

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 615.214.2 +591.51

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ МАЛЫХ ДОЗ КЛЕБОПРИДА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ БЕЛЫХ КРЫС

А.В. Малышев, А.М. Захаров, К.Ю. Саркисова*, В.А. Дубынин

(кафедра физиологии человека и животных,
лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов;
e-mail: malyshev89@gmail.com)

Изучалось влияние селективного антагониста D2-рецепторов клебоприда на поведение взрослых самцов крыс в тестах “потребление сахарозы”, “открытое поле”, “приподнятый крестообразный лабиринт” и “сложный лабиринт” с пищевым подкреплением. Препарат вводился в малых дозах (0,2 и 0,4 мг/кг) хронически в течение двух недель. Показано, что клебоприд способен воздействовать на эмоционально-мотивационное состояние экспериментальных животных, с одной стороны, вызывая депрессивно-подобные изменения; с другой — оказывая некоторое активирующее влияние на способность к обучению и исследовательские реакции. Разнообразие последствий применения D2-антагониста обусловлено, по-видимому, конкуренцией его пост- и пресинаптических эффектов.

Ключевые слова: дофаминергическая система мозга, клебоприд, поведение, депрессия, обучение.

Клебоприд является селективным антагонистом D2-рецепторов дофамина. В экспериментах на животных он в первую очередь используется как нейрорептик и транквилизатор. Большие количества клебоприда (10 и 20 мг/кг) вызывают катаlepsию и паралич задней части тела у детенышей крыс [1]. В не столь высоких дозах препарат, как и другие нейрорептики, оказывает относительно мягкое действие на ЦНС, затрагивая в основном мотивационно-эмоциональную сферу.

К настоящему времени накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о ключевой роли дофамина, прежде всего D2/D3-рецепторов мозга, в патогенезе депрессивных нарушений у человека и животных [2, 3], а также в опосредовании терапевтического эффекта антидепрессантов, независимо от нейрорхимических механизмов их действия [4]. Для депрессии характерно снижение активности дофаминергической системы в центрах, связанных с подкреплением (прежде всего в *nucleus accumbens*) [5].

В наших предыдущих работах было выявлено, что однократно вводимый клебоприд в дозе 0,2 мг/кг вызывает значимое ослабление материнской мотивации и подавление компонентов родительского поведения самок белых крыс (“материнская депрессия”). Вместе с тем параллельного снижения двигательной и исследовательской активности животных не про-

исходило. Более высокая доза препарата (0,5 мг/кг) не только подавляла материнское поведение, но и уменьшала подвижность кормящих самок [6].

Субхроническое (4–6 дней) введение клебоприда в дозе 0,2 мг/кг вызывает более выраженное, чем однократные инъекции, ослабление родительской заботы (неопубликованные результаты). Имеющаяся в нашем распоряжении информация, а также данные литературы подтверждают представление о важном вкладе D2-рецепторов в развитие поведенческих проявлений послеродовой депрессии.

В представленном исследовании мы анализировали влияние малых доз повторно вводимого клебоприда на поведение взрослых самцов белых крыс в тестах на депрессивность, общую двигательную активность, тревожность и способность к обучению.

Объекты и методы

Работа выполнена на половозрелых самцах крыс линии Wistar ($n = 52$). Всего было проведено две серии экспериментов. В первой из них животные ($n = 25$) были разделены на 3 группы: контрольная (плацебо, 9 особей); экспериментальная группа, получавшая инъекции клебоприда в дозе 0,2 мг/кг (8 особей); экспериментальная группа, получавшая инъекции клебоприда в дозе 0,4 мг/кг (8 особей). Возраст животных составлял 3 месяца, средний вес —

* Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, лаборатория функциональной биохимии нервной системы, г. Москва.

300 г. У крыс оценивалось потребление сахарозы, а также поведение в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт”. Работа была выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Во второй серии крысы ($n = 27$) были разделены на 2 группы: контрольную (плацебо, 14 особей) и экспериментальную, получавшую инъекции препарата в дозе 0,4 мг/кг (13 особей). Возраст животных составлял 5–6 месяцев, средний вес — 450 г. Крысы обучались в “сложном лабиринте” с пищевым подкреплением. Серия была выполнена на базе Института ВНД и нейрофизиологии РАН.

Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Клебоприд (“Sigma Aldrich”) растворяли в физиологическом растворе; инъекции делали внутривенно инсулиновым шприцем в течение 2 недель немедленно после проведения поведенческого тестирования. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя (1 мл/кг).

Тест на потребление сахарозы используется для оценки одного из основных показателей депрессивности животных — ангедонии [7]. Крысу помещали на 15 мин в экспериментальную камеру, где регистрировали количество выпитой жидкости (20%-й раствор сахарозы). Животных не подвергали специальной процедуре пищевой или питьевой депривации. Тестирование проводили ежедневно в течение 11 дней.

Уровень двигательной активности и исследовательской деятельности крыс оценивали в “открытом поле”, представляющем собой круглую арену с высокими стенками и небольшими отверстиями — “норками” (“Открытая Наука”, Москва). Тест проводили со сменой освещенности по следующему протоколу: первые 3 мин — яркий свет, затем 1 мин — красный свет и 1 мин — яркий свет. В ходе наблюдений по минутно определяли горизонтальную (по количеству пересеченных секторов арены) и вертикальную (по количеству стоек) активность крыс, число выходов в центр арены, а также ряд других параметров [8].

Для определения баланса оборонительной и исследовательской мотиваций животных тестировали в “приподнятом крестообразном лабиринте” (“Открытая Наука”, Москва). В начале опыта крысу помещали в центр лабиринта, после чего ей предоставлялась возможность свободно перемещаться по двум затемненным (со стенками) и двум ярко освещенным (открытым) рукавам. Каждая крыса проводила в установке 5 мин. Регистрировали число стоек, умываний и затаиваний, количество выглядываний из темных рукавов, выходов на свет и ряд других параметров [8].

Обучение животных производили в “сложном лабиринте”, который представляет собой квадратную камеру, разделенную пятью параллельными прозрачными перегородками на 6 равных по ширине отсеков-коридоров. В каждой перегородке имеется пря-

моугольное отверстие [9]. Перед экспериментом животных подвергали 24-часовой пищевой депривации. Затем проводилась адаптация крыс к условиям эксперимента. В последующие 6 дней животное помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно, длительность каждой посадки не превышала 3 мин. В качестве подкрепления использовались стандартные сахарозные шарики (находились в самом удаленном отсеке). Регистрировали количество выполненных реакций (по числу найденных подкреплений), латентный период взятия подкрепления, латентный период выхода из стартового (ближайшего к экспериментатору) отсека и ряд других параметров. В дни опыта животных кормили один раз в сутки непосредственно после эксперимента.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программ Statistica V8.0 и MS Office Excel 2003. Вычисляли средние (AM) и ошибки средних (SEM) массивов данных. Статистический анализ реализовывался с использованием параметрических методов (t -критерий Стьюдента для независимых и зависимых выборок), непараметрических методов (критерии Манна—Уитни, χ^2 , Фишера), а также двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA).

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов был проведен тест на потребление сахарозы, направленный на оценку мотивационно-эмоционального состояния животных и выявление такого симптома депрессивных расстройств, как ангедония. Измерение количества потребляемой сахарозы начинали через трое суток после первой инъекции клебоприда, очередная инъекция производилась немедленно после тестирования. Значимые различия в количестве потребляемого раствора сахарозы между контрольной группой и группой, получавшей клебоприд в большей дозе, были зарегистрированы на 3-й день проведения теста, что соответствует 5 инъекциям D2-антагониста. Эти различия проявлялись, кроме того, в 4, 5, 6 и 8-й дни измерений (рис. 1, А). Применение ANOVA-метода показало, что различия в потреблении сахарозы являются достоверными в интервале с 3-го по 10-й день измерений. Также значимыми оказались различия по среднему количеству потребляемой сахарозы за период с 3-го по 10-й день суммарно (рис. 1, Б). В последние дни наблюдений эффекты становились недостоверны, что, по-видимому, связано с постепенным развитием толерантности к действию препарата.

Доза 0,2 мг/кг оказалась неэффективной для формирования депрессивноподобного состояния: ни в один из дней тестирования не зарегистрировано отличий от контрольной группы.

При тестировании животных в “открытом поле” через сутки после 7-й инъекции клебоприда были выявлены некоторые активирующие влияния, только меньшей дозы. Величина горизонтальной двигатель-

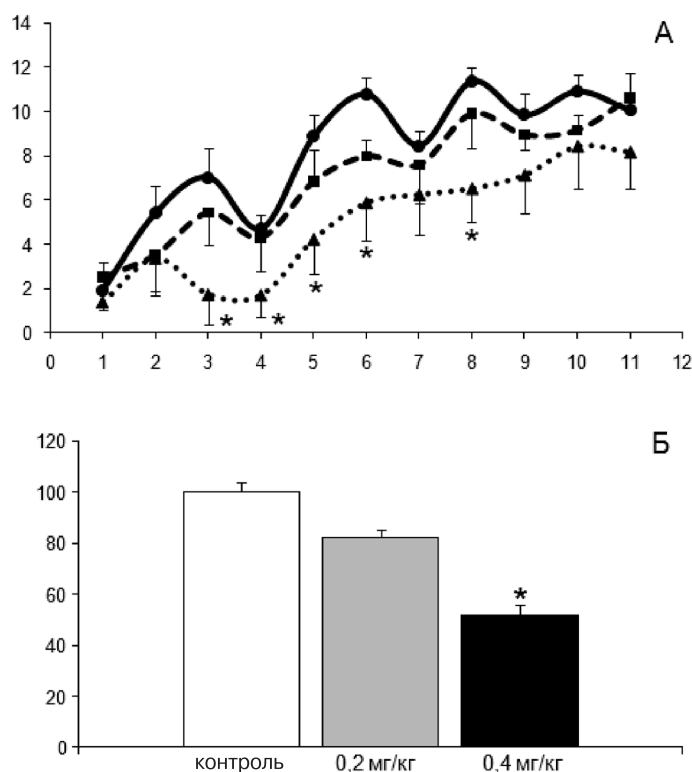


Рис. 1. Влияние клонидина на потребление раствора сахарозы самцами белых крыс.

А. Динамика потребления. По оси ординат — количество сахарозы в граммах ($AM \pm SEM$); по оси абсцисс — дни тестирования. Обозначения: сплошная линия — контрольная группа; прерывистая линия — группа, получавшая клонидин в дозе 0,2 мг/кг; пунктирная линия — группа, получавшая клонидин в дозе 0,4 мг/кг. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены * (по t-критерию Стьюдента).

Б. Среднее количество потребляемого раствора сахарозы в период с 3-го по 10-й день проведения теста. По оси ординат — процент от потребления в контрольной группе. Обозначения: белый цвет — контроль; серый цвет — группа, получавшая клонидин в дозе 0,2 мг/кг; черный цвет — группа, получавшая клонидин в дозе 0,4 мг/кг. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены * (по t-критерию Стьюдента).

ной активности суммарно за 5 мин тестирования в соответствующей группе оказалась достоверно больше по сравнению с контролем (рис. 2, А). Наиболее выраженные отличия зарегистрированы на 1-й (при ярком свете) и 4-й (при красном свете) минутах наблюдений ($p = 0,04$ по критерию Стьюдента). Кроме того, крысы, получавшие инъекции клонидина в дозе 0,2 мг/кг, совершали заметно больше выходов в центр арены: только 1 крыса из опытной группы не сделала ни одного выхода в центр, в то время как в контроле таких животных было 5 ($p = 0,06$ по критерию χ^2 ; рис. 2, Б).

По результатам тестирования в “приподнятом крестообразном лабиринте” для большей дозы препарата зарегистрирован некоторый анксиолитический эффект: снижение времени, проведенного в закрытых рукавах лабиринта, а также увеличение числа свешиваний с открытых лучей. В контрольной группе имелись 4 особи, которые за 5 мин тестирования

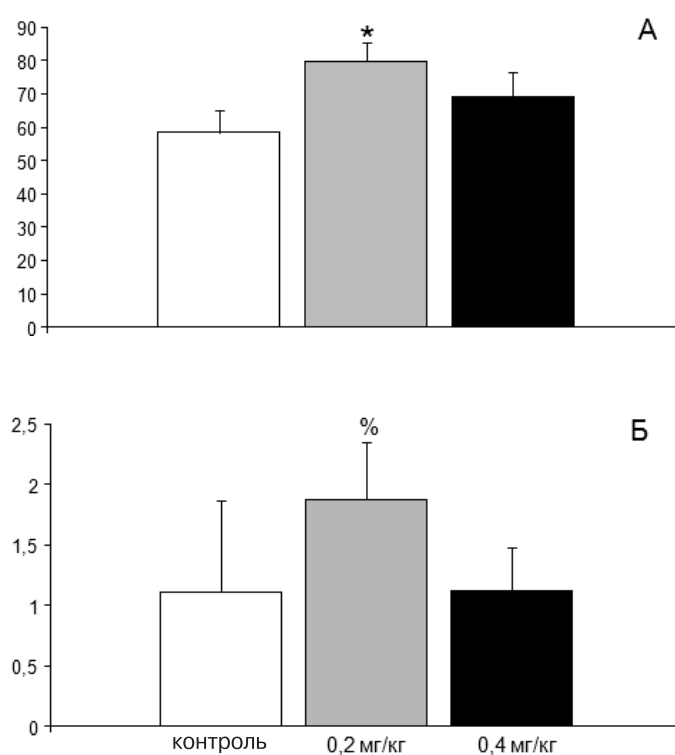


Рис. 2. Влияние клонидина на поведение животных в тесте “открытое поле” со сменой освещенности. По оси ординат — величина параметров.

Показано количество пересеченных секторов арены “открытого поля” (А) и число выходов в центр арены (Б) за 5 мин тестирования. Отличия от контроля с $p = 0,06$ отмечены % (по критерию χ^2). Остальные обозначения, как на рис. 1, Б

провели более 250 сек в закрытых рукавах лабиринта, в то время как в группе, получавшей клонидин в дозе 0,4 мг/кг, таких животных не было ($p = 0,03$ по критерию χ^2 ; рис. 3, А). Также в этой группе все крысы совершили хотя бы одно свешивание с открытых рукавов, тогда как в контроле оказалось 4 особи, которые не выполняли свешиваний ($p = 0,03$ по критерию χ^2 , рис. 3, Б).

Таким образом, в тесте на потребление сахарозы нами зарегистрирован продепрессантный эффект более высокой дозы препарата. В то же время в тестах “открытое поле” и “крестообразный приподнятый лабиринт” мы наблюдали определенное активирующее влияние клонидина, выражающееся в повышении двигательной активности и исследовательской мотивации крыс вместе с параллельным снижением уровня тревожности. Полученные результаты могут быть связаны с различиями в чувствительности отделов мозга к малым дозам антагонистов дофамина (в том числе с разной концентрацией в этих отделах D2-рецепторов в *nucleus accumbens*, стрио-паллидарной системе, гипоталамусе, новой коре). Следует также учитывать не только пост-, но и пресинаптическое действие нейролептиков (о чем будет сказано ниже).

Представленные данные хорошо соотносятся с влиянием клонидина на параметры материнского поведения самок белых крыс: у животных наблю-

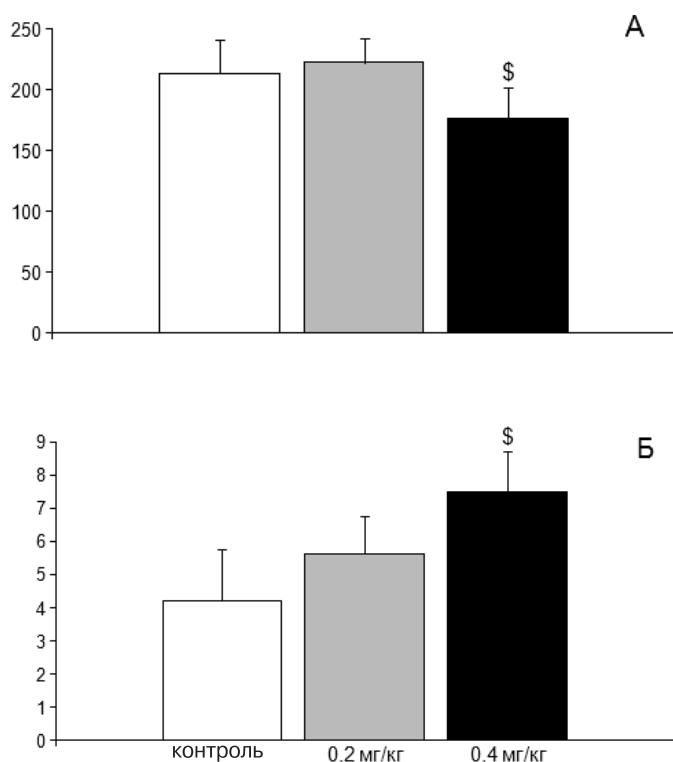


Рис. 3. Влияние клебоприда на поведение животных в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. По оси ординат — величина параметров.

Показано время, проведенное в закрытых рукавах лабиринта (А) и количество свешиваний с открытых рукавов (Б). Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены \$ (по критерию χ^2). Остальные обозначения, как на рис. 1, Б

далось снижение выраженности родительской мотивации (“материнская депрессия”) параллельно с ростом двигательной активности (неопубликованные результаты).

Во второй серии экспериментов было исследовано воздействие клебоприда в дозе 0,4 мг/кг на обучение. Выработка навыка в тесте “сложный лабиринт” с пищевым подкреплением была начата через сутки после 6-й инъекции D2-антагониста. Введение препарата продолжалось и в последующие дни.

Показано, что для взрослых крыс (возраст 5—6 мес) задача выработки пищевого навыка является сложной, и рост числа выполненных реакций происходит очень медленно. В результате к 6-му дню обучения лишь около 60% животных реализовывали условный пищевой рефлекс хотя бы 1 раз из 5 посадок. В предыдущих работах нами обнаружено, что детеныши крыс в возрасте 36—40 дней гораздо легче справляются с той же задачей: уже ко 2-му дню обучения примерно 90% из них реализуют условный пищевой навык не менее 4 раз из 5 посадок [9].

В 1—5-е дни обучения значимые межгрупповые различия отсутствовали. На 6-й день наблюдений выявлено определенное улучшение обучения в экспериментальной группе. Число выполненных реакций в случае животных, получавших клебоприд, составило почти 150% от величины показателя в контроле (рис. 4, А). При этом 4 крысы экспериментальной группы достигли подкрепления во всех 5 попытках, в то время как в контроле таких животных не было ($p = 0,02$ по критерию χ^2). После введения клебоприда время выполнения реакции на 6-й день обучения оказалось ниже: 5 крыс из экспериментальной группы стабильно решали задачу быстрее, чем за 100 сек; в контрольной группе таких особей не было ($p = 0,01$ по критерию χ^2). Кроме того, в экспериментальной группе был значимо снижен латентный период выхода из стартового отсека (рис. 4, Б).

Таким образом, в последний день обучения нами зарегистрировано положительное влияние клебоприда на процесс выработки пищевого навыка. Напомним, что сходные активирующие эффекты препарата в первой серии экспериментов выявлены в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт”. Из литературы известно подобное парадоксальное действие низких доз нейролептиков. Его механизмы обусловлены пресинаптическими эффектами D2-антагонистов, способных выключать ауторецепторы дофамина. Ауторецепторы, как известно, тормозят выделение дофамина, и результатом их блокады является активация дофаминергических синапсов [10].

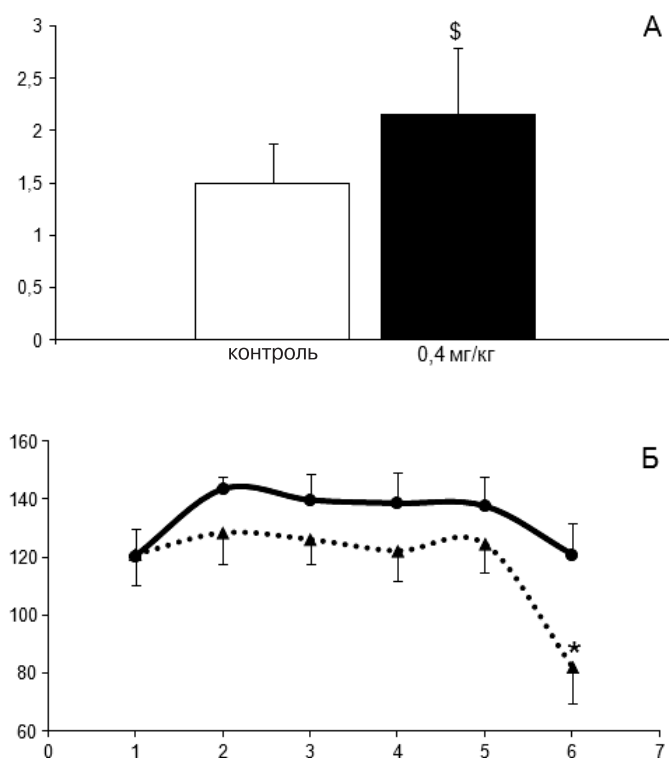


Рис. 4. Влияние клебоприда на обучение крыс в экспериментальной установке “сложный лабиринт” с пищевым подкреплением. А. Количество выполненных реакций на 6-й день тестирования. По вертикали — величина параметра. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены \$ (по критерию χ^2).

Б. Динамика латентного периода выхода из стартового отсека (сек). По оси ординат — сек; по оси абсцисс — дни тестирования. Отличия от контроля с $p < 0,05$ отмечены * (по t-критерию Стьюдента). Остальные обозначения, как на рис. 1, А

Зарегистрированное нами активирующее действие клебоприда может быть также связано с включением компенсаторных процессов в мозге животных. Известно, что при резкой отмене нейролептиков у пациентов наблюдаются яркие психотические симптомы, что связано с усилением дофаминергической передачи. Хроническое введение нейролептиков (несколько недель) увеличивает синтез дофамина и количество постсинаптических рецепторов к нему [11]. Обратные эффекты вызывают психомоторные стимуляторы: при их длительном введении количество дофамина в мозге снижается [12].

Полученные нами результаты способствуют более глубокому пониманию функций дофамина в процессах обучения и формирования памяти, позволяют объяснить целый ряд парадоксальных эффектов нейролептиков, наблюдаемых в клинической практике. Вместе с тем нами показано, что повторное введение даже низких доз D2-антагониста может вызывать депрессивноподобные симптомы (по крайней мере в тесте на потребление сахарозы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Byrnes E.M., Ughrin Y., Bruno J.P. Developmental plasticity in the D1- and D2-mediation of motor behavior in rats depleted of dopamine as neonates // *Dev. Psychobiol.* 1996. Vol. 29. N 8. P. 653–666.
2. D'Haen H., Bossuyt A. Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography // *Biol. Psych.* 1994. Vol. 35. N 2. P. 128–132.
3. Drago F., Arezzi A., Vitzl A. Effects of acute or chronic administration of substituted benzamides in experimental models of depression in rats // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2000. Vol. 10. N 6. P. 437–442.
4. D'Aquila P.S., Collu M., Gessa G.L., Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. Vol. 405. N 1–3. P. 365–373.
5. Sarkisova K., van Luijckelaar G. The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011. Vol. 35 N 4. P. 854–876.
6. Добрякова Ю.В., Дубынин В.А., Ван Луийтелаар Ж. Материнское поведение крыс линии WAG/Rij в норме и при действии на дофаминергическую систему мозга // *Журн. высш. нервн. деят.* 2010. Т. 60. № 3. С. 372–380.
7. Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Шацкова А.Б. Тревожны ли крысы линии WAG/Rij с генетической absence-

Выводы

1. Показано, что хроническое введение клебоприда в дозе 0,4 мг/кг, не снижающей двигательную активность, вызывает падение потребления сахарозы животными, что можно расценить как продепрессантный эффект, проявляющийся в форме ангедонии. Механизм его развития, по всей вероятности, обусловлен снижением интенсивности дофаминергической передачи в мозговых центрах, связанных с подкреплением.

2. Повторное введение клебоприда привело к повышению двигательной и исследовательской активности крыс (доза 0,2 мг/кг); снижению уровня тревожности и некоторому улучшению обучения с пищевым подкреплением (доза 0,4 мг/кг). Вероятно, активирующие эффекты препарата связаны с его пресинаптическим действием, а также с развитием (в ответ на хроническое применение) компенсаторных процессов в мозге животных.

эпилепсией? // *Журн. высш. нервн. деят.* 2005. Т. 55. № 2. С. 241–249.

8. Дубынин В.А., Каменский А.А. Бета-казоморфины и их роль в регуляции поведения. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 306 с.

9. Беляева Ю.А., Дубынин В.А., Стоволосов И.С., Добрякова Ю.В., Беспалова Ж.Д., Каменский А.А. Влияние однократного и хронического введения экзорфина С на поведение и обучение детенышей белых крыс // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология.* 2009. № 2. С. 13–18.

10. Benoit-Marand M., Borrelli E., Gonon F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo // *J. Neurosci.* 2001. Vol. 21. N 23. P. 9134–9141.

11. Wasti A., Siddiqui N.A. Alterations in the level of neurotransmitters associated with the chronic treatment of antipsychotic drugs // *J. Pak. Med. Assoc.* 2010. Vol. 60. N 8. P. 628–632.

12. Lee J., Parish C.L., Tomas D., Horne K. Chronic cocaine administration reduces striatal dopamine terminal density and striatal dopamine release which leads to drug-seeking behaviour // *Neuroscience.* 2011. Vol. 174. P. 143–150.

Поступила в редакцию
13.09.12

EFFECTS OF CHRONICAL INJECTIONS OF CLEBOPRIDE IN LOW DOSES ON BEHAVIOR REACTIONS OF WHITE RATS

A.V. Malyshev, A.M. Zakharov, K.Yu. Sarkisova, V.A. Dubynin

Effects of the selective D2-receptors antagonist clebopride on behavior of adult males rats was studied in such tests as sucrose consumption, "open field", "elevated plus maze" and "complex maze" with a food reinforcement. The drug was injected in small doses (0,2 and 0,4 mg/kg) chronically within two weeks. It was shown that clebopride may have an influence on emotionally-motivational

state of experimental animals, on the one hand, causing depressive-like changes, and on the other — improve learning ability and research behavior. A variety of consequences of D2-antagonist action is caused, apparently, by a competition of its post- and presynaptic effects.

Key words: *dopamine brain system, clebopride, behavior, depression, learning.*

Сведения об авторах

Мальшев Антон Викторович — аспирант 1-го года обучения биологического факультета МГУ, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов. Тел.: 8-916-51-38-707; e-mail: malyshev89@gmail.com

Захаров Антон Михайлович — студент 5-го курса биологического факультета МГУ, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория общей физиологии и регуляторных пептидов. Тел.: 8-916-81-36-100; e-mail: zam1561@yandex.ru

Саркисова Карине Юрьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (ИВНД и НФ РАН). Тел.: 8-903-01-35-750; e-mail: karine@online.ru

Дубынин Вячеслав Альбертович — докт. биол. наук., проф. кафедры физиологии человека и животных, лаборатории общей физиологии и регуляторных пептидов биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-14-48-611; e-mail: dva-msu@yandex.ru