

Влияние агонистов и антагонистов ГАМК_A-рецепторов на формирование латентного торможения у крыс с разными уровнями тревожности

Редькина А.В.¹, Лоскутова Л.В.², Замощина Т.А.^{1,3}

The GABA_A receptors agonists and antagonists influence on formation of a latent inhibition at rats with different levels of anxiety

Redkina A. V., Loskutova L. V., Zamoshchina T. A.

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

² НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Редькина А.В., Лоскутова Л.В., Замощина Т.А.

Феномен латентного торможения отражает способность мозга игнорировать нерелевантные стимулы. Нарушение данного процесса регистрируется у больных психическими расстройствами с нарушениями в эмоциональной и когнитивной сферах. В представленном эксперименте латентное торможение формировали в условной реакции пассивного избегания предварительным угашением новизны условного стимула. Крысы получали 0 или 20 преэкспозиций условного стимула, сочетаемого при обучении с аверсивным подкреплением. Латентное торможение было нарушено у высокотревожных крыс и патологически усилено у низкотревожных. У высокотревожных крыс агонист ГАМК_A-рецепторов мусцимол (1 мг/кг массы тела) усиливал латентное торможение, в то время как антагонист ГАМК_A-рецепторов бикуккуллин (1 мг/кг массы тела) нормализовал этот показатель у низкотревожных крыс.

Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи градиента тревожности и вовлечения ГАМК_A-рецепторов в процесс торможения внимания к нерелевантной информации.

Ключевые слова: крысы, тревожность, внимание, латентное торможение, ГАМК_A-рецепторы.

Latent inhibition phenomenon indexes the ability to ignore irrelevant stimuli. Disturbance of latent inhibition is registered in different psychiatric populations with pathology in the emotional and cognitive spheres. In our experiments latent inhibition was measured in a conditioned passive avoidance reaction in rats that previously received 0 or 20 conditioned stimuli exposures followed by foot shock. Latent inhibition was disrupted in high-anxiety rats and pathologically enhanced in low-anxiety rats. The effects of an agonist (muscimol) and an antagonist (bicuculline) of GABA_A receptors on the learning and latent inhibition in these rats were studied. In high-anxiety rats, muscimol (1 mg/kg) had no effect on learning but enhanced latent inhibition. Bicuculline (1 mg/kg) enhanced both acquisition of the reflex and latent inhibition in low-anxiety rats. The present results show direct involvement of GABA_A-receptors in process of attentional inhibition to irrelevant information.

Key words: rats, anxiety, attention, latent inhibition, GABA_A-receptors.

УДК 616.891-009.88:577.122.3]:599.323.4

Введение

Латентное торможение (ЛТ) — важный физиологический механизм подавления внимания к незначимой информации. Его экспериментальным отражением является задержка формирования условного рефлекса, если обучению предшествует процедура угашения новизны условного стимула (стадия преэкспозиции).

Нарушение ЛТ обнаружено у больных психическими расстройствами с нарушениями когнитивной и эмоциональной сфер [9]. Тестирование ЛТ широко используется в экспериментальных исследованиях для выявления биологических и нейрохимических механизмов внимания, а также для скрининга биологически активных веществ с потенциально антипсихотическими свойствами. Участие в ЛТ моноаминергических

и глутаматергической систем мозга показано во многих исследованиях, представленных в обзорах [12].

В то же время экспериментальные работы с анализом вовлечения в этот процесс ГАМК-ергической системы единичны, а их данные достаточно противоречивы. Австралийские исследователи сообщили об отсутствии какого-либо эффекта антагониста бензодиазепиновых рецепторов FG7142 на развитие ЛТ у крыс линии Вистар [7]. Другие авторы регистрировали как положительную, так и негативную ГАМК-ергическую модуляцию ЛТ у крыс той же линии [8].

Необходимо отметить, что в приведенных исследованиях не учитывался эмоциональный статус животных. Однако при работе с феноменом ЛТ, формируемого у крыс в задаче условной реакции пассивного избегания, всегда отмечались индивидуальные различия в способности тормозить приобретение навыка в ответ на преэкспозицию условного стимула [1]. Это выражалось наличием в группе особей с противоположными показателями задержки перехода в наказуемый отсек камеры (5—15 или 140—180 с), отличавшихся от показателей животных с нормальным ЛТ (40—80 с).

Стало очевидным, что выраженность ЛТ может зависеть не только от стандартных условий эксперимента (число преэкспозиций, параметры подкрепления, неизменность контекста), но и от индивидуальной детерминированности эмоционального статуса. Установлено, что у генетически тревожных крыс линии OXYS нарушение формирования ЛТ обусловлено трудностью габитуации к условному стимулу на стадии преэкспозиции [2].

О том, что латентное торможение может быть связано с уровнем тревожности, свидетельствуют факты его нарушения у людей с признаками как ситуационной, так и личностной тревожности [5]. Очевидно, что в исследованиях по вовлечению ГАМК-ергической системы в процесс формирования ЛТ с применением фармакологического анализа, тем более анксиотропных средств, необходимо предварительное выделение групп животных с крайними вариантами тревожности.

Вопросы, возникшие после анализа собственных и литературных данных, определили цель настоящей работы — оценить роль ГАМК-ергических рецепторов мозга в развитии латентного торможения у крыс линии Вистар с высокой и низкой тревожностью.

Материал и методы

В работе использованы крысы-самцы линии Вистар в возрасте 3,5—4,0 мес, полученные из лаборатории разведения животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). После доставки из вивария все животные были размещены по две особи в пластиковых клетках и далее содержались в стандартных условиях вивария. Через 1 нед привыкания к новой обстановке эксперимент начинали с отборочного теста в приподнятом крестообразном лабиринте [2]. В течение 5 мин регистрировали наиболее важные параметры тревожного поведения: число переходов на открытые рукава и время нахождения на них. Критерием для выделения групп животных с крайними проявлениями тревожности служило время нахождения на открытых рукавах лабиринта: для низкотревожных (НТ) — не менее 10 с (с выходами на все сектора аллеи), для высокотревожных (ВТ) — отсутствие выходов. Животные с промежуточными показателями исключались из дальнейшего опыта.

Через 48 ч для отобранных групп животных проводился тест в темно-светлой камере, определяющий уровень тревожности в другой ситуации. Наблюдение за поведением проводилось во время первого помещения крысы в установку для выработки условной реакции (УР) пассивного избегания, состоящую из двух отсеков — темного (опасного) и ярко освещенного (безопасного) [2]. В течение 3 мин регистрировали три показателя: латентный период (ЛП) перехода в темный отсек, общее число переходов из одного отсека в другой и время нахождения в светлом отсеке. Крысы, показатели которых не соответствовали результатам, полученным в крестообразном лабиринте, удалялись из дальнейшего эксперимента. Исходя из данных обоих тестов были выделены две совокупности животных с разной базовой тревожностью — низкотревожные и высокотревожные, каждую из которых в случайном порядке разделили на четыре экспериментальные группы (по 8—10 особей в каждой). В качестве контроля была использована смешанная совокупность крыс, состоящая из двух групп (по 10—12 особей) с преэкспозицией и без нее.

Для получения эффекта ЛТ выработку УР пассивного избегания начинали после стадии преэкспозиции (ПЭ), которая состояла из 20 неподкрепляемых предъявлений условного стимула (контекста) в течение

5 сут с ежедневным четырехкратным помещением животного в экспериментальную камеру. На 6-е сут переход в темный отсек наказывали болевым раздражением (0,75 мА в течение 2 с), после чего животное немедленно переносили в домашнюю клетку. Период наблюдения — 180 с как во время ПЭ, так и при тестировании выработанного навыка через 24 ч после обучения. Наличие ЛТ определяли при сравнении результатов обучения преэкспозированных (20ПЭ) и непреэкспозированных (0ПЭ) крыс.

Для фармакологического анализа использовали избирательный агонист ГАМК_A-рецепторов мусцимол (Sigma, США) в дозе 1 мг/кг массы тела и антагонист ГАМК_A-рецепторов бикукуллин (Serva, Германия) в дозе 1 мг/кг массы тела. Последний препарат растворяли в физиологическом растворе с добавлением 1—2 капель 0,1N HCl. Все введения выполнялись внутривенно за 30 мин до обучения.

Полученные экспериментальные данные оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA 6.0). Независимыми факторами являлись группа крыс и число ПЭ. Влияние каждого фактора оценивали по критерию Фишера, а статистическую значимость различий между групповыми средними величинами определяли с помощью теста LSD. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения *M* со средней стандартной ошибкой *m*.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты тестирования крыс в крестообразном лабиринте. Однофакторный анализ ANOVA указывает на высокую статистическую значимость различий между группами НТ и ВТ животных относительно главного из показателей — процента времени нахождения животных на открытых рукавах ($F(1,67) = 52,04; p < 0,001$). Такие же значимые различия касаются количества переходов крыс на открытые рукава ($F(1,67) = 68,11; p < 0,001$). Кроме того, у 89% ВТ крыс отмечалось состояние полной неподвижности (фризинг), продолжительность кото-

рого составила 152,3 с. У низкотрещовных животных такая реакция отсутствовала, доминировали высокий двигательный и исследовательский компоненты.

Поведение крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (*M* ± *m*)

Показатель	Группа	
	ВТ (38 животных)	НТ (31 животное)
Число выходов на открытые рукава	0,3 ± 0,1	3,9 ± 0,3*
Время на открытых рукавах, с	1,1 ± 0,5	26,7 ± 3,3*
Время нахождения крыс на открытых рукавах, %	0,4 ± 0,1	7,8 ± 1,3*

* $p < 0,001$ при межгрупповом сравнении ВТ и НТ крыс.

Результаты определения уровней трещовности у этих же крыс в ситуации темно-светлой камеры показаны на рис. 1. Неизменность эмоционального статуса была установлена почти у всех крыс, кроме 2 ВТ и 1 НТ, которые были исключены из дальнейшего опыта. Межгрупповые сравнения обнаружили статистически значимые различия по всем трем показателям: ЛП перехода ($F_{1,64} = 7,81; p = 0,002$), времени нахождения в светлом отсеке ($F_{1,64} = 11,32; p < 0,001$) и по числу переходов ($F_{1,64} = 23,68; p < 0,001$).

На рис. 2 представлены результаты обучения крыс трех групп (НТ, ВТ и контрольных) на новый и угашенный стимулы. Совершенно очевидна зависимость как обучения, так и формирования ЛТ от уровня трещовности. Это подтверждено результатом двухфакторного анализа ANOVA, который выявил не только значимость влияния группы ($F_{2,72} = 4,86; p < 0,05$) и преэкспозиции ($F_{1,72} = 29,53; p < 0,001$), но и взаимодействие этих факторов ($F_{5,72} = 6,84; p < 0,001$).

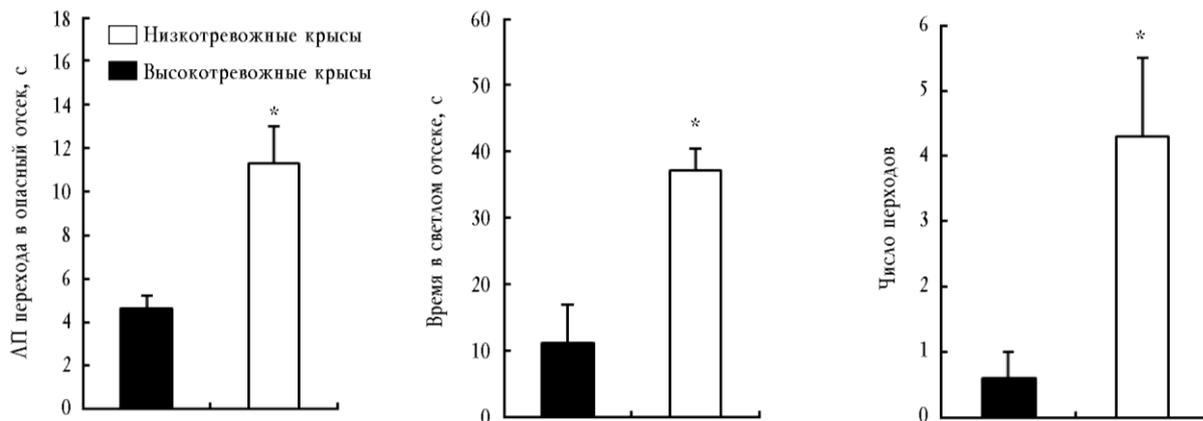


Рис. 1. Поведение высокотрещовных и низкотрещовных крыс при первом предъявлении экспериментальной камеры для выработки условной реакции избегания (тест в темно-светлой камере): * — $p < 0,01$ при межгрупповых сравнениях для каждого из трех показателей

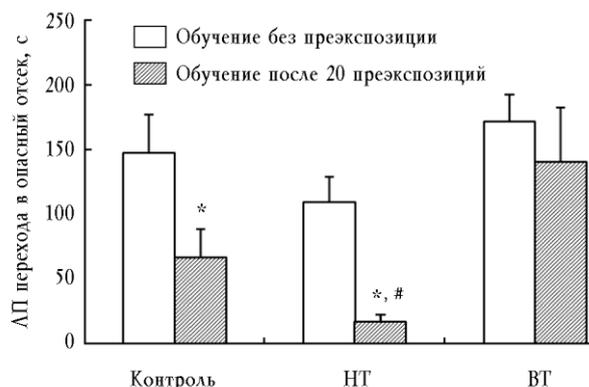


Рис. 2. Влияние высокого и низкого уровней трещовности на выработку условной реакции пассивного избегания и формирование латентного торможения: * — $p < 0,01$ по сравнению с собственными группами без преэкспозиции; # — $p < 0,05$ по сравнению с аналогичной группой контроля

По данным дисперсионного анализа, у контрольных и НТ крыс эффект ЛТ отразился в значимых внутригрупповых различиях ЛП перехода у крыс с ПЭ и без нее ($p < 0,01$). В то же время у ВТ крыс внутригрупповые различия отсутствовали ($p > 0,05$), что свидетельствует о нарушении ЛТ. Крысы с низкой трещовностью (группа 20ПЭ), наоборот, демонстрировали наиболее выраженное ЛТ ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой 20ПЭ).

На рис. 3 показано влияние фармакологических воздействий на величину воспроизводимого навыка (ЛП перехода). Активация ГАМК_A-рецепторов мусцимолом нормализовала способность ВТ крыс к формированию ЛТ ($F_{1,21} = 12,53$; $p < 0,01$ по сравнению с собственной группой 0ПЭ) и не вызвала существенных изменений результатов обучения в группе 0ПЭ

($p > 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем без препарата (см. рис. 2)). В то же время блокада ГАМК_A-рецепторов бикикуллином у НТ крыс привела к увеличению ЛП перехода как в группе 0ПЭ, так и 20ПЭ, сохранив при этом значимые внутригрупповые различия ($F_{1,19} = 9,53$; $p < 0,01$ по сравнению с собственной подгруппой 0ПЭ).

Таким образом, у контрольных (смешанных) крыс регистрировалось нормальное обучение на новый стимул и задержка обучения (ЛТ) в ответ на угашение его новизны. У крыс с низкой трещовностью отмечены мощная экспрессия ЛТ и одновременно ухудшение обучения на новый стимул. Крысы ВТ показали почти 100%-е обучение на новый стимул и отсутствие ЛТ.

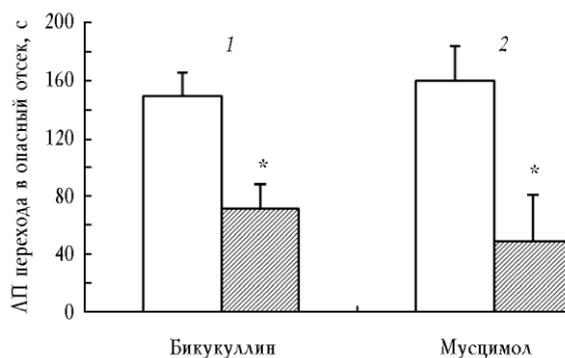


Рис. 3. Влияние агонистов и антагонистов ГАМК_A-рецепторов на формирование латентного торможения у низкотрещовных (1) и высокотрещовных (2) крыс: * — $p < 0,01$ по сравнению с собственными группами без преэкспозиции; # — $p < 0,05$ по сравнению с аналогичной группой контроля

Проведенное исследование прежде всего указывает на зависимость формирования латентного торможения от градиента тревожности. Иными словами, латентное торможение является функцией тревожности раньше, чем числа преэкспозиций и интенсивности подкрепляющего стимула, поскольку при одних и тех же параметрах получено два противоположных результата — суперлатентное торможение у низкотревожных и его нарушение у высокотревожных крыс. Результат, полученный на ВТ животных, соответствует нарушению латентного торможения у людей, имеющих по опроснику Schizotypal Personality Questionnaire высокую отметку state и trait тревожности [5].

Поскольку высокотревожные крысы в разных ситуационных тестах демонстрировали одинаковый уровень тревожного поведения, то можно предполагать у них наличие как ситуационной, так и личностной тревожности, негативно влияющей на способность тормозить незначимую информацию. Выявленная высокая корректирующая эффективность как агониста, так и антагониста ГАМК_A-рецепторов относительно исходного высокого или низкого уровня тревожности указывает на прямое участие данной системы в формировании ЛТ, нарушение или чрезмерная экспрессия которого может быть связана либо с ослаблением, либо с гиперактивностью ГАМК-ергического торможения. Следовательно, оптимальный уровень ГАМК-рецепторной активности необходим для нормального функционирования ЛТ.

Существует совпадение морфофункциональных контуров тревожности и латентного торможения с включением фронтальной коры, гиппокампа, миндалевидного комплекса и прилежащего ядра [3, 10, 11]. Полученные результаты подтверждают это перекрытие и определяют дальнейший поиск механизмов вовлечения ГАМК-ергической системы в указанных структурах мозга при формировании ЛТ.

Известно, что реализация ЛТ может быть сопряжена со снижением уровня дофамина в прилежащем ядре [6].

Однако участие в этом механизме ГАМК_A-рецепторов целенаправленно не определялось, хотя есть биохимические данные о том, что торможение нейрональной активности вентрального гиппокампа локальным введением мусцимола вызывало понижение трансмиссии дофамина в прилежащее ядро [4], а это, в свою очередь, могло вызвать усиление ЛТ [6].

Первопричиной экспрессии ЛТ у низкотревожных крыс в представленном эксперименте могло быть врожденное усиление ГАМК-ергического торможения от интернейронов вентрального гиппокампа. Системное введение бихукуллина не в состоянии ответить на этот вопрос, поэтому дальнейшие исследования будут направлены на анализ локальных воздействий ГАМК-ергических анализаторов на функциональное состояние заинтересованных в ЛТ структур мозга.

Заключение

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о взаимосвязи градиента тревожности и вовлечения ГАМК_A-рецепторов в процесс торможения внимания к нерелевантной информации. Формирование латентного торможения нарушается у высокотревожных крыс и патологически усиливается у низкотревожных. У высокотревожных крыс агонист ГАМК_A-рецепторов мусцимол (1 мг/кг массы тела) усиливает латентное торможение, в то время как антагонист ГАМК_A-рецепторов бихукуллин (1 мг/кг массы тела) нормализует этот показатель у низкотревожных крыс.

Литература

1. Дубровина Н.И., Лоскутова Л.В. Дофаминергические механизмы памяти и внимания. Новосибирск: Наука, 2003. 278 с.
2. Лоскутова Л.В., Зеленкина Л.М. Нарушение латентного торможения у крыс линии OXYS с генетически обусловленным синдромом преждевременного старения // Журн. высш. нервн. деятельности им. И.П. Павлова. 2002. Т. 52, № 3. С. 366—370.
3. Лоскутова Л.В., Костюнина Н.В., Редькина А.В. Нарушение латентного торможения у взрослых крыс после блокады дофаминовых терминалей вентрального гиппокампа в период пубертатного развития // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2010. Т. 96, № 5. С. 455—463.
4. Bast T., Feldon J., Zhang W.-N. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol // Exp. Brain Res. 2001. V. 139, № 1. P. 39—52.
5. Braunstein-Bercovitz H. Is the attentional dysfunction in schizotypy related to anxiety? // Schizophr. Res. 2000. V. 46, № 2—3. P. 255—267.
6. Joseph M.H., Young A.M., Gray J.A. Reinforcement, conditioning and dopamine function in the nucleus accumbens // Neurosci. 1993. V. 49, № 2. P. 200—203.
7. Harris J.A., Westbrook R.F. Evidence that GABA transmission mediates context-specific extinction of learned fear // Psychopharmacology (Berl). 1998. V. 140. № 1. P. 105—115.
8. Lacroix L., Spinelli S., Broersen L.M., Feldon J. Blockade of

Экспериментальные и клинические исследования

- latent inhibition following pharmacological increase or decrease of GABA(A) transmission // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000. V. 66, № 4. P. 893—901.
9. *Lubow R.E.* Construct validity of the animal latent inhibition model of selective attention deficits in schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 2005. V. 31, № 1. P. 139—153.
10. *Ninan P.T.* The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety // *J. Clin. Psychiatry.* 1999. V. 60, Suppl. 22. P. 12—17.
11. *Oswald C.J., Yee B.K., Bannerman D.B. et al.* The influence of selective lesions to components of the hippocampal system on the orientating response, habituation and latent inhibition // *J. Neurosci.* 2002. V. 15, № 1. P. 1983—1990.
12. *Weiner I.* The «two-headed» latent inhibition model of schizophrenia: modeling positive and negative symptoms and their treatment // *Psychopharmacology.* 2003. V. 169, № 2—3. P. 257—297.

Поступила в редакцию 15.06.2011 г.

Утверждена к печати 22.12.2011 г.

Сведения об авторах

А.В. Редькина — аспирант кафедры физиологии человека и животных ТГУ (г. Томск).

Л.В. Лоскутова — д-р биол. наук, профессор, вед. науч. сотрудник НИИ физиологии СО РАМН (г. Новосибирск).

Т.А. Замощина — д-р биол. наук, профессор кафедры фармакологии СибГМУ, профессор кафедры физиологии человека и животных ТГУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Замощина Татьяна Алексеевна, e-mail: beladona@hotmail.ru 8-9138502246