

# ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЦИНКА НА ЭФФЕКТЫ АНТАГОНИСТА МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА 5-ГО ТИПА, ВВЕДЕННОГО В РОСТРАЛЬНЫЙ СТРИАТУМ КРЫС

УДК 612.821.6 : 612.18.2 : 615.357

© **А.Ф. Якимовский**

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ; ФГУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург

## Ключевые слова:

неостриатум; условный рефлекс активного избегания; двигательная активность; хлорид цинка; МТЕР.

## Резюме

В хронических экспериментах на крысах Вистар с выработанным рефлексом активного избегания в «челночной камере» изучаются эффекты многократных введений в ростральный неостриатум антагониста 5-го типа метаботропных рецепторов глутамата МТЕР, в том числе и при добавке в инъецируемый раствор хлорида цинка. Двухнедельные ежедневные микроинъекции 3 мкг МТЕР, как и введения 1 мкл физиологического раствора (у контрольной группы животных), существенно не влияли на параметры условнорефлекторного и свободного (в «открытом поле») двигательного поведения. Введение в ростральный неостриатум 3 мкг МТЕР вместе с хлоридом цинка (1 мкг/мкл) вызывало у крыс снижение показателей условнорефлекторного избегательного поведения и усиление спонтанной двигательной активности с переходом у части животных в двигательную стереотипию. Так как при раздельном введении МТЕР и хлорида цинка усиления двигательной активности не наблюдалось, есть основания считать, что полученные сдвиги в поведении крыс вызваны их сочетанным действием на субстрат мозга. Обсуждаются возможные изменения в межмедиаторных отношениях, вызванные насыщением стриатума ионами цинка. Высказывается предположение о том, что ведущим является повышение активности нигростриарной дофаминергической системы.

Цинк, как компонент металлоферментов — соединений, имеющих множественные функции в организме человека, — известен давно. В последнее десятилетие физиологическая роль этого металла существенно расширилась, в частности, в связи с гипотезой о «нейрональном» цинке, как регуляторе синаптической передачи, в основном глутаматергической [13, 15, 16]. Основанием для этого стали две группы фактов: во-первых, обнаружение везикулированного цинка в окончаниях глутаматергических нейронов мозга (в неокортексте, стриатуме, гиппокампе) и, во-вторых, активный захват цинка нейронами из межклеточного пространства, его вези-

кулирование и потенциалзависимое выделение в синаптическую щель вместе с медиатором [9, 11]. Предполагается, что цинк способен менять соотношение активности (чувствительности к глутамату) различных типов рецепторов и этим влиять на состояние, среднешипиковых нейронов стриатума (основных структурно-функциональных элементов этого подкоркового образования мозга), получающих глутаматергическую афферентацию из неокортекста [15].

Соединения цинка, как лекарственные препараты, а не только биологически активные пищевые добавки, стали активно использоваться в практической медицине. В клинической неврологии цинкотерапия проводится при гепатолентикулярной дегенерации (болезни Вильсона–Коновалова), связанной с дисфункцией подкорковых узлов [14]. В решении проблем цинкодефицитных состояний широкое применение нашел препарат ацизол [1]. Вместе с тем, далеко не все аспекты нейрофармакологии цинка исследованы. Нами были описаны эффекты избирательной активации и блокады различных типов глутаматных рецепторов неостриатума у крыс [3, 4]. В данной работе изучаются изменения эффектов внутристриатного введения блокатора 5-го типа метаботропных рецепторов — препарата МТЕР в условиях добавки в инъецируемый раствор ионов цинка. Объектом исследования являются крысы Вистар, исследуются сдвиги в свободном двигательном поведении крыс в «открытом поле» и в показателях упроченного рефлекса активного избегания в «челночной камере».

## МЕТОДИКА

Работа с животными базировалась на принципах Хельсинской Декларации в редакции 2002 г. и в соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» (2002). В эксперименте использованы 24 белые крысы-самцы линии Вистар массой 250–280 г с выработанным условным рефлексом активного избегания в «челночной камере», которая представляет собой ящик из оргстекла размерами 650 x 550 x 300 мм, разделенный на освещенную (левую) и затемненную (правую)

половины. Камера имеет проволочный пол, через который подается электрический ток (силой 1 мА): крысы обучались покидать затемненную половину в течение 10 с действия условного раздражителя (тон 7000 Гц). В течение 3–5 дней крыс адаптировали к «челночной камере» и раздражителям, после чего приступали к выработке условного рефлекса активного избегания темной половины камеры. У крыс добивались выработки навыка не ниже 80%-го уровня правильных ответов (отношение в процентах правильно выполненных реакций к общему числу предъявляемых условных раздражителей). За опыт подавали 10 сочетаний условного и безусловного раздражителей с промежутком 25–35 с. В установке «открытое поле» (ящик с квадратным дном, расчерченным на 16 квадратов 165 × 165 мм и стенками высотой 25 мм) оценивали спонтанную двигательную активность (пересечение границ квадратов пола) и исследовательское поведение (по количеству стопок на задних лапах). Для адаптации к новым условиям и угашения реакции на новизну, крыс в течение 3 дней помещали на 5 мин в «открытое поле», после чего проводили контрольное тестирование; время тестирования — 3 минуты. В область рострального отдела неостриатума под нембуталовым наркозом (40–60 мг/кг) каждому из животных по стереотаксическим координатам (ростральнее 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 на 15–20 инъекций. Способ введения описан ранее [4].

Животные были разделены на контрольную и две экспериментальные группы. 11 животным контрольной группы вводили стерильный апиrogenный физиологический раствор (0,9%-й раствор хлорида натрия), объём одной микроинъекции — 1 мкл. У крыс двух экспериментальных групп канюли были заполнены раствором антагониста 5-го типа метаболитных рецепторов — МТЕР ([2-methyl-1,3-thiazol-4-yl]ethynyl-pyridine; «Merz Pharmaceuticals», Германия); в 1 мкл раствора содержалось 3 мкг МТЕР. У 6 крыс первой экспериментальной группы препарат был растворён в физиологическом растворе, у второй (7 крыс) — в растворе хлорида цинка (1 мкг в 1 мкл). Объём одной микроинъекции у них был, как и у крыс контрольной группы, 1 мкл. Введения начинали через 2–3 дня после операции и производили ежедневно в течение 15–17 дней. Тестирование поведения осуществляли с промежутком 1–3 дня. Опыты начинали через 15 мин после очередной микроинъекции: вначале животных помещали на 3 мин в «открытое поле», а затем проводили тестирование в «челночной камере», по итогам которого оценивали успешность реализации рефлекса (отношение своевременных переходов на светлую половину камеры к общему числу подаваемых условных раздражителей, в про-

центах) и его латентный период (время в секундах от момента подачи условного раздражителя до исполнения навыка).

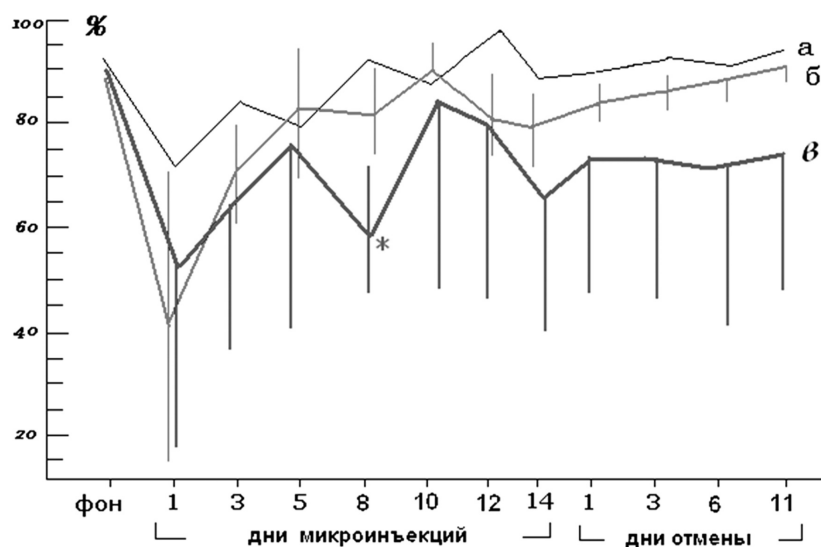
После прекращения цикла микроинъекций эксперименты продолжали еще в течение двух недель — исследовали возможную динамику восстановления нарушенных двигательных функций. По окончании опытов проводили морфологический контроль локализации канюль. У всех животных кончики канюль располагались в области неостриатума (животные с иной локализацией канюль выбраковывались и полученные на них данные в публикации не представлены). При статистическом анализе рассчитывались средние арифметические по группе животных, стандартные ошибки и стандартные отклонения. Показатели в очередной день введения препарата сравнивали с показателями этой группы до начала микроинъекций и с показателями в соответствующий день экспериментов у крыс контрольной группы. Значимость различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента, различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У крыс контрольной группы в регистрируемых параметрах поведения изменений зафиксировано не было. Лишь в первый день микроинъекций физиологического раствора в неостриатум зарегистрировано понижение реализации условного рефлекса избегания (рис. 1, а). Те же закономерности обнаружены и у крыс первой экспериментальной группы: в первый день тестирования (третий день после операции имплантации канюль) точность выполнения рефлекса в среднем по группе снижалась до 42% правильных ответов (рис. 1, б). Можно предположить, что микроинъекции МТЕР усилили понижение условнорефлекторного навыка в результате послеоперационной травмы. Латентный период рефлекса и параметры спонтанной двигательной активности у контрольной и первой экспериментальной групп не изменялись, моторных нарушений зарегистрировано не было.

Присутствие ионов цинка в инъецированном растворе у крыс второй экспериментальной группы негативно сказалось на реализации условнорефлекторного навыка, а на 8-м дне микроинъекций данной комбинации препаратов реализация рефлекса была достоверно ниже, чем у контрольной группы животных (рис. 1, в). После прекращения микроинъекций, на протяжении последующих 11 дней наблюдений реализация рефлекса у крыс этой группы в среднем оставалась ниже и контрольной и первой экспериментальной групп.

Важные факты выявил анализ индивидуальных различий в регистрируемых параметрах поведения животных внутри группы. Если у одной из крыс рефлекс практически полностью исчезал, то у дру-



■ Рисунок 1. Динамика показателя точности реализации условного рефлекса избегания у крыс (средние значения по группе животных) на фоне хронических внутристриарных микроинъекций 1 мкл физиологического раствора (а), 3 мкг МТЕР (б), или 5 мкг МТЕР с 1 мкг хлорида цинка (в). По оси абсцисс — дни опытов (фон до начала микроинъекций, период введения препаратов и период после их отмены); по оси ординат — число правильных реализаций к общему числу поданных за опыт сочетаний, %. \* — случай достоверного отличия показателя в данный день опыта по сравнению с соответствующими значениями у животных контрольной группы (а),  $p = 0,01-0,05$

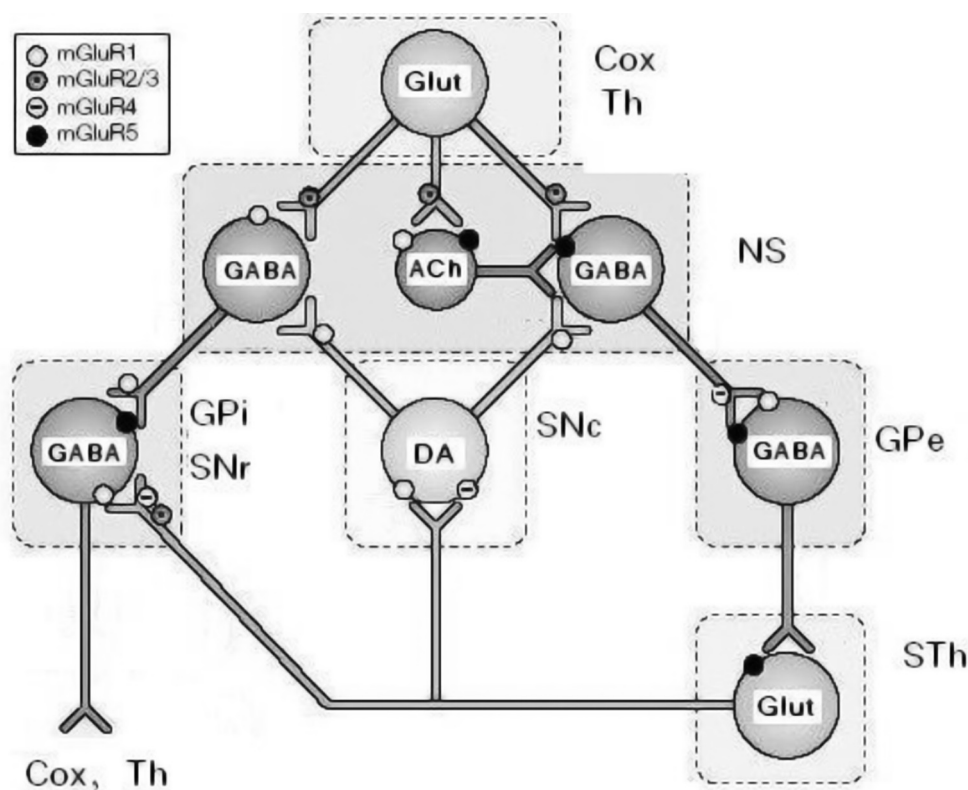
гих животных в тот же день опытов, он был близок к таковому до операции. Естественно, что при статистическом анализе это изменение (за исключением 8-го дня микроинъекций) оказалось недостоверным — как в отношении фоновых значений у тех же крыс до начала цикла микроинъекций, так и в сравнении с параметрами у крыс с введением физиологического раствора. Индивидуальные различия стали очевидными и при анализе спонтанной двигательной активности крыс в «открытом поле». Критическим стал 8-й день цикла микроинъекций: с этого дня и до окончания серии микроинъекций чётко проявилась подгруппа из трёх крыс с повышенной двигательной активностью. На 8-м дне опытов число пересечений границ квадратов за 3 мин теста составило у них  $27,3 \pm 14,4$ , в то время как у остальных 4 крыс (условно — вторая подгруппа) интенсивность двигательной активности сохранялась на исходном уровне —  $3,3 \pm 0,4$  перехода ( $p = 0,05$ ); на 10-м дне соответственно  $38,7 \pm 30,0$  и  $6,0 \pm 5,3$  ( $p = 0,08$ ) и на 12-м дне опытов —  $26,7 \pm 4,0$  и  $3,0 \pm 1,6$  ( $p = 0,01$ ). Интересно, что чёткой корреляции интенсивности двигательной активности с точностью реализации рефлекса получено не было. У двух крыс «гиперактивной» подгруппы к концу цикла микроинъекций появилась отчётливая стереотипия в виде вынюхивания и грызения (иногда несуществующих предметов — императивные движения челюстями с обильной гиперсаливацией), которая наблюдалась в течение нескольких часов после введения препарата. После прекращения микроинъекций двигательная гиперактивность прекратилась. Попытка

выявления отличий в локализации канюль в пределах стриатума у крыс двух подгрупп никакой закономерности не выявила.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано [2, 5], что хлорид цинка, введённый в неостриатум крыс в дозе 1 мкг, начиная с 5-го дня микроинъекций, понижает реализацию рефлекса избегания в «челночной камере» (рефлекс восстановился только через неделю после прекращения введений) и снижает интенсивность спонтанной двигательной активности в «открытом поле». При совместном введении цинка с МТЕР также получено ухудшение параметров избегательного поведения, но уже на фоне отчётливой гиперактивности, которая переходит в ряде случаев в двигательную стереотипию. Если учесть, что блокада 5-го типа метаболитных рецепторов глутамата на спонтанную двигательную активность не влияла, полученный эффект можно считать результатом сочетанного действия МТЕР и ионов цинка на субстрат мозга.

Какие изменения могли произойти в стриатуме при введении в него ионов цинка, способные привести к видоизменению влияний МТЕР на ткань мозга? Известно, что цинк способен блокировать ГАМК-А рецепторы [12] и этим вызывать изменение функционального баланса в системе ГАМК — дофамин. Именно такой сдвиг в пользу преобладания дофаминергической системы стриатума, как известно, приводит к феномену двигательной стереотипии [8], и именно это явление зарегистриро-



■ Рисунок 2. Схема распределения метаботропных рецепторов к глутамату в ядрах неостриатума и связанных с ними структур мозга (по Sonn et al., 2005 с изменениями). Условные обозначения: Cox — неокортекс, Th — зрительный бугор, NS — неостриатум (хвостатое ядро и скорлупа), GPI — внутренний членник бледного шара, GPe — наружный членник бледного шара, SNc — компактная часть черной субстанции, SNr — сетчатая часть черной субстанции, STh — субталамическое ядро, GABA — гамма-амино-масляная кислота, Glut — глутамат, ACh — ацетилхолин, DA — дофамин. Графическими знаками (кружками) обозначено расположение 1, 2/3, 4 и 5 типов метаботропных рецепторов глутамата (mGluR)

вано нами у крыс. Возможно влияние цинка и на ионотропные NMDA рецепторы глутамата, и что ещё более важно — на AMPA рецепторы со снижением проводимости через них кальция [10]. Значительно меньше известно о влиянии цинка на метаботропные рецепторы глутамата. Есть сведения, полученные на нейронах CA3 зоны гиппокампа [6], что цинк обладает активирующими «триггерным» свойствами в отношении этой рецепторной системы. Авторы считают, что экстраклеточный цинк действует в отношении синапсов, обслуживаемых метаботропными рецепторами глутамата, как своеобразный биологический лиганд.

Метаботропные рецепторы к глутамату I группы (1-го и 5-го типов) оказались наиболее «нейронизированными» — в большей степени связанными с мембранами нейронов, чем с глиальными элементами стриатума или сопутствующей тканью. Именно им приписывается главная роль в обслуживании высокофункциональных асимметричных аксошиповых и аксодендритических синапсов [7]. Участие метаботропной глутаматной системы в регуляции дофаминергической системы неостриатума оказалась сложной и дифференцированной. Установлено (рис. 2), что рецепторы 1-го типа расположены исключительно на пресинаптических мембранах до-

фаминергических синапсов неостриатума, а 5-го — на постсинаптических. На дендритах и soma средне-шиповых нейронов, идущих к ретикулярной зоне черной субстанции и внутреннему членнику бледного обнаружены только рецепторы 1-го типа. Аналогичные тормозные нейроны, идущие к наружному членнику бледного шара, содержат на soma и дендритах рецепторы 5-го типа. Это означает, что так называемые, «прямой» и «непрямой» — исходящие из неостриатума регуляторные тракты, обеспечиваются разными типами рецепторов глутамата, а избирательное влияние на подтипы этих рецепторов способно повлиять на физиологическую активность этого подкоркового образования. Цинк может оказаться своеобразным нейрональным, синаптическим «стрелочником», способным менять приоритетные эфферентные потоки из стриатума.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаниязова З.Х., Бабаниязов Х.Х., Радионов И.А., Скальный А.В., Бобр И.С. Ацизол в решении проблем цинкодефицитных состояний // Микроэлементы в медицине. — 2010. — Т. 11, № 1. — С. 25–30.
2. Якимовский А.Ф. Влияние хлорида цинка, введённого в неостриатум, на двигательное поведение крыс // Журн. высш. нервн. деят. — 2011. — Т. 61, № 2. — С. 212–218.



3. Якимовский А.Ф., Варшавская В.М. Глутаматергическая система неостриатума вовлечена в генез пикротоксического хорео-миоکلонического гиперкинеза // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2004. — Т. 138, № 12. — С. 604–607.
4. Якимовский А.Ф., Варшавская В.М. Этиопатогенез хореи Гентингтона: итоги и перспективы экспериментального моделирования // Мед. акад. журн. — 2006. — Т. 6, № 2. — С. 28–40.
5. Якимовский А.Ф., Степанов И.И. Влияние хлорида цинка на пикротоксический гиперкинез зависит от его концентрации в растворе, инъекцируемом в неостриатум крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2010. — Т. 150, № 12. — С. 604–606.
6. Besser L., Chorin E., Sekler I. et al. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus // J. Neurosci. — 2009. — Vol. 29, N 9. — P. 2890–2901.
7. Conn P. J., Battaglia G., Marino M. J., Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit // Nat. Rev. Neurosci. — 2005. — Vol. 6, N 10. — P. 787–798.
8. Costall B., Naylor R. J. The role of telencephalic dopaminergic system in the mediation of apomorphine-stereotyped behavior // Eur. J. Pharmacol. — 1973. — Vol. 24, N 1. — P. 8–24.
9. Cousins R. J., McMahon R. J. Integrative aspects of zinc transporters // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130, N 5. — P. 1384S–1387S.
10. Dorofeeva N. A., Tikhonov D. B., Barygin O. I. et al. Action of extracellular divalent cations on native alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptors // J. Neurochem. — 2005. — Vol. 95, N 6. — P. 1704–1712.
11. Frederickson Ch. J., Suh S. W., Silva D., Frederickson C. J., Thompson R. D. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130, N 5. — P. 1471S–1483S.
12. Hosie A. M., Dunne E. L., Harvey R. J., Smart T. G. Zinc-mediated inhibition of GABA<sub>A</sub> receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity // Nat. Neurosci. — 2003. — Vol. 6, N 4. — P. 362–369.
13. Kay A. R., Neyton J., Paoletti P. A startling role for synaptic zinc // Neuron. — 2006. — V. 52, N 4. — P. 572–574.
14. Marcellini M., Di Ciommo V., Callea F. et al. Treatment of Wilson's disease with zinc from the time of diagnosis in pediatric patients: a single-hospital, 10-year follow-up study // J. Lab. Clin. Med. — 2005. — Vol. 145, N 3. — P. 139–143.
15. Mott D. D., Dingledine R. Unraveling the role of zinc in memory // PNAS. — 2011. — Vol. 108, N 8. — P. 3103–3104.
16. Smart T. G., Hosie A. M., Miller P. S. Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity // Neuroscientist. — 2004. — Vol. 10, N 5. — P. 432–442.

**THE LOCOMOTOR HYPERACTIVITY IN THE RATS, PRODUCED BY 5-TH TYPE METHABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS ANTAGONIST MTEP AND ZNCL<sub>2</sub> INJECTION INTO ROSTRAL STRIATUM**

Yakimovskiy A. F.

◆ **Summary:** The effects of 5th type of metabotropic glutamate receptors antagonist MTEP separately or with ZnCl<sub>2</sub> multiple injection into the rostral neostriatum in chronic experiments were investigated in rats learned with condition avoidance reflexes in “shuttle box”. The two-week daily microinjection of 3 μg MTEP, similar with 1 μl saline (control group) did not influence on condition avoidance reflexes parameters and free locomotor activity in “open field”. The injection of 3 μg MTEP with ZnCl<sub>2</sub> (1 μg / 1 μl) in rostral neostriatum impaired the avoidance conditioning and locomotor hyperactivity with motor stereotypia in part of experimental animals. As separate injection as MTEP or ZnCl<sub>2</sub> did not produce the locomotor hyperactivity, the reason of the changed behaviour of rats was the combined action of them administered into brain substrat. The possible changes in neurotransmitter relationship provided by zinc ions striatum saturation are discussed. The hypothesis about nigro-striatal dopaminergic system activation as a general cause is proposed.

◆ **Key words:** neostriatum; condition avoidance responses; locomotor activity; ZnCl<sub>2</sub>; MTEP.

◆ Информация об авторах

Якимовский Андрей Федорович — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Государственный медицинский университет им. Акад. И. П. Павлова» МЗ РФ. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8. E-mail: jakim2010@gmail.com.

Yakimovskiy Andrey Fedorovich — Dr. Med. Sci., Professor, Head, Dept. of Normal Physiology, Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Ministry of Health Care of the Russian Federation. 197022, St. Petersburg, Lev Tolstoy St., 6/8, Russia. E-mail: jakim2010@gmail.com.