

КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В ГИППОКАМПЕ С ПОМОЩЬЮ НЕЙРОТОКСИКАНТА ХЛОРИДА ТРИМЕТИЛОЛОВА

Першина Е.В.^{1,2}, Архипов В.И.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино;

²Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, e-mail: pershina-ev@mail.ru

Водорастворимый нейротоксикант хлорид триметиллолова (ТМТ) вызывает у млекопитающих значительные повреждения мозга, преимущественно в гиппокампе, что сопровождается расстройством различных форм поведения, а также провоцирует судорожную активность. В работе изучали влияние однократной инъекции хлорида триметиллолова (ТМТ) в дозе 7,5 мг/кг на обучение крыс в лабиринте с четырьмя целевыми полками. Для предотвращения возникновения судорог через 24 и 48 часов после ТМТ крысам дважды вводили пентобарбитал (25 мг/кг, в/б). Выработку реакции чередования у крыс начинали через одну неделю после инъекции ТМТ. Результаты показали, что обучение животных опытной и контрольной групп не различались. Однако после изменения экспериментальных условий, когда одна из подкрепляемых полок была заменена на другую, поведение крыс опытной группы заметно отличалось от контроля: они с трудом подавляли реакцию к неподкрепляемой полке, совершая больше ошибок. Снижение способности животных к переучиванию и дефекты ориентировочного рефлекса подтверждают преимущественное повреждение гиппокампа после однократного системного введения ТМТ.

Ключевые слова: хлорид триметиллолова, нейротоксичность, гиппокамп, обучение и память.

COGNITIVE IMPAIRMENT IN RATS AT MODELING OF NEURODEGENERATION IN THE HIPPOCAMPUS BY USING NEUROTOXICANT TRIMETHYL TIN CHLORIDE

Pershina E.V.^{1,2}, Arkhipov V.I.^{1,2}

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino;

²Pushchino State Institute of Natural Science, Pushchino, e-mail: pershina-ev@mail.ru

The water-soluble neurotoxicant trimethyltin chloride (TMT) causes significant damage to the brain of mammals, especially in the hippocampus, which is accompanied by disorder of behavior, as well as provoking seizure activity. It was studied the effect of a single injection of trimethyltin chloride (TMT) at a dose of 7.5 mg/kg on the learning of rats in a maze with four targets shelves. To prevent seizures, 24 and 48 hours after TMT rats were administered twice with pentobarbital (25 mg/kg, i/p). Learning of alternation reaction in rats was started one week after injection of the TMT. The results showed that animal's training in experimental and control groups did not differed. However, after the change of reinforcement order, when one of the reinforced shelves was replaced by another, the behavior of the rats of the experimental group were significantly different from control: they could hardly inhibits the response to the non-reinforced shelf, making more mistakes. The reduced ability of animals to the retraining, and revealed defects of orienting reflex confirm preferential damage to the hippocampus after a single systemic administration of TMT.

Keywords: trimethyltin chloride, neurotoxicity, hippocampus, learning and memory.

Хлорид триметиллолова (ТМТ) является нейротоксикантом, применяющимся в производстве и сельском хозяйстве [7]. Экспериментальные исследования на животных, предпринятые с целью выяснения механизмов действия ТМТ, показали, что вещество вызывает ряд патологических явлений в центральной нервной системе: расширение боковых желудочков, отек мозга, нейродегенерацию [3, 4]. Способность ТМТ вызывать нейрональную гибель в отдельных областях мозга дает возможность использовать этот нейротоксикант в качестве экспериментальной модели, позволяющей изучать клеточно-

молекулярные механизмы нейродегенерации, намечать подходы для создания новых нейропротективных средств [2]. Использование ТМТ в качестве инструмента нейродегенерации дает несколько преимуществ: 1) известны повреждаемые области мозга, клеточные мишени и динамика нейродегенерации; 2) гематоэнцефалический барьер не претерпевает существенных изменений, что ограничивает вклад периферических факторов в механизмы нейротоксичности; 3) известные белковые и мРНК-маркеры могут быть использованы в качестве положительного контроля при изучении экспрессии генов, связанной с действием ТМТ. Первичной мишенью действия ТМТ на нейроны являются, по-видимому, митохондрии, в частности, локализованный на внешней мембране высоко консервативный мембранно-связанный белок станнин (stannin). Как при действии и других нейротоксинов, наблюдается активация циклооксигеназ, провоспалительных цитокинов, индукторов апоптоза, нарушение кальциевого обмена, что свидетельствует о развитии окислительного стресса, эксайтотоксичности, нейровоспаления [2, 4].

Важная особенность действия ТМТ заключается в спонтанном восстановлении и нормализации некоторых функций мозга, например, показано, что возникающая судорожная активность у крыс исчезает через 2–3 недели после инъекции нейротоксиканта [4]. Рассматривая характер поведенческих нарушений, вызванных ТМТ у крыс, можно отметить их существенное многообразие – от изменения двигательных реакций до специфических когнитивных дисфункций. Особенности дефектов обучения и памяти, которые выявлены в различных поведенческих тестах, определяются своеобразием нарушений, вызванных ТМТ в структурах мозга животных. У мышей и крыс ТМТ вызывает гиперактивность в открытом поле, повышение двигательной активности и нарушение обучения в тестах пассивного и активного избегания, поведения в Т-образном лабиринте и водном лабиринте Морриса [3, 4]. Гиппокампальные нарушения поведения у животных были показаны и через длительные промежутки времени: даже через 16 недель после введения ТМТ было выявлено ухудшение обучения крыс в лабиринте Морриса [8]. Эффекты, вызываемые ТМТ, как и любого фармакологического агента, зависят от дозы, способа введения вещества, а также от типа поведенческого теста и промежутка времени между инъекцией и тестированием. В экспериментальных работах, посвященных изучению когнитивных функций, основное внимание уделяется реакциям, зависящим от гиппокампальной системы, однако, полученные результаты могут интерпретироваться по-разному. В настоящей работе изучали влияние однократной инъекции ТМТ на обучение крыс в лабиринте. Для того чтобы исключить влияние судорожной активности на развитие нейродегенеративных процессов и для облегчения проведения поведенческих экспериментов, после инъекции ТМТ животным вводили противоэпилептический препарат (пентобарбитал).

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на крысах-самцах линии Вистар ($n=28$) весом 210–220 г. Животных содержали и использовали в соответствии с правилами Совета Европейского сообщества (директива от 1986 г.).

Введение ТМТ. После предварительного привыкания к рукам крысам делали однократную инъекцию ТМТ (Sigma) в дозе 7,5 мг/кг, подкожно. Вещество растворяли в изотоническом растворе NaCl и вводили в объеме 0,5 мл. Контрольным животным делали инъекции изотонического раствора NaCl в том же объеме. После этого животных отсаживали в клетки и ежедневно взвешивали; воду и корм этим животным давали без ограничений. Другой группе животных вводили ТМТ (7,5 мг/кг) и через одну неделю начинали обучение в лабиринте с пищевым подкреплением.

Поведенческие эксперименты. Обучение крыс навыку чередования с пищевым подкреплением в лабиринте с четырьмя целевыми полками (Рис. 1) начинали через 7 дней после инъекции ТМТ. Предварительное привыкание к экспериментальной обстановке в течение двух дней заключалось в помещении каждого животного на 10–15 минут в лабиринт, в котором были разложены смоченные шарики хлеба. Выработку навыка проводили в течение шести дней до достижения животными критерия: среднее время побежки за дневную серию должно составлять менее 10 секунд. В день животные совершали по 10 побегов. В этот период обучения крысы получали подкрепление на полках № 1 и № 2. После обучения в течение 6 дней изменяли экспериментальные условия: пищевое подкрепление осуществляли на полках № 1 и № 4. При этом регистрировали время побегов и число ошибочных реакций к неподкрепляемой полке № 2.

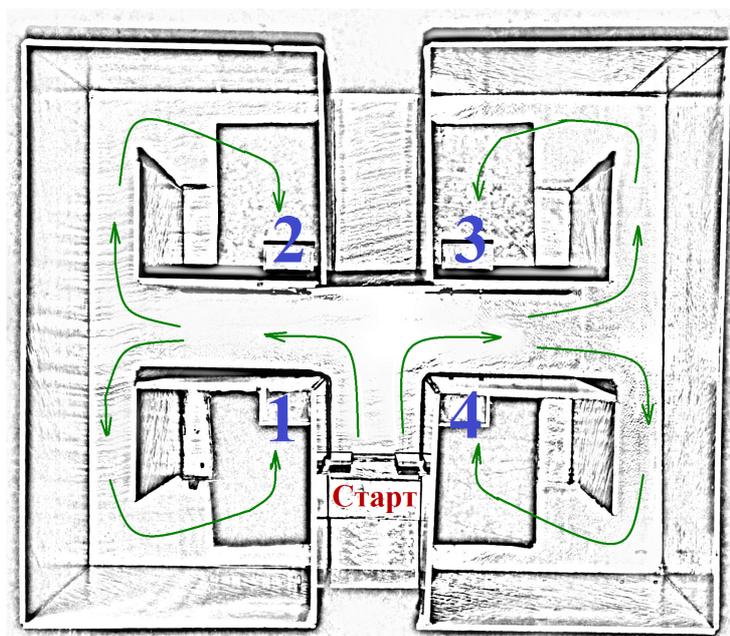


Рис. 1. Схема лабиринта. Цифрами указаны номера полок для пищевого подкрепления

Результаты и обсуждение

Одно из заметных проявлений токсического действия ТМТ на крыс заключается в нарушении пищевого поведения и, как следствие, потере массы тела. Действительно, в течение первых двух дней после инъекции ТМТ вес животных снизился и оставался примерно постоянным в течение одной недели. Затем вес животных стал увеличиваться, и через три недели после инъекции крысы контрольной и опытной групп по этому показателю достоверно не различались (Рис. 2).

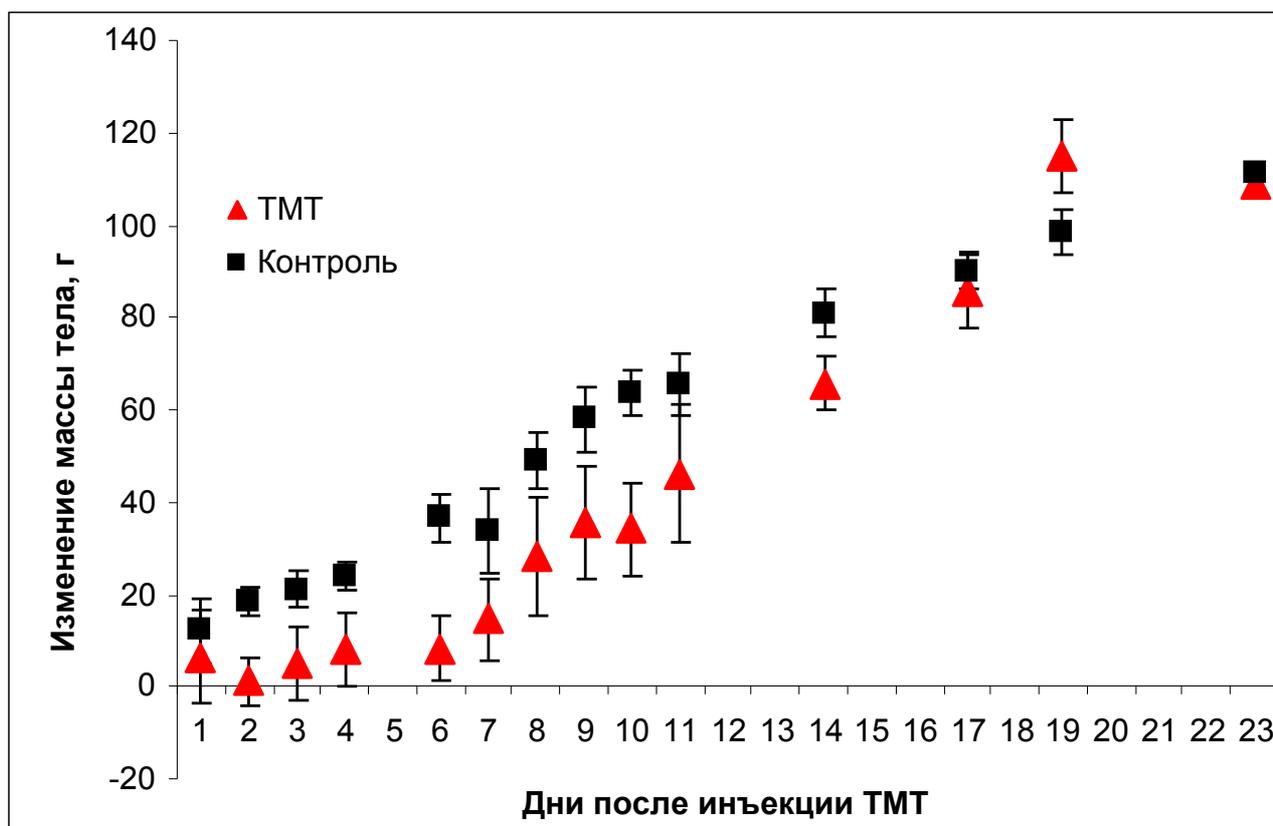


Рис.2. Среднее значение привеса животных. Изменение массы тела крыс после инъекции хлорида триметилолова в дозе 7,5 мг/кг в контрольной (n=6) и опытной (n=6) группах

Выработку навыка чередования в лабиринте у животных опытной и контрольной групп начинали, когда пищевая мотивация, нарушенная ТМТ, нормализовалась – через одну неделю после инъекции нейротоксиканта и изотонического раствора NaCl. Стабильное воспроизведение навыка наблюдалось через 4–5 дней обучения. Результаты показали, что динамика обучения животных контрольной и опытной групп была сходной, и время побегов достоверно не различалось между группами (Рис. 3).

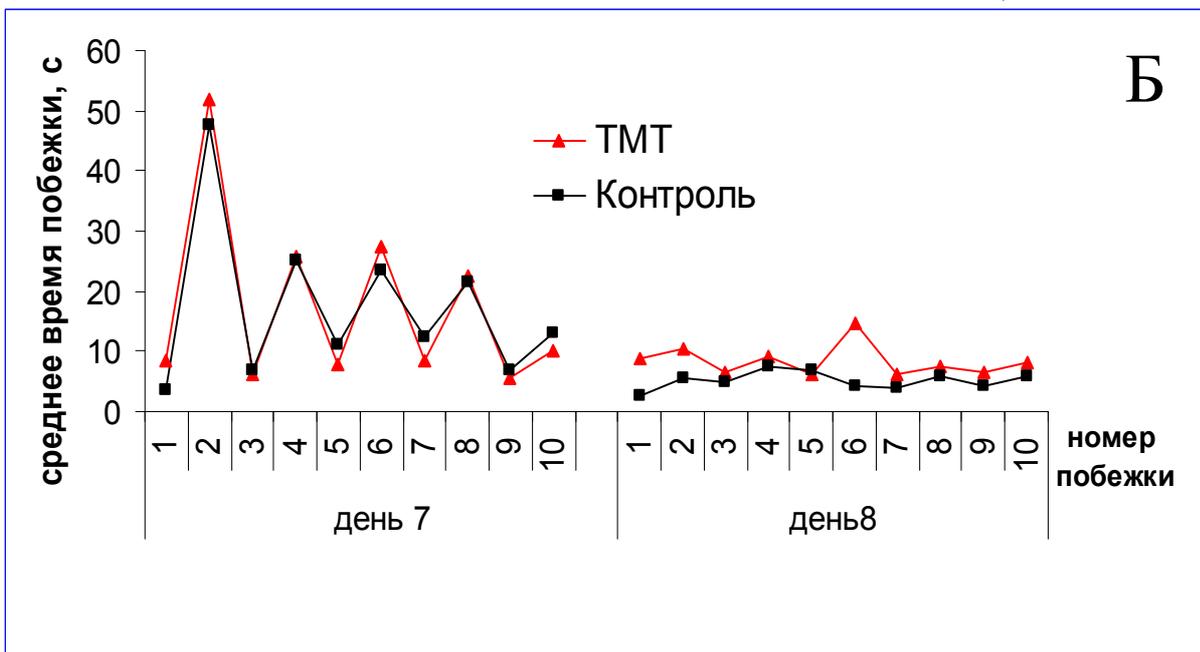
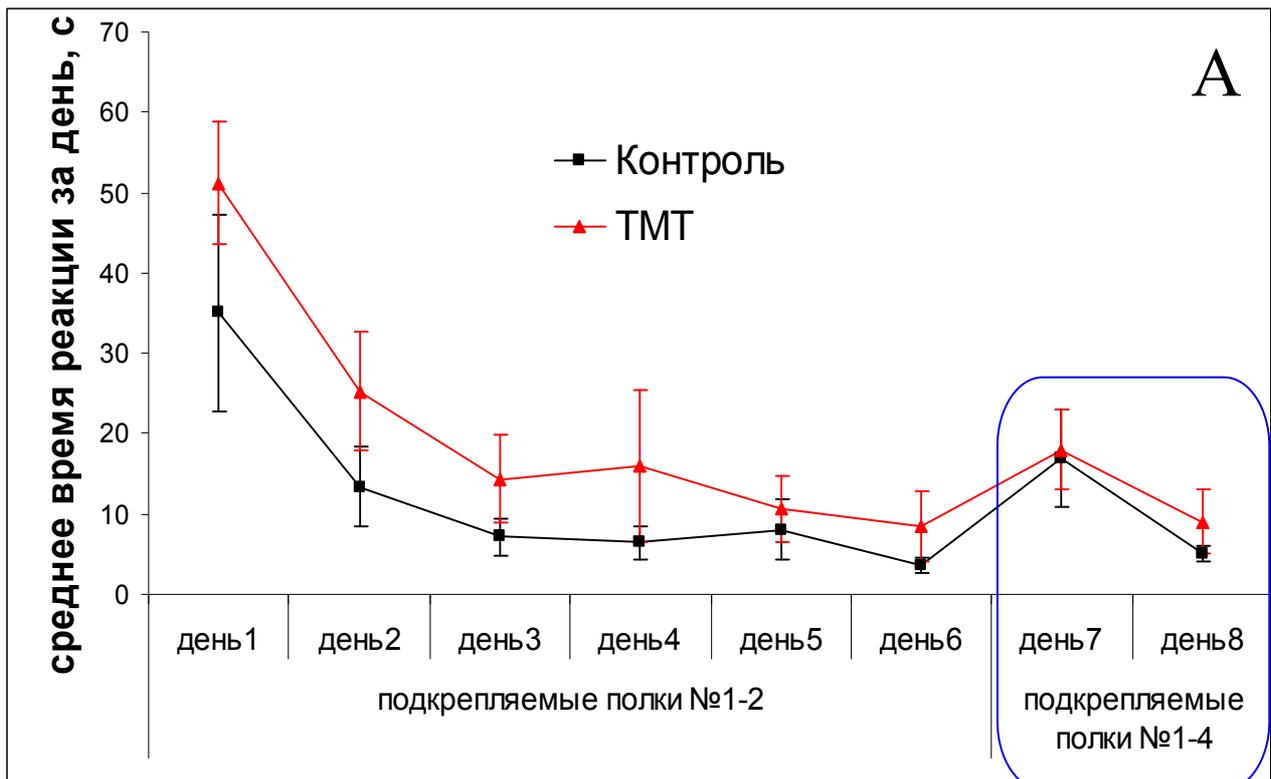


Рис. 3. Динамика выработки реакции чередования с пищевым подкреплением в лабиринте у крыс ($n=16$). **А** – усредненное значение времени побегов за день. Динамика обучения через одну неделю после однократной инъекции хлорида триметилолова в дозе 7,5 мг/кг. **Б** – среднее время побегов после изменения подкрепляемых полок (№1-2 на №1-4)

В наших экспериментах применение ТМТ не оказало существенного влияния, как на двигательную активность животных, так и на способность к выработке реакции чередования.

Однако изменение подкрепления выявило дефекты в поведении опытных крыс: у них существенно ухудшилась способность адекватно реагировать на изменившуюся экспериментальную ситуацию. Целевая полка № 2 на этой стадии эксперимента уже не подкреплялась, однако крысы продолжали совершать к ней побежки; причем число таких реакций, которые рассматривались как ошибочные, было больше у животных опытной группы, чем контрольной (Рис. 4). Настойчивое повторение заученной реакции, потерявшей биологическое значение, характерно для животных с поврежденным гиппокампом, например, в ситуации экспериментального угашения навыка (вызванное отсутствием подкрепления) [1].

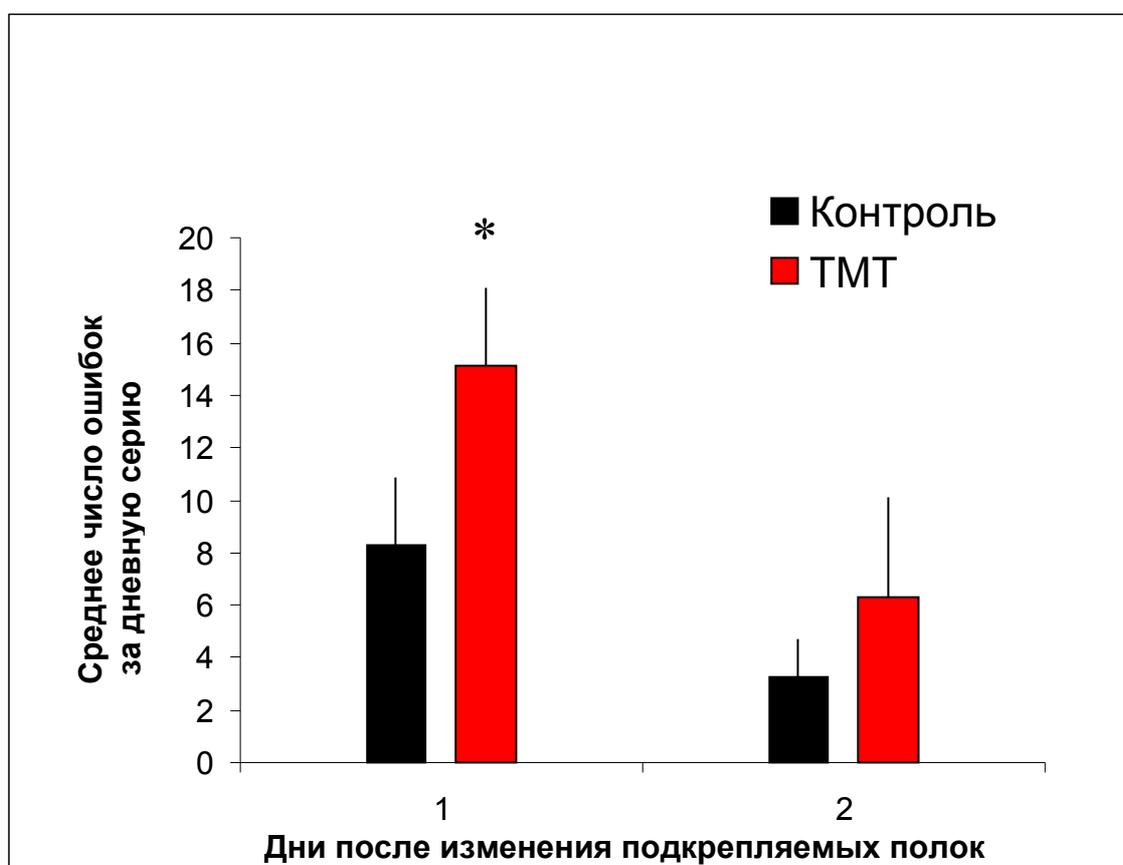


Рис. 4. Среднее число ошибочных побежек к неподкрепляемой полке № 2, совершаемых крысами через 2 недели после инъекции хлорида триметилолова и контрольными животным. Указано значение $M \pm s$; * - $P < 0,02$, по критерию Манна – Уитни

Гиппокамп чувствителен ко многим повреждающим воздействиям, и его дефекты проявляются при проведении различных поведенческих тестов. Результаты исследований последних лет показывают, что нейроны гиппокампа способны кодировать не только пространственные, но и временные параметры, принимая участие в когнитивных функциях, связанных с регистрацией и воспроизведением информации [6]. Особое значение для

обучения имеет участие гиппокампа в механизмах ориентировочно-исследовательского поведения, так как формирование осознаваемой (декларативной, эпизодической) формы памяти невозможно без проявления ориентировочной реакции. Животные с поврежденным гиппокампом показывают повышенную реактивность к новым раздражителям и сниженную продолжительность сна. Однако некоторые формы поведения не меняются, например, такие как груминг, потребление пищи и воды. Животные с дефектным гиппокампом менее любопытны, у них нет необходимости в увеличении притока информации, поэтому нарушены свойства ориентировочного рефлекса: его избирательность, возможность переключения с одного стимула на другой; тормозящее влияние на другие виды деятельности [9]. Триметилолово в дозе, используемой в настоящей работе, вызвал ограниченное повреждение гиппокампа, которое проявилось через четыре недели после инъекции как снижение способности к переучиванию, не повлияв на общую двигательную активность и выработку реакции чередования в лабиринте. Гибель нейронов, как это следует из литературных и наших предварительных данных, ограничивается полями СА3-СА4 и зубчатой фасцией. Кроме того, следует принять во внимание фармакологическое подавление судорожной активности, предпринятое нами в этой работе, что также ограничивает повреждающее влияние ТМТ на гиппокамп. Специфический характер нейротоксического повреждения, когда гибель нейронов ограничена отдельными полями, позволяет оценить их возможную роль в когнитивных функциях. Действительно, хорошо известно, что эффекты повреждения гиппокампа зависят не только от того, каков объем повреждений, но и от субрегионального распределения гибели нейронов. Общепринятым можно считать сам факт особого вклада в механизмы когнитивных функций субрегионов гиппокампа, но мнения относительно того, какие именно функции они выполняют, противоречивы, на что указывают, например, авторы обзора [5]. После рассмотрения большого массива экспериментальных результатов в обзоре делается вывод, что поле СА1 специфически вовлекается, когда требуется процессинг событий во времени. Это проявляется двумя путями: во-первых, при образовании ассоциативных связей во времени (например, когда применяется отсрочка между стимулами); во-вторых, при запоминании порядка стимулов во времени. Поле СА3 требуется как для постепенного, так и для быстрого формирования ассоциативных связей между событием и пространственной информацией (контекстом). Разрушение дорсального поля СА3 не нарушает постепенное приобретение пространственной информации, однако поле СА3, по-видимому, необходимо для быстрого кодирования новой пространственной информации. О функциональных особенностях зубчатой фасции известно меньше – отмечается, что в этом субрегионе гиппокампа происходит предварительная обработка информации, которая передается в СА3, где она

связывается с другими стимулами [5]. Такое заключение согласуется с представлением о компараторной роли поля СА3, которое было обосновано О.С. Виноградовой [9].

Заключение

Экспериментальная модель нейрональной гибели, вызванной ТМТ, представляет большой интерес при исследовании механизмов нейродегенерации, прежде всего, в гиппокампе. Нейродегенеративные процессы, происходящие как в нормальных условиях при развитии и старении, так и при многих заболеваниях (эпилепсия, болезни Паркинсона и Альцгеймера и др.), сопровождаются нарушением когнитивных функций. Специфичность таких нарушений может указывать на возникновение и развитие нейродегенеративного процесса. Морфо-функциональные нарушения гиппокампа, вызванные ТМТ, со временем частично компенсируются. Очевидно, что нарушение клеточного состава в полях СА3-СА4 гиппокампа необратимо, вследствие чего такие компенсаторные процессы должны происходить благодаря модификации нейрональных сетей, с участием экстрагиппокампальных структур. Таким образом, благодаря особенностям действия ТМТ на мозг, эту экспериментальную модель можно рассматривать как вполне адекватную для разработки новых средств терапии нейродегенеративных заболеваний.

Работа поддержана РФФИ-мол_а № 16-34-01167.

Список литературы

1. Arkhipov V., Kuleskaja N., Lebedev D. Behavioral perseveration and impairment of long-term memory in rats after intrahippocampal injection of kainic acid in subconvulsive dose // Pharmacol. Biochem. Behav. 2008. Vol. 88. № 3. – P. 299-305.
2. Corvino V., Marchese E., Michetti F. et al. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin // Neurochem Res. 2013. Vol. 38. № 2. – P. 240-53.
3. Earley B., Burke M., Leonard B.E. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat // Neurochem. Int. 1992. Vol. 21. № 3. – P. 351-66.
4. Geloso M.C., Corvino V., Michetti F. et al. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes // Neurochem Int. 2011. Vol. 58. № 7. – P. 729-38.
5. Langston R.F., Stevenson C.H., Wilson C.L. et al. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations // Behav Brain Res. 2010. vol. 215. № 2. – P. 275-291.

6. Salz D.M., Tiganj Z., Khasnabish S. et al. Time Cells in Hippocampal Area CA3 // The Journal of Neuroscience. 2016. Vol. 36. № 28. – P. 7476-7484.
7. Trabucco A., Di Pietro P., Nori S. L. et al. Methylated tin toxicity a reappraisal using rodents models // Archives italiennes de biologie. 2009. Vol. 147. № 4. – P. 141-153.
8. Tsutsumi S., Akaike M., Arimitsu H. et al. Circulating corticosterone alters the rate of neuropathological and behavioral changes induced by trimethyltin in rats // Exp. Neurol. 2002. Vol. 173. – P.86-94.
9. Vinogradova O.S. Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information // Hippocampus. 2001. Vol. 11. № 5. – P. 578-598.