

Активация этанолом механизмов мозгового подкрепления*

ШАБАНОВ П.Д.
ЛЕБЕДЕВ А.А.
МЕЦЕРОВ Ш.К.

д.м.н., профессор, зав. каф. фармакологии Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург
к.б.н., ст. науч. сотр. Физиологич. отдела НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург
к.м.н., директор института наркологии, Санкт-Петербург

Алкоголизация крыс 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 5 месяцев изменяла поведение животных в «открытом поле», ротационное поведение, предпочтение места, кратковременную память в Y-образном лабиринте. В «открытом поле» увеличивались степень эмоционального реагирования и отдельные компоненты исследовательской активности. Алкоголизация существенно повышала чувствительность к условно-рефлекторному обусловливанию (тест предпочтения места) и нарушала кратковременную память животных. Эти данные указывают на активацию мезолимбической дофаминергической системы мозга и косвенно отражают повышение подкрепляющих свойств этанола.

Подкрепляющие свойства мозга определяются функционированием в основном мезокортиколимбической дофаминергической системы [1, 6–8]. Хорошо известно, что антагонисты дофамина (ДА), например галоперидол или пимозид, существенно подавляют потребление алкоголя животными. Однако снижение потребления этанола может наблюдаться также при введении агонистов ДА (фенамина или апоморфина), что связано не столько с их влиянием на само потребление, сколько обусловлено подавлением повышенной алкогольной мотивации. Алкоголь активирует ДА-ергические нейроны в среднем мозгу. Микроинъекции антагонистов ДА в прилегающее ядро и агонистов ДА в вентральную область покрышки (подавление активности ДА-ергических нейронов) снижали потребление этанола крысами [14, 19]. Химическая денервация прилегающего ядра также нарушает добровольное потребление этанола животными. Внутроструктурное введение слабого раствора этанола в вентральную область покрышки стимулировало оперантное поведение, направленное на самовведение алкоголя в эту структуру [11]. В период абстиненции высвобождение ДА в прилегающем ядре резко возрастает [20]. Это инициирует поисковое поведение, направленное на достижение потребления алкоголя, а также обостряет тягу у больных алкоголизмом. Введение на этом фоне галоперидола, блокирующего рецепторы ДА, снимает тягу и приостанавливает желание повторно принять дозу алкоголя после приема первой дозы [18].

Исследования, выполненные на крысах, селективных по признаку предпочтения алкоголя (предпочита-

ющие этанол или воду), показали, что структуры мезокортиколимбической системы мозга более чувствительны к действию этанола именно у животных, предпочитающих этанол. Более того, у таких крыс алкоголь сильнее активирует высвобождение ДА из структур мозга во время сеанса самостимуляции [20]. В дополнение к этому показано, что предпочитающие этанол животные, в отличие от не предпочитающих этанол, активнее самовводили ДА в вентральную область покрышки [11]. И, наконец, у крыс с высоким уровнем предпочтения этанола алкоголь в большей степени стимулирует двигательную активность, чем у животных с низким уровнем предпочтения этанола. Это косвенно отражает повышение активности мезолимбических структур мозга, а следовательно, и подкрепляющих свойств этанола [15]. Все это привело к развитию гипотезы, что предпочтение этанола во многом обусловлено наследственным дефицитом ДА в мозгу и гиперактивностью мезолимбической ДА-ергической медиации в ответ на прием алкоголя [16, 17].

Безусловно, ДА имеет прямое отношение и к авersiveм, и дисфорическим эффектам синдрома абстиненции от алкоголя. У крыс, хронически потреблявших этанол, после прекращения его введения развивается снижение высвобождения ДА в прилегающем ядре. В сходных условиях эксперимента у зависимых от этанола крыс облегчаются приобретение и реализация оперантного поведения нажатия на педаль для получения порции этанола, уменьшающего явления абстиненции [9]. Самовведение алкоголя на пике абстиненции устраняет дефицит высвобож-

* Поддержана грантом РФФИ № 01-04-49073.

Таблица 1

“Подкрепляющий профиль” этанола

Биологические эффекты	Преимущественно участвующие нейромедиаторные системы
Стимуляция центральной нервной системы	Дофамин, норадреналин, опиоиды, апетилхолин, возбуждающие аминокислоты
Эйфория	Дофамин, норадреналин, опиоиды
Предпочтение	Серотонин, дофамин
Уменьшение напряженности	ГАМК, возбуждающие аминокислоты
Седация	ГАМК
Мышечная релаксация	ГАМК

дения ДА, связанный с отменой этанола, и нормализует содержание ДА в прилегающем ядре до уровня, соответствующего преабстинентному состоянию.

Если охарактеризовать «подкрепляющий профиль» этанола по вовлеченности различных нейромедиаторных систем, то можно увидеть (табл. 1), что в самостимуляцию, гедонистический (эйфоризирующий) эффект и в свойства, обуславливающие предпочтение, вовлекаются преимущественно дофаминергические механизмы [9]. Таким образом, ДА-ергическая медиация играет важную роль как при остром воздействии этанола, обуславливая его положительные подкрепляющие свойства, так и при хроническом его введении, выполняя роль отрицательного подкрепляющего фактора у зависимых от этанола крыс [20].

Для изучения механизмов подкрепления, лежащих в основе действия этанола на центральную нервную систему, используется несколько основных методических приемов: 1) изучение самовведения этанола, включая технологии отбора животных по степени предпочтения этанола и воды (предпочитающие этанол или воду, с высоким и низким уровнем потребления этанола); 2) модели условного предпочтения места и вкуса; 3) исследование анксиолитических свойств этанола; 4) процедуры дифференцирования действия этанола с другими фармакологическими средствами (drug discrimination). В настоящей работе представлены данные по изучению некоторых форм ДА-зависимого поведения у крыс, подвергшихся длительной алкоголизации.

Методика

Опыты выполнены на 186 крысах-самцах линии Вистар с начальной массой 200–220 г. Животных содержали группами по 6 особей в отдельных клетках при искусственном 12-часовом освещении и температуре 22 ± 2 С. В течение 7 дней перед проведением поведенческих опытов животных ежедневно брали в руки для взвешивания и привыкания с целью снижения стрессорных реакций. Половину животных подвергали полупринудительной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости в течение 5 мес. при свободном доступе к сухой стандартизованной пище [5]. На период экспериментов алкоголизацию не прекращали. Контрольные животные получали воду. В качестве поведенческих тестов были выбраны «открытое поле», ротационное поведение, условное предпочтение места, обучение в Y-образном лабиринте. Выборка для каждой группы животных составляла не менее 10–12 крыс. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента, а также дисперсионного анализа по методу ANOVA.

Исследование поведения крыс в «открытом поле». Свободную двигательную активность животных исследовали в тесте «открытого поля» [13], представляющего собой круглую площадку диаметром 80 см, ограниченную по окружности непрозрачными бортами высотой 30 см. По всей площади открытого поля равномерно расположены 16 отверстий (норок) диаметром 3 см каждая, предназначенных для выявления видоспецифического компонента исследовательской активности у грызунов (норковый рефлекс). Освещенность открытого поля 100 лк. Во время опыта экспериментальный вольер находился в специальной звукоизолированной комнате. Продолжительность одного опыта составляла 3 мин. Регистрировали горизон-

тальную и вертикальную двигательную активность, груминговые реакции, число болюсов дефекаций и уринаций, характеризующих эмоциональность [3].

Исследование функциональной асимметрии мозга методом ротации. Число ротаций определяли в полусфере диаметром 30 см через 30 мин после введения фенамина (2,5 мг/кг внутривбрюшинно) за два последовательных периода по 10 мин, используя для анализа средние значения (определяемые за 10 мин). Регистрировали число полных вращений на 360° отдельно вправо и влево. В дальнейшем вычисляли разность между числом предпочитаемых и не предпочитаемых вращений. Если эта разность достигала пяти, считали что животное удовлетворяет критерию ротации. Фиксировали также число неполных ротаций (от 90° до 360°), которые связаны со спонтанной двигательной активностью и отражают снижение чувствительности к фенамину [12]. Для оценки чувствительности животного к фенамину в последние 10 с каждой минуты тестирования в ротометре определяли также показатель стереотипии по следующей шкале: 0 — сидит спокойно; 1 — обычная (нормальная) двигательная активность; 2 — прерывистая активность, включая частые принохивания и стойки; 3 — непрерывная стереотипная активность с обнюхиванием и стойками; 4 — отчетливые стереотипные движения головой, двигательная активность падает; 5 — то же, крыса грызет и лижет пол; 6 — преобладают последние формы поведения [10].

Условная реакция предпочтения места. Опыты проводили в прямоугольной двухкамерной экспериментальной установке размером 35 × 55 × 30 см, стороны которой различались цветом (темный и светлый) и текстурой пола и были разделены перегородкой с опускающейся и поднимающейся дверцей [2]. В течение первых двух дней эксперимента животных помещали в установку с целью их адаптации. В первый тестовый день регистрировали время нахождения животного в каждом отсеке в течение 10 мин для определения исходного предпочтения. Отсек считался предпочитаемым, если животное проводило в нем больше 50% времени. В последующие 6 дней обуславливания дверцу между отсеками закрывали. В традиционном варианте животные получают через день инъекцию препарата непосредственно перед помещением в исходно не предпочитаемый отсек на 60 мин и инъекцию физиологического раствора (0,9%-ный раствор хлорида натрия) перед помещением в исходно предпочитаемый отсек; животные контрольной группы получают только физиологический раствор. В условиях наших опытов в качестве средства инициации предпочтения использовали фенамина гидрохлорид 1 мг/кг внутривбрюшинно. Во второй тестовый день дверцы открывали и повторно измеряли время нахождения в каждом из отсеков в течение 10 минут.

Исследование кратковременной памяти в Y-образном лабиринте. Изучение кратковременной памяти с помощью Y-образного лабиринта проводили в экспериментальной установке, представлявшей камеру с тремя равными рукавами, расположенными по отношению друг к другу под углом 120°. Каждый рукав камеры был прямоугольной формы 30 × 10 см и высотой 30 см, центральная площадка представляла собой равновеликий треугольник со стороной, равной 10 см. Перед опытом один рукав камеры закрывали непрозрачной перегородкой. Крысу сажали в центр установки, и в течение 5 мин она обследовала свободные два ее рукава. Регистрировали время нахождения в рукавах. Через 2 ч повторяли эксперимент, предварите-

льно открыв третий, закрытый, рукав. Животное могло обследовать 3 рукава экспериментальной камеры в течение 5 мин, регистрировали те же показатели во всех рукавах. Об уровне кратковременной памяти судили по времени нахождения в новом рукаве установки.

Результаты исследования

Влияние алкоголизации на поведение в «открытом поле». Алкоголизация крыс 15%-ным раствором этанола в течение 5 мес приводила к увеличению локомоций (горизонтального и вертикального компонентов), снижению паттерна «сидение», повышала вероятность перехода из вертикальных стоек в обноживание. Это указывает на повышенную двигательную активность и более высокую эмоциональность данных животных, что косвенно может расцениваться как участие в этих эффектах мезолимбической ДА-ергической системы мозга.

Влияние алкоголизации на ротационное поведение. Ротационное поведение и стереотипии вызывали внутрибрюшинным введением фенамина с регистрацией числа ротаций и стереотипий через 30 мин. Фенамин (2,5 мг/кг) инициировал ротационное поведение, определяемое в ротометре по числу вращений и стереотипий. У контрольных (неалкоголизованных) крыс и животных, подвергшихся алкоголизации в течение 5 мес, ротационное поведение не менялось (табл. 2).

Влияние алкоголизации на условное предпочтение места. В условиях нашего эксперимента в качестве индуктора предпочтения использовали фенамин (1 мг/кг), в качестве контроля — физиологический раствор. У контрольных животных обусловливание фенамином не приводило

к существенному увеличению предпочтения места в не-предпочитаемом отсеке установки. Алкоголизация в течение 5 мес. повышала чувствительность к процедуре обусловливания. В этом случае инъекция этанола в 2,5 раза повышала пребывание животного в непредпочитаемом отсеке после обусловливания (табл. 3).

Влияние алкоголизации на кратковременную память в Y-образном лабиринте. Исследование кратковременной памяти в Y-образном лабиринте по соотношению пребывания животных в старом и новом рукавах лабиринта выявило, что у алкоголизованных в течение 5 мес. крыс время нахождения в новом рукаве уменьшается почти в 3 раза в сравнении с контрольными (неалкоголизованными) животными. Время пребывания в старом рукаве уменьшалось незначительно (табл. 4). Это указывает на то, что алкоголизация существенно нарушает кратковременную память.

Обсуждение результатов

Проведенные исследования показали, что алкоголизация крыс в течение 5 мес. изменяет поведение животных, увеличивая степень их эмоционального реагирования и отдельные компоненты исследовательской активности в открытом поле. В то же время алкоголизация повышает чувствительность к условно-рефлекторному обусловливанию (тест предпочтения места) и нарушает кратковременную память животных. Повышение исследовательской и двигательной активности алкоголизованных животных указывает на активацию мезолимбической ДА-ергической системы мозга и косвенно отражает подкрепляющие свойства этанола [15].

Таблица 2

Влияние алкоголизации на ротационное поведение крыс

Группа крыс	Всего полных вращений (левых и правых)	Вращения влево	Вращения вправо	Число стереотипий
Контроль	15,2±2,7	6,7±2,2	8,5±2,9	2,6±0,2
Алкоголизация 5 мес.	12,5±1,9	7,2±1,6	5,3±1,7	2,6±0,12

Таблица 3

Влияние алкоголизации на условное предпочтение места, вызванное фенамином (1 мг/кг) у крыс

Группа крыс	Время нахождения в непредпочитаемой камере, с	
	До обусловливания	После обусловливания
Контроль	52,5±16,4	62,2±20,6
Алкоголизация 5 мес.	64,1±19,4	143,2±42,6*

Примечание. *P<0,05 по отношению к показателям до обусловливания

Таблица 4

Влияние алкоголизации на кратковременную память крыс в Y-образном лабиринте

Группа крыс	Время нахождения в старом рукаве, с	Время нахождения в новом рукаве, с
Контроль	37±17	75±22
Алкоголизация 5 мес.	23±11	26±9*

Примечание. *P<0,05 по отношению к контрольной группе

Об этом свидетельствует и повышение чувствительности к обуславливанию в процессе исследования условного предпочтения места. Время пребывания в исходно не предпочитаемом отсеке двухкамерной установки у алкоголизованных животных увеличивается более чем в 2 раза. Интересно отметить, что фактором обуславливания в этом случае являлось не активное вещество, а введение физиологического раствора на фоне состояния длительной (в течение 5 мес.) алкоголизации. Известно, что грызуны активно регулируют объем потребляемой жидкости. В условиях эксперимента одна крыса потребляет в среднем 20–25 мл жидкости в сутки. Если пересчитать на 15%-ный раствор этанола, то одно животное потребляет приблизительно 3 г этанола в сутки (речь идет о полупринудительной алкоголизации, когда 15%-ный раствор этанола является единственным источником жидкости). Организм крысы позволяет достаточно эффективно метаболизировать указанное количество этанола. Однако при длительной алкоголизации (в наших опытах в течение 5 мес.) сказывается повреждающее действие этанола на организм, изменяется чувствительность к этанолу, трансформируются его подкрепляющие свойства. В настоящем исследовании видно, что алкоголизация повышает подкрепляющие свойства этанола, что, по-видимому, связано с активацией мезокортиколимбической ДА-ергической системы мозга.

В то же время, алкоголизация нарушает высшие функции мозга, в частности кратковременную память. В тесте обучения в Y-образном лабиринте алкоголизация достоверно и довольно существенно снижала время пребывания в новом (неизученном) отсеке лабиринта. Фактически время пребывания в старом и новом рукавах у крыс, подвергшихся алкоголизации, совпадает. На фоне незначительного снижения времени пребывания в обоих рукавах лабиринта это указывает на элемент стереотипного поведения. Ранее было показано [4], что при изучении лабиринтных рефлексивных в Y-образном лабиринте последовательное посещение рукавов лабиринта без предпочтения того или иного рукава может рассматриваться как элемент стереотипного поведения, обусловленного активацией ДА-ергической системы мозга. По-видимому, и в наших опытах отсутствие предпочтения и исследования нового рукава лабиринта может трактоваться как вовлечение (активация) ДА-ергической системы мозга.

Список литературы

1. Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Сопоставление реакции самостимуляции и условного предпочтения места при введении фенамина у крыс // Журн. высш. нервн. деят. — 1992. — Т. 42., вып. 4. — С. 692–698.
2. Лебедев А.А., Гурковская О.В., Ноздрачев А.Д., Шабанов П.Д. Участие дофаминергической системы мозга в эффектах глюкокортикоидных гормонов // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. — 2001. — Т. 87, № 7. — С. 911–917.
3. Пошивалов В.П. Этологический атлас для фармакологических исследований на лабораторных грызунах. — М., 1978. — 43 с. / Деп. в ВИНТИ, № 3164-78.
4. Шабанов П. Д., Бородин Ю. С. Нарушения памяти и их коррекция. — Л.: Наука, 1989. — 127 с.
5. Шабанов П. Д., Калишевич С. Ю. Биология алкоголизма. — СПб: Лань, 1998. — 272 с.
6. Шабанов П.Д., Лебедев А.А. Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейрохимическая организация и участие в формировании зависимости от психостимуляторов // Психофармакол. и биол. наркол. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 13–26.
7. Шабанов П. Д., Лебедев А. А., Ноздрачев А. Д. Функциональное маркирование состояния социальной изолированности с помощью аналога меланостатина алапиды у крыс // ДАН. — 1999. — Т. 368, № 2. — С. 283–285.
8. Шабанов П.Д., Ноздрачев А.Д., Лебедев А.А., Лебедев В.В. Нейрохимическая организация подкрепляющих систем мозга // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. — 2000. — Т. 86, № 8. — С. 935–945.
9. Alcohol and health. 9th special report to the US Congress / Ed. by E. Gordis. Washington: US Dept. Health and Human Services. — 1997. — 400 p.
10. Clarke P.B.S., Jakubovic A., Fibiger H.C. Anatomical analysis of the involvement of mesolimbocortical dopamine in the locomotor stimulant actions of d-amphetamine and apomorphine // Psychopharmacology. — 1988. — Vol. 96. — P. 511–520.
11. Gatto G. J., McBride W. J., Murphy J. M. et al. Ethanol self-infusion into ventral tegmental area by alcohol-preffering rats // Alcohol. — 1994. — Vol. 11, № 6. — P. 557–564.
12. Glick S.D., Jerussi T.P., Fleisher L.N. Turning in circles: the neuropharmacology of rotation // Life Sci. — 1976. — Vol. 18. — P. 869–896.
13. Hall C.S. Emotional behavior in the rat // J. Compar. Psychol. — 1934. — Vol. 18. — P. 385–391.
14. Hodge C. W., Haraguchi M., Erickson H., Samson H. H. Ventral tegmental microinjection of quinpirole decrease ethanol and sucrose-reinforced responding // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1993. — Vol. 17, № 2. — P. 370–375.
15. Krimmer E. C., Schechter M. D. HAD and LAD rats respond differently to stimulating effect but not discriminative effects of ethanol // Alcohol. — 1992. — Vol. 9, № 1. — P. 71–74.
16. McBride W. J., Murphy J. M., Ikemoto S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies // Behav. Brain Res. — 1999. — Vol. 101. — P. 129–152.
17. McBride W. J., Murphy J. M., Lumeng L., Li T. K. Serotonin, dopamine, and GABA involvement in alcohol drinking of selectively bred rats // Alcohol. — 1990. — Vol. 7, № 3. — P. 199–205.
18. Modell J. G., Mountz J. M., Glaser F. B., Lee J. Y. Effect of haloperidol on measures of craving and impaired control in alcoholic subjects // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1993. — Vol. 17, № 2. — P. 234–240.
19. Samson H. H., Hodhe C. W., Tolliver G. A., Haraguchi M. Effect of dopamine agonists and antagonists on ethanol-reinforced behavior: The involvement of nucleus accumbens // Brain Res. Bull. — 1993. — Vol. 30, № 1–2. — P.133–141.
20. Weiss F., Lorang M. T., Bloom F. E., Koob G.F. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: Genetic and motivational determinants // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1993. — Vol. 267, № 1. — P. 250–258.

ETHANOL-INDUCED ACTIVATION OF BRAIN REWARD MECHANISMS

Shabanov P.D., Lebedev A.A., Meshcherov S.K.

Alcoholization of rats with 15% ethanol solution as an alone source of liquid during 5 months changed behaviors in open field, rotation behavior, place preference and short-term memory in Y-maze. There was the increased level of emotional and explorative activity in open field. Alcoholization enhanced significantly the sensitivity to conditioned place preference and disturbed short-term memory of rats. These data show the activation of mesocorticolimbic dopaminergic system of the brain and reflex indirectly the increased reinforcing properties of ethanol.