. С другой стороны, в исследованиях выяснены сильные и слабые стороны традиционных психофармакологических средств, используемых для медикаментозной коррекции экспериментальной патологии, как на уровне поведенческих реакций, так и на уровне нейрофизиологических и нейрохимических процессов в ключевых структурах лимбической системы, для подбора оптимальных направлений психофармакологической коррекции.

Результаты проведенного исследования включены в материалы лекций и практических занятий для студентов на кафедрах фармакологии и клинической фармакологии, патологической физиологии, семейной медицины Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького. Методические подходы к коррекции когнитивных и эмоциональных нарушений при соматических заболеваниях и побочном действии лекарственных веществ используются в научно-исследовательской работе кафедр фармакологии и клинической фармакологии, семейной медицины ГОУ ВПО Донецкого национального университета им. М. Горького.

Методология и методы исследования

В проведенном исследовании использовался комплексный подход по изучению патогенеза эмоциональных и мнестических нарушений при моделировании сахарного диабета, асептического воспаления, побочного действия при хроническом введении дексаметазона, как на уровне поведенческих реакций, так и на уровне клеточных и синаптических процессов.

Дизайн исследования соответствовал международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).

Положения выносимые на защиту

1. Используемые в исследовании психотропные лекарственные средства оказывали разнонаправленное действие на нарушения фоновой синаптической передачи в медиальной префронтальной коре при моделировании у крыс сахарного диабета, хронического воспаления и побочного действия дексаметазона.
2. Средства патогенетического действия и диазепам незначительно влияли на нарушения длительных потенциации и депрессии в синапсах коры, а другие исследуемые вещества обращали эти нарушения при моделировании соматической патологии.
3. Выявлен определенный параллелизм во влиянии исследуемых лекарственных веществ на нарушения синаптической пластичности нейронов коры и на рост уровней депрессивности, тревожности и замедление воспроизведения навыков обучения при моделировании соматической патологии.
4. Если психотропное средство восстанавливает нарушенную синаптическую длительную потенциацию в коре при моделировании патологии, то оно понижает

уровень депрессивности и ускоряет воспроизведение навыков обучения. Однако этого условия недостаточно для снижения уровня тревоги.

- Используемые лекарственные вещества проявляют частичную корригирующую активность в отношении нарушений поведения. Только верапамил умеренно ослабляет все наблюдаемые нарушения поведения.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по изучаемой проблеме, выполнена экспериментальная часть работы, проведены статистическая обработка и описание результатов исследования, которые отражены в научных публикациях.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, применением специализированного и высокотехнологичного оборудования, общепринятых методов и критериев статистической обработки данных. Материалы работы докладывались и обсуждались на V съезде фармакологов Украины (Киев, 2011), на конференции молодых фармакологов Украины (Киев, 2012)

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 5 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 171 источников, из них 44 отечественных и 127 зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 24 рисунками и 11 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава посвящена литературному обзору причин патогенетических механизмов развития депрессивного синдрома при различных соматических заболеваниях.

Во **второй главе** рассматриваются материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 324 нелинейных крысах. Животные были получены из питомника Киевского Института Физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины. Все животные содержались в соответствии с рекомендациями ВОЗ по экспериментальной работе с использованием лабораторных животных. Проведение экспериментов осуществлялось в соответствии с требованиями Российского национального комитета по биоэтике при Российской академии наук и международным рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Исследование было одобрено региональным комитетом по биоэтике ГОО ВПО Донецкого национального университета им. М. Горького (протокол № 118/16 от 30 октября 2009г).

Поведенческие исследования

Для оценки когнитивных, эмоциональных и мотивационных составляющих целостных поведенческих актов исследовали поведение животных в условиях вынужденного плавания, в аппарате приподнятый крестообразный лабиринт, целенаправленного избегания аверсивного воздействия.

Электрофизиологические исследования

Для регистрации электрической активности нейронов переднего мозга, вовлеченных в реализацию когнитивных, эмоциональных и мотивационных процессов, исследования проводили в переживающих срезах дорсального гиппокампа (ДГ) и медиальной префронтальной коры (мПФК). Регистрация электрической активности осуществлялась с помощью стандартной установки для электрофизиологических исследований [Митюшев, М. И., 1986].

Приготовление срезов: крыс наркотизировали кетаминем внутривенно в дозе 50 мг/кг и подвергали декапитации. После этого вскрывали череп и из него извлекали головной мозг, который тот час охлаждали раствором для препарирования. Срезы мПФК выделяли из переднего полюса, а ДГ – из заднего. Соответствующие блоки мозга фиксировали с помощью цианакрилового клея и агарового блока на площадке вибратора (Campden Instruments). Последняя находилась в ванночке, заполненной охлажденным и насыщенным карбогеном (смесь 95 % O₂ и 5 % CO₂) раствором для препарирования. С помощью вибратора готовили продольные срезы мозга, содержащие прелимбическую и инфраламбическую области мПФК, либо ДГ толщиной 400 – 450 мкм. Далее из срезов выделяли необходимую для исследований область, которую переносили в инкубационную камеру объемом 3 мл. Через 60 – 90 мин пребывания в инкубационной камере срезы мозга переносили для электрофизиологических исследований в рабочую камеру объемом 0,5 мл и фиксировали на дне камеры стимулирующим электродом

Регистрация электрической активности нейронов: с помощью стеклянных микроэлектродов, регистрировали популяционные возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) пирамидных нейронов области CA1 ДГ и V слоя мПФК. Локализация раздражающих электродов и отводящих микроэлектродов в каждой конкретной ситуации имела свои особенности.

Работая со срезами ДГ, биполярный никромовый стимулирующий электрод располагали в радиальном слое – в области проекций коллатералей Шаффера. Микроэлектрод также располагали в радиальном слое ближе к зубчатой извилине. Коллатерали Шаффера стимулировали прямоугольными импульсами тока возрастающей интенсивности длительностью 0,1 мс частотой 0,1 Гц для получения кривой зависимости амплитуды постсинаптических ответов от интенсивности пресинаптической стимуляции.

В срезах мПФК стимулирующий электрод располагали во II/III слоях прелимбической области, а регистрирующий микроэлектрод локализовали в V слое коры ближе ко II/III слоям, регистрировали пВПСП, амплитуда которых почти линейно возрастала при увеличении интенсивности пресинаптической стимуляции.

НМДА-компонент пВПСП пирамидных нейронов выделяли фармакологически. Для этого срезы мозга суперфузировали раствором Кребса с добавлением 10 мкМ блокатора AMPA-рецепторов – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-диона (DNQX), 100 мкМ неконкурентного блокатора ГАМК_A-рецепторов пикротоксина и 1 мкМ ко-агониста НМДА-рецепторов глицина. AMPA-компонент пВПСП пирамидных нейронов выделяли путем суперфузии срезов мозга раствором Кребса, содержащим конкурентный блокатор глутаматных НМДА-рецепторов D-2-амино-5-фосфоновалериановую кислоту (D-AP5) в концентрации 50 мкМ.

Помимо этого, исследовали две формы пластичности глутаматергических синапсов пирамидных нейронов V слоя мПФК – длительную потенциацию и длительную депрессию, вызываемые тетанической стимуляцией различной интенсивности и продолжительности. После нанесения тетанической стимуляции амплитуду пВПСП пирамидных нейронов регистрировали в течение 30 мин.

Для выяснения природы (пре- или постсинаптическая) наблюдаемых изменений амплитуд пВПСП пирамидных нейронов использовали параметр отношение парного облегчения.

Каждая серия электрофизиологических опытов на срезах мозга выполнена на 6 – 9 срезах мозга, взятых от 3 – 4 животных.

Моделирование соматической патологии и побочного действия глюкокортикоидов

Моделирование сахарного диабета: экспериментальный сахарный диабет вызывали путем одноразового внутрибрюшинного введения крысам аллоксана в дозе 125 мг/кг [Можейко, Л. А., 2013]. Исследования начинали через две недели после введения аллоксана, когда уровень гипергликемии становился стабильным.

Моделирование хронического воспаления: хроническое асептическое воспаление у крыс вызывали по методу, предложенному [Тринус Ф.П., 1975]. Животным под кожу спины вводили 0,5 мл 9 % уксусной кислоты. Об интенсивности воспалительного процесса судили по увеличению лейкоцитов в крови (до $12,65 \pm 1,14$, в сравнении с контролем $4,77 \pm 0,52$ Г/л), размеру воспалительного инфильтрата (до 3-х см в диаметре) и повышению в крови уровня С-реактивного белка(++,+++ методом иммунодиффузии). К проведению поведенческих и электрофизиологических исследований приступали на пятые - седьмые сутки после введения крысам флогогенов.

Моделирование побочного действия глюкокортикоидов: дексаметазон растворяли в питьевой воде в такой концентрации, чтобы с потребляемой водой крысы получали стероид в дозе 0,5 мг/кг за сутки. Точность дозирования дексаметазона в отдельных сериях исследований колебалась в границах $\sim \pm 10$ %. Животные получали смешанный корм и потребность в воде составляла $21,4 \pm 0,6$ мл/сутки [Власов, А. А., 2010].

Используемые фармакологические вещества

Для моделирования соматической патологии и выяснения нейрофизиологической и нейрохимической природы наблюдаемых поведенческих и нейрональных эффектов использовали следующие вещества: аллоксан (Sigma, США) однократно в дозе 125 мг/кг; декстран в виде препарата Полиглюкин (Красфарма, РФ) внутрь в дозе 200 мг/кг; ингибитор обратного захвата норадреналина и серотонина имипрамин (EGYS, Венгрия) внутрибрюшинно, селективный ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин (Биолек, Украина) внутрь со слизью крахмала, оба препарата в максимальных дозах 20 мг/кг один раз в день на протяжении 14 дней; конкурентный блокатор глутаматных НМДА-рецепторов D-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота (D-AP5; RBI, США) в концентрации 50 мкМ, конкурентный блокатор глутаматных АМРА-рецепторов – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион (RBI, США) в концентрации 10 мкМ, неконкурентный блокатор ГАМК_A-рецепторов пикротоксин (Merk, ФРГ) в концентрации 100 мкМ, ко-агонист НМДА-рецепторов глицин (Олайнфарма, Литва) в концентрации 1 мкМ, все 4 вещества воздействовали на срезы в течение 20 мин; неконкурентный блокатор глутаматных НМДА-рецепторов кетамин (Биолек, Украина) вводили внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг 1 раз в день на протяжении 5 дней, блокатор потенциал-зависимых Ca²⁺ каналов L-типа верапамил (Orion Pharma Int., Финляндия) вводили внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг за 1 час до исследований, позитивный аллостерический модулятор ГАМК_A-рецепторов диазепам (Gideon Richter, Венгрия) вводили внутрибрюшинно в дозе 2 мг/кг за 1 час до исследований; селективный блокатор ЦОГ-2 нимесулид (Medicom, Болгария) и неселективный блокатор ЦОГ-1 и ЦОГ-3 парацетамол (ICN Polipharm, Польша) вводили внутрибрюшинно в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно 1 раз в день в течение 7 дней.

Статистическая обработка результатов

Результаты исследований обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с помощью лицензионной программы «Medstat» [Ю. Е. Лях, 2006]. Для каждой

серии определяли среднюю и стандартную ошибку средней. Результаты анализировали используя метод ANOVA. Для сравнения различий между двумя группами использовали t тест Стьюдента. Величина $P < 0,05$ расценивалась как статистически значимая. Для оценки вероятных связей между изменениями поведения животных и синаптическими процессами использовали коэффициенты корреляций рангов по Спирмену.

В третьей главе представлены результаты собственных исследований нарушения синаптических процессов в коре и гиппокампе и поведения крыс при моделировании сахарного диабета; поиск путей лекарственной коррекции этих нарушений.

3.1. Нарушения релейных свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов гиппокампа и медиальной префронтальной коры при моделировании сахарного диабета: развитие экспериментального сахарного диабета (ЭСД) сопровождалось изменениями поведения животных. В этих условиях выявлено увеличение времени иммобилизации животных в тесте вынужденного плавания до $247,3 \pm 16,7$ с против $166,4 \pm 6,3$ с в контроле ($P < 0,05$), что свидетельствует о возрастании уровня депрессивности. Параллельно наблюдали уменьшение времени пребывания крыс в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта от $102,6 \pm 8,4$ с в контроле до $44,7 \pm 6,2$ с ($P < 0,05$), т. е. –повышение уровня тревожности. Выявленное увеличение латентного периода условнорефлекторной реакции активного избегания (УРАИ) до $4,85 \pm 0,4$ с против $1,75 \pm 0,3$ с ($P < 0,05$) свидетельствует о нарушении процессов воспроизведения навыков обучения.

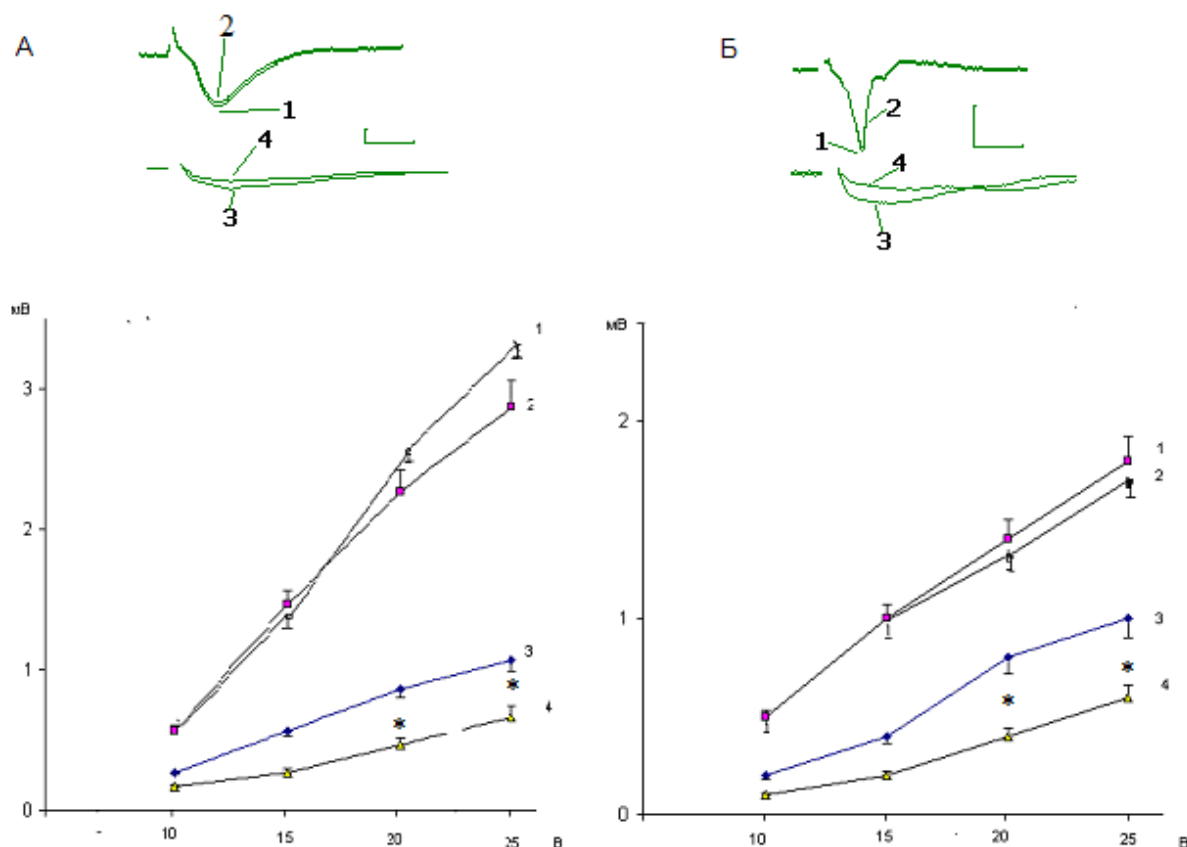


Рис. 1. Изменения глутаматергической синаптической передачи в пирамидных нейронах области CA1 гиппокампа (А) и V слоя медиальной префронтальной коры (Б) при ЭСД.

Сверху осциллограммы максимальных постсинаптических ответов. Калибровка: 1 мВ, 10 мс.

Ниже – кривые зависимости амплитуд популяционных ВПСП пирамидных нейронов (1) и их НМДА-компонентов (3) от интенсивности пресинаптической стимуляции в контроле и на фоне развившегося ЭСД (2) и (4) соответственно.

По вертикальной оси – амплитуда пВПСП пирамидных нейронов в мВ; по горизонтальной оси интенсивность пресинаптической стимуляции в В (сопротивление стимулирующего электрода по постоянному току 200 кОм).

* - величины статистически достоверно отличаются от контроля при $P < 0,05$.

В условиях ЭСД исследовали релейные свойства глутаматергических синапсов нейронов дорсального гиппокампа и медиальной префронтальной коры. Базальный уровень глутаматергической синаптической передачи существенных изменений не претерпевал, амплитуды НМДА-компонентов ВПСП пирамидных нейронов гиппокампа и коры достоверно уменьшались (рис. 1).

В срезах мозга крыс с ЭСД после двухдневного введения препарата инсулина не наблюдалось значительных изменений глутаматергической синаптической передачи (рис. 2).

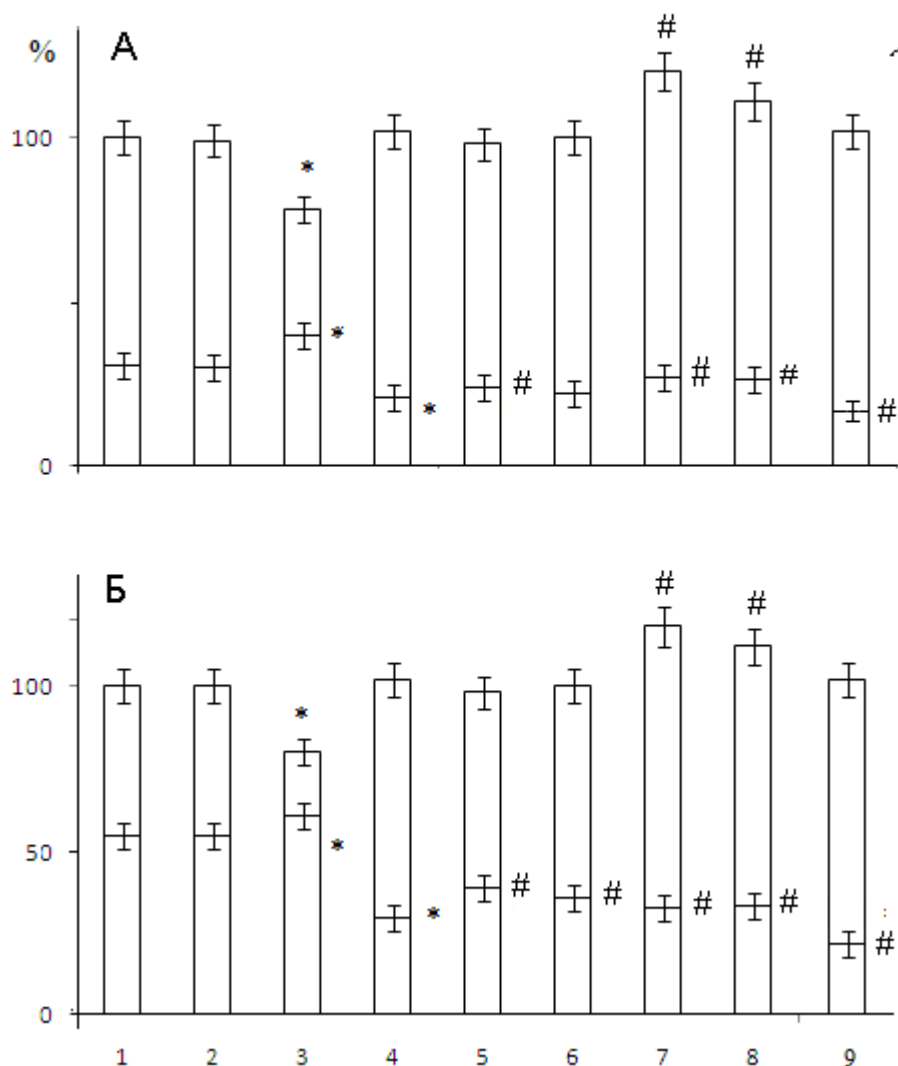


Рис. 2. Изменения амплитуд популяционных ВПСП и их НМДА-компонентов пирамидных нейронов гиппокампа (А) и коры (Б) при разных экспериментальных условиях.

В каждом столбце верхняя и средняя границы отражают максимальные амплитуды ВПСР и их НМДА-компонентов соответственно.

1 - контроль; 2 – воздействие 30 мМ/л глюкозы; 3 – воздействие 0,1 ЕД/мл инсулина; 4 – на 4-й неделе развития ЭСД; 5 – то же после двухдневного введения протафана в дозе 2 ЕД/сутки; 6 – то же после введения 20 мг/кг верапамила; 7 и 8 – то же после двухнедельного введения имипрамина и флуоксетина в дозах 20 мг/кг соответственно; то же после введения 2 мг/кг диазепама – 9.

По вертикальной шкале – изменения амплитуды постсинаптических ответов в %.

* - изменения достоверны относительно интактной группы – столбец 1 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

- изменения достоверны относительно контрольной группы животных с экспериментальным сахарным диабетом – столбец 2 (t- критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$).

В то же время, воздействие на срезы мозга интактных крыс инсулина в концентрации 0,1 ЕД/мл в течение 2-х часов вызывало снижение амплитуд пВПСР пирамидных нейронов гиппокампа и коры, но при этом отмечалось увеличение амплитуд НМДА-компонентов данных потенциалов (рис.2) При воздействии на срезы мозга интактных крыс глюкозы в концентрации 30 мМ в течение 6 ч изменений глутаматергической синаптической передачи и амплитуд НМДА-компонентов пВПСР пирамидных нейронов гиппокампа и коры не наблюдалось (рис. 2).

Хроническое введение антидепрессантов неселективного ингибитора обратного захвата норадреналина и серотонина имипрамина и селективного ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина в течение 2 недель в дозе 20 мг/кг (на протяжении третьей и четвертой недель после введения аллоксана) вызывало незначительное увеличение базальной глутаматергической синаптической передачи (рис. 2). В то же время, НМДА-компоненты пВПСР пирамидных нейронов были меньшими по амплитуде по сравнению с таковыми у контрольных животных (рис. 2). Следовательно, хроническое введение антидепрессантов не устраняло нарушений функциональной активности нейрональных глутаматных НМДА-рецепторов. Воздействие верапамила в концентрации 20 мкМ в течение 1 часа не вызывало существенных изменений амплитуд пВПСР, но незначительно увеличивало амплитуду НМДА-компонентов постсинаптических ответов пирамидных нейронов только в срезах коры (рис. 2). Введение опытным крысам транквилизатора диазепама в дозе 2 мг/кг за 1 час до приготовления срезов не оказывало влияния на амплитуды пВПСР пирамидных нейронов коры и гиппокампа, однако вызывало достоверное угнетение амплитуд НМДА-компонентов фокальных потенциалов (рис. 2)

3.2. Нарушения пластических свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов гиппокампа и медиальной префронтальной коры при моделировании сахарного диабета: для характеристики пластических свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов гиппокампа и медиальной префронтальной коры мы использовали явления длительной потенциации и длительной депрессии (ДП и ДД соответственно) синаптической передачи.

Четырехкратная высокочастотная (100 Гц, длительность 1 сек) тетаническая стимуляция II слоя коры у интактных крыс вызывала прирост амплитуды пВПСР пирамидных нейронов V слоя, который через 30 мин после стимуляции составил $144,6 \pm 6,3$ % по отношению к контролю. В условиях моделирования сахарного диабета прирост амплитуды пВПСР равнялся $109,3 \pm 5,5$ % (рис. 3).

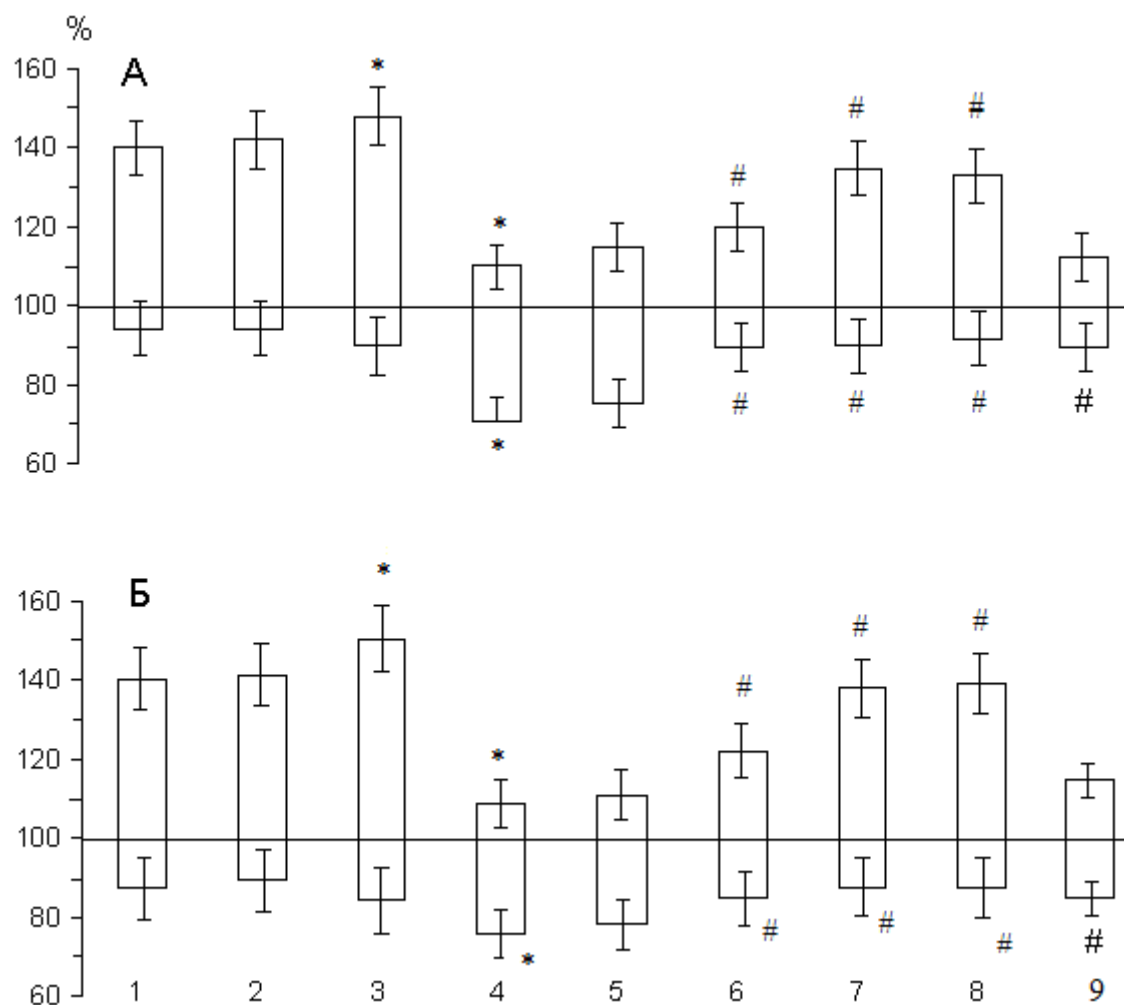


Рис. 3. Длительная потенция и длительная депрессия синаптической передачи в пирамидных нейронах гиппокампа (А) и коры (Б) при разных экспериментальных условиях.

Каждый направленный вверх и вниз столбец отражают изменения амплитуды популяционных ВПСР на 30-й мин после прекращения тетанической стимуляции синаптических входов, т. е. длительную потенцию и длительную депрессию синаптической передачи соответственно.

1 - контроль; 2 – воздействие 30 мМ/л глюкозы; 3 – воздействие 0,1 ЕД/мл инсулина; 4 – на 4-й неделе развития ЭСД; 5 – то же после двухдневного введения протафана в дозе 2 ЕД/сутки; 6 – то же после введения 20 мг/кг верапамила; 7 и 8 – то же после двухнедельного введения имипрамина и флуоксетина в дозах 20 мг/кг соответственно; то же после введения 2 мг/кг диазепама – 9.

По вертикальной шкале – изменения амплитуды ответов в %.

* - изменения достоверны относительно интактной группы – столбец 1 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

- изменения достоверны относительно контрольной группы животных с экспериментальным сахарным диабетом – столбец 4 (t- критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$).

Низкочастотная (5 Гц, длительность 10 мин) тетаническая стимуляция вызывала снижение амплитуды пВПСР до $85,6 \pm 4,5$ % через 30 мин после прекращения стимуляции в срезах мозга контрольных крыс. У крыс с экспериментальным сахарным диабетом в тот же временной промежуток амплитуда пВПСР равнялась $72,4 \pm 3,1$ % (рис. 3). Таким образом, при моделировании данной патологии имеет место угнетение развития ДП, но усиление развития ДД синаптической передачи.

Воздействие на срезы мозга интактных крыс инсулина в концентрации 0,1 ЕД/мл в течение 2-х часов вызывало усиление развития как ДП, так и ДД синаптической

передачи (рис.3). Воздействие на срезы мозга интактных крыс глюкозы в концентрации 30 мМ в течение 6 часов не влияло на развитие ДП и ДД синаптической передачи (рис. 3)

В срезах мозга крыс с ЭСД после двухдневного введения *in vivo* препарата инсулина длительного действия не выявлено существенных изменений экспрессии ДП и ДД синаптической передачи в пирамидных нейронах гиппокампа и коры (рис. 3). Двухнедельное введение крысам антидепрессантов – имипрамина и флуоксетина в условиях моделирования сахарного диабета восстанавливало нарушенные пластические свойства глутаматергических синапсов пирамидных нейронов коры и гиппокампа практически до исходного уровня (рис. 3). Введение крысам с ЭСД блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов верапамила в дозе 20 мг/кг за 1 час до приготовления срезов мозга восстанавливало экспрессию ДД практически до исходного уровня и только ослабляло угнетение развития ДП синаптической передачи – контроль $144,6 \pm 6,3 \%$, ЭСД $109,3 \pm 5,5 \%$, после введения верапамила $124,6 \pm 4,4 \%$ (рис. 3). Бензодиазепиновый транквилизатор диазепам в дозе 2 мг/кг не оказывал влияния на нарушение экспрессии ДП синаптической передачи при моделировании сахарного диабета, но частично устранял дефект развития ДД синаптической передачи (рис. 3).

Таким образом, средство патогенетической терапии – инсулин длительного действия при введении крысам в течение двух дней уменьшал гипергликемию от $27,3 \pm 4,6$ мМ до $6,5 \pm 2,3$ мМ, но не влиял на нарушения пластических свойств глутаматергических синапсов гиппокампа и коры. Антидепрессанты – флуоксетин и имипрамин – уменьшали дефицит функциональной активности глутаматных НМДА-рецепторов и нормализовали синаптическую пластичность пирамидных нейронов коры и гиппокампа, нарушенную в условиях ЭСД. Такое же, но количественно менее интенсивное действие на нарушенную синаптическую пластичность оказывал верапамил. Диазепам оптимизировал только ДД синаптической передачи.

3.3. Оценка степени корреляционных связей влияний лекарственных веществ на синаптические процессы и поведенческие реакции животных при моделировании сахарного диабета: поскольку синаптическая пластичность участвует в формировании поведенческих актов, возможно, что используемые лекарственные вещества могут ослаблять нарушения синаптической пластичности, и могут в определенной степени корригировать нарушения поведенческих реакций.

Как следует из табл. 1, способность используемых лекарственных веществ уменьшать время иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания в условиях моделирования сахарного диабета обнаруживает значимую корреляционную связь с их корригирующим влиянием на развитие ДП синаптической передачи в пирамидных нейронах префронтальной коры. Следовательно, можно думать, что повышенный уровень депрессивности крыс обусловлен угнетением экспрессии ДП в синапсах проекционных нейронов медиальной префронтальной коры.

Что касается ДД синаптической передачи, то связь ее с уровнем депрессивности нечетка. В тоже время, корригирующее влияние исследуемых лекарственных веществ на развитие ДД в синапсах проекционных нейронов префронтальной коры обнаруживает значимую корреляционную связь с их способностью увеличивать время пребывания крыс в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта (табл. 1). Это указывает на то, что ослабление глутаматергической синаптической передачи (ДД) в проекционных нейронах префронтальной коры сопровождается возрастанием уровня тревожности.

Наконец, способность используемых лекарственных веществ нормализовать латентное время УРАИ при моделировании сахарного диабета выявляет значимую корреляционную связь с вызываемой ими коррекцией нарушения экспрессии ДП синаптической передачи в проекционных нейронах префронтальной коры (табл. 1).

Таблица 1. Матрица коэффициентов корреляции рангов влияния исследуемых лекарственных веществ на синаптические процессы и поведение животных при моделировании сахарного диабета.

	ДП синаптической передачи в мПФК	ДД синаптической передачи в мПФК	Амплитуда пВПСП пирамидных нейронов мПФК	Амплитуда НМДА-компонентов пВПСП
Время иммобилизации	0,95 *	0,62	0,60	0,51
Время пребывания в открытых рукавах	0,05	0,95 *	- 0,21	- 0,71
Латентное время УРАИ	0,95 *	0,10	0,61	0,62

n = 5; * - коэффициент корреляции рангов статистически значим при P = 0,05.

Сравнение корригирующего влияния исследуемых лекарственных веществ на нарушения поведения в условиях моделирования сахарного диабета дает следующие результаты: антидепрессанты обнаруживают выраженную активность в плане коррекции повышенного уровня депрессивности и нормализации воспроизведения навыка УРАИ. Наиболее выраженную активность в плане снижения повышенного уровня тревожности на фоне ЭСД обнаруживает диазепам, несколько меньшая активность присуща имипрамину и умеренную противотревожную активность демонстрирует флуоксетин. Диазепам не влияет на повышенный уровень депрессивности, в отдельных опытах вызывает даже дальнейшее его увеличение, и усугубляет нарушенное воспроизведение УРАИ. Верапамил умеренно корректирует всю триаду нарушений поведения при моделировании сахарного диабета. Введение инсулина на нарушения поведения влияния не оказывает.

В **четвёртой главе** описаны нарушения синаптических процессов в коре и поведения крыс при моделировании хронического воспаления; изучались возможности лекарственной коррекции этих нарушений.

4.1. Нарушения релейных свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов медиальной префронтальной коры при моделировании хронического воспаления и влияние на них исследуемых веществ: в исследованиях *in vitro* на срезах мПФК выявлено характерное для воспалительной реакции организма снижение базальной глутаматергической передачи в синапсах, образованных дендритными шипиками пирамидных нейронов V слоя и аксонами нейронов II слоя данной структуры. Как следует из рис. 4, на фоне воспаления наблюдается снижение наклона кривой, отражающей зависимость амплитуд пВПСП от интенсивности пресинаптической стимуляции – $0,64 \pm 0,04$ против $0,86 \pm 0,06$ в контроле (P = 0,02). Поскольку генерация глутаматергических ВПСП нейронов коры и гиппокампа опосредована активацией ионофорных глутаматных AMPA- и НМДА-рецепторов, вполне допустимо, что ослабление базальной синаптической передачи обусловлено снижением активности глутаматных AMPA- и/или НМДА-рецепторов.

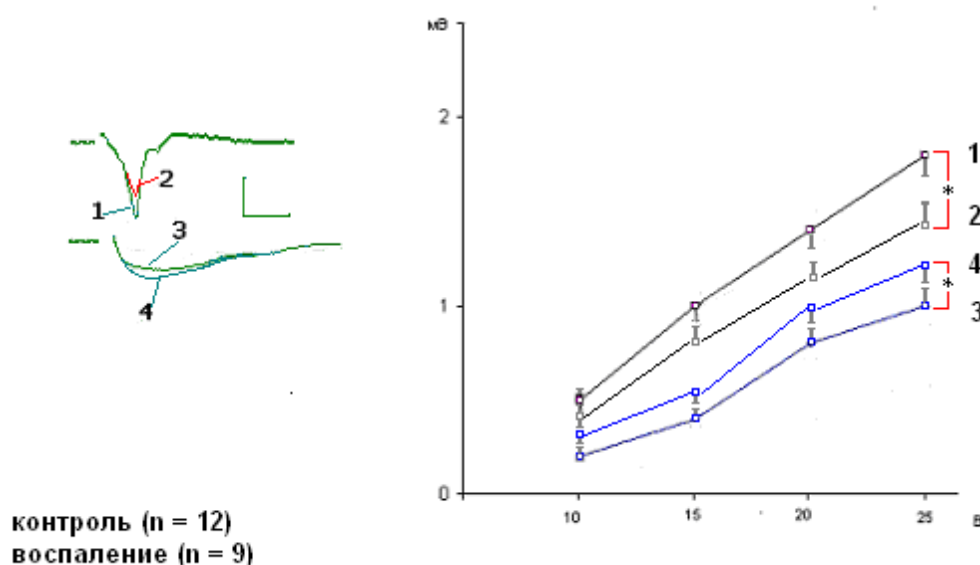


Рис. 4. Снижение амплитуд пВПСП пирамидных нейронов V слоя медиальной префронтальной коры и увеличение их НМДА-компонента в условиях хронического воспаления.

Слева – сверху образцы максимальных пВПСП пирамидных нейронов, внизу их НМДА-компоненты в контрольных условиях 1 и 3, и на фоне воспаления 2 и 4 соответственно.

Справа – графики зависимости средних амплитуд пВПСП и их НМДА-компонентов от интенсивности пресинаптической стимуляции в контроле 1 и 3, и на фоне воспаления 2 и 4 соответственно.

По вертикальной шкале амплитуда пВПСП в мВ; по горизонтальной шкале интенсивность пресинаптической стимуляции в В.

Калибровка: 1 мВ, 10 мс. Сопротивление раздражающего электрода 200 кОм.

* - (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Максимальное значение амплитуды пВПСП пирамидных нейронов префронтальной коры на фоне хронического воспаления уменьшалось от $1,82 \pm 0,05$ мВ в контроле до $1,41 \pm 0,03$ мВ ($P = 0,002$). Используемые лекарственные вещества по-разному влияли на сниженную при моделировании хронического воспаления амплитуду пВПСП. Селективный ингибитор ЦОГ₂ нимесулид достоверно увеличивал сниженную на фоне хронического воспаления амплитуду пВПСП до $1,52 \pm 0,03$ мВ ($P = 0,03$), а неселективный ингибитор циклооксигеназ парацетамол подобным действием не обладал. На фоне хронического введения антидепрессантов амплитуда пВПСП пирамидных нейронов возрастала до $1,94 \pm 0,07$ и $1,89 \pm 0,06$ мВ при использовании имипрамина и флуоксетина соответственно ($P = 0,007$). После введения блокатора кальциевых каналов верапамила возрастание сниженной на фоне хронического воспаления амплитуды пВПСП было на грани достоверности $1,59 \pm 0,03$ ($P = 0,048$). Введение кетамина и диазепама на сниженную амплитуду пВПСП пирамидных нейронов влияния не оказывало.

На фоне хронического воспаления амплитуда фармакологически изолированного НМДА-компонента пВПСП пирамидных нейронов V слоя коры возрастала, при снижении амплитуд пВПСП пирамидных нейронов. При этом НМДА-компоненты пВПСП пирамидных нейронов коры претерпевали не только количественные, но и качественные изменения, поскольку менялась их фармакологическая чувствительность к действию блокаторов.

Наблюдаемое при хроническом воспалении увеличение максимальной амплитуды НМДА-компонентов пВПСП пирамидных нейронов коры – $1,21 \pm 0,04$ мВ против $0,92 \pm 0,04$ мВ в контроле ($P = 0,01$) – частично обращалось нимесулидом – $1,07 \pm 0,03$ мВ, но не парацетамолом. Антидепрессанты имипрамин и флуоксетин в условиях хронического воспаления уменьшали амплитуду НМДА-компонентов пВПСП даже ниже

контрольного уровня – $0,71 \pm 0,03$ и $0,62 \pm 0,03$ мВ соответственно против $0,92 \pm 0,04$ ($P = 0,03$ и $0,02$). Кетамин снижал увеличенные при воспалении амплитуды НМДА-компонентов пВПСП исследуемых нейронов $1,02 \pm 0,04$ против $1,21 \pm 0,04$ мВ. Блокатор потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов L-типа верапамил и анксиолитик диазепам на исследуемый показатель влияния не оказывали.

4.2. Нарушения пластических свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов медиальной префронтальной коры при моделировании хронического воспаления и влияние на них исследуемых веществ: изменение функциональной активности нейрональных НМДА-рецепторов может быть причиной нарушения НМДА-зависимых форм синаптической пластичности в мПФК. Судя по данным, представленным на рис. 5, на фоне хронического воспаления наблюдали угнетение экспрессии регистрируемой на 30-й мин после тетанической стимуляции ДП синаптической передачи ($113,2 \pm 4,4$ % против $142,5 \pm 7,1$ % в контроле, $P < 0,05$, $n = 5$), так и ДД синаптической передачи ($95,6 \pm 5,0$ % против $83,1 \pm 4,1$ % в контроле, $P < 0,05$, $n = 5$).

Ингибиторы ЦОГ нимесулид и парацетамол частично, а антидепрессанты имипрамин и флуоксетин практически полностью обращали вызываемые хроническим воспалением нарушения основных форм синаптической пластичности пирамидных нейронов мПФК (рис. 5). Кетамин обладал более низкой активностью в отношении восстановления синаптической пластичности по сравнению с ингибиторами ЦОГ и антидепрессантами (рис. 5).

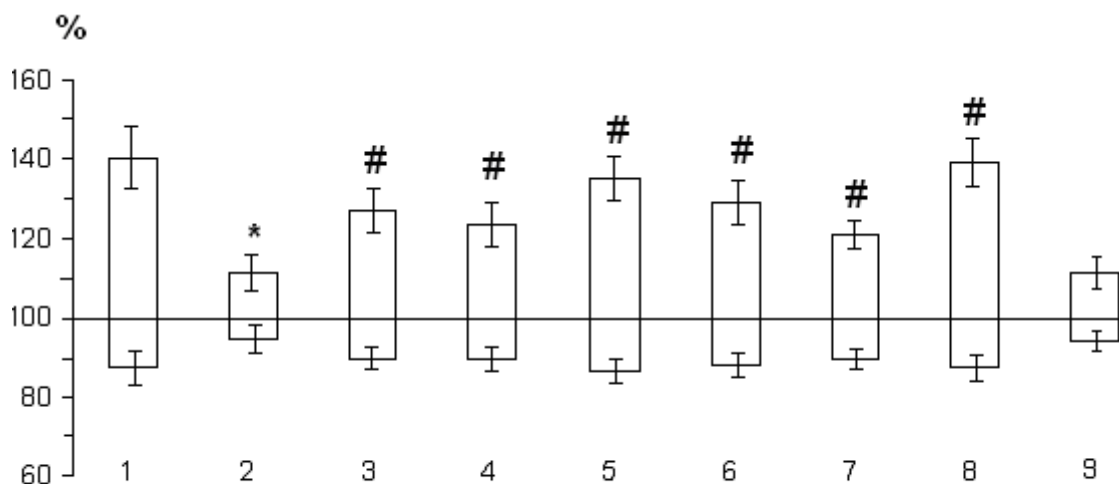


Рис. 5. Угнетение экспрессии длительной потенциации и депрессии синаптической передачи в медиальной префронтальной коре при хроническом воспалении и влияние на эти эффекты веществ анализаторов.

Отклонения вверх соответствуют ДП, вниз – ДД синаптической передачи. Столбец 1 – средняя максимальной амплитуды НМДА-компонента пВПСП в контроле, 2 – то же при хроническом воспалении; средняя максимальной амплитуды НМДА-компонента при хроническом воспалении на фоне действия: 3 – 5 мг/кг нимесулида, 4 – 10 мг/кг парацетамола, 5 – 20 мг/кг имипрамина, 6 – 20 мг/кг флуоксетина, 7 – 30 мг/кг кетамина, 8 – 20 мг/кг верапамила и 9 – 2 мг/кг диазепама.

По вертикальной шкале – изменения амплитуд пВПСП пирамидных нейронов в %.* - изменения достоверны относительно интактной группы – столбец 1 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$); # - изменения достоверны относительно контрольной группы животных с экспериментальным сахарным диабетом – столбец 2 (t- критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$).

Верапамил достаточно эффективно восстанавливал нарушенные воспалением как ДП, так и ДД синаптической передачи, а диазепам на нарушения синаптической пластичности влияния не оказывал (рис. 5). В то же время, необходимо отметить, что ДП

синаптической передачи на фоне хронического воспаления развивается при увеличении интенсивности пресинаптической стимуляции. Действительно, если аксонные терминалы нейронов II слоя стимулировать более высокой частотой - 200 Гц, то на 30-й мин после стимуляции амплитуда пВПСП пирамидных нейронов составила $135,4 \pm 6,7$ % (не иллюстрировано). Возможно, что на фоне хронического воспаления имеет место повышение порога индукции ДП синаптической передачи, несмотря на повышение функциональной активности глутаматных НМДА-рецепторов.

4.3. Оценка корреляционных связей влияний лекарственных веществ на синаптические процессы и поведенческие реакции животных при моделировании хронического воспаления: в условиях моделирование хронического асептического воспаления у крыс наблюдали изменение поведения. Отмечено возрастание уровня депрессивности животных, которое проявлялось увеличением времени иммобилизации в тесте вынужденного плавания, повышение степени тревожности, судя по уменьшению времени пребывания животных в открытых рукавах ПКЛ, а также увеличение латентного периода УРАИ.

Как следует из табл. 2, способность используемых лекарственных веществ уменьшать время иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания в условиях моделирования хронического воспаления обнаруживает значимую корреляционную связь с их корригирующим влиянием на развитие ДП и в меньшей степени ДД синаптической передачи в пирамидных нейронах префронтальной коры.

Таблица 2. Матрица коэффициентов корреляции рангов влияния исследуемых лекарственных веществ на синаптические процессы и поведение животных при моделировании хронического воспаления.

	ДП синаптической передачи в мПФК	ДД синаптической передачи в мПФК	Амплитуда пВПСП пирамидных нейронов мПФК	Амплитуда НМДА компонентов пВПСП
Время иммобилизации	0,88 *	0,79 *	0,41	0,55
Время пребывания в открытых рукавах	- 0,26	- 0,19	- 0,14	- 0,45
Латентное время УРАИ	0,89 *	0,96 *	0,51	0,26

n = 7; * - коэффициент корреляции рангов статистически значим при P = 0,05.

Ситуация с влиянием исследуемых лекарственных веществ на синаптические процессы и возросший уровень тревожности при моделировании хронического воспаления неопределенная. Влияние лекарственных веществ ни на один из исследуемых синаптических параметров не обнаруживает статистически значимой корреляционной связи с их влиянием на уровень тревожности крыс при моделировании хронического воспаления (табл. 2). Наиболее высокое значение коэффициента корреляции рангов выявляется во влиянии лекарственных веществ на НМДА-компоненты пВПСП пирамидных нейронов префронтальной коры и уровень тревожности животных (табл. 2).

Также, как и на фоне ЭСД, при моделировании хронического воспаления выявлена статистически значимая корреляционная связь во влиянии лекарственных веществ на латентный период воспроизведения навыка УРАИ и на синаптическую пластичность проекционных нейронов префронтальной коры (табл. 2). Существенную роль в корригирующем влиянии исследуемых лекарственных веществ на воспроизведение навыков обучения играет их способность восстанавливать не только ДП, но и ДД синаптической передачи в проекционных нейронах префронтальной коры, ослабленные при моделировании хронического воспаления (табл. 2).

Антидепрессанты наиболее интенсивно нивелируют повышенный уровень депрессивности при моделировании на крысах хронического воспаления. В несколько меньшей степени верапамил снижает время иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания. Но разница заключается в том, что указанный эффект антидепрессантов развивается через две недели их систематического введения, а эффект верапамила проявляется через час. В меньшей степени повышенное время иммобилизации в тесте вынужденного плавания при моделировании хронического воспаления снижают ингибиторы ЦОГ – нимесулид и парацетамол. Неселективный неконкурентный блокатор глутаматных НМДА-рецепторов кетамин при хроническом введении демонстрировал умеренную (на уровне ингибиторов ЦОГ) способность уменьшать возросший уровень депрессивности крыс. Бензодиазепиновый транквилизатор диазепам на повышенный уровень депрессивности влияния не оказывал.

Влияние исследуемых лекарственных веществ на вторую составляющую триады нарушений поведения при моделировании хронического воспаления – возросший уровень тревожности не столь выражено как их влияние на повышенную депрессивность. Только диазепам обладает выраженным противотревожным действием. Из антидепрессантов лишь имипрамин умеренно увеличивал время пребывания крыс в открытых рукавах крестообразного лабиринта при моделировании данной патологии, а флуоксетин такой активностью не обладал. Приблизительно в такой же степени как имипрамин, увеличивали время пребывания крыс в открытых рукавах кетамин и верапамил. Наконец, на третью составляющую триады нарушений поведения на фоне хронического воспаления – замедление воспроизведения навыков обучения (следов памяти) только имипрамин и верапамил оказывали умеренное корригирующее действие.

В пятой главе описаны нарушения синаптических процессов в коре и поведения крыс при хроническом введении глюкокортикоидов и поиск возможности лекарственной коррекции этих нарушений.

5.1. Влияние хронического введения глюкокортикоидов синаптическую передачу в нейронах медиальной префронтальной коры: хроническое введение Дмз вызывало изменения функционального состояния нейронов лимбических структур мозга, которые участвуют в формировании поведенческих реакций животных.

Исследуя ключевую лимбическую структуру – мПФК, мы обнаружили изменения релейных и пластических свойств глутаматергических синапсов. Как следует из рис. 6, на фоне хронического введения Дмз имеет место снижение глутаматергической передачи в синапсах, образованных афферентами медиодорсального таламуса и дендритами пирамидных нейронов, о чем свидетельствует снижение амплитуды пВПСП. Поскольку в пирамидных нейронах мПФК генерация ВПСП обусловлена активацией как АМРА-, так и НМДА-рецепторов, установлено, что снижение амплитуд пВПСП происходит за счет уменьшения и АМРА-, и НМДА- компонентов фокальных потенциалов (рис. 6).

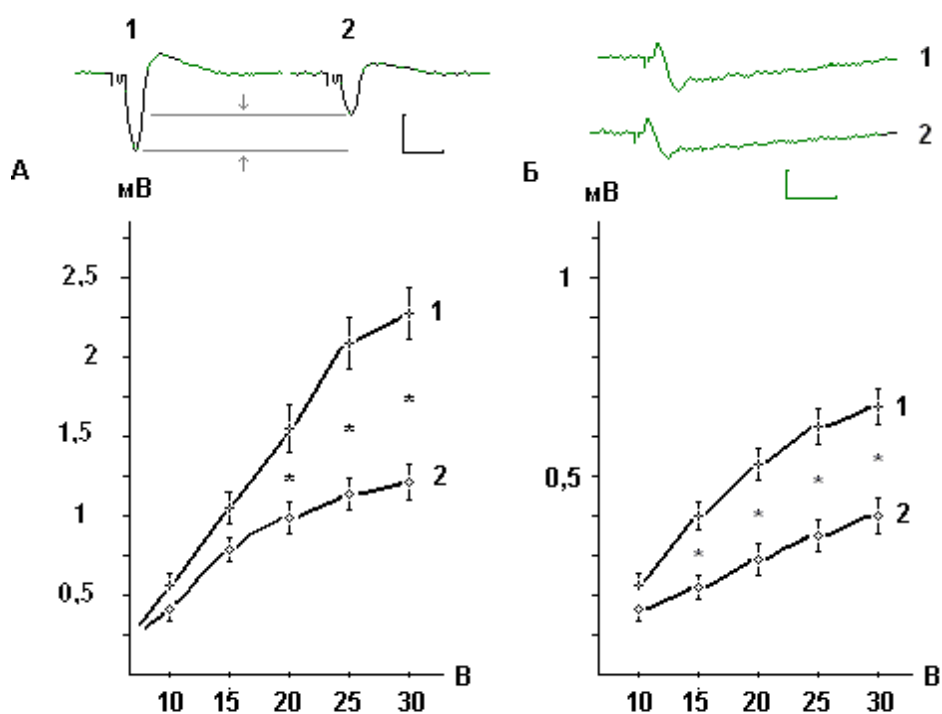


Рис. 6. Снижение амплитуд пВПСП пирамидных нейронов V слоя медиальной префронтальной коры (А) и их НМДА-компонента (Б) в условиях хронического введения Дмз

Сверху образцы максимальных пВПСП пирамидных нейронов (А) и их НМДА-компоненты (Б), усредненных по 10 реализациям, в контрольных условиях (1) и на фоне хронического введения Дмз (2) соответственно.

Внизу графики зависимости средних амплитуд пВПСП и их НМДА-компонентов (в мВ) от интенсивности пресинаптической стимуляции (в В) в контроле (1) и на фоне хронического введения Дмз (2) соответственно.

Калибровка: 1 мВ (А), 0,5 мВ (Б); 10 мс.

* - изменения достоверны относительно интактной группы (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

Снижение амплитуд пВПСП пирамидных нейронов не сопровождалось изменением величин парного облегчения при межимпульсном интервале 50 мс – $1,75 \pm 0,36$ против $1,67 \pm 0,29$ в контроле ($P > 0,05$), т. е. имело постсинаптическую природу.

5.2. Нарушения пластических свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов медиальной префронтальной коры при хроническом введении дексаметазона и влияние на них исследуемых веществ: хроническое введение Дмз крысам вызывало также нарушения пластических свойств глутаматергических синапсов пирамидных нейронов мПФК. Действительно, в эти условия наблюдали угнетение экспрессии ДД синаптической передачи (рис. 7), величина которой составляла $108,3 \pm 5,4$ % против $142,3 \pm 6,9$ % в контроле ($P = 0,004$). С другой стороны, в контрольных условиях, вызываемая низкочастотной стимуляцией ДД синаптической передачи проявлялась снижением амплитуд пВПСП до $85,1 \pm 3,2$ % на 30-й мин после прекращения низкочастотной стимуляции синаптических входов. В тоже время, на фоне Дмз наблюдали усиление экспрессии ДД (рис. 7) - $72,3 \pm 5,1$ % против $85,1 \pm 3,2$ % в контроле ($P = 0,05$).

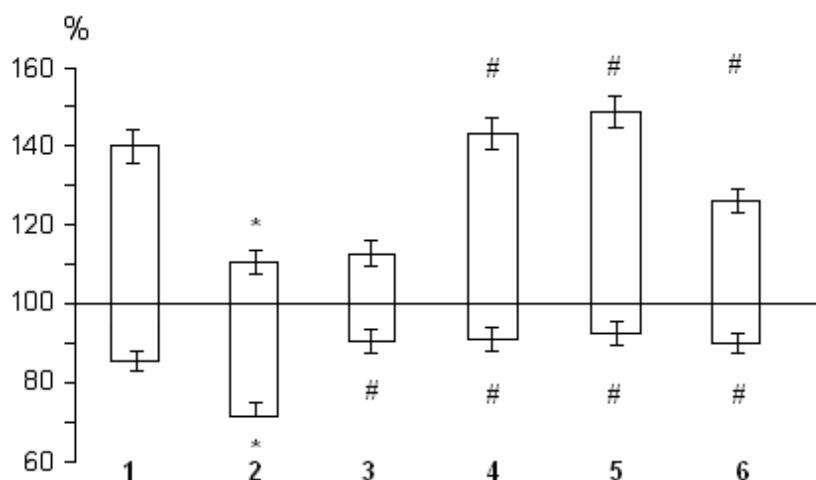


Рис. 7. Угнетение экспрессии длительной потенциации и облегчение развития длительной депрессии синаптической передачи в медиальной префронтальной коре при хроническом введении Дмз и влияние на эти эффекты веществ-анализаторов.

Отклонения вверх соответствуют увеличению амплитуд пВПСП на 30-й мин после прекращения высокочастотной стимуляции, т. е. ДП, а отклонения вниз соответствуют снижению амплитуд пВПСП на 30-й мин после прекращения низкочастотной стимуляции, т. е. ДД синаптической передачи.

Столбец 1 – величины ДП и ДД синаптической передачи в контроле, 2 – то же при хроническом введении Дмз; величины ДП и ДД синаптической передачи при хроническом введении Дмз на фоне действия: 3 – 2 мг/кг диазепам, 4 – 20 мг/кг имипрамина, 5 – 20 мг/кг флуоксетина, 6 – 20 мг/кг верапамила.

По вертикальной шкале – амплитуда постсинаптических потенциалов в %.

* - изменения достоверны относительно интактной группы – столбец 1 (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$);

- изменения достоверны относительно контрольной группы животных с экспериментальным сахарным диабетом – столбец 2 (t- критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони, $p < 0,05$).

В срезах мПФК крыс, подвергнутых хроническому воздействию Дмз, взятых через 1 час после введения диазепам, не выявлено влияния на развития ДП $112,3 \pm 5,4$ % против $108,3 \pm 5,4$ % на фоне только Дмз ($P > 0,05$), но обнаружено выраженное угнетающее влияния анксиолитика на экспрессию ДД (рис. 7). Антидепрессанты флуоксетин и имипрамин облегчали развитие ДП у животных, получавших Дмз: $144,6 \pm 7,2$ % и $150,4 \pm 7,4$ % против $108,3 \pm 5,4$ % на фоне только Дмз ($P < 0,05$). В то же время, оба антидепрессанта существенно ослабляли вызываемое Дмз усиление экспрессии ДД синаптической передачи (рис. 7). Как и антидепрессанты блокатор п/з Ca^{2+} каналов верапамил облегчал развитие ДП синаптической передачи (рис. 7) – $127,4 \pm 4,9$ % против $108 \pm 5,4$ % на фоне действия Дмз ($P = 0,03$), но угнетал усиленную экспрессию ДД – $88,3 \pm 4,7$ % против $72,3 \pm 5,1$ % ($P = 0,04$).

5.3. Оценка корреляционных связей влияний лекарственных веществ на синаптические процессы и поведенческие реакции животных в условиях хронического введения Дмз: в условиях хронического введения Дмз как и при моделировании ЭСД и хронического асептического воспаления у крыс наблюдали стереотипные изменение поведения. Отмечено возрастание уровня депрессивности животных, повышение уровня тревожности, а также увеличение латентного периода УРАИ.

Как следует из табл. 3, способность исследуемых веществ уменьшать время иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания в условиях хронического введения Дмз обнаруживает значимую корреляционную связь с их корригирующим влиянием на развитие ДП и лишь недостоверную тенденцию с таковым на развитие ДД синаптической

передачи в пирамидных нейронах префронтальной коры. Следовательно, наблюдаемое в условиях хронического введения Дмз повышение уровня депрессивности животных связано с нарушением пластических свойств (экспрессии ДП синаптической передачи) глутаматергических синапсов проекционных нейронов медиальной префронтальной коры. В свою очередь, угнетение развития ДП в синапсах проекционных нейронов мПФК при хроническом воздействии Дмз связано с дефицитом влияний, опосредуемых активацией нейрональных глутаматных НМДА-рецепторов, поскольку лекарственные вещества, ослабляющие функциональную активность глутаматных НМДА-рецепторов уменьшают время иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания, о чем свидетельствует значимый коэффициент корреляции рангов (табл. 3).

Что касается наблюдаемого возросшего уровня тревожности крыс при хроническом введении Дмз, то эта поведенческая реакция обнаруживает значимую корреляционную связь с нарушением развития ДД в синапсах проекционных нейронов мПФК (табл. 3).

Таблица 3. Матрица коэффициентов корреляции рангов влияния исследуемых лекарственных веществ на синаптические процессы и поведение животных в условиях хронического введения Дмз.

	ДП синаптической передачи в мПФК	ДД синаптической передачи в мПФК	Амплитуда пВПСП пирамидных нейронов мПФК	Амплитуда НМДА компонентов пВПСП
Время иммобилизации	0,81 *	0,71	0,14	0,82*
Время пребывания в открытых рукавах	- 0,71	0,97*	0,48	- 0,71
Латентное время УРАИ	0,83 *	0,33	0,24	-0,71

n = 4; * - коэффициент корреляции рангов статистически значим при P = 0,05.

Наконец, способность используемых лекарственных веществ нормализовать латентное время УРАИ в условиях моделирования хронического воздействия глюкокортикоидов выявляет значимую корреляционную связь с вызываемой ими коррекцией нарушения экспрессии ДП синаптической передачи в проекционных нейронах префронтальной коры (табл. 3).

Сравнение корректирующего влияния исследуемых лекарственных веществ на нарушения поведения в условиях хронического введения Дмз дает следующие результаты. Антидепрессанты обнаруживают выраженную активность в плане коррекции повышенного уровня депрессивности, но не оказывают влияния на уровень тревожности и воспроизведения навыка УРАИ. Диазепам снижает повышенный уровень тревожности в условиях хронического введения Дмз, но не оказывает влияния на повышенный уровень депрессивности, а также усугубляет нарушение воспроизведения УРАИ. Верапамил обладает умеренно корригирующей активностью на всю триаду нарушений поведения в условиях хронического введения Дмз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Префронтальная кора – область мозга, которая контролирует «исполнительные» функции высшего порядка, такие как рабочая (оперативная) память, восприятие новизны,

оценка текущей ситуации, выбор парадигмы поведения, регуляция эмоционального статуса [Euston et al., 2012]. С другой стороны, установлено, что глутаматергическая синаптическая передача, которая определяет активность нейронов ПФК, является ключевым звеном генеза вышеперечисленных функций (Gilmartin et al., 2013).

При моделировании различной по патогенезу патологии мы наблюдали нарушения психических процессов, которые проявлялись изменениями поведения животных – увеличение уровня депрессивности; возростании тревожности; нарушение мнестических процессов. Перечисленная триада нарушения поведения при всех формах изучаемой патологии различается лишь количественно. Анализ способности исследуемых лекарственных веществ корригировать составляющие триады поведенческих нарушений показывает, что большинство из них обладают парциальной активностью (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительная качественная характеристика активности исследуемых лекарственных веществ как корректоров нарушения поведения при моделировании патологии

Исследуемое вещество	Моделирование сахарного диабета			Моделирование хронического воспаления			Хроническое введение дексаметазона		
	Уровень депрессивности	Уровень тревоги	Дефект УРАИ	Уровень депрессивности	Уровень тревоги	Дефект УРАИ	Уровень депрессивности	Уровень тревоги	Дефект УРАИ
Протофан	0	0	0	#	#	#	#	#	#
Имипрамин	++	++	+	++	+	+	++	0	0
Флуоксетин	++	+	++	++	0	0	++	0	0
Нимесулид	*	*	*	+	0	0	*	*	*
Парацетамол	*	*	*	+	0	0	*	*	*
Верапамил	+	+	+	++	+	+	+	++	+
Диазепам	0	++	0	0	++	0	0	++	@
Кетамин	¥	¥	¥	+	+	0	¥	¥	¥

++ - максимальная активность; + - умеренная активность; 0 – отсутствие влияния.

Данные вещества не применялись по причинам: # - отсутствия дефицита инсулина; * - отсутствия признаков воспаления; ¥ - снижения функциональной активности глутаматных НМДА-рецепторов. @ - вещество усиливало исследуемое нарушение.

С нарушением глутаматергической синаптической передачи в мПФК мы связываем нарушения психических функций мозга при ЭСД, хроническом воспалении кожи и хроническом введении синтетического глюкокортикоида дексаметазона. Наиболее существенное нарушение глутаматергической передачи в мПФК на фоне ЭСД, хронического воспаления, дексаметазоновой интоксикации – угнетение синаптической пластичности в виде ослабления ДП, но облегчения ДД синаптической передачи. В основе угнетения синаптической пластичности лежат нарушения функциональной активности НМДА глутаматных рецепторов на которые наслаиваются вызываемые стрессом нарушения кальциевого гомеостаза нейронов. Такое неблагоприятное сочетание нейрохимических механизмов затрудняет подбор психофармакологических средств, необходимых для ослабления или устранения психических нарушений.

Использование клинически активных антидепрессантов (модуляторов моноаминергических процессов) для коррекции эмоциональных и когнитивных нарушений при соматических заболеваниях проблематично, поскольку их тимолептический и психостимулирующий эффекты развиваются через 2 – 3 недели систематического применения. Это обстоятельство делает необходимым разработку быстродействующих антидепрессантов, основные эффекты которых развиваются в течение часов. Прототипом таких антидепрессантов могут быть блокаторы глутаматных НМДА-рецепторов и нейрокининовых 1 рецепторов. Но блокаторы глутаматных НМДА-рецепторов имеет смысл применять при эмоциональных и когнитивных нарушениях, наблюдаемых при хронической боли или хроническом воспалении, поскольку в этих ситуациях имеет место повышение функциональной активности глутаматных НМДА-рецепторов. Однако при сахарном диабете и гиперкортизолемии имеет место даун-регуляция глутаматных НМДА-рецепторов, поэтому применение блокаторов данных рецепторов в этих ситуациях неприемлемо. Для этих случаев больше подходит другая группа быстродействующих антидепрессантов, прототипом которых может быть блокатор нейрокининовых 1 (NK 1) рецепторов МК-869 [Rupniak, 2001].

Представляется, что более подходящими для коррекции эмоциональных и мнестических нарушений при сахарном диабете и хроническом воспалении являются блокаторы высокопороговых кальциевых каналов L-типа, которые, судя по результатам исследования, являются психокорректирующими средствами «широкого спектра». Помимо этого, в соответствии с литературными данными, антагонисты кальция обладают противовоспалительным действием и способностью корригировать метаболические нарушения при сахарном диабете. Прототипами этой группы средств могут служить липофильные, проникающие в мозг производные фенилалкиламинов и дигидропиридинов второго/третьего поколений.

ВЫВОДЫ:

1. При моделировании различной по этиологии патологии выявлено выраженное в разной степени угнетение глутаматергической синаптической передачи в проекционных нейронах префронтальной коры, но разнонаправленные изменения компонентов синаптических ответов нейронов, опосредуемых активацией глутаматных НМДА-рецепторов.

2. На фоне экспериментального сахарного диабета и хронического введения дексаметазона нарушения синаптической пластичности проявлялись угнетением развития длительной потенциации, но усилением развития длительной депрессии синаптической передачи; при моделировании хронического воспаления обе формы синаптической пластичности угнетались.

3. Несмотря на разнообразие изменений синаптических процессов в префронтальной коре при моделируемой патологии воспроизводились стереотипные поведенческие

нарушения: рост уровней депрессивности и тревожности и замедление воспроизведения навыка обучения.

4. Анализ корреляционных связей влияния используемых лекарственных веществ на синаптические процессы и поведенческие реакции животных указывает, что наблюдаемые при моделировании патологии увеличение времени иммобилизации (рост уровня депрессивности) и латентного времени УРАИ (нарушение воспроизведение навыков обучения) обусловлены угнетением развития длительной потенциации синаптической передачи; уменьшение времени пребывания крыс в открытых рукавах крестообразного лабиринта (рост уровня тревожности) имеет многокомпонентную нейрофизиологическую организацию.

5. Используемые для коррекции нарушений поведенческих реакций лекарственные вещества не оказывают тотального влияния на стереотипную поведенческую триаду: антидепрессанты и противовоспалительные средства корригируют преимущественно повышенный уровень депрессивности, диазепам влияет только на тревожность, кетамин на фоне воспаления снижает уровни депрессивности и тревожности.

6. Верапамил обнаруживает умеренную корректирующую активность в отношении всей триады исследуемых поведенческих реакций. Это косвенно отражает повышение функциональной активности потенциал-зависимых кальциевых каналов в проекционных нейронах префронтальной коры при моделировании исследуемой патологии.

Научно-практические рекомендации

1. Нарушения психических процессов при соматических заболеваниях, по крайней мере, при сахарном диабете, хронических воспалительных заболеваниях и хроническом использовании глюкокортикоидов многокомпонентны, судя по моделированию этих заболеваний на крысах. Используемые в настоящее время средства патогенетической терапии и психофармакологические средства оказывают корректирующее действие на отдельные компоненты континуума психических нарушений при моделируемой патологии. Это обстоятельство требует разработки психокорректирующих средств «широкого спектра».

2. Прототипами таких средств могут быть липофильные, проникающие в мозг блокаторы потенциал-зависимых кальциевых каналов, судя по спектру корректирующего действия верапамила. Помимо этого, могут быть использованы быстродействующие вещества с сочетанной антидепрессивной и анксиолитической активностью.

Список работ, опубликованных по теме диссертации, в том числе статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Абрамец И.И., Сидорова Ю.В., Талалаенко А.Н. Нейропротективные свойства свойства серотонинергической модулирующей системы мозга. *Нейронауки: теоретические и клинические аспекты*. 2010; 6, № 1: С. 3–8.
2. Изменение постсинаптических глутаматных рецепторов в префронтальной коре при поведенческой депрессии у крыс / Евдокимов Д.В., Сидорова Ю.В., Абрамец И.И. // *Нейронауки: теоретичні та клінічніаспекти*. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 139–144.
3. Нейрофизиологические и нейрохимические механизмы нарушений поведения у крыс с хроническим воспалением тканей спины / Сидорова Ю. В., Образцова О.Г., Евдокимов Д.В., Абрамец И.И. // *Нейрофизиология*. 2013. – Т. 45, № 3. – С. 228–243.
4. Нейрохимическая природа когнитивных и эмоциональных нарушений при экспериментальном сахарном диабете / Сидорова Ю. В., Образцова О.Г., Евдокимов Д.В., Абрамец И.И // *Нейрофизиология*. – 2013. – Т. 45, № 4. – С. 317–328.

5. Розробка раціональних підходів до терапії тривожного та депресивного синдромів при експериментальному хронічному запаленні / **Сидорова Ю. В.**, Образцова О. Г., Талалаенко А.М // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 2 (33). – С. 31–36.

6. Synaptic Transmission Mediated by Ionotropic Glutamate Receptors in Rats Cerebral Cortex in Behavioral Depression / Igor I. Abramets., **Yulia V Sidorova.**, Dmitriy V. Evdokimov., Alexander N. Talalaenko // **Reserch in Neurology: An international Journal.** – November 2013. article ID 159123, DOI: 10.5171/2013.159123

7. Нарушение психических процессов при длительном введении глюкокортикоидов в эксперименте и вероятные пути их коррекции / **Сидорова Ю. В.**, Евдокимов Д.В., Абрамец И.И. // **Журнал фундаментальной медицины и биологии.** – 2016. – № 3. – С. 68–73.

8. **Сидорова Ю.В.** Разработка рациональных подходов терапии тревожного и депрессивного синдромов при экспериментальном сахарном диабете./ Сидорова Ю.В., Образцова О.Г // Материалы I Международной научной конференции «Донецкие чтения». -Ростов-на-Дону, 2016.-Т.2.-С. 202.

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AMPA – альфа-амино-3-метил-5-изоксазолпропионовая кислота,
ВПСР – возбуждающий постсинаптический потенциал,
ГАМКА рецепторы – рецепторы гамма-аминомасляной кислоты типа А,
ГК – глюкокортикоиды,
5-ГТ – серотонин (5-гидроксиทริปтамин),
ДГ – дорсальный гиппокамп,
ДД – длительная депрессия синаптической передачи,
Дмз – дексаметазон,
ДП – длительная потенциация синаптической передачи,
мВ – милливольт,
мкМ – микромоль,

мм – миллимоль,
мПФК – медиальная префронтальная кора,
НМДА – N-метил-D-аспарагиновая кислота,
пВПСР – популяционный возбуждающий постсинаптический потенциал,
п/з – потенциал-зависимый
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт,
с – секунда,
УРАИ – условная реакция активного избегания,
ЭСД – экспериментальный сахарный диабет

Сидорова
Юлия Владимировна

ИССЛЕДОВАНИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ НАРУШЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ
ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАТОЛОГИИ И РАЗРАБОТКА
ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Подписано в печать _____ 2018г.
Формат 60x84/16. Печать офсетная. Усл.-печ.л. ____.
Усл. Узд.л. ____ Тираж 100 экз. Заказ ____
Отпечатано в типографии