

УДК 612.821.6:615.214.2:615.27:615.357
<https://doi.org/10.17816/MAJ19257-62>

ВЛИЯНИЕ АЦИЗОЛА НА ЭФФЕКТЫ ПИКРОТОКСИНА, ВВЕДЕННОГО В НЕОСТРИАТУМ КРЫС

А.Ф. ЯКИМОВСКИЙ

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург;
 ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН», Санкт-Петербург

Для цитирования: Якимовский А.Ф. Влияние ацизола на эффекты пикротоксина, введенного в неостриатум крыс // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 2. – С. 57–62. <https://doi.org/10.17816/MAJ19257-62>

Поступила: 29.04.2019

Одобрена: 22.05.2019

Принята: 30.05.2019

Цель исследования — изучить влияние донатора цинка ацизола на нарушения поведения у крыс, вызванные внутростриарным введением блокатора ГАМК-А-рецепторов пикротоксина.

Материалы и методы. У крыс Вистар вырабатывали условный рефлекс активного избегания в «челночной камере» и оценивали спонтанную двигательную активность в «открытом поле». Пикротоксин (2 мкг в 1 мкл раствора) вводили ежедневно в течение 15 дней двусторонне в роstralный неостриатум крыс. Внутривентрикулярно вводили донатор цинка ацизол (24 мкг/кг).

Результаты. Пикротоксин вызывал устойчивую потерю условно-рефлекторного избегательного навыка и индуцировал хореомиоклонический гиперкинез конечностей и туловища — аналога гиперкинеза при хореи Гентингтона у человека. Ацизол способствовал восстановлению условно-рефлекторного навыка, предупреждал развитие гиперкинеза или существенно увеличивал латентный период его возникновения, укорачивал продолжительность гиперкинеза.

Заключение. С учетом полученных ранее данных можно предположить, что ацизол, повышая содержание цинка в организме и, особенно, в головном мозге, способствует восстановлению нарушенных когнитивных функций, предупреждает развитие пикротоксин-индуцированного гиперкинеза. Ацизол может стать перспективным препаратом в лечении экстрапирамидных нарушений гиперкинетического типа у человека.

Ключевые слова: неостриатум; ацизол; пикротоксин; хореический гиперкинез; спонтанное двигательное поведение; условный рефлекс избегания.

THE INFLUENCE OF ACIZOL INTO EFFECTS OF PICROTOXIN, INJECTED IN RAT'S NEOSTRIATUM

A.F. Yakimovskii

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia;
 Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

For citation: Yakimovskii AF. The influence of acizol into effects of picrotoxin, injected in rat's neostriatum. *Medical Academic Journal*. 2019;19(2):57-62. <https://doi.org/10.17816/MAJ19257-62>

Received: April 29, 2019

Revised: May 22, 2019

Accepted: May 30, 2019

The aim of the article. The article is devoted to investigation of zinc donator acizol influence to rat's behavior, broken by intrastriatal injection of GABA-A receptor antagonist picrotoxin.

Materials and methods. Adult male Wistar rats with avoidance conditioning reflexes in "shuttle box" and free locomotor activity in "open field" were used. Daily microinjection of picrotoxin (2 mcg/1 mcl) bilateral into rostral neostriatum in term of 15 days were made. Zinc donator acizol was injected intraperitoneal (24 mg/kg).

Results. Steady losses of avoidance conditioning and choreo-mioclonic hyperkineses of limbs and body, similar with human Huntington's chorea by picrotoxin were produced. Acizol is contribute to restore avoidance conditioning and to prevent the development of hyperkineses or essentially extend latency and lover duration of it.

Conclusion. With the early data obtained, there is reason to propose, that acizol, to increasing the zinc content in the body, especially in the brain, is recover damaged cognitive function and to prevent the picrotoxin-induced hyperkineses. Acizol should be proposed as perspective drug in extrapyramidal hyperkinetic deviation treatment in human.

Keywords: neostriatum; acizol; picrotoxin; choreic hyperkineses; spontaneous locomotor activity; condition reflex of avoidance.

Список сокращений

УРАИ — условный рефлекс активного избегания

Введение

Несмотря на существенные успехи в изучении этиопатогенеза экстрапирамидных гиперкинезов (большой хорей — болезни Гентингтона, малой ревматической хорей и др.), до сих пор не разработано их эффективной лекарственной терапии. Так, в Европе зарегистрирован лишь один препарат для лечения болезни Гентингтона — тетрабеназин [1], но и его эффективность невелика. Одна из причин — недостаточность знаний о патогенезе заболевания. Наши исследования на модели хореомиоклонического гиперкинеза, воспроизводимого на крысах с помощью многократных внутривенных микроинъекций блокатора ГАМК-А-рецепторов пикротоксина [2], продемонстрировали роль нарушения ионного гомеостаза в генезе моторных дисфункций гиперкинетического типа. Описан положительный эффект ионов магния и цинка — возникновение гиперкинеза у крыс купировалось или его проявления минимизировались [3]. Однако протестированные нами соединения относились не к лекарственным средствам, а к химическим соединениям. Использованный в данной части работы донатор цинка ацизол относится к официальным препаратам. Он разработан как антидот и протектор при отравлениях продуктами горения органических соединений (патент РФ № 2247558. Бабаниязова З.Х., Баринов В.А., Шилов В.Н. и др.) [4], но перспективен для применения и в других сферах, в том числе и в неврологической практике.

Цель — изучить влияние внутрибрюшинного введения ацизола (в дозах, близких к рекомендуемым при приеме ацизола человеком) на параметры хореомиоклонического гиперкинеза, индуцированного у крыс путем многократных введений в неостриатум пикротоксина, на вызываемые им нарушения избегательного условно-рефлекторного поведения крыс в челночной камере и спонтанного двигательного поведения в «открытом поле».

Материалы и методы

Работу с животными проводили в соответствии с принципами Хельсинской декларации в редакции 2002 г. и Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (2002). В эксперименте использовали 31 белую крысу-самца Вистар массой 250 г с выработанным условным рефлексом активного избегания (УРАИ) в челночной камере. Камера представляет собой ящик из хлорвинила и прозрачного оргстекла (перед-

няя стенка) размером 650 × 550 × 300 мм, разделенный на освещенную (левую) и затемненную (правую) половины; имеет проволочный пол (через который подается электрический ток силой 1 мА): крыс обучали покидать затемненную половину не позднее десяти секунд с начала действия условного раздражителя (тон 7000 Гц). В течение трех дней крыс адаптировали к челночной камере и раздражителям, после чего приступали к выработке условного рефлекса активного избегания темной половины камеры. Добивались выработки навыка не ниже 80 % уровня правильных ответов (отношение в процентах правильно выполненных реакций к общему числу предъявляемых условных раздражителей). При последующем тестировании за опыт подавали восемь сочетаний условного и безусловного раздражителя с промежутком 30–40 с. В установке «открытое поле» (ящик с квадратным дном, расчерченным на 16 квадратов размером 165×165 мм и стенками высотой 250 мм) оценивали спонтанную двигательную активность: пересечение границ квадратов пола и исследовательское поведение — по количеству стоек на задних лапах. В течение трех дней крыс помещали на 5 мин в «открытое поле» для адаптации к новым условиям и угашения реакции на новизну, после чего проводили контрольное тестирование (время тестирования — 3 мин).

Каждому из животных под нембуталовым наркозом (40–60 мг/кг) в область роstralного отдела неостриатума по стереотаксическим координатам (роstralнее брегмы на 1,0–1,5 мм, латеральнее средней линии черепа на 2,0–2,5 мм и вентральнее его поверхности на 6,0–6,5 мм) вживляли гибкие микроинъекторы, заполненные раствором вещества, достаточного для 15–20 инъекций. Способ введения описан ранее [2].

Контрольной группе (11 животных) в роstralный неостриатум двусторонне инъецировали стерильный апиrogenный 0,9 % раствор хлорида натрия. Животным второй (11 крыс) и третьей (9 крыс) групп в стриатум инъецировали блокатор ГАМК-А-рецепторов пикротоксин (Seiva, Германия) — 2 мкг. Объем одной микроинъекции (во всех группах) составлял 1 мкл. К инъекциям приступали через 3 дня после операции, а затем производили ежедневно в течение 15 дней. Кроме того, третьей группе животных внутрибрюшинно вводили ацизол — 0,1 мл, содержащий 6 мг препарата (24 мг/кг). Опираясь на полученные ранее данные [5, 6], ацизол начинали вводить за 10 дней до первой внутривенной микроинъекции; всего было произведено три предварительные инъекции ацизола.

Тестирование проводили с промежутком в 1–3 дня. В дни тестирования ацизол вводили за 10 мин до микроинъекции пикротоксина, а через 15 мин после пикротоксина начинали исследование: вначале животных помещали в «открытое поле», а затем — в челночную камеру. Затем оценивали успешность реализации рефлекса (отношение своевременных переходов на светлую половину камеры к общему числу подаваемых условных раздражителей в процентах) и его латентный период (время в секундах от момента подачи условного раздражителя до исполнения навыка). После прекращения цикла введения препаратов эксперименты продолжали еще в течение недели с целью исследования возможной динамики восстановления нарушенных двигательных функций.

По окончании опытов осуществляли морфологический контроль локализации канюль. У всех животных кончики канюль располагали в области неостриатума (животные с иной локализацией канюль выбраковывали и полученные на них данные не учитывали). При статистическом анализе рассчитывали средние арифметические значения по группе животных, стандартные ошибки и стандартные отклонения. Показатели в очередной день введения препарата сравнивали с показателями этой группы до вживления канюль и с показателями в соответствующий день экспериментов у крыс контрольной группы; также производили сравнение показателей второй и третьей опытных групп. Данные оценивали с использованием непараметрических методов статистики (по Манну – Уитни, Вилкоксоу, Фридману, дисперсионный анализ Фишера). По t -критерию Стьюдента различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

У животных контрольной группы с микроинъекциями 0,9 % раствора хлорида натрия (рис. 1, *a*) в первый день введения наблюдалось снижение реализации УРАИ (возрастало число ошибок — крысы не покидали опасную половину челночной камеры за положенные 10 с), но это не привело к изменениям, которые достоверно отличались от этого показателя до начала опытов. Интенсивность спонтанной двигательной активности «в открытом поле» у них не изменялась, двигательные девиации отсутствовали.

Эффекты внутристриарного введения пикротоксина (вторая опытная группа) описаны в наших предыдущих публикациях [2, 3]. У этих крыс не только в период микроинъекций,

но и после их окончания нарушалась реализация избегательного условно-рефлекторного навыка (рис. 1, *b*), спонтанная двигательная активность в «открытом поле» достоверно увеличивалась. Однако главным в эффектах пикротоксина является хореомиоклонический гиперкинез (неконтролируемые стереотипные движения различных частей тела), основные характеристики которого совпадают с таковыми при хорее Гентингтона у человека. Гиперкинез начинался с мелких подергиваний головы или лапы, их частота и амплитуда увеличивались, движения становились целостными и у части животных охватывали все тело. Такая генерализация гиперкинеза воспроизводилась у половины животных. Гиперкинез наблюдался у всех крыс второй группы, латентный период его возникновения (время от микроинъекции до первых его проявлений) в первый день эксперимента составил в сред-

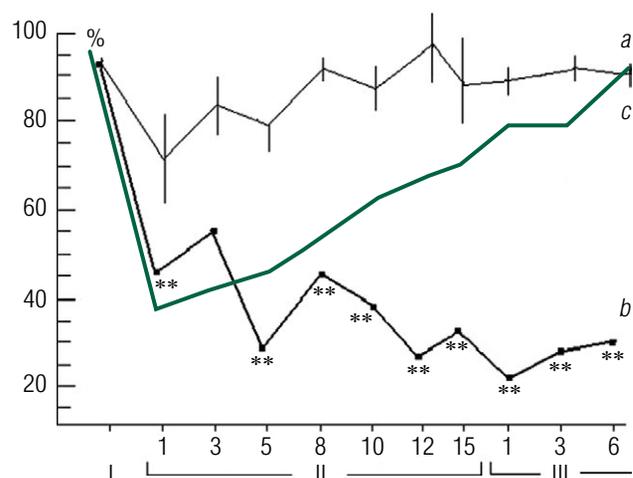


Рис. 1. Динамика показателя точности реализации условного рефлекса активного избегания у крыс в челночной камере (средние значения по группе животных) на фоне внутристриарного введения 1 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида (*a*), 2 мкг пикротоксина (*b*) и 2 мкг пикротоксина на фоне внутрибрюшинного введения 24 мг/кг ацизола (*c*). По оси абсцисс — дни опытов: I — фон, II — период инъекции препаратов, III — период после их окончания; по оси ординат — правильные ответы (от предъявленных за опыт), %. **случаи достоверного отличия показателя в данный день опыта с показателями у крыс с введением 0,9 % раствора натрия хлорида (сравнение двух рядов по Стьюденту), $p = 0,01$

Fig. 1. Conditioned avoidance performance in a shuttle box (mean values) in rats with intrastriatal injection of 1 mcl physiological saline (*a*), 2 µg picrotoxin (*b*) and 2 µg picrotoxin with 24 mg/kg of acizol simultaneously (*c*). The abscissa shows experimental days: I —baseline before injections, II — days of treatment and III — withdrawal days. Ordinate: ratio between the number of conditioned responses and total number of presented conditioned stimuli; ** $p = 0.01$ compared to the control

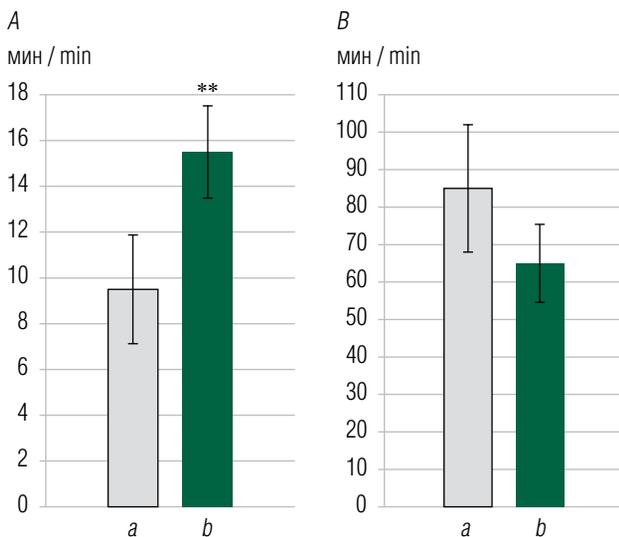


Рис. 2. Латентный период (А) и длительность (В) гиперкинеза, вызванного внутривентрикулярными микроинъекциями 2 мкг пикротоксина (а) и микроинъекциями 2 мкг пикротоксина на фоне внутрибрюшинного введения 24 мг/кг ацизола (b). По оси ординат обозначено время (в минутах). **случай достоверного отличия показателя гиперкинеза у крыс с введением пикротоксина и ацизола по сравнению с соответствующим значением у группы животных с введением одного пикротоксина (сравнение двух рядов по Стьюденту), $p = 0,01$

Fig. 2. Latency (A) and duration (B) of hyperkineses, produced by 2 μ g picrotoxin intrastriatal microinjection in rat's with picrotoxin alone (a) and with 2 μ g picrotoxin microinjection and with intraperitoneal injection of 24 mg/kg acizol (b). Ordinate: time in minutes; ** $p = 0.01$ compared to rat's with picrotoxin microinjection alone

нем по группе $9,6 \pm 4,2$ мин (рис. 2, А, а); средняя продолжительность гиперкинеза составляла $88,4 \pm 27,7$ мин (рис. 2, В, а).

На эти достаточно драматические изменения в поведении животных, индуцируемые пикротоксином, существенно влиял ацизол. Хотя у животных третьей группы реализация УРАИ также страдала и формально при первых введениях пикротоксина в среднем по группе была даже ниже, чем у крыс второй группы (рис. 1, с), ни один метод статистической обработки не выявил достоверности отличий от крыс контрольной группы. Это связано с тем, что в третьей группе в эти дни были крысы как с полной потерей условно-рефлекторного навыка, так и с его достаточно высоким уровнем.

В последующие дни цикла введения препаратов показатели УРАИ у крыс третьей группы восстанавливались, различие между второй и третьей группами становилось очевидным. Особенно демонстративными различия стали в последние дни микроинъекций пикротоксина и после их прекращения: у крыс вто-

рой группы реализация УРАИ оставалась на низком уровне, в то время как у крыс, которым вводили ацизол, навык восстановился. Параметры пикротоксинового гиперкинеза также изменялись. Латентный период в первый день введений увеличивался в среднем по группе до $15,5 \pm 6,7$ мин; $p = 0,01$ (рис. 2, А, b), длительность сокращалась до $64,2 \pm 20,2$ мин. Не менее важно и то, что из 9 крыс, получавших ацизол, гиперкинез в первый день опытов был зарегистрирован только у половины животных. В последующие дни воспроизводимость была еще ниже, в силу чего статистический анализ параметров гиперкинеза стал невозможен.

Обсуждение

В данных экспериментах проявились антигиперкинетические свойства ацизола в отношении экспериментальной модели хорейческого экстрапирамидного гиперкинеза, вызванного блокадой ГАМК-А-рецепторов неостриатума. Было показано, что при повторных введениях ацизола содержание цинка в ткани головного мозга крыс возрастало [5], в наибольшей степени — в коре больших полушарий и подкорковых образованиях мозга [6]. Под влиянием многократных введений ацизола зарегистрированы определенные сдвиги (в центральной нервной системе, плазме крови, паренхиматозных органах — в печени и поджелудочной железе) в содержании других важных для деятельности мозга биоэлементов — селена, кальция, меди, железа [5].

Нейробиологическая роль цинка [7] много шире, чем просто антагониста ионных каналов мембранных рецепторов и фактора тормозных и возбуждающих процессов в нервной ткани. Он активно захватывается глутаматергическим нейроном, везикулируется вместе с медиатором и потенциал-зависимо выбрасывается в синаптическую щель [8]. Есть основания считать нейрональный цинк фактором сложного модулирования синаптической передачи [9] за счет влияния не только на постсинаптические рецепторы, но и на пресинаптический и внесинаптический аппарат ряда медиаторных систем мозга [7]. В неостриатуме цинк, содержащийся в терминалях кортикостриарных нейронов [11], по-видимому, является участником регуляции баланса значимых для деятельности базальных ганглиев нейрональных потоков, идущих по «прямому» и «непрямому» эфферентным путям: чувствительность к цинку (и итоговый эффект) различна у подтипов NMDA-рецепторов, они по-разному представлены на указанных эфферентных нейронах.

Дисбаланс в эфферентных потоках приводит к гиперкинезам [7, 10], который цинк нормализует. В пользу того что полученный в данных экспериментах поведенческий эффект связан с повышением содержания цинка в ткани неостриатума, свидетельствует и зарегистрированная динамика восстановления УРАИ, совпадающая с таковой в других наших исследованиях с введением цинка непосредственно в неостриатум крыс [3].

Выводы

1. Ацизол, многократно введенный крысам внутривентрикулярно в дозе 24 мг/кг, способствует восстановлению условного рефлекса активного избегания в челночной камере, нарушенного под влиянием внутривентрикулярного введения антагониста ГАМК-А-рецепторов пикротоксина.
2. Ацизол предупреждает возникновение или снижает интенсивность развившегося у крыс под влиянием пикротоксина хореомиоклонического гиперкинеза.
3. Донатор цинка ацизол, благодаря отчетливому антигиперкинетическому действию, может быть использован в неврологической практике при терапии экстрапирамидных гиперкинезов у человека.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. Все международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Литература

1. Селиверстов Ю.А., Ключников С.А., Иллариошкин С.Н. Лечение гиперкинезов при болезни Гентингтона // *Medica mente. Неврология.* – 2018. – Т. 4. – № 1. – С. 20–24. [Seliverstov YuA, Klyushnikov SA, Illarioshkin SN. Treatment of hyperkinesis in Huntington's disease. *Medica Mente. Neurology.* 2018;4(1):20-24. (In Russ.)]
2. Якимовский А.Ф., Варшавская В.М. Этиопатогенез хореи Гентингтона: итоги и перспективы экспериментального моделирования // *Медицинский академический журнал.* – 2006. – Т. 6. – № 2. – С. 28–40. [Yakimovskii AF, Varshavskaya VM. Etiopatogenesis of Huntington's disease: results and perspectives of experimental modeling. *Medical academic journal.* 2006;6(2):28-40. (In Russ.)]
3. Якимовский А.Ф., Крыжановская С.Ю. Влияние внутривентрикулярных введений ацетата цинка на нормальное и патологическое двигательное поведение крыс // *Медицинский академический журнал.* – 2015. – Т. 15. – № 2. – С. 50–54. [Yakimovskii AF, Kryzhanovskaya SYu. The effect of intrastriatal zinc acetate injections on normal and pathological locomotor behavior in rats. *Medical academic journal.* 2015;15(2):50-54. (In Russ.)]
4. Баринов В.А., Алексанин С.С., Радионов И.А., Шантырь И.И. Ацизол в комплексе мер защиты от токсических продуктов горения и лечения пострадавших // *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях.* – 2011. – Т. 5. – № 1. – С. 14–19. [Barinov VA, Aleksanin SS, Radionov IA, Shantyr II. Acyzol within the package of measures for protection from toxic burning products and treatment of injured. *Medico-biological and socio-psychological problems of safety in emergency situations.* 2011;5(1):14-19. (In Russ.)]
5. Якимовский А.Ф., Шантырь И.И., Власенко М.А., и др. Влияние ацизола на содержание биоэлементов в плазме крови, паренхиматозных органах и головном мозге крыс // *Биомедицинская химия.* – 2018. – Т. 64. – № 2. – С. 183–187. [Yakimovskii AF, Shantyr II, Vlasenko MA, et al. The influence of acyzolum to bioelements content in rat's plasma, parenchymal organs and brain. *Biomedical chemistry.* 2018;64(2):183-187. (In Russ.). <https://doi.org/10.18097/PBMC20186402183>.
6. Якимовский А.Ф., Шантырь И.И., Власенко М.А., Яковлева М.В. Влияние ацизола на содержание цинка в плазме крови и головном мозге крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2016. – Т. 162. – № 9. – С. 268–270. [Yakimovskii AF, Shantyr II, Vlasenko MA, Yakovleva MV. The influence of acizol to zinc blood plasma and brain tissue in rats. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2016;162(9):268-270. (In Russ.)]
7. Якимовский А.Ф. Нейробиология цинка // *Успехи современной биологии.* – 2019. – Т. 139. – № 3. – С. 267–279. [Yakimovskii AF. Neurobiology of zinc. *Advances in current biology.* 2019;139(3):267-279. (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0042132419030104>.
8. Smart TG, Hosie AM, Miller PS. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist.* 2004;10(5):432-442. <https://doi.org/10.1177/1073858404263463>.
9. Kay AR, Toth K. Is zinc a modulator? *Science signaling.* 2008;1(19):1-7. <https://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;1/19/re3>.
10. Mabrouk OS, Mela F, Calcagno M, et al. GluN2A and GluN2B NMDA receptor subunits differentially modulate striatal output pathways and contribute to levodopa-induced abnormal involuntary movements in dyskinetic rats. *ACS Chemical Neuroscience.* 2013;4(5):808-816. <https://doi.org/10.1021/cn400016d>.
11. Frederickson ChJ, Suh SW, Silva D, et al. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutrition.* 2000;130(5):1471S-1483S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1471S>.

Сведения об авторе / Information about the author

Андрей Федорович Якимовский — д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией физиологии и патологии двигательного поведения Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова; старший научный сотрудник лаборатории физиологии высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова. E-mail: jakim2010@gmail.com.

Andrey F. Yakimovskii — MD, Professor, Chief of Laboratory of Normal and Pathological Locomotor Behaviour Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia; Senior Research Scientist in Laboratory of Physiology Higher Nervous Activity Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia. E-mail: jakim2010@gmail.com.