

Экспериментальная оценка подкрепляющих свойств фенамина при дисбалансе гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы у крыс*

ШАБАНОВ П.Д.

д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии Российской военно-медицинской академии МО РФ, Санкт-Петербург;

САПРОНОВ Н.С.

член-корр. РАМН, д.м.н., профессор, зав. отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

ЛЕБЕДЕВ А.А.

д.б.н., с.н.с. НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

СТРЕЛЬЦОВ В.Ф.

аспирант кафедры фармакологии Российской военно-медицинской академии МО РФ, Санкт-Петербург.

Удаление гипофиза у крыс существенно меняло подкрепляющие свойства фенамина (1 мг/кг, внутрибрюшинно), оцениваемые по влиянию на самостимуляцию латерального гипоталамуса. При этом у животных с гипофизэктомией повышались пороги самораздражения, умеренно снижалась частота самостимуляции и включались ее аверсивные механизмы. Вторичноподкрепляющие свойства фенамина, оцениваемые по предпочтению места, проявлялись одинаково у интактных и ложноперированных животных. АКТГ-цинк фосфат (10 ЕД/кг) снижал, а гипофизэктомия, адреналэктомия и введение дексаметазона (0,25 мг/кг) устраняли подкрепляющие свойства фенамина. Сделан вывод, что проявление подкрепляющих свойств фенамина в значительной степени определяется балансом гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы. Дисбаланс системы отражается в большей мере на вторичноподкрепляющих свойствах, когда в механизмы подкрепления вовлекаются как эмоциональные, так и мнестические компоненты поведенческих реакций.

В головном мозге существует специализированная система нейронов, дофаминергических по своей химической организации, которая опосредует эффекты психостимулирующих средств. Эта система имеет довольно четкую структурно-функциональную организацию и включает передний мозговой пучок, прилежащее ядро, вентральную область покрышки и медиальную префронтальную кору. Она описывается как мезокортиколимбическая система мозга. Исследованиями последних лет [3, 6] показано, что глюкокортикоидные гормоны активируют подкрепляющие системы мозга по типу психостимуляторов. До настоящего времени не выяснено значение отдельных гормонов (тропных гормонов гипофиза, гормонов периферических эндокринных желез, в первую очередь, глюкокортикоидов), в механизмах действия психостимуляторов амфетаминового ряда [5]. Знание этих вопросов принципиально важно для представлений о предпосылках формирования лекарственной зависимости от психостимуляторов, особенно в раннем постнатальном периоде жизни. Среди психостимуляторов наиболее часто используют непрямой адреномиметик фенамин, механизмом действия которого является усиление высвобождения дофамина и в меньшей степени — норадреналина и серотонина из пресинаптических депо с одновременной умеренной блокадой моноаминоксидазы [2, 4].

Моделирование дисрегуляции гормональных систем является важным аспектом исследования функционального значения отдельных компонентов этих систем, будь то рилизинг-гормоны, тропные гормоны гипофиза или гормоны периферических эндокринных желез. В этом отношении наиболее изучена гипофизарно-надпочечниковая система. Установлено, что гормоны этой системы участвуют в формировании общей реактивности (стрессовых реакций), эмоциональных компонентов поведения,

памяти и обучения, механизмов зависимости [1]. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение подкрепляющих свойств психостимулятора фенамина у крыс при экспериментальном дисбалансе гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы, вызванной удалением гипофиза либо надпочечников или же введением адренокортикотропного гормона (АКТГ) либо синтетического глюкокортикоида дексаметазона.

Методика

Животные. В опыте использовано 112 крыс-самцов Вистар массой 220—250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде в условиях инвертированного света с 6.00 до 18.00.

Исследование поведения. Использовали метод самостимуляции латерального гипоталамуса для оценки первично-подкрепляющих свойств фенамина и условную реакцию предпочтения места (УРПМ) в трехкамерной установке для оценки вторичноподкрепляющих свойств препарата.

Стереотаксическая процедура. Стереотаксические операции по вживлению электродов в мозг крысам проводили под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) с использованием стереотаксического прибора фирмы Medcor, Венгрия. Билатерально в латеральное гипоталамическое ядро вживляли нихромовые монополярные электроды в стеклянной изоляции (диаметр электрода 0,25 мм, длина оголенного кончика 0,25–0,30 мм, его толщина 0,12 мм) по следующим координатам: AP = 2,5 мм назад от брегмы, SD = 2,0 мм латерально от сагитального шва, H = 8,4 мм от поверхности черепа [8]. Индифферентный электрод из нихромовой проволоки закрепляли на черепе животного. Все электроды коммутировались на микрораземе, который фиксировался на черепе самотвердеющей пластмассой. Поведенческие эксперименты начинали не ранее 10 дней после операции. По окончании всех опытов про-

* Поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 01-04-49073).

изводили морфологический контроль локализации кончиков электродов на серии фронтальных срезов мозга, которые окрашивали по методу Ниссля, предварительно производили коагуляцию через вживленные электроды (1 мА, 30 с).

Самостимуляция мозга. Использовали классический вариант изучения самораздражения мозга в виде pedalной самостимуляции в камере Скиннера. Через 10 дней после вживления электродов в мозг крыс обучали нажимать на педаль в камере Скиннера для получения электрического раздражения мозга (прямоугольные импульсы отрицательной полярности, длительностью 1 мс, с частотой 100 Гц, в течение 0,4 с, пороговые значения тока в режиме “фиксированных пачек”). Для повторного раздражения животное было вынуждено вновь нажимать на педаль. Частота и длительность нажатий регистрировались автоматически. Анализировали частоту и время каждого нажатия на педаль. На основании этих результатов вычисляли коэффициент “рассогласования” [4] по формуле:

$$K = \frac{T_1 - T_2}{T_1 + T_2},$$

где K — коэффициент “рассогласования”; T_1 — время нажатия педали после окончания стимуляции в случае длительных нажатий, по длительности больших, чем 0,4 с; T_2 — время от момента отжатия педали до окончания стимуляции.

Коэффициент “рассогласования” принимает значения от -1 до $+1$ и показывает долю активации положительной и отрицательной подкрепляющей фазы самостимуляции [5, 6]. Если данный коэффициент принимает положительные значения, то это означает, что крыса продолжала нажимать на педаль даже после того, как раздражение мозга прекратилось. При отрицательных значениях коэффициента “рассогласования” крыса заканчивала нажимать на педаль раньше, чем прекратилась стимуляция мозга. Учитывая, что реакции самостимуляции можно рассматривать как одновременное включение положительного и отрицательного механизмов подкрепления, сдвиг в сторону увеличения и снижения коэффициента позволяет говорить как об изменении частоты самостимуляции, так и об изменениях подкрепляющих свойств мозга. Поэтому как дополнительный критерий изменения подкрепляющих свойств стимуляции коэффициент “рассогласования” является удобным показателем для оценки действия фармакологических препаратов. Последние вводили на 3-й день эксперимента после стабилизации реакции при использовании фиксированного значения силы тока. Регистрировали число нажатий на педаль и коэффициент “рассогласования” в течение 15 мин эксперимента, затем производили внутрибрюшинную инъекцию препарата и через 30 мин регистрировали те же показатели (число нажатий на педаль и коэффициент “рассогласования”) за 15-минутный интервал времени [6].

Условное предпочтение места. Предпочтение места исследовали в трехкамерной установке [9, 10]. Два крайних отсека ($36 \times 34 \times 28$ см) были отделены от центрального отсека (18×34 см), куда первоначально помещалось животное, поднимающейся дверцей. Крайние отсеки установки различались цветом и текстурой пола: один из них имел темные пластиковые стены и гладкий пол, второй — светлые стены и пол, посыпанный опилками. В течение первых трех дней эксперимента животное помещали на

15 мин в установку (в центральный отсек), где оно свободно перемещалось и могло исследовать все отсеки. На 3-й день регистрировали время, в течение которого крыса находилась в светлом и темном отсеках установки, при этом выявляли предпочитаемый (где крыса пребывала более 50% времени) и не предпочитаемый отсеки. На 4-й, 6-й и 8-й дни эксперимента каждой крысе вводили фенамина гидрохлорид (1 мг/кг) внутривбрюшинно и через 40–60 мин помещали в не предпочитаемый отсек. На 5-й, 7-й и 9-й дни вводили изотонический раствор хлорида натрия (физиологический раствор) и помещали животное в предпочитаемый отсек. На 10-й день инъекций не делали и проводили контрольное тестирование, помещая крысу на 15 мин в центральный отсек с последующим определением времени нахождения в каждом из крайних отсеков (предпочтения). Динамику предпочтения P вычисляли по формуле:

$$P = \frac{T_1 - T_2}{T_1 + T_2} - \frac{T_3 - T_4}{T_3 + T_4},$$

где T_1 — время нахождения в изначально предпочитаемом отсеке на 3-й день; T_2 — время нахождения в изначально не предпочитаемом отсеке на 3-й день; T_3 — время нахождения в изначально предпочитаемом отсеке на 8-й день; T_4 — время нахождения в изначально не предпочитаемом отсеке на 8-й день.

Величина P отражает степень предпочтения того или иного отсека: чем больше ее значение, тем больше предпочтение.

Оперативные вмешательства. Экстирпацию гипофиза у крыс осуществляли трансаурикулярно в стереотаксическом приборе под эфирным наркозом, как описано ранее [7]. Адреналэктомию производили также под эфирным наркозом, используя параспинальный доступ. Ложная операция повторяла все этапы оперативного вмешательства без удаления эндокринных желез. Поведенческие опыты начинали через 7 суток после оперативных вмешательств.

Фармакологические агенты для анализа. В опытах использовали не прямой адреномиметик фенамин (1 мг/кг), адренокортикотропный гормон АКТГ-цинк фосфат (10 ЕД/кг) и дексаметазон (0,25 мг/кг). Все вещества вводили внутривбрюшинно за 40–60 мин до начала опыта.

Статистический анализ проводили с использованием метода ANOVA.

Результаты исследования

В работе изучали значение отдельных структурно-функциональных образований системы гипоталамус — гипофиз — надпочечники в механизмах первичного и вторичного подкрепления. Для этого исследовали подкрепляющие свойства фенамина гидрохлорида (1 мг/кг) в 5 группах крыс: 1) с удалением гипофиза; 2) с удалением надпочечников; 3) с введением АКТГ-цинк фосфата (10 ЕД/кг); 4) с введением дексаметазона (0,25 мг/кг); 5) с ложной операцией (оперативные манипуляции, связанные с удалением надпочечников или гипофиза, но без удаления эндокринных желез). В качестве модели первичного подкрепления использовали реакцию самостимуляции латерального гипоталамуса, в качестве модели вторичного подкрепления — условную реакцию предпочтения места (УРПМ) в трехкамерной установке. Опыты начинали через 7 дней после оперативных вмешательств.

Исследование первичноподкрепляющих свойств фенамина у крыс с гипопизэктомией

Использовали две группы крыс — гипопизэктомированных и с ложной операцией. Фенамин (1 мг/кг) повышал реакцию самостимуляции латерального гипоталамуса у ложнооперированных крыс на 36%, что соответствует показателям у интактных животных (35-45%). Единственным отличием был больший разброс полученных данных в сравнении с неоперированными крысами.

У гипопизэктомированных крыс почти в 2 раза повышались пороги самостимуляции (с 64 ± 12 мкА у ложнооперированных до 117 ± 21 мкА у крыс с гипопизэктомией). У ложнооперированных животных фенамин вызывал гиперактивность, активацию груминга, поискового поведения, принюхиваний, повышение контактов (общительности) с сородичами. Напротив, у гипопизэктомированных крыс фенамин вызывал умеренную седацию и длительный груминг. Характерно, что у таких животных за периодами самостимуляции следовали периоды покоя без нажатия на педаль. Тем не менее, достоверных различий в частоте самостимуляции между ложнооперированными и гипопизэктомированными животными не получено, хотя у последних отмечена тенденция к уменьшению показателей частоты самораздражения мозга (табл. 1).

Важной характерологической особенностью при сравнении ложнооперированных и гипопизэктомированных животных стало изменение коэффициента “рассогласования”, характеризующего позитивную фазу подкрепления при самостимуляции. Так, коэффициент “рассогласования” у ложнооперированных крыс составлял обычные для контроля значения $0,23 \pm 0,02$, тогда как у крыс с удаленным гипофизом он принимал отрицательные значения до $-0,21 \pm 0,03$, что указывает на появление у них аверсивной фазы самостимуляции. Сходные изменения были получены нами ранее [10] при локомоторной самостимуляции в челночной камере. В условиях этого эксперимента фенамин удлинял время нахождения ложнооперированных крыс в активной зоне камеры и снижал его у гипопизэктомированных животных.

Таким образом, удаление гипофиза существенно меняет первично-подкрепляющие свойства самостимуляции латерального гипоталамуса. Гипопизэктомия повышает пороги самостимуляции, изменяет ее типичную картину, включает аверсивную фазу самостимуляции, что подтверждает участие гормонов гипофиза в оптимальной реализации первичноподкрепляющих свойств фенамина.

Исследование вторичноподкрепляющих свойств фенамина у крыс с дисбалансом гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы

Вторичноподкрепляющие свойства фенамина оценивали по УРПМ в трехкамерной установке [10, 11]. Фенамин существенно (более чем в 3 раза) увеличивал степень предпочтения П у ложнооперированных крыс, служивших активным контролем. Величина П характеризует способность препарата увеличивать время нахождения

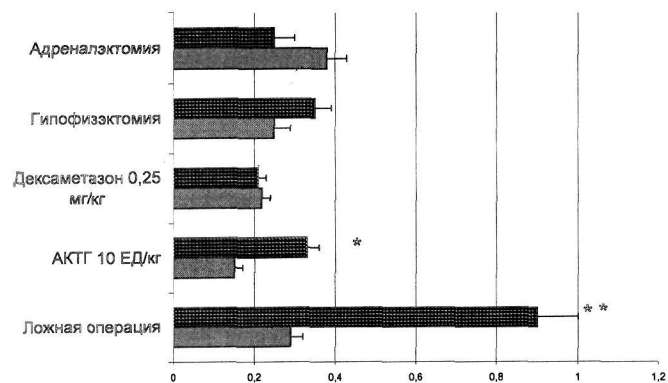


Рис. 1. Влияние фенамина на величину предпочтения П при тестировании УРПМ на 10-й день в условиях дисбаланса гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы у крыс: по оси ординат — группы крыс; по оси абсцисс — величина предпочтения П, усл. Ед. Темные столбики — контроль; заштрихованные столбики — после введения фенамина (1 мг/кг).

* — $P < 0,05$;

** — $P < 0,01$ в сравнении с контролем

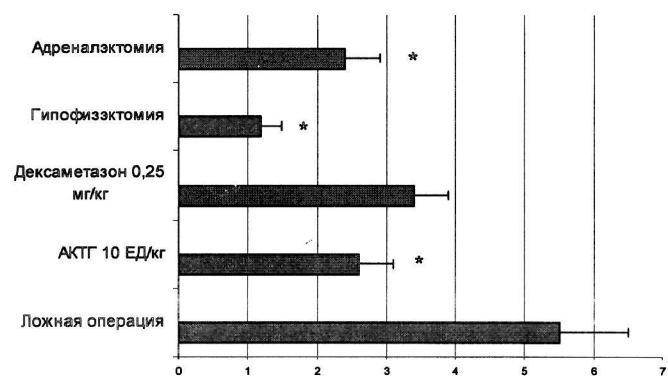


Рис. 2. Влияние фенамина на число выходов из центрального отсека при тестировании УРПМ на 10-й день в условиях дисбаланса гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы у крыс: по оси ординат — группы крыс; по оси абсцисс — число выходов при тестировании УРПМ.

* — $P < 0,05$ в сравнении с контролем (ложная операция)

Таблица 1

Влияние фенамина (1 мг/кг) на пороги и частоту реакции самостимуляции латерального гипоталамуса у крыс с гипопизэктомией

Группа крыс	Пороговые значения силы тока для самостимуляции (мкА)	Частота самостимуляции за 5 мин		Коэффициент “рассогласования”
		Фоновые значения	После введения фенамина	
С ложной операцией (контроль)	64 ± 12	$34,2 \pm 2,1$	$46,4 \pm 4,2 (+36\%)*$	$0,23 \pm 0,02$
С гипопизэктомией	$117 \pm 21^{\#}$	$32,1 \pm 1,6$	$41,4 \pm 2,0 (+29\%)*$	$-0,21 \pm 0,03^{##}$

Примечание. * $P < 0,05$ в сравнении с фоновыми значениями; $^{\#}$ $P < 0,05$; $^{##}$ $P < 0,01$ в сравнении с контролем

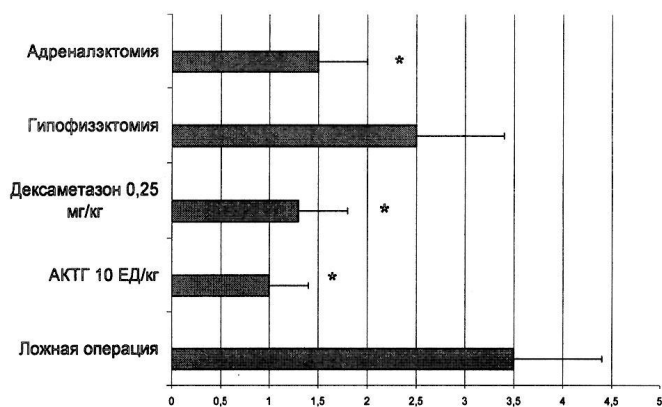


Рис. 3. Влияние фенамина на показатели длительного груминга при тестировании УРПМ на 10-й день в условиях дисбаланса гормонов гипоталамико-надпочечниковой системы у крыс: по оси ординат — группы крыс; по оси абсцисс — число актов груминга более 20 с при тестировании УРПМ.

* — $P < 0,05$ в сравнении с контролем (ложная операция)

животного в непреподобаваемом отсеке установки. Стимулирующий эффект фенамина существенно уменьшался введением АКТГ (10 ЕД/кг) и гипофизэктомией и полностью устранялся введением дексаметазона (0,25 мг/кг) или адреналэктомией (рис. 1). Сходную закономерность наблюдали и при оценке числа выходов из центрального отсека, а также числа длительных грумингов (более 20 с) за 15 мин тестирования на 10-й день опыта (рис. 2 и 3). Эти параметры являются показателями комфортности пребывания крысы в установке.

Обсуждение результатов

В настоящем исследовании продемонстрировано, что вторичноподкрепляющие и в меньшей степени первичноподкрепляющие свойства фенамина существенно зависят от баланса гормонов гипоталамико-надпочечниковой системы. Дисбаланс гормонов приводит к уменьшению подкрепляющих свойств психостимулятора. Примечателен тот факт, что подкрепляющие свойства фенамина уменьшаются или нарушаются независимо от характера вмешательства в гипоталамико-надпочечниковую систему — будь то повышение уровня периферических глюкокортикоидов (при введении дексаметазона или АКТГ) или же их снижение (при адреналэктомии). В последнем случае наблюдали наиболее драматическое изменение подкрепляющих свойств вплоть до их инверсии. По-видимому, для вторичноподкрепляющих свойств фенамина важен прежде всего оптимальный уровень периферических глюкокортикоидных гормонов.

Начиная с 1920-х годов доказано, что гипоталамико-надпочечниковая система выполняет универсальную регулирующую роль в поддержании реактивности организма (стрессорных реакций). Положительные или отрицательные воздействия на организм вызывают однотипный по направленности эффект, описываемый как повышение продукции глюкокортикоидных гормонов. В течение долгого времени считалось, что это основная функция системы гипоталамико-надпочечники. В середине 1960-х годов было показано, что удаление гипоталамуса существенно нарушает обучение и что гормоны гипоталамико-надпочечниковой системы играют значительную роль в механизмах памяти [1, 7]. Позднее было установлено, что эти гормоны принимают участие в формировании эмоцио-

нального поведения и механизмов зависимости [6, 10]. Нами [3] обосновано положение, что глюкокортикоидные гормоны обладают подкрепляющими свойствами как самостоятельно, так и способствуя их проявлению у других соединений с наркотическим потенциалом, в частности психостимуляторов амфетаминового типа. Действие глюкокортикоидов на механизмы подкрепления зависит от дозы и повторяет характеристики, типичные для психостимулятора фенамина, но с меньшей выраженностью. Возникло предположение, что глюкокортикоиды модулируют дофаминергическую систему мозга, являющуюся структурно-функциональной основой механизмов положительного подкрепления [6]. Действительно, сопоставление характеристик действия фенамина и глюкокортикоида дексаметазона во многом совпало, в частности по влиянию на предпочтение места. Более того, фенамин в подпороговых дозах, не вызывающих активацию систем вторичного подкрепления, активировал их после совместного применения с подпороговыми дозами дексаметазона [3].

В наших опытах с удалением гипоталамуса продемонстрировано снижение подкрепляющих свойств фенамина (1 мг/кг) как при изучении первичноподкрепляющих (самостимуляция мозга), так и вторичноподкрепляющих (предпочтение места) свойств препарата. Выраженность действия фенамина на механизмы вторичного подкрепления существенно снижалась при введении АКТГ, дексаметазона, удалении гипоталамуса или надпочечников, т.е. при дисбалансе системы гипоталамико-надпочечники. Величина этого снижения была неодинаковой. В меньшей степени подкрепляющие свойства фенамина снижал сам АКТГ. При этом подкрепляющие свойства фенамина сохранялись, хотя и были редуцированы. Удаление гипоталамуса или надпочечников в большей степени сглаживало показатели предпочтения (величины P), хотя по другим показателям (число выходов из центрального отсека или длительных грумингов) регистрировали более неоднозначную картину.

Таким образом, дисбаланс гипоталамико-надпочечниковой системы снижает первично- и вторичноподкрепляющие свойства, в механизм формирования которых вовлекаются как эмоциональные, так и мнестические компоненты поведения. Полученные данные подтверждают важную роль гормонов гипоталамико-надпочечниковой системы для реализации механизмов подкрепления и, возможно, механизмов формирования зависимости от психостимуляторов амфетаминового типа.

Список литературы

1. Ноздрачев А.Д., Баженов Ю.И., Баранникова И.А. и др. Начала физиологии / Под ред. А.Д. Ноздрачева. — СПб.: Лань, 2001. — 1088 с.
2. Ноздрачев А.Д., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Организация подкрепляющих систем мозга // Вестник СПбГУ. — 2000. — Сер. 3. — Вып. 4 (27). — С. 62–76.
3. Шабанов П.Д. Дофаминергические системы мозга: участие в эффектах психостимуляторов, кортикостероидов и этанола // Мед. акад. журн. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 41–57.
4. Шабанов П.Д. Основы наркологии. — СПб.: Лань, 2002. — 560 с.
5. Шабанов П.Д., Лебедев А.А. Подкрепляющие системы мозга: локализация, нейробиохимическая организация, участие в формировании зависимости от психостимуляторов // Психофармакол. и биол. наркол. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 13–26.

6. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мешеров Ш.К. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. — СПб.: Лань, 2002. — 208 с.

7. Шабанов П.Д., Сапронов Н.С. Влияние избытка и недостатка гормонов гипофизарно-адреналовой системы на питьевое поведение крыс // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. — 1986. — Т. 72, № 2. — С. 170—175.

8. König P.R., Klippel A. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Baltimore, 1963. — 214 p.

9. Mucha R.F., Iversen S.D. Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a produral

examination // Psychopharmacology. — 1984. — Vol. 82. — P. 241—247.

10. Sapronov N.S., Lebedev A.A., Djulakidze I.D., Shabanov P.D. Imbalance of hypophyseal hormones and the influence of amphetamine on self-stimulation and place preference test in rats // CEPNESP Bull. (Brazil). — 1993. — Vol. 1, N 2. — P. 14—18.

11. Wongwitdech N., Marsden C.A. Isolation rearing prevents the reinforcing properties of amphetamine in a conditioned place preference paradigm // Eur. J. Pharmacol. — 1995. — Vol. 279. — P. 99—103.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF REINFORCING PROPERTIES OF AMPHETAMINE IN IMBALANCE OF PITUITARY-ADRENAL HORMONES IN RATS

SHABANOV P.D. Dr.med.sci., professor, Head of chair of Pharmacology, S.-P. military med. academy, Sankt-Peterburg
 SAPRONOV N.S. Corresp. Fellow RAMS, professor, head of neurofarmacological dept. of Institute of Exper. medicine RAMS, Sankt-Peterburg
 LEBEDEV A.A.cand.biol.sci., senior researcher, Institute of experimental medicine of RAMS, Sankt-Peterburg
 STRELTSOV V.F. postgraduate researcher, S.-P. Military medicine academy, Sankt-Peterburg

In rats, hypophysectomy changed the reinforcing properties of amphetamine (1 mg/kg intraperitoneally), assessed by the effect on self-stimulation of lateral hypothalamus. In hypophysectomised rats, the thresholds of self-stimulation were decreased, the frequency of self-stimulation was reduced moderately and the aversive mechanisms of self-stimulation were switched on. The secondary reinforcing properties of amphetamine, assessed by means of place preference test, were the similar both in intact and sham-operated rats. ACTH-zinc phosphate (10 IU/kg) decreased, but hypophysectomy, adrenalectomy and administration of dexamethasone (0,25 mg/kg) abolished the reinforcing properties of amphetamine. In conclusion, the reinforcing properties of amphetamine are depended on the balance of pituitary-adrenal hormones in the great degree. The imbalance of the hormonal system affect the secondary reinforcing properties preferably. In this case both emotional and mnemonic components of behavior are included.