



На правах рукописи

МЕРЧИЕВА СВЕТЛАНА АНАТОЛЬЕВНА

**ОТСТАВЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ НЕОНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ
ФЛУВОКСАМИНА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ
СЕМАКС**

03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2015

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Биологического факультета (зав. кафедрой – профессор А.А. Каменский) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Левицкая Наталья Григорьевна доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики РАН

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Кост Наталия Всеволодовна доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения “Научный центр психического здоровья РАМН”

Добрякова Юлия Владимировна кандидат биологических наук, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН.

Защита диссертации состоится 23 марта 2015 г. в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.93 при биологическом факультете Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова” по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан 21 февраля 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Депрессивные состояния являются одними из самых распространенных психических расстройств. Женщины намного больше подвержены депрессии, чем мужчины. Симптомы депрессии регистрируются у 14-23% женщин в период беременности [Yonkers et al., 2009]. Тяжелые формы дородовой депрессии нельзя не лечить, т.к. заболевание может нанести вред не только матери, но и будущему ребенку. В последние два десятилетия при лечении депрессивных расстройств широкое распространение получили представители нового класса фармакологических средств - селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС) [Пантелеева и др., 2000]. СИОЗС являются препаратами первой очереди при лечении депрессий, в том числе у беременных и кормящих женщин. Известно, что препараты этой группы хорошо проникают через плацентарный барьер, и плод подвергается постоянному воздействию физиологически активных доз СИОЗС [Casper et al., 2011]. Однако, несмотря на это, последствия воздействия СИОЗС на развивающийся организм до настоящего времени недостаточно изучены. В ряде клинических исследований показано, что СИОЗС негативно влияют на исход беременности: отмечается увеличение числа спонтанных выкидышей и неонатальной смертности, возрастание риска преждевременных родов, снижение веса новорожденных, а в дальнейшем - задержка психомоторного развития детей [Diav-Citrin, 2012; Olivier et al., 2011]. Наблюдения за детьми, получавшими пренатально СИОЗС, в большинстве случаев проводились в ранний период, не позднее полутора лет. Сведения об отставленных эффектах пренатального воздействия СИОЗС ограничены, что связано с долговременностью и сложностью проведения таких исследований в клинике [Olivier et al., 2011; Harris et al., 2012].

Долговременные последствия воздействия препаратов группы СИОЗС на развивающийся мозг активно исследуются в экспериментах на животных, главным образом на грызунах. Было показано, что хронические инъекции препаратов группы СИОЗС в период активного развития мозга приводят к долговременным изменениям поведения животных. Данные по созреванию ЦНС позволяют сопоставить последний триместр беременности у человека с

первыми неделями жизни у крыс [Karpova et al., 2009; Thompson et al., 2009]. Поэтому неонатальное воздействие СИОЗС в течение первых недель жизни крыс можно рассматривать как модель для изучения эффектов пренатального воздействия препаратов этой группы в течение III триместра беременности у человека [Lee, Lee, 2012].

Одним из современных антидепрессантов из группы СИОЗС является флувоксамин (ФА). По фармакологическим свойствам ФА близок к флуоксетину (прозак), но отличается более высокой эффективностью и селективностью [Hrdina, 1991]. Ранее в нашем научном коллективе были получены предварительные данные о негативных эффектах неонатального введения ФА [Володина, 2011]. Однако для детального анализа острых эффектов и долговременных последствий воздействия этого антидепрессанта на развивающуюся нервную систему, а также для выяснения механизмов этих эффектов были необходимы дальнейшие исследования.

Лекарственные препараты на основе синтетического аналога АКТГ₄₋₁₀ - гептапептида семакс используются в клинике уже более 20 лет в качестве ноотропных и нейропротекторных средств [Ашмарин и др., 1997; Левицкая и др., 2002; Dolotov et al., 2006]. Данные об эффектах неонатального введения семакса детенышам белых крыс, полученные ранее [Себенцова и др., 2005; Володина и др., 2011], позволяют предположить возможность коррекции семаксом последствий неонатального введения селективного ингибитора обратного захвата серотонина.

Цели и задачи исследования. Целью представленной работы явилось исследование острых и отставленных эффектов хронического неонатального введения селективного ингибитора обратного захвата серотонина флувоксамина детенышам белых крыс, а также оценка возможности коррекции этих эффектов при помощи препарата семакс.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. изучить влияние хронического неонатального введения флувоксамина на физическое развитие, эмоциональное состояние и способность к обучению самцов и самок белых крыс различного возраста;

2. оценить функциональное состояние системы биогенных аминов мозга крыс разного возраста, подвергавшихся воздействию флувоксамина в ранний постнатальный период;
3. оценить возможность коррекции отставленных негативных эффектов неонатального введения флувоксамина последующим введением препарата семакс.

Научная новизна работы. В представленной работе впервые проведено исследование острых эффектов неонатального введения антидепрессанта флувоксамина. Показано, что введение препарата в течение первых недель жизни крыс приводит к повышению летальности, замедлению становления двигательных функций и соматического роста крысят. Также впервые детально исследованы долговременные эффекты неонатального введения ФА. Показано, что неонатальное введение этого препарата приводит к повышению уровня тревожности в условиях повышенной стрессорной нагрузки и нарушению способности к обучению животных в тестах с различным знаком подкрепляющего раздражителя. Кроме того, у крыс, получавших неонатально ФА, наблюдаются долговременные изменения функциональной активности системы биогенных аминов мозга. В работе впервые показано, что хроническое интраназальное введение семакса с 15 по 28 дни постнатального развития в значительной степени компенсирует негативные последствия введения флувоксамина – нормализует поведение и состояние системы биогенных аминов мозга крыс.

Теоретическое и научно-практическое значение работы. Согласно клиническим данным, пренатальное воздействие препаратов группы СИОЗС негативно влияет на исход беременности и состояние новорожденных. Проведенное исследование показало, что неонатальное введение ФА приводит к увеличению уровня летальности, замедлению соматического роста и задержке моторного развития крыс, что доказывает адекватность использованной модели для исследования эффектов пренатального воздействия препаратов этой группы у человека. Данная модель может быть использована для изучения механизмов отставленных эффектов пренатального введения СИОЗС и поиска путей их коррекции. Проведенное

исследование состояния системы биогенных аминов мозга крыс разного возраста, получавших неонатально ФА, способствуют выяснению механизмов долговременных последствий перинатального воздействия СИОЗС.

Практическая значимость проведенного исследования определяется тем, что препарат флувоксамин, как и другие СИОЗС, применяется при лечении депрессивных расстройств у беременных и кормящих женщин. Полученные в работе результаты необходимо учитывать при назначении препаратов из группы СИОЗС женщинам в период беременности. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о возможности применения лекарственного препарата семакс для коррекции негативных последствий пренатального применения антидепрессантов группы СИОЗС.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Используемую в экспериментах модель введения флувоксамина в течение первых недель постнатального развития крысят можно рассматривать как модель для изучения долговременных эффектов пренатального воздействия СИОЗС в клинической практике.
2. Ежедневное внутрибрюшинное введение флувоксамина в дозе 10 мг/кг с 1 по 14 дни жизни крыс вызывает замедление соматического роста крыс, приводит к снижению возраста открытия глаз и вызывает нарушение становления двигательных функций.
3. Ежедневное неонатальное введение флувоксамина приводит к отставленному снижению массы тела, повышению уровня тревожности и ухудшению обучения белых крыс.
4. Введение флувоксамина в неонатальный период приводит к долговременным изменениям функциональной активности системы биогенных аминов мозга крыс.
5. Хроническое интраназальное введение семакса с 15 по 28 дни постнатального развития в значительной степени компенсирует негативные последствия введения флувоксамина.

Апробация работы. Результаты работы были изложены на IV съезде фармакологов России (Казань, 2012 г.), IV Международной научной конференции “Химия, структура и функции биомолекул” (Минск, Беларусь,

2013 г.), XX и XXI международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2013” и “Ломоносов-2014”, VI Российском симпозиуме “Белки и пептиды” (Уфа, 2013 г.), Всероссийской конференции с международным участием “Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга” (Санкт-Петербург, 2014 г.), 9-th FENS Forum of Neuroscience (Милан, Италия, 2014 г.), 27-th ECNP Congress (Берлин, Германия, 2014 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 29 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 211 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась на белых беспородных крысах обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде и соблюдением 12 часового светового режима дня. Крысята каждого выводка содержались в отдельной клетке вместе с матерью до достижения ими месячного возраста, после чего крысят отсаживали от матери. Начиная с 45-ого дня жизни, самцов и самок содержали отдельно. Всего в работе было использовано 286 животных из 30 выводков. День рождения крысят принимали за 0-вой день жизни, в первый день жизни каждый выводок делили на группы.

В опытах использовали водный раствор флувоксамина малеата фирмы Sigma и водный раствор гептапептида семакс (MEHFPGP), синтезированного в Секторе регуляторных пептидов Института молекулярной генетики РАН. Флувоксамин вводили внутрибрюшинно (в/б) в дозе 10 мг/кг веса (в объеме 2 мл/кг веса). Семакс вводили интраназально (и/н) в дозе 0.05 мг/кг, в водном растворе из расчета 1 мкл/10 г массы тела. Контрольным животным вводили эквивалентный объем воды для инъекций в соответствующие сроки.

В первой серии каждый выводок делили на 3 группы: контроль (“КОН”), интактный контроль (“ИК”) и флувоксамин (“ФА”). С 1 по 14 день жизни крысятам группы “ФА” ежедневно в/б вводили флувоксамин в дозе 10 мг/кг, крысятам группы “КОН” - эквивалентный объем воды для инъекций. Животные группы “ИК” не получали никаких инъекций. В возрасте 16 дней животных декапитировали.

Во второй серии экспериментов каждый выводок делили на группы: “КОН”, “ФА” и “ФА-Сем”. С 1 по 14 постнатальный день (ПНД) крысятам группы “ФА” и “ФА-Сем” ежедневно в/б вводили раствор ФА в дозе 10 мг/кг, крысятам группы “КОН” – эквивалентный объем воды для инъекций. С 15 по 28 ПНД животные группы “ФА-Сем” ежедневно получали и/н инъекции семакса в дозе 0.05 мг/кг веса, животные групп “КОН” и “ФА” – эквивалентный объем воды для инъекций.

Для оценки физического развития крысят проводили взвешивания в течение первого месяца жизни – ежедневно, в течение второго – один раз в неделю. Уровень психомоторного развития крысят оценивали в тестах “рефлекс переворота со спины на лапы” (6 ПНД) и “рефлекс отрицательного геотаксиса” (12 ПНД).

Для оценки параметров поведения крыс использовали следующие тесты: “приподнятый крестообразный лабиринт” (31 и 60 день); обучение в сложном пищевом лабиринте (42-46 дни жизни) и принудительное плавание (55 ПНД).

В возрасте 16, 32 или 63 ПНД часть крыс декапитировали, извлекали головной мозг и выделяли 4 структуры: фронтальную кору, гипоталамус, стриатум и гиппокамп. Образцы мозга немедленно замораживали в жидком азоте и в дальнейшем методом ВЭЖХ определяли содержание биогенных аминов: серотонина (5-НТ), норадреналина (НА), дофамина (ДА) и их метаболитов.

Методы тестирования:

Тест “Рефлекс переворота со спины на лапы”

Крысенка помещали в положении лежа на спину и засекали время, за которое животное переворачивалось в нормальное положение. Максимальное время регистрации – 30 сек.

Тест “Отрицательный геотаксис”

Крысенка помещали на середину наклонной поверхности (угол наклона 45°) длиной 30 см, головой по направлению склона. Записывали время, за которое животное поворачивается в направлении вверх по склону. Максимальное время тестирования – 120 с.

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ)

Крысу помещали в центр лабиринта и в течение 3-х минут регистрировали следующие показатели: латентный период первого захода в темный отсек; общее время нахождения на свету; количество выходов из темных рукавов; количество выходов на открытые рукава; количество стоек и свешиваний с открытых рукавов.

Эксперимент проводился в двух модификациях: (1) – при однородном слабом освещении (низкая стрессорная нагрузка; открытые рукава – 44-50 лк (люкс), закрытые рукава – 18-20 лк); (2) - закрытые рукава затемнены, открытые – ярко освещены (высокая стрессорная нагрузка; открытые рукава – 460 лк, закрытые рукава – 8 лк).

Выработка условного пищевого рефлекса на место (“сложный лабиринт”)

В первый день эксперимента крыс помещали в лабиринт на 30 мин с целью адаптации и угашения ориентировочно-исследовательской реакции. В последующие 4 дня животное помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно, причем длительность каждой посадки не превышала 3-х минут. Ежедневно регистрировали следующие показатели: число выполненных реакций (число случаев, когда животное находит пищевое подкрепление в течение 3-х минут пребывания в лабиринте); количество ошибок (число любых отклонений от правильной траектории движения); время выполнения реакции, а также число “стоек” и “умываний”. В дни опыта животных кормили один раз в сутки непосредственно после эксперимента.

Тест “Принудительное плавание”

Использовали цилиндры двух видов – (1) высотой 40 см и диаметром 20 см; (2) – высотой 40 см и диаметром 35 см. Крысу помещали в пластиковый цилиндр, заполненный на 2/3 водой (температурой $28-29^{\circ}\text{C}$) и в течение 10

мин регистрировали: суммарную длительность активного плавания, длительность клайминга, длительность иммобилизации, а также латентный период первой иммобилизации.

Статистическая обработка данных

Обработка результатов производилась с помощью пакета статистических программ "Statistica 8". Определялись внутригрупповые средние и разбросы. Отличия между группами оценивались с помощью методов ANOVA-MANOVA, а также непараметрических критериев Вилкоксона Манна-Уитни, Фишера и χ^2 . Данные на рисунках представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Отличия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В проведенных нами экспериментах были использованы животные обоего пола. Применение двухфакторного ANOVA-метода не выявило значимого влияния фактора пол и взаимодействия между факторами пол и группа во всех использованных нами тестах, что позволило нам представить результаты, полученные на всей выборке крыс.

1. Острые эффекты хронического неонатального введения флувоксамина с 1-го по 14-й дни жизни крыс.

В первой части работы исследовали эффекты ФА, зарегистрированные на фоне введения препарата. Крысят каждого выводка делили на 3 группы – интактный контроль ("ИК"), контроль ("КОН") и флувоксамин ("ФА"). Группа "ИК" была необходима для оценки влияния ежедневных экспериментальных манипуляций на регистрируемые нами параметры.

В ходе экспериментов проводилась оценка уровня летальности животных в экспериментальных группах. Показано, что в группе "ИК" к 16 ПНД выжило 100% крыс, в группе "КОН" выживаемость составила 95,1 %, а в группе "ФА" – 85.5% от исходного количества животных в группах (рис. 1). Хроническое неонатальное введение ФА с 1 по 14 ПНД приводило к достоверному увеличению уровня летальности относительно контроля ($p < 0.03$).

Измерение веса тела крыс показало, что во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение массы тела с 1-го по 16 ПНД. Исходных отличий по массе тела от контроля в группах "ИК" и "ФА" отмечено не было.

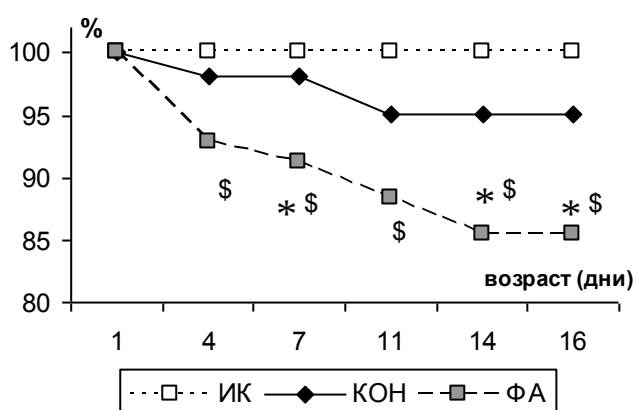


Рис. 1. Оценка уровня летальности. По оси абсцисс – возраст крыс, по оси ординат – число выживших животных в % к исходному количеству крыс в группе. Исходное число животных в группе: n (ИК)=34; n (КОН)=90; n (ФА)=88. Значимые отличия от контроля ($p < 0.05$) отмечены *, от группы “ИК” ($p < 0.05$) – \$.

При этом у крысят группы “ФА” с 6-го дня жизни масса тела была достоверно ниже, чем в контрольной группе (рис. 2Б). Отличия между группами “КОН” и “ИК”, не наблюдались (рис. 2А). Следовательно, ежедневные в/б инъекции растворителя с 1 по 14 ПНД не влияли на прирост массы тела, в то время как введение ФА в те же сроки приводило к достоверному замедлению роста животных.

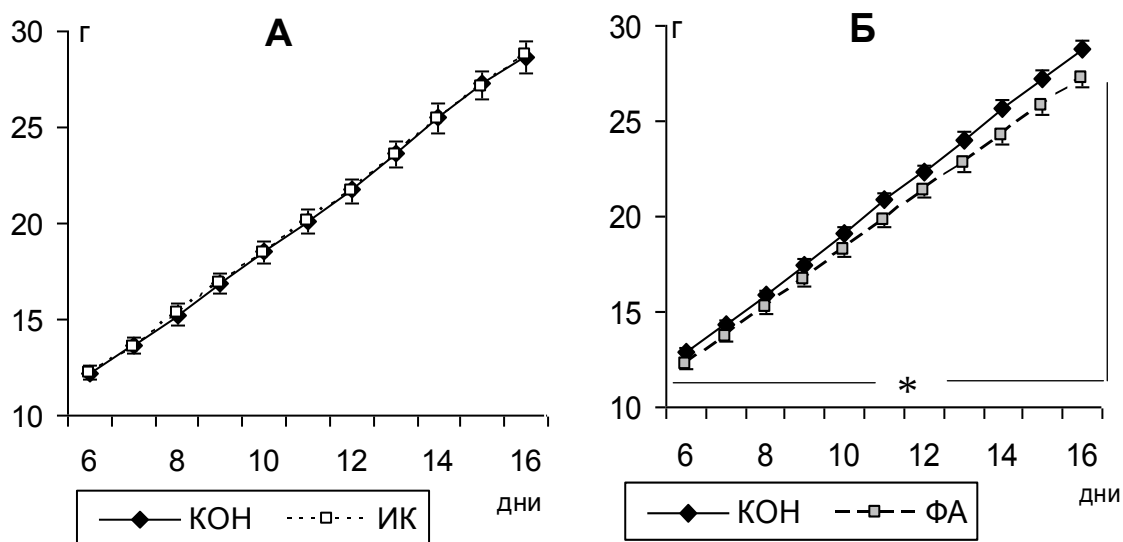


Рис. 2. Влияние неонатального введения флувоксамина на изменение массы тела крыс. По оси абсцисс – возраст крыс, по оси ординат – масса тела. Число животных в группах: в серии А n (ИК)=33, n (КОН)=33; в серии Б n (КОН)=86, n (ФА)=75. Значимые отличия от контроля ($p < 0.05$) отмечены *.

В тестах “рефлекс переворота” и “рефлекс негативного геотаксиса” было выявлено достоверное увеличение латентного периода выполнения реакций у крысят, получавших ФА, по сравнению с группой “КОН” и “ИК”, что

свидетельствует о замедлении становления моторных рефлексов. Достоверных отличий между группами “КОН” и “ИК” отмечено не было (рис. 3).

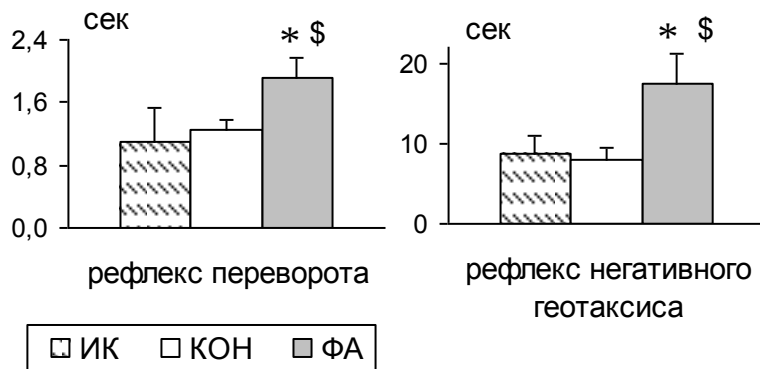


Рис. 3. Влияние флувоксамина на время выполнения моторной реакции. Число животных в группах: тест “рефлекс переворота” (n=28-30); тест “рефлекс негативного геотаксиса” (n=13-14). Значимые отличия от группы “КОН” (p<0.05) отмечены *; от группы “ИК” (p<0.05) – \$.

Замедление становления моторных рефлексов может быть связано с нарушением формирования связей между структурами мозга и морфологическими изменениями в ЦНС на фоне неонатального введения ФА.

Измерение содержания биогенных аминов в мозге крыс проводили на 16 ПНД у животных пяти выводков. Чтобы исключить влияние фактора “выводок” значения параметров для каждого выводка нормировали к собственному контролю. В группе “ФА” было зарегистрировано увеличение содержания 5-НТ в гиппокампе, а также 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) и отношения 5-ГИУК/5-НТ во всех исследованных структурах относительно контроля. По сравнению с интактным контролем в группе крыс, получавших ФА, отмечалось достоверное увеличение содержания 5-НТ и 5-ГИУК в гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме, а также отношения 5-ГИУК/5-НТ в гиппокампе (рис. 4).

Согласно данным литературы, через 2-3 суток после завершения курса введения СИОЗС у взрослых животных наблюдается увеличение содержания метаболита серотонина 5-ГИУК, а также возрастание отношения 5-ГИУК/5-НТ [Bosker et al., 2010; Renoir, 2013], что свидетельствует об увеличении скорости оборота серотонина в мозге. Следовательно, у крысят в ответ на отмену ФА, так же как у взрослых животных, наблюдается повышение активности серотонинергической системы мозга.

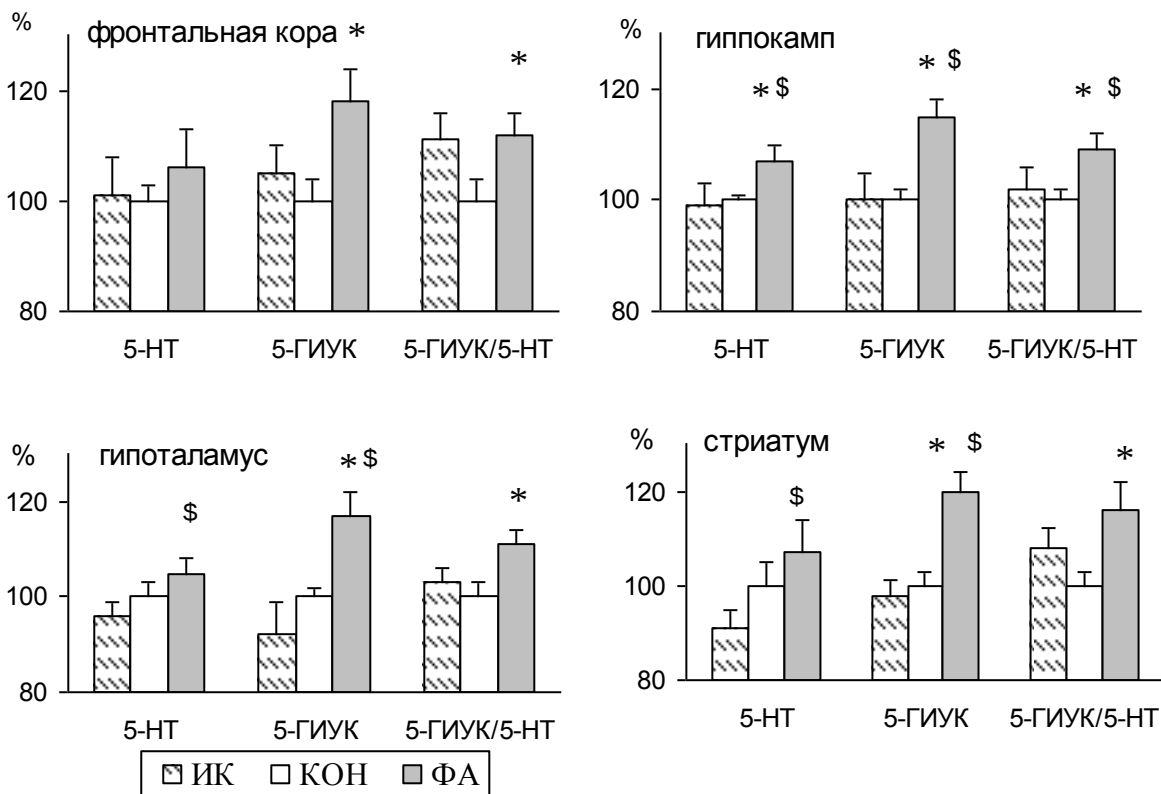


Рис. 4. Влияние флувоксамина на содержание серотонина и его метаболита 5-ГИУК в структурах головного мозга крыс в возрасте 16 дней. Число животных в группах: n (ИК)=18, n (КОН)=19, n (ФА)=18. Значимые отличия от группы "КОН" ($p < 0.05$) отмечены *; от группы "ИК" ($p < 0.05$) – \$.

На основании результатов первой части исследования можно заключить, что использованные экспериментальные манипуляции, т.е. ежедневные внутривенные инъекции растворителя, не приводят к значимым изменениям физиологических и нейрохимических показателей. На фоне введения ФА наблюдается повышение летальности, замедление становления моторных рефлексов и соматического роста. Через 2 суток после последней инъекции ФА отмечается повышение функциональной активности серотонинергической системы мозга.

2. Отставленные эффекты хронического неонатального введения флувоксамина и последующего введения семакса.

Во второй части работы изучали долговременные эффекты неонатального введения ФА и возможность их коррекции препаратом семакс. Каждый выводок крыс делили на 3 группы: "КОН", "ФА" и "ФА-Сем".

В возрасте 15 дней масса тела контрольных животных значительно превышала массу тела крыс, получавших ФА. Достоверное отставание по

массе от контроля в группе ‘ФА’ сохранялось до 28 дня жизни ($p<0.05$), в то время как в группе ‘ФА-Сем’ только до 22 дня (рис 5).

Таким образом, отставание от контроля по массе тела, вызванное неонатальным введением ФА, сохраняется в течение двух недель после отмены препарата. Вес крыс, получавших инъекции семакса, через 8 дней после отмены антидепрессанта не отличается от контрольных значений.

В конце первого месяца жизни животные трех экспериментальных групп не различались по массе тела. Однако, начиная с 35-го ПНД, масса крыс группы ‘ФА’ была достоверно ниже контроля ($p<0.05$). Крысы группы ‘ФА-Сем’ по массе тела значимо от контроля не отличались ($p>0.97$), при этом их вес превышал соответствующие значения в группе ‘ФА’ с 42 по 56 ПНД ($p<0.02$) (рис 5).

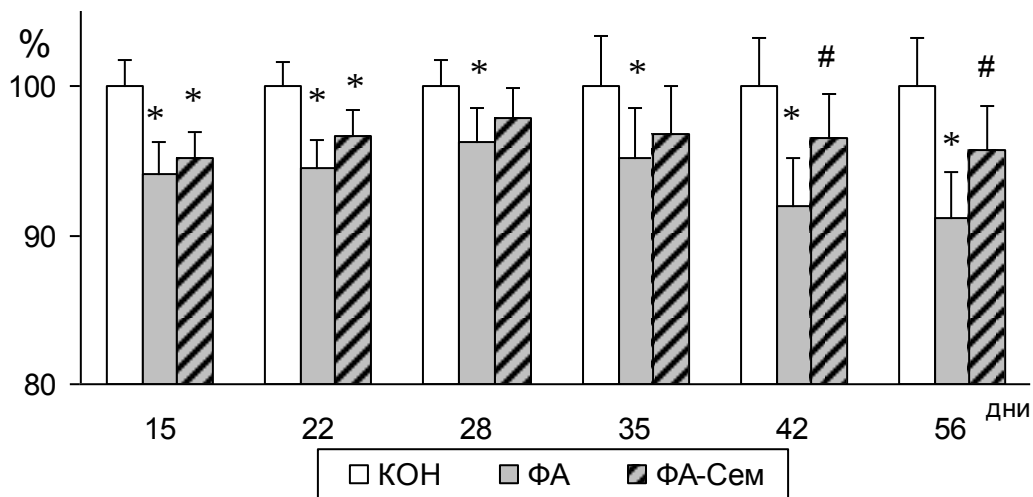


Рис. 5. Влияние флувоксамина и семакса на изменение массы тела крыс. По оси абсцисс – возраст крыс, по оси ординат – масса тела в % к соответствующим контрольным значениям. Число животных в группе: n (КОН)=63; n (ФА)=56; n (ФА-Сем)=58. Значимые отличия от контроля ($p<0.05$) отмечены *, от группы ‘ФА’ ($p<0.05$) – #.

Таким образом, начиная с 35-го дня жизни, у крыс, получавших инъекции ФА, наблюдается вторая фаза замедления прироста массы тела. Данное изменение может быть связано с отлучением крысят от матери и переходом к самостоятельному питанию. Введение семакса корректировало эффекты ФА.

Уровень тревожности животных в возрасте 31 день оценивали в тесте ‘приподнятый крестообразный лабиринт’ (ПКЛ), при этом часть животных

тестировали в условиях повышенной стрессорной нагрузки, остальных крыс – в условиях незначительной стрессорной нагрузки.

В условиях высокой стрессорной нагрузки у животных, получавших ФА, наблюдалось достоверное снижение времени, проведенного на свету и числа выходов из закрытых рукавов лабиринта ($p < 0.05$). При этом по числу стоек и свешиваний значимых отличий между группами “КОН” и “ФА” зарегистрировано не было (рис. 6А). Такие изменения свидетельствуют о повышении уровня тревожности у животных группы “ФА”. Последующее введение семакса значительно ослабляло влияние ФА на показатели поведения, приближая их к контрольным значениям. Было зарегистрировано достоверное увеличение времени, проведенного на открытых рукавах, и числа выходов на открытые рукава по сравнению с группой “ФА” (рис. 6А).

Уменьшение стрессорной нагрузки в тесте ПКЛ (равномерное неяркое освещение лабиринта) приводит к снижению у животных реакции тревоги и страха. Сравнение параметров поведения крыс контрольных групп в тесте ПКЛ в различных экспериментальных условиях показало, что снижение стрессорной нагрузки приводит к достоверному увеличению времени, проведенного на освещенной части лабиринта, числа выходов из закрытых рукавов и числа свешиваний, а также снижению числа стоек ($p < 0.01$) (рис. 6).

В таких условиях у крысят, получавших неонатально ФА, наблюдается достоверное увеличение времени, проведенного на свету, количества стоек и свешиваний с открытых рукавов лабиринта относительно контроля. Отмеченные изменения в поведении свидетельствует о снижении тревожности и увеличении исследовательской активности в условиях низкой стрессорной нагрузки у животных группы “ФА”. Введение семакса в течение 3-4 недели жизни незначительно ослабляло эффекты ФА – отмечалось снижение числа стоек и свешиваний относительно группы “ФА” (рис. 6Б).

Таким образом, неонатальное введение ФА приводило в дальнейшем к изменению поведения в ПКЛ в разных экспериментальных условиях. Последующее введение семакса незначительно влияло на поведение крыс при низкой стрессорной нагрузке, но в условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха, нормализовало уровень тревожности животных.

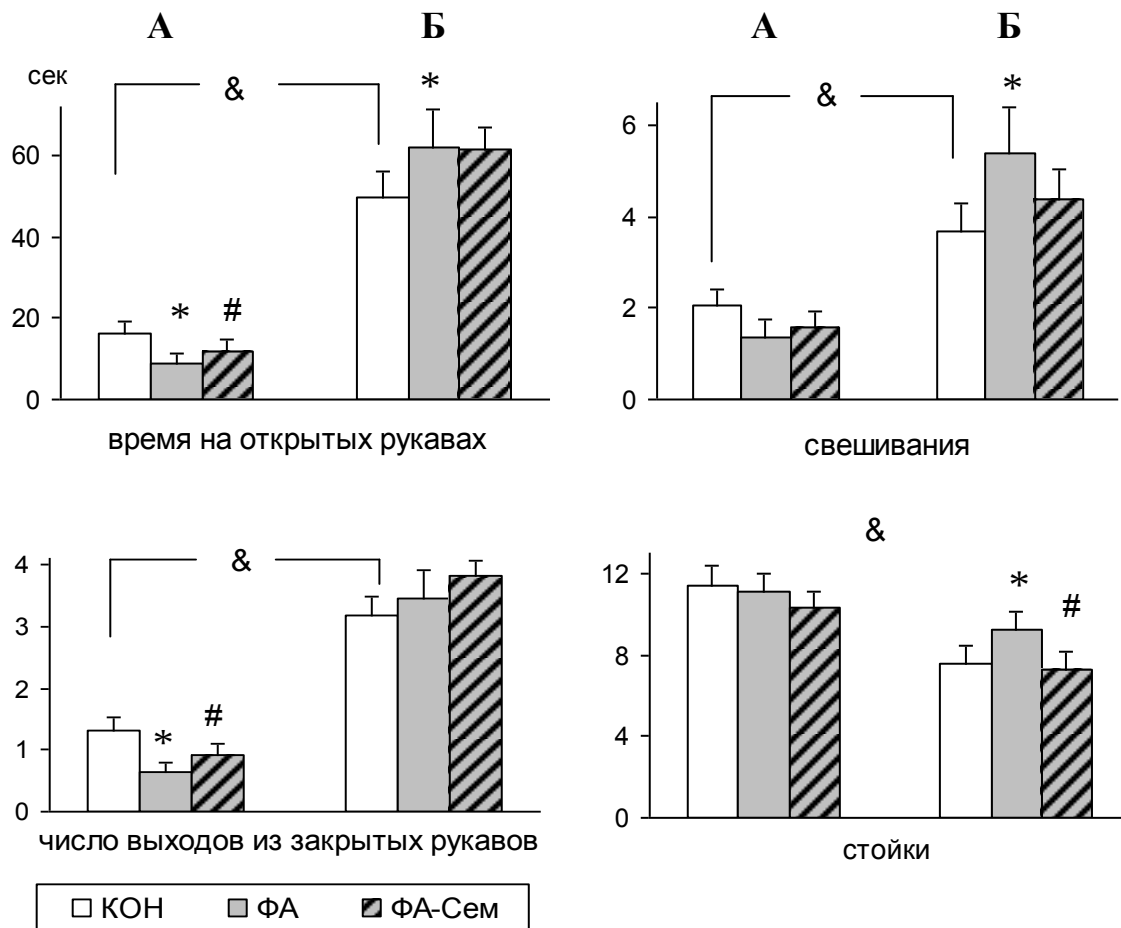


Рис. 6. Влияние флувоксамина и семакса на параметры поведения крыс в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” на 31 ПНД в условиях высокой (А) и низкой (Б) стрессорной нагрузки. Число животных в группах в серии А $n=34-40$; в серии Б $n=15-18$. Значимые отличия между контрольными группами ($p<0.01$) отмечены &, отличия от соответствующего контроля ($p<0.05$) – *, от группы “ФА” ($p<0.05$) – #.

На 60 ПНД крыс повторно тестировали в крестообразном лабиринте. В этом возрасте у животных группы “ФА” сохранялась повышенная тревожность в условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха. Параметры поведения в ПКЛ у крыс группы “ФА-Сем” не отличались от контрольных значений. Кроме того, отмечалась тенденция к увеличению времени, проведенного на открытых рукавах, и числа выходов по сравнению с группой “ФА” ($p<0.07$) (рис. 7А). Сравнение поведения контрольных крыс в различных экспериментальных условиях показало, что, как и в возрасте 1 месяц, снижение стрессорной нагрузки приводит к достоверному увеличению времени, проведенного на освещенной части лабиринта и числа свешиваний, а также снижению числа стоек ($p<0.01$) (рис. 7). При этом в условиях рассеянного освещения значимых эффектов от введения препаратов не наблюдалось (рис. 7Б).

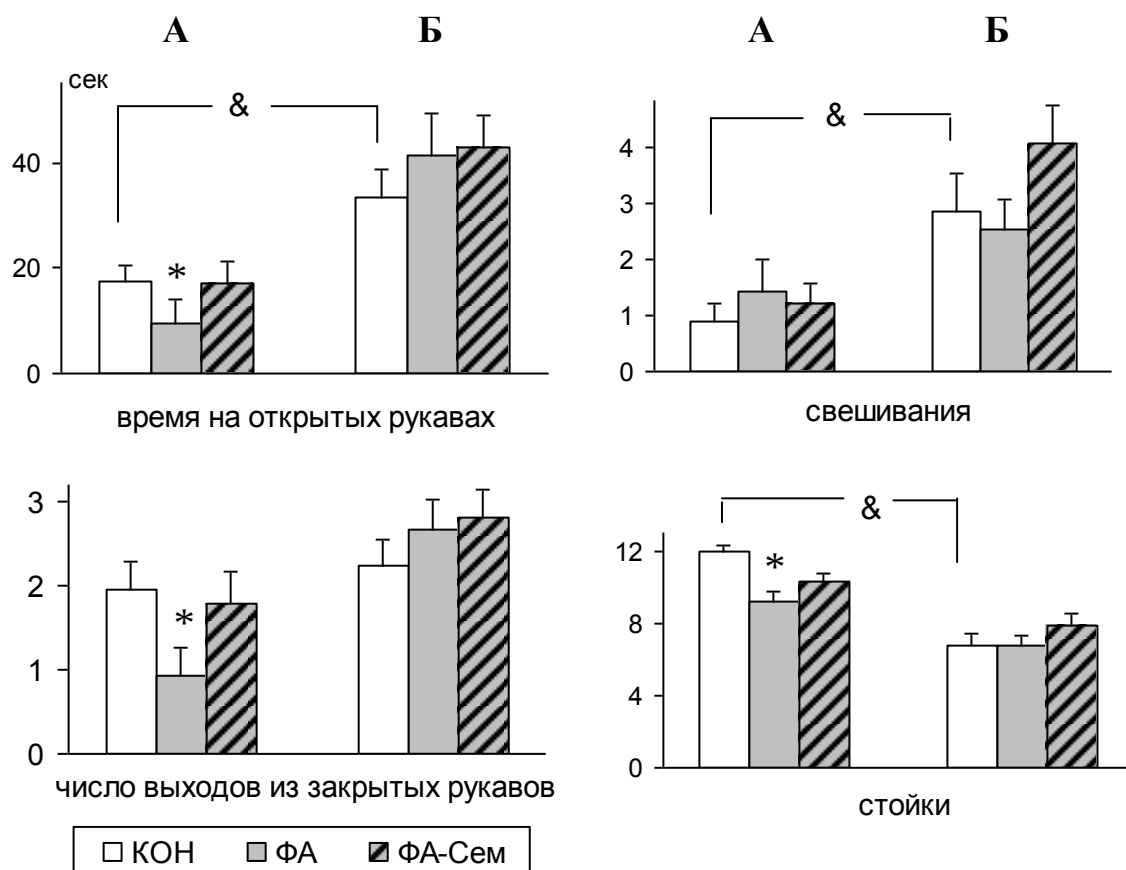


Рис. 7. Влияние флувоксамина и семакса на параметры поведения крыс в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” на 60 ПНД в условиях высокой (А) и низкой (Б) стрессорной нагрузки. Число животных в группах в серии А – $n=16-19$; в серии Б – $n=19-21$. Значимые отличия между контрольными группами ($p<0.01$) отмечены &, отличия от соответствующего контроля ($p<0.05$) – *.

Таким образом, так же, как и в возрасте одного месяца, при повторном помещении в ПКЛ в возрасте двух месяцев животные, получавшие неонатально ФА, в условиях яркого освещения характеризовались повышенным уровнем тревожности и сниженной исследовательской активностью. Введение семакса нормализовало поведение животных, нарушенное введением ФА. В условиях однородного освещения не было зарегистрировано значимых различий в поведении животных трех групп.

Стандартным тестом для оценки выраженности депрессивных составляющих поведения грызунов является тест принудительное плавание. В нашей работе было использовано 2 модификации теста: в первом случае были использованы прозрачные цилиндры диаметром 20 см, во втором случае - матовые цилиндры диаметром 35 см.

Сравнение параметров поведения контрольных животных в разных условиях теста показало, что увеличение поверхности сосуда приводит к возрастанию активного поведения животных, при этом увеличивается только активное плавание, но не длительность клайминга (рис. 8). Поведение клайминга связывают со стремлением животного избавиться от неблагоприятных условий, в то время как активное плавание отражает уровень двигательной и исследовательской активности [Shirayama et al., 2002]. При использовании меньших цилиндров значимых отличий параметров поведения между группами крыс отмечено не было (рис. 8А). В модификации теста с использованием больших цилиндров в группе “ФА” отмечалось достоверное повышение длительности активного плавания и снижение длительности иммобилизации (рис. 8Б).

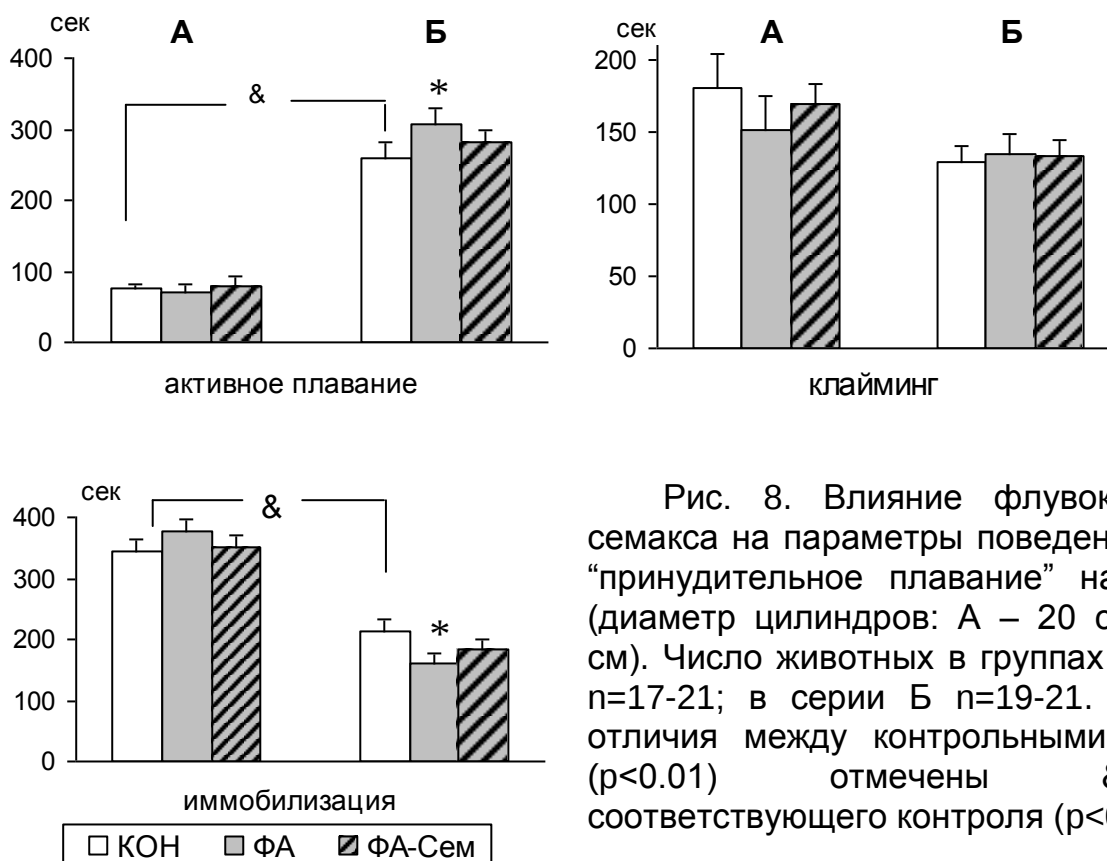


Рис. 8. Влияние флувоксамина и семакса на параметры поведения в тесте “принудительное плавание” на 55 ПНД (диаметр цилиндров: А – 20 см, Б – 35 см). Число животных в группах в серии А $n=17-21$; в серии Б $n=19-21$. Значимые отличия между контрольными группами ($p<0.01$) отмечены &, от соответствующего контроля ($p<0.05$) – *.

Можно предположить, что наблюдаемые эффекты ФА связаны не со снижением депрессивных компонентов поведения, а с возрастанием двигательной и исследовательской активности в условиях неизбежного стресса. Последующее введение семакса нормализовало поведение животных, приближая показатели к контрольным значениям.

Влияние неонатального введения ФА на способность к обучению оценивали в тесте выработки условного пищедобывательного рефлекса на место в сложном лабиринте. У животных группы “ФА” было отмечено достоверное увеличение латентного периода выхода из стартового отсека и снижении количества выполненных реакций, что свидетельствует о нарушении обучения. Кроме того, в группе ФА наблюдалось увеличение уровня груминга, что указывает на возрастание тревожности. Последующее введение семакса ослабляло последствия введения ФА, приближая показатели к контрольным значениям (рис. 9).

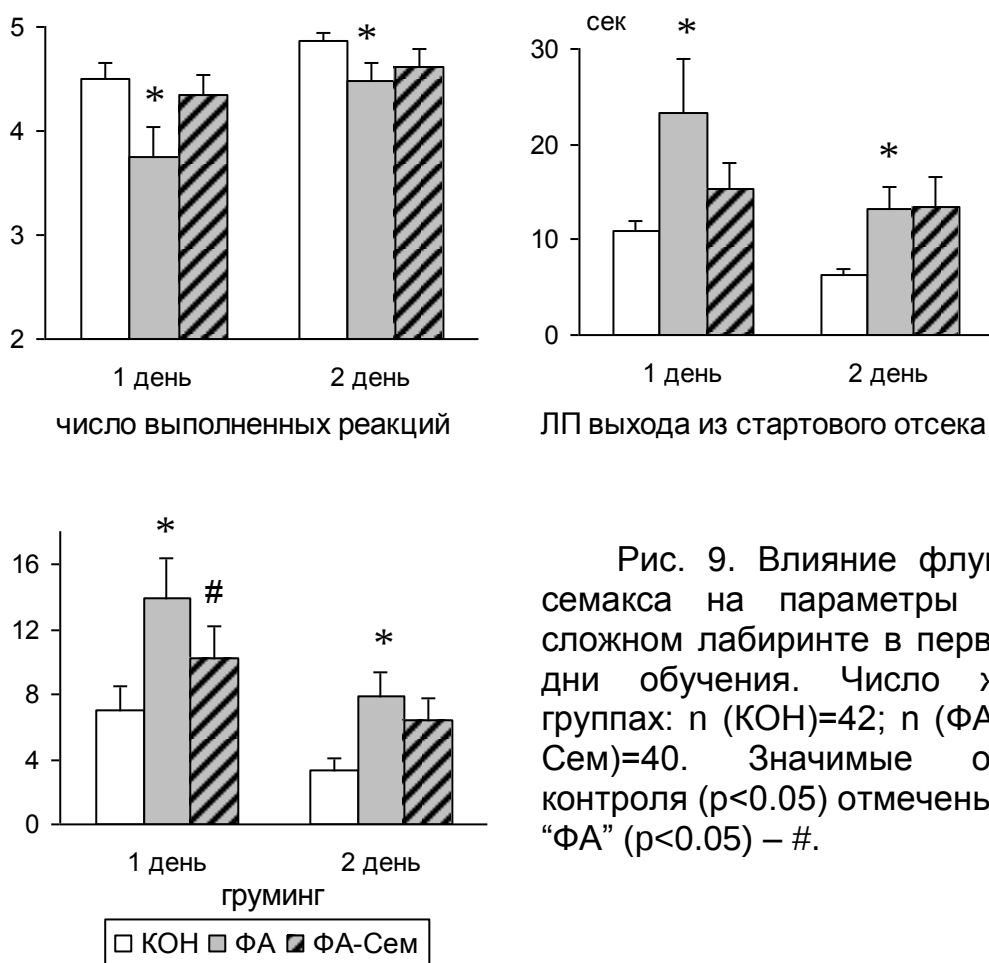


Рис. 9. Влияние флувоксамина и семакса на параметры обучения в сложном лабиринте в первый и второй дни обучения. Число животных в группах: n (КОН)=42; n (ФА)=36; n (ФА-Сем)=40. Значимые отличия от контроля ($p < 0.05$) отмечены *, от группы “ФА” ($p < 0.05$) – #.

Содержание биогенных аминов в различных структурах головного мозга определяли на 32-й и 63-й дни жизни. При анализе нормированных данных было показано значимое увеличение уровня 5-НТ в гиппокампе и стриатуме и уровня 5-ГИУК в гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме в группе “ФА” по сравнению с контролем (рис.10). В группе “ФА-Сем” было зарегистрировано

достоверное увеличение содержания 5-ГИУК во всех исследованных структурах относительно контроля, кроме того отмечалось достоверное снижение содержания 5-НТ в гиппокампе и стриатуме по сравнению с группой “ФА” (рис.10).

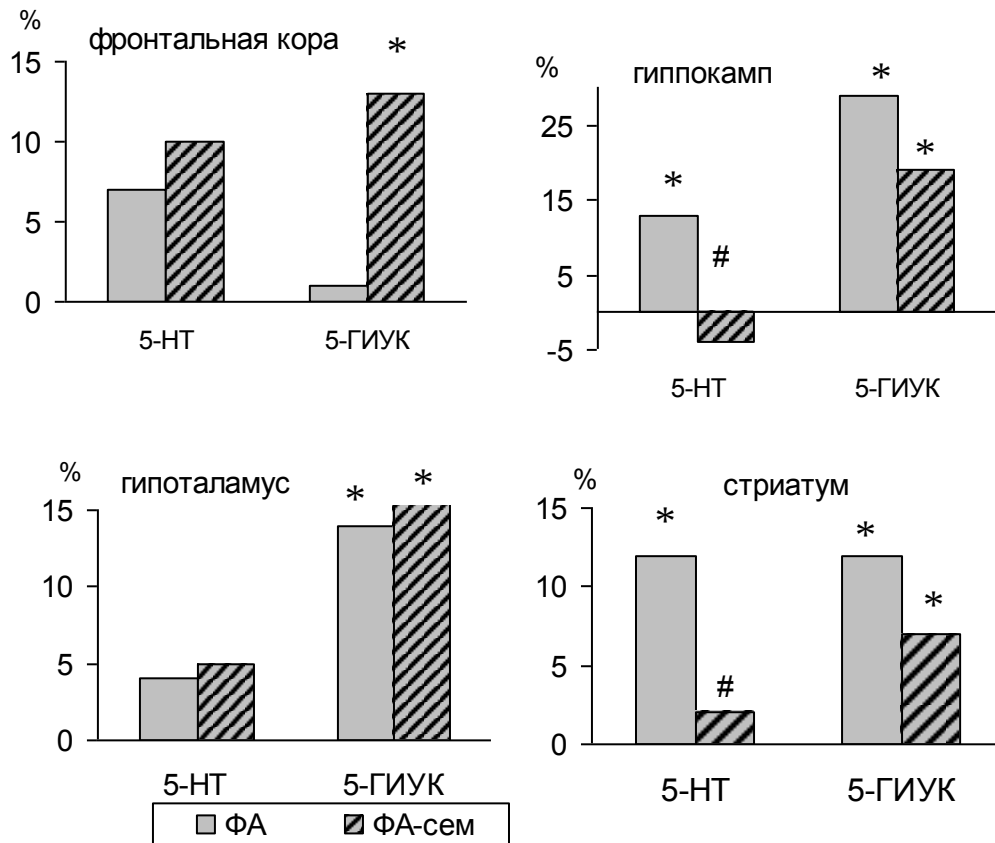


Рис. 10. Изменение содержания биогенных аминов и их метаболитов в % к контрольным значениям в структурах мозга крыс в возрасте 32 дня. Число животных в группах: n (КОН)=21; n (ФА)=20; n (ФА-Сем)=23. Значимые отличия от группы “КОН” ($p < 0.05$) отмечены *; от группы “ФА-Сем” ($p < 0.05$) – #.

При измерении содержания биогенных аминов в возрасте двух месяцев было показано достоверное увеличение содержания НА в гиппокампе и гипоталамусе, уровня 5-ГИУК в гиппокампе в группе “ФА” относительно контроля. Кроме того, у крыс группы “ФА” отмечалась тенденция к снижению уровня серотонина в гипоталамусе ($p < 0.06$) и фронтальной коре ($p < 0.08$) относительно контрольных значений (рис. 11).

В группе животных, которым после окончания курса ФА вводили семакс, содержание биогенных аминов и их метаболитов не отличалось от контроля. При этом содержание 5-НТ в гипоталамусе и фронтальной коре было значимо

выше, уровень НА в гиппокампе значительно ниже, а в гипоталамусе снижен на уровне тенденции ($p < 0.08$) по сравнению с группой “ФА”(рис. 11).

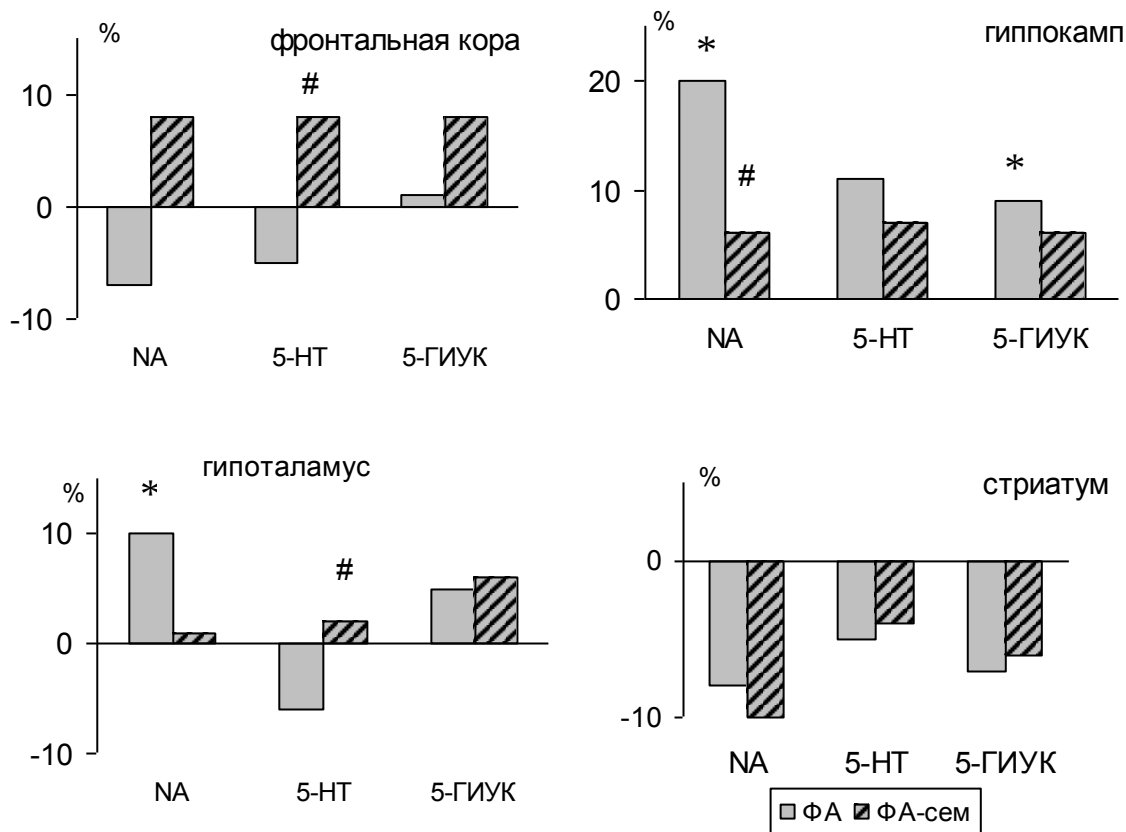


Рис. 11. Изменение содержания биогенных аминов и их метаболитов в % к контрольным значениям в структурах мозга крыс в возрасте 63 дня. Число животных в группе: n (КОН)=21; n (ФА)=18; n (ФА-Сем)=21. Значимые отличия от группы “КОН” ($p < 0.05$) отмечены *; от группы “ФА-Сем” ($p < 0.05$) – #.

Суммируя результаты второй части работы можно заключить, что после прекращения введения препарата наблюдалось отставленное замедление соматического роста тела животных. Кроме того, инъекции ФА вызывали повышение тревожности в условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха, усиление исследовательского поведения в условиях низкой стрессорной нагрузки и ухудшение способности к обучению. Также введение ФА приводило к долговременному изменению активности системы биогенных аминов мозга. Введение семакса снимало негативный эффект ФА на массу тела, нормализовало уровень тревожности, ослабляло эффекты ФА на обучение с положительным подкреплением, а также нормализовало содержание биогенных аминов в мозге.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование показало, что хроническое введение селективного ингибитора обратного захвата серотонина – флувоксамина детенышам белых крыс с 1 по 14 дни жизни приводит к изменениям физического развития, эмоционального состояния, способности к обучению и активности системы биогенных аминов мозга крыс. Отличия от контрольных животных наблюдались в течение всего времени регистрации – до 62 дня жизни крыс, т.е. носили отставленный, долговременный характер. Изменения, вызванные введением ФА, не зависели от пола животных, последствия введения препарата были зарегистрированы как у самцов, так и самок крыс.

Оценка острых эффектов неонатального введения ФА показала, что на фоне введения препарата наблюдается повышение летальности, замедление становления моторных рефлексов и соматического роста. Через двое суток после последней инъекции флувоксамина наблюдалось повышение функциональной активности серотонинергической системы мозга. Сопоставление эффектов, зарегистрированных нами на фоне неонатального введения ФА, с клиническими данными [Domar et al., 2013, Stephanson et al., 2013] позволяет заключить, что введение СИОЗС детенышам крыс в течение первых недель жизни является адекватной моделью для изучения эффектов пренатального воздействия препаратов этой группы у человека.

Изучение отставленных эффектов неонатального введения флувоксамина показало, что у крыс, получавших неонатально ФА, в возрасте 1 месяц наблюдается увеличение уровня тревожности в условиях, провоцирующих реакцию страха, а также повышение исследовательской активности в условиях низкой стрессорной нагрузки. Кроме того, нами было зарегистрировано увеличение активности 5-НТ системы. Известно, что повышенное содержание серотонина вызывает импульсивное поведение [Karpova et al., 2010; Frick et al., 2015]. Возможно, возрастание реакции на внешние раздражители у крыс, получавших ФА, связано с избыточной активностью серотонинергической системы мозга.

На 2-м месяце жизни наблюдалась вторая фаза снижения веса тела у животных группы “ФА”. Причиной замедления набора веса может быть

повышение уровня метаболизма у животных, получавших ФА, т.к. показано, что неонатальное введение СИОЗС приводит к развитию гиперметаболического состояния у мышей [Kummet et al., 2012]. Кроме того, вторая фаза снижения веса тела у животных группы ФА наблюдается во время отлучения от матери и перехода животных к самостоятельному питанию. Повышенный уровень тревожности крыс может затруднить адаптацию к новым условиям.

У крыс, получавших неонатально ФА, в возрасте 2 месяца сохранялась повышенная тревожность в стрессогенных условиях. Изменения эмоционального состояния животных, которым неонатально вводили СИОЗС, зарегистрированы во многих исследованиях [Ansorge et al., 2004; Karpova et al., 2010]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что неонатальное введение ФА, также как и других препаратов группы СИОЗС, приводит к долговременному изменению эмоционального статуса животных. Нами также было зарегистрировано негативное влияние неонатального введения ФА на способность животных к обучению.

Оценка содержания биогенных аминов в структурах мозга крыс в возрасте 2 месяца показала повышение уровня норадреналина и снижение активности серотонинергической системы. Согласно данным литературы изменения активности норадренергической системы мозга приводят к нарушению реакции на значимые стимулы окружающей среды и адаптивного поведения [West et al., 2010; Darling et al., 2011]. Вероятно, зарегистрированные нами повышенная тревожность и нарушения обучения у крыс, получавших ФА, могут быть связаны с повышенным содержанием норадреналина.

В исследованной нами литературе отсутствуют данные о способах коррекции негативных последствий неонатального введения СИОЗС. Для коррекции таких последствий нами был использован препарат Семакс. Было показано, что введение семакса животным, получавшим неонатально ФА, приводит к ослаблению эффекта гипотрофии у крыс, снижению повышенной тревожности, улучшению обучения и нормализации содержания биогенных аминов мозга (таблица).

Таблица. Острые и отставленные эффекты неонатального введения флувоксамина и их коррекция семаксом

	эффекты на фоне введения ФА	
1-14 дни жизни	↑ Летальность ↓ Физическое развитие ↓ Моторное развитие	
	↑ 5-НТ система	
	ФА 1-2 недели жизни	Семакс 3-4 недели жизни
1 месяц жизни	Физическое развитие ↓	частично нормализует
	Реакция на внешние раздражители ↑	снижает
	5-НТ система ↑	частично нормализует
2 месяц жизни	Физическое развитие ↓	нормализует
	Обучение ↓	частично нормализует
	Тревожность ↑	снижает
	Содержание NA ↑ Содержание 5-НТ ↓	нормализует активность

На основании проведенного исследования, можно заключить, что неонатальное введение ФА вызывает долговременные изменения поведения животных, что, вероятно, связано с дисбалансом системы биогенных аминов мозга. Введение семакса после завершения курса флувоксамина в значительной степени компенсирует нарушения, вызванные неонатальной блокадой SERT. У животных, получавших инъекции семакса, нормализуется масса тела, уровень тревожности и ослабляются нарушения когнитивных функций (таблица). Позитивное действие семакса на состояние крыс, получавших в неонатальный период флувоксамин, связано с его нормализующим воздействием на функциональную активность системы биогенных аминов мозга животных.

ВЫВОДЫ

1. Ежедневное внутрибрюшинное введение ингибитора обратного захвата серотонина флувоксамина в дозе 10 мг/кг с 1 по 14 дни жизни крыс вызывает как острые, так и долговременные изменения физического развития, эмоционального состояния и функциональной активности системы биогенных аминов мозга животных. Эффекты неонатального введения флувоксамина не зависят от пола животных.

2. На фоне введения флувоксамина наблюдаются следующие эффекты: повышение летальности, замедление становления двигательных функций и соматического роста крысят. Указанные эффекты свидетельствуют об адекватности использованной модели для изучения отдаленных последствий пренатального воздействия селективных ингибиторов обратного захвата серотонина у человека.

3. Неонатальное введение флувоксамина приводит к увеличению уровня тревожности крыс в условиях, провоцирующих реакцию тревоги и страха, и нарушению способности к обучению животных в возрасте 1 и 2 месяца.

4. Введение флувоксамина вызывает изменения активности системы биогенных аминов мозга крыс. Отмечается повышение оборота серотонина в стриатуме, фронтальной коре, гипоталамусе и гиппокампе через 3 дня и через 2 недели после отмены препарата. В возрасте двух месяцев у животных, получавших неонатально флувоксамин, наблюдается изменение содержания серотонина и норадреналина в гиппокампе, гипоталамусе и фронтальной коре.

5. Ежедневное интраназальное введение семакса в дозе 0.05 мг/кг с 15 по 28 день жизни крыс ослабляет долговременные негативные последствия неонатального введения флувоксамина – нормализует эмоциональное состояние, способность к обучению и содержание биогенных аминов в различных отделах мозга крыс.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Володина М.А., Мерчиева С.А., Себенцова Е.А., Глазова Н.Ю., Манченко Д.М., Андреева Л.А., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Мясоедов Н. Ф. Эффекты неонатального введения флувоксамина белым крысам и их коррекция препаратом семакс // Известия РАН. Серия биологическая.- 2014.- № 4.- с. 391-397.
2. Глазова Н.Ю., Мерчиева С.А., Володина М.А., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Кудрин В.С., Левицкая Н.Г. Влияние неонатального введения флувоксамина на физическое развитие и активность серотонинергической системы белых крыс // Acta Naturae.- 2014.- т. 6.- № 3(22).- с. 70-78.

Тезисы докладов:

3. Глазова Н.Ю., Володина М.А., Мерчиева С.А., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Коррекция семаксом негативного влияния хронического неонатального введения флувоксамина на массу тела и поведение белых крыс // Материалы IV съезда фармакологов России. – г. Казань, 2012. – с. 47.
4. Мерчиева С.А., Володина М.А., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Левицкая Н.Г., Каменский А.А. Зависимые от пола эффекты неонатального введения флувоксамина детенышам белых крыс // Материалы IV съезда фармакологов России. – г. Казань, 2012. – с. 130.
5. Себенцова Е.А., Володина М.А., Манченко Д.М., Мерчиева С.А., Глазова Н.Ю., Андреева Л.А., Левицкая Н.Г., Мясоедов Н.Ф. Влияние семакса на отставленные эффекты неонатального введения флувоксамина // Сборник материалов IV Международной научной конференции “Химия, структура и функции биомолекул”. – г. Минск, 2012. – с. 187-188.
6. Себенцова Е.А., Володина М.А., Манченко Д.М., Мерчиева С.А., Глазова Н.Ю., Андреева Л.А., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Коррекция семаксом негативных эффектов неонатального стресса и неонатального введения флувоксамина // Материалы IV съезда фармакологов России. – г. Казань, 2012. – с. 167.

7. Мерчиева С.А. Влияние неонатального введения флувоксамина на физическое развитие, поведение и серотонинергическую систему детенышей белых крыс // XX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2013”. – г. Москва, 2013. – с. 336
8. Глазова Н.Ю., Мерчиева С.А., Андреева Л.А., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Коррекция препаратом семакс негативных эффектов неонатального введения флувоксамина // VI Российский симпозиум “Белки и пептиды”. – г. Уфа, 2013. – с. 146
9. Мерчиева С.А. Семакс нормализует поведение крыс, нарушенное хроническим неонатальным введением флувоксамина // XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2014”. – г. Москва, 2014. – с. 325.
10. Manchenko D.M., Merchieva S.A., Glazova N.Yu., Kudrin V.S., Levitskaya N.G. Chronic neonatal administration of fluvoxamine delays physical development in white rats pups // 9th FENS forum of neuroscience.- Milan, Italy, 2014.- № 2637.
11. Мерчиева С.А., Глазова Н.Ю., Манченко Д.М., Кудрин В.С., Левицкая Н.Г. Хроническое неонатальное введение флувоксамина замедляет физическое развитие детенышей белых крыс // Всероссийская конференция с международным участием “Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга” – г. Санкт-Петербург, 2014. – с. 95.
12. Manchenko D.M., Merchieva S.A., Glazova N.Yu., Kudrin V.S., Levitskaya N.G. Chronic neonatal administration of fluvoxamine delays physical development and causes imbalance of the serotonin metabolism in rats pups // Eur. Neuropsychopharmacol., 2014.- v. 24 (suppl 2).- p. S185.