

Р.А. Томиленко, Н.И. Дубровина

ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ВЛИЯНИЯ ДИЗОЦИЛПИНА НА ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ОБУЧЕНИЕ У НИЗКО- И ВЫСОКОТРЕВОЖНЫХ МЫШЕЙ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

Изучали зависимость выработки пространственного навыка от уровня исходной тревожности мышей и влияние блокады N-метил-D-аспартатных (NMDA) рецепторов. По времени нахождения на открытых рукавах и центре приподнятого крестообразного лабиринта мыши были классифицированы как высоко- и низкотревожные. Низкотревожные мыши оказались не способными к обучению навигационному рефлексу в отличие от высокотревожных, у которых пространственная память сохранялась 2 суток. Антагонист NMDA рецепторов дизоцилпин в дозе 0,15 мг/кг улучшал формирование пространственного навыка у низкотревожных мышей и ухудшал у высокотревожных.

Ключевые слова: пространственная память, тревожность, NMDA рецепторы, мыши

Для приспособления организма к окружающей среде важной является способность ориентироваться в пространстве, в значительной степени зависящая от адекватных соотношений пространственной памяти и тревожности. Тревожность как эмоциональное предчувствие опасности может быть защитной реакцией или причиной стрессовых нарушений психоэмоционального состояния. При анализе пространственной памяти мышей наиболее часто используемым когнитивным тестом является водный лабиринт [2, 5, 7, 11]. Пространственное обучение в водном лабиринте — это ассоциативный процесс, заключающийся в приобретении связей между маркерами обстановки и местом локализации платформы [12]. Выработка пространственного навыка сочетает формирование активной реакции избегания от водной среды и умение ориентироваться в пространстве и позволяет раздельно исследовать процессы обучения и памяти.

Многочисленными экспериментами показана значимая роль возраста, особенностей поведения мышей различных линий в пространственной памяти [5, 6, 7, 11]. Исследования зависимости пространственной памяти от уровня тревожности фрагментарны и противоречивы. В частности, у мышей линии SAMP8 (модель болезни Альцгеймера) с повышенной тревожностью плохо вырабатывался навык нахождения спасательной платформы [6]. В то же время есть данные, полученные в экспериментах на мышах разных линий, что лишь у низкотревожных особей нарушено обучение пространственному навыку в водном лабиринте [5, 18]. Достаточно доказательств с ис-

пользованием разных экспериментальных подходов (мышь с генетическим нокаутом, многократные болевые воздействия в детстве, социальная изоляция) независимости когнитивной способности к пространственному обучению от уровня тревожности [8, 13]. Важной характеристикой памяти является сохранность ее воспроизведения в течение времени, и для ее оценки широко используется подход с угашением выработанного навыка. Нами в модели условной реакции пассивного избегания показана избирательность угашения у мышей с разным уровнем тревожности [1]. Угашению пространственной памяти посвящено лишь несколько исследований [9, 12], а о связи его с индивидуальными особенностями поведения работ нет.

В регуляции тревожности и пространственной памяти важная роль отводится глутаматовым рецепторам N-метил-D-аспартатного (NMDA) типа. Существуют экспериментальные свидетельства выраженной анксиолитической активности [17, 18] и дефицита пространственной памяти [4, 7, 16] при блокаде NMDA рецепторов.

Однако остается невыясненным существенный вопрос — избирательны ли эффекты блокады NMDA рецепторов у мышей с разным уровнем тревожности на процессы обучения и угашения пространственной памяти, что и стало целью данной работы.

Методика

Эксперименты проводили на 47 мышах — самцах линии C57BL/6J в возрасте 3-3,5 мес., массой 22-27 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и

воде. Опыты проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755), одобренных комитетом по биомедицинской этике ГУ НИИ физиологии СО РАМН.

Уровень тревожности определялся в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, состоящего из двух закрытых и двух открытых рукавов. Мышь помещали в центр лабиринта носом к закрытому рукаву. Анализировали следующие показатели: время нахождения на открытых рукавах и в центре, число выходов на открытые рукава и свешиваний с них, количество выглядываний из закрытых рукавов, переходов из одного закрытого рукава в другой, вертикальных стоек и уровень дефекации в течение 5 мин теста.

Для анализа пространственной памяти использовали прямоугольный бассейн длиной 60 см, шириной 30 см и высотой 45 см, заполненный водой до 22 см [2]. Площадь бассейна условно делилась на три равных сектора. Спасательная платформа была диаметром 5 см. Температура воды в бассейне составляла 21-23 °С. Использовали пространственную версию, когда от мыши требовалось локализовать скрытую платформу в бассейне, вода которого забелелась молоком. Во время эксперимента каждая мышь видела стимулы окружающей обстановки, которые служили маркерами для пространственного ориентирования в бассейне при нахождении скрытой платформы. Экспериментатор также был в поле зрения мыши,

находясь в одной и той же позиции в течение пробы. Обучение включало 8 одноминутных сеансов по 4 в день с интервалом между сеансами 30-40 мин и затем следовало угашение из 4 ежедневных тестов без платформы. Анализировали латентный период нахождения платформы и время «пассивного дрейфа».

Оценивали влияние блокады NMDA рецепторов на обучение и угашение пространственного навыка у высоко- и низкотревожных мышей. Использовали диэтилолпипин (МК-801, «Sigma», США) — блокатор ионных каналов NMDA рецепторов в дозе 0,15 мг/кг. Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально в объеме 0,2 мл на мышь за 1 час до 1-го и 5-го сеансов выработки навигационного рефлекса. Контрольным мышам вводили физиологический раствор. Были выделены 2 группы низкотревожных (n=9 — контроль и n=15 — с препаратом) и 2 группы высокотревожных (n=11 — контроль и n=12 — с препаратом) мышей.

Результаты обработаны статистически с применением однофакторного и двухфакторного ANOVA с последующими плановыми множественными сравнениями.

Результаты и обсуждение

По результатам тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте мыши были разделены на высокотревожных, находившихся на открытых рукавах и в центре от 0 до 60 с (n=23) и низкотревожных (n=24) — с временем > 60 с (Рис. 1). Высокотревожные мыши с малым временем пребывания на открытых рукавах и в цен-

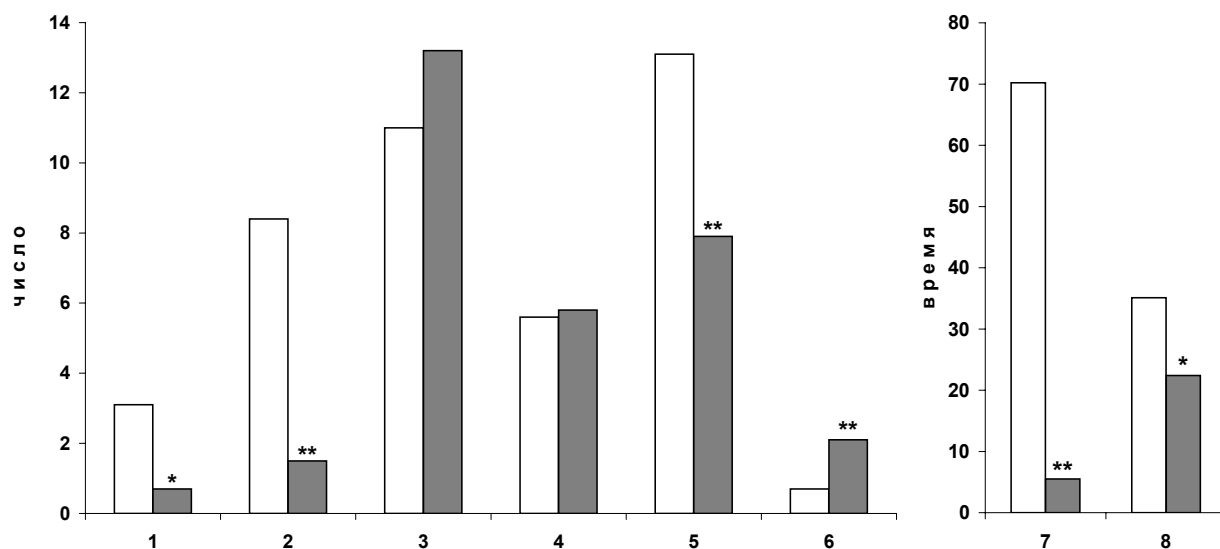


Рис. 1. Характеристики поведения низкотревожных (светлые столбцы) и высокотревожных (темные столбцы) мышей в приподнятом крестообразном лабиринте

1 — выходы на открытые рукава; 2 — свешивания с открытых рукавов; 3 — вертикальные стойки; 4 — переходы из одного темного рукава в другой; 5 — выглядывания из закрытых рукавов; 6 — уровень дефекации; 7 — время на открытых рукавах; 8 — время в центре. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ достоверность межгрупповых отличий

Таблица

Процент мышей с эпизодами «пассивного дрейфа»

Группы	Сеансы обучения								Тесты			
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4
1	33	65	33	22	22	22	22	22	33	22	44	66
2	18	36	55	73	36	55	55	45	64	73	73	82
3	20	7	13	13	13	13	20	20	13	33	20	40
4	8	8	17	8	23	17	17	8	42	58	42	50

тре характеризовались значимо меньшим числом посещений открытых рукавов, свешиваний с них, выглядываний из закрытых рукавов, но более высоким уровнем дефекаций ($p < 0,05$). Показатели вертикальной (число вертикальных стоек) и горизонтальной (число переходов) активности были сходны у особей обеих групп.

Данные по динамике времени нахождения скрытой платформы и «пассивному дрейфу» контрольными низко- и высокотренируемыми мышами представлены на рисунке 2. Отчетливо видно, что низкотренируемые мыши были не способны к выработке навигационного рефлекса, что отразилось в высоких значениях времени поиска скрытой платформы. При этом 40% таких особей не могли идентифицировать местоположение спасательной платформы в течение всей обучающей процедуры, несмотря на принудительную высадку на нее. В отличие от низкотренируемых мышей, у высокотренируемых время выполнения задачи

существенно снижалось в процессе обучения и, начиная с 5-го сеанса, достоверно отличалось от значения в 1-ом сеансе (Рис. 2А). Выработанный пространственный навык сохранялся 2 суток, затем наступало угашение рефлекса, отразившееся в достоверном росте времени посещения «целевого» отсека (местоположение платформы при обучении). Анализ показателя «пассивного дрейфа» при всей вариативности его динамики показал преобладание его в поведении высокотренируемых мышей (Рис. 2Б). Этот факт доказан значимостью факторов группы ($F_{1,18} = 7,15$, $p < 0,02$), сеансов ($F_{11,198} = 4,25$, $p < 0,001$) и взаимодействия этих факторов ($F_{11,198} = 2,22$, $p < 0,02$). И еще более отчетливо он выражен при анализе процентного соотношения мышей с эпизодами «пассивного дрейфа» (Таблица).

Полученные нами данные о плохой выработке навигационного рефлекса мышами с исходной низкой тревожностью подтверждают таковые, полученные на мышах селективных линий — с повышенной экспрессией 5-HT_{1A} серотониновых рецепторов [18] и линии СЗН/Не [5]. Такой дефект может быть обусловлен сочетанием использования низкотренируемыми мышами неэффективной пространственной стратегии поиска спасательной платформы и нарушения реагирования в ситуации водного стресса. Они могли воспринимать ситуацию как неизбежную и легко отвлекаться незначимыми для целенаправленного поведения стимулами. Способность же приобретения навыка высокотренируемыми мышами связана, по-видимому, с их лучшей ориентацией в пространстве, основанной на формировании более четких связей между внешними маркерами и местом положения спасательной платформы. Не исключено также, что у них сильнее мотивация избегания негативной ситуации водного пространства.

При этом не совсем ясно, почему именно у обучающихся высокотренируемых мышей мы регистрировали преобладание эпизодов «пассивного дрейфа» во время сеансов обучения, так как этот показатель коррелировал с нарушением пространственной памяти у крыс Крушинского-Молодкиной [3] и крыс с высоким уровнем неподвижности в тесте принудительного плавания [15]. Объяснение этому, вероятно, кроется в ви-

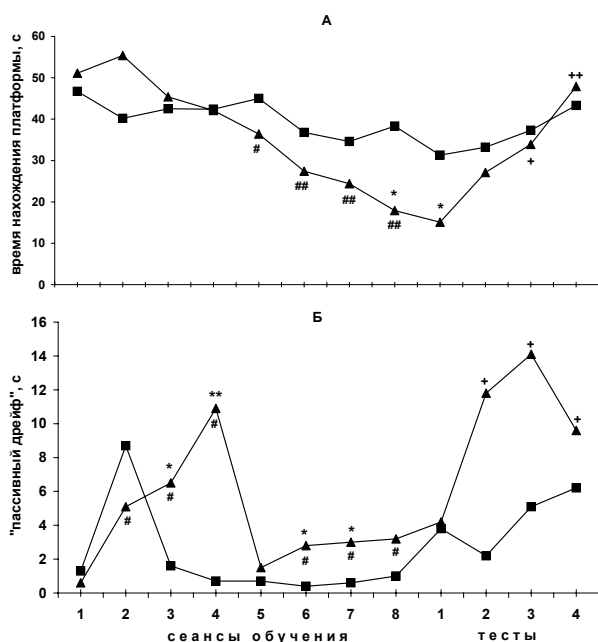


Рис. 2. Динамика пространственного обучения и угашения низкотренируемых (квадраты) и высокотренируемых (треугольники) мышей. А — латентный период нахождения скрытой платформы; Б — «пассивный дрейф».

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ достоверность межгрупповых отличий; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,001$ достоверность различий по сравнению с 1-м сеансом; + — $p < 0,05$; ++ — $p < 0,001$ достоверность различий по сравнению с 1-м тестом

довых особенностях выработки адекватной стратегии поиска мышей и крыс [11] или отмечаемой независимости пространственной памяти от повышенной тревожности и появления эпизодов «пассивного дрейфа» у нокаутных по аденозиновым A1 рецепторам мышей [8].

При угашении пространственного навыка повторное тестирование без платформы приводило у высокотревожных мышей к закономерному росту латентного периода нахождения «целевого» места, где была локализована платформа при обучении, и «пассивного дрейфа» (Рис. 2А, Б). Угашение поведения избавления в водном лабиринте, обусловленное удалением платформы, по мнению некоторых исследователей [9], заключается в возникновении негативного состояния и включает развитие неподвижности как отражение беспомощности или «поведенческого отчаяния». Однако угашение можно рассматривать и как процесс нового обучения, формирования новых ассоциаций, когда внешние маркеры уже не указывают на местоположение спасательной платформы [12], и тогда «пассивный дрейф» служит защитным механизмом сохранения энергии. Неизменность обоих показателей при выработке и угашении навигационного рефлекс у низкотревожных мышей свидетельствует о дефиците ассоциативных процессов и случайной стратегии поиска выхода из аверсивной ситуации водного бассейна.

На рисунке 3 представлены результаты анализа влияния антагониста NMDA рецепторов

диэтилопилона в дозе 0,15 мг/кг на формирование и угашение пространственной памяти низкотревожных мышей. Под воздействием диэтилопилона низкотревожные мыши к концу периода обучения (8-й сеанс) находили платформу с латентным периодом 20 ± 3 с в отличие от контроля. Влияние препарата на угашение сохранялось при 1-ом и 2-ом тестированиях. Изменений показателя «пассивного дрейфа» при введении диэтилопилона не регистрировалось.

У высокотревожных мышей диэтилопилон тормозил формирование пространственного навыка, что видно по задержке снижения латентного периода нахождения спасательной платформы во время обучения — в контроле достоверные отличия от значений 1-го сеанса выявлены уже при 5-ом сеансе, а у диэтилопилинизированных — только при 7-ом (Рис. 4А). Более того, диэтилопилон снижал эффективность обучения, как показано общим ANOVA (достоверность факторов группы — $F_{1,21}=8,69$, $p<0,008$ и сеансов — $F_{11,231}=20,18$, $p<0,001$) и плановыми сравнениями. Угашение навыка у диэтилопилинизированных высокотревожных мышей по характеру было сходно с контрольными особями. Что касается показателя «пассивного дрейфа», то диэтилопилон блокировал появление этих эпизодов при обучении, хотя при угашении навыка они отчетливо регистрировались (Рис. 4Б).

Принципиальным результатом нейрофармакологического анализа была обнаруженная из-

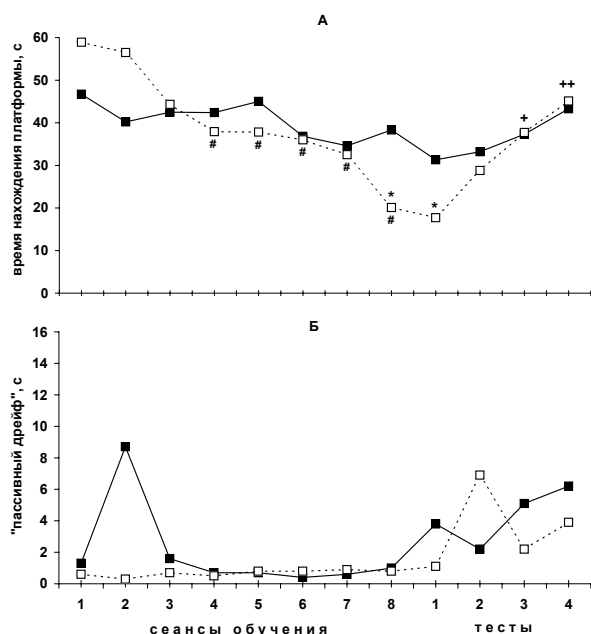


Рис. 3. Влияние блокады NMDA рецепторов на формирование пространственного навыка низкотревожных мышей.

Сплошная линия — контроль; пунктирная — диэтилопилон в дозе 0,15 мг/кг. Остальные обозначения как на рис. 2

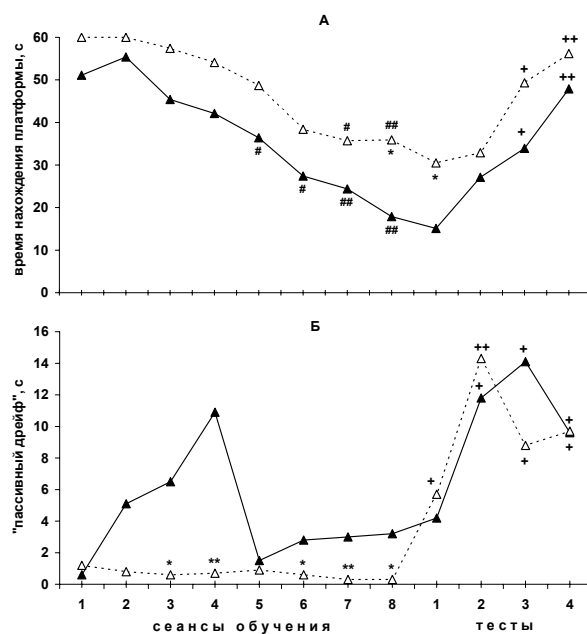


Рис. 4. Влияние блокады NMDA рецепторов на формирование пространственного навыка высокотревожных мышей.

Сплошная линия — контроль; пунктирная — диэтилопилон в дозе 0,15 мг/кг. Остальные обозначения как на рис. 2

бирательность влияний антагониста NMDA рецепторов на обучение пространственному навыку у мышей с разным уровнем тревожности. В мировой литературе отмечалось преимущественно угнетающее пространственную память влияние дизоцилпина [4, 7, 16] и лишь в одной работе регистрировалось улучшение при использовании антагонистов NMDA рецепторов в низких дозах [14]. Однако ни в одном исследовании не акцентировалось внимание на зависимость эффектов от тревожности.

Мы в одинаковых экспериментальных условиях зарегистрировали значимое ухудшение пространственного обучения у высокотренируемых и облегчение — у низкотренируемых мышей. Некоторые авторы [7] предполагают, что дефицит выработки навигационного рефлекса под действием дизоцилпина обусловлен вызванной препаратом гиперактивностью скорее, чем нарушением пространственного обучения. Действительно, мы обнаружили снижение эпизодов «пассивного дрейфа» при обучении у высокотренируемых мышей, однако корреляций с латентным периодом нахождения платформы не было. Этот факт скорее свидетельствует лишь о стимуляции двигательной активности, не связанной с изменениями процесса обучения. Подтверждением независимости пространственного обучения от моторного компонента служит улучшение выработки навигационного рефлекса у дизоцилпининъектированных низкотренируемых мышей, который не сопровождается модификациями «пассивного дрейфа».

Избирательность влияния блокады NMDA рецепторов у мышей с исходно разным тревожным поведением может быть следствием дифференцированных изменений ситуативной тревожности при выработке навигационного рефлекса под действием дизоцилпина. При анализе такой возможности приходится констатировать, что это маловероятно, так как у дизоцилпина доминирует анксиолитический эффект [17, 18], а изменения обучения были различны. Известно также дизоцилпинвызванное нарушение внимания к окружающим стимулам и сенсомоторного сопряжения, что послужило основой разработки фармакологической модели шизофрении при блокаде NMDA рецепторов [10]. Однако выявленное в данной работе разнонаправленное влияние этого препарата на пространственное обучение высоко- и низкотренируемых особей не позволяет рассматривать такие эффекты, как причину избирательности. Исходя из этого нам представляется, что дифференцированное влияние дизоцилпина у низко- и высокотренируемых мышей связано с изменением ассоциативных процессов во время

обучения, то есть непосредственно с формированием следа пространственной памяти.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать выводы о зависимости формирования навигационного рефлекса от исходного уровня тревожности и избирательности влияния блокады NMDA рецепторов у высоко- и низкотренируемых мышей.

SELECTIVITY OF DIZOCILPINE EFFECTS ON SPATIAL MEMORY IN LOW-ANXIOUS AND HIGH-ANXIOUS MICE

R. A. Tomilenko, N. I. Dubrovina

Dependence of spatial memory on a level of mice initial anxiety and influence of blockade of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors were investigated. Mice were classified as high- and low-anxious by time spent in the open area of the elevated plus-maze. The low-anxious mice have appeared not to be capable of learning to navigational reflex in difference from high-anxious ones in which spatial memory was evident for 2 days. Antagonist of NMDA receptors dizocilpine in the of dose 0,15 mg/kg improved spatial learning in low-anxious mice and impaired — in high-anxious mice.

Литература

1. Дубровина Н.И. Особенности угашения условной реакции пассивного избегания мышей с разным уровнем тревожности / Н.И. Дубровина, Р.А. Томиленко // Рос. физиол. журн. — 2005. — Т. 52. — № 9. — С. 1013-1020.
2. Нарушение пространственной памяти у мышей под влиянием агроклавина / Н.В. Бобкова, Н.И. Медвинская, И.В. Нестерова, М.У. Аринбасаров // Журн. высш. нервн. деят. — 2002. — Т. 52. — № 2. — С. 183-188.
3. Поведение в водном тесте Морриса крыс линии Крушинского-Молодкиной, селектированных на повышенную судорожную готовность / М.Г. Плещачева, З.А. Зорина, Д.Л. Николенко и др. // Журн. высш. нервн. деят. — 2002. — Т. 52. — № 3. — С. 356-365.
4. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat / M. Ahlander, I. Misane, P.A. Schott, S.O. Ogren // Neuropsychopharmacology. — 1999. — Vol. 21. — № 3. — P. 414-426.
5. Behavioural profiles of inbred mouse strains used as transgenic backgrounds. II: cognitive tests / S.P. Brooks, T. Pask, L. Jones, S.B. Dunnett // Genes Brain Behav. — 2005. — Vol. 4. — № 5 — P. 307-317.
6. Brandewiede J. Ethological analysis of the senescence-accelerated P/8 mouse / J. Brandewiede, M. Schachner, F. Morellini // Behav. Brain Res. — 2005. — Vol. 158. — № 1. — P. 109-121.
7. D'Hooge R. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory / R. D'Hooge, P.P. De Deyn // Brain Res. Brain Res. Rev. — 2001. — Vol. 36. — № 1. — P. 60-90.

8. Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice / U.E. Lang, F. Lang, K. Richter et al. // *Behav. Brain Res.* — 2003. — Vol. 145. — № 1-2. — P. 179-188.
9. Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: a possible model for depression? / D. Schulz, B. Topic, M.A. De Souza Silva, J.P. Huston // *Neurobiol. Learn. Mem.* — 2004. — Vol. 82. — № 2. — P. 128-141.
10. *Farber N.B.* The NMDA receptor hypofunction model of psychosis / N.B. Farber // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2003. — Vol. 1003. — P. 119-130.
11. *Jonasson Z.* Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data / Z. Jonasson // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2005. — Vol. 28. — № 8. — P. 811-825.
12. *Lattal K.M.* Extinction, renewal, and spontaneous recovery of a spatial preference in the water maze / K.M. Lattal, M.T. Mullen, T. Abel // *Behav. Neurosci.* — 2003. — Vol. 117. — № 5. — P. 1017-1028.
13. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences / V. Voikar, A. Polus, E. Vasar, H. Rauvala // *Genes Brain Behav.* — 2005. — Vol. 4. — № 4. — P. 240-252.
14. *Mondadori C.* NMDA — receptor blockers facilitate and impair learning via different mechanisms / C. Mondadori, L. Weiskrantz // *Behav. Neural. Biol.* — 1993. — Vol. 60. — P. 205-210.
15. *Naudon L.* Opposite behaviours in the forced swimming test are linked to differences in spatial working memory performance in the rat / L. Naudon, T.M. Jay // *Neuroscience.* — 2005. — Vol. 130. — № 2. — P. 285-293.
16. Parallel recovery of MK-801-induced spatial learning impairment and neuronal injury in male mice / G. Brosnan-Walters, D.F. Wazniak, A. Nardi, J.W. Olney // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1999. — Vol. 62. — P. 111-117.
17. *Rorick-Kehn L.M.* Pharmacological characterization of stress-induced hyperthermia in DBA/2 mice using metabotropic and ionotropic glutamate receptor ligands / L.M. Rorick-Kehn, J.C. Hart, D.L. McKinzie // *Psychopharmacology.* — 2005. — Vol. 183. — № 2. — P. 226-240.
18. Transient overexpression of the 5-HT_{1A} receptor impairs water-maze but not hole-board performance / B. Bert, E. Dere, N. Wilhelmi et al. // *Neurobiol. Learn. Mem.* — 2005. — Vol. 84. — № 1. — P. 57-68.