

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОДИФИКАЦИЙ ТЕСТА «УРПИ» ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ СКОПОЛАМИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ АМНЕЗИИ У КРЫС

А.В. Коновалов¹, М.А. Юдин^{1,2}, С.В. Чепур¹, А.Л. Бузмакова², А.В. Потапова²,
С.Н. Субботина¹

¹ *ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4, тел. 8-910-626-46-71, e-mail: gniiivm_15@mil.ru*

² *ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, Санкт-Петербург 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, д. 47.*

Резюме

В настоящее время лечение болезни Альцгеймера, сопровождающейся прогрессированием когнитивных нарушений, и проблема адекватности её моделирования в эксперименте при поиске эффективных лекарственных средств представляют нерешенные медицинские и научно-практические задачи. Выбор модели амнезии в условной реакции пассивного избегания (УРПИ) при проведении доклинических исследований может сильно повлиять на наблюдаемые биологические отклики и интегральные показатели. В связи с этим более глубокая проработка вопроса экспериментального моделирования амнезий может повысить качество и надежность получаемых результатов. Широко распространено использование скополамина для индукции нарушений кратковременной и долговременной памяти (КП и ДП, соответственно) у грызунов. Проведено сравнение чувствительности различных модификаций теста УРПИ, моделирующих антероградную и ретроградную амнезии при внутривенном введении скополамина в диапазоне доз от 0,5 до 20 мг/кг. В отношении КП наиболее чувствительной была модель антероградной амнезии, которую вызывали введением скополамина за 30 мин в дозах более 1 мг/кг. Чувствительность методики подтверждали статистически значимыми изменениями эффективных доз модельного препарата, долей животных с амнезией, средним временем нахождения в светлой камере. В отношении ДП также наиболее чувствительной признана модель антероградной амнезии. Введение скополамина в дозах 1 и 2,5 мг/кг через 24 ч после электроболевого стимулирования приводило к статистически значимым отличиям среднего времени нахождения крыс в светлой камере. Среди моделей ретроградной амнезии модификация теста УРПИ с повторным напоминанием была более чувствительной, чем модификация без напоминания. Минимальное значение дозы скополамина, введение препарата в которой вызывает статистически значимые изменения показателей теста, на модели с

повторным напомниманием составило 10 мг/кг, в то время как при использовании модели без напомнимания эффективным стало введение холиноблокатора в дозе 20 мг/кг.

Ключевые слова: Болезнь Альцгеймера, скополамин, ретроградная амнезия, антероградная амнезия

COMPARATIVE ANALYSIS OF MODIFICATIONS OF THE CONDITIONED PASSIVE AVOIDANCE REFLEX TEST ON SENSITIVITY OF SCOPOLAMIN-INDUCED AMNESIA DETECTION IN RATS

A.V. Konovalov¹, M.A. Yudin^{1,2}, S.V. Chepur¹, A.L. Buzmakova², A.V. Potapova², S.N. Subbotina¹

¹ *Federal State Budgetary Institution "State Research Testing Institute of Military Medicine" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg 195043, St. Petersburg, st. Lesoparkovaya, 4, tel. 8-910-626-46-71, e-mail: gniiivm_15@mil.ru*

² *Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov (NWSMU), Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 195067, St. Petersburg, Piskarevsky prospect, 47.*

Abstract.

Nowadays the treatment of Alzheimer's disease, accompanied by the progression of cognitive impairment, and the problem of sufficiency of its modeling in the experiment in the search for effective drugs represent unsolved medical, theoretical and practical problems. The choice of conditioned passive avoidance reflex (CPAR) amnesia model in preclinical studies can strongly influence the observed biological responses and integral indicators. In this regard, a more profound study of the issue of experimental modeling of amnesia can improve the quality and reliability of experimental results. The use of scopolamine for the induction of short-term and long-term memory impairments in rodents is widespread. The comparison of sensitivity of various modifications of passive avoidance reaction test, simulating anterograde and retrograde amnesia with intravenous administration of scopolamine in the dose range 0,5 - 20 mg/kg was made. With regard to short-term memory the most sensitive was the model of anterograde amnesia, which was induced by the administration of scopolamine for 30 min at doses exceeding 1 mg/kg. The sensitivity of this technique was confirmed by statistically significant changes in effective doses of the model drug, the proportion of animals with amnesia, and the average time spent in the light chamber. In relation to long-term memory the model of anterograde amnesia

was also recognized as the most sensitive. Administration of scopolamine at doses 1 – 2,5 mg/kg 24 h following electric pain stimulation led to statistically significant differences in the mean time spent by rats in the light chamber. Among the models of retrograde amnesia modification of the passive avoidance reflex test with repeated reminder was more sensitive than modification without reminding. The minimum value of the dose of scopolamine, that caused statistically significant changes in test parameters, in the model with repeated reminder was 10 mg/kg, while when using the model without a reminder, the administration of a cholinergic antagonist at a dose of 20 mg/kg turned out to be effective.

Keywords: Alzheimer's disease, scopolamine, retrograde amnesia, anterograde amnesia

Введение

Неуклонный рост частоты встречаемости болезни Альцгеймера (БА) послужил причиной активизации исследований механизмов формирования и нарушения памяти. По данным всемирной организации здравоохранения в 2005 г. деменцией страдали 0,379 % населения, в 2015 г. - 0,441 %, а к 2030 г. этот показатель прогнозируют на уровне 0,556 % [1]. По другим наблюдениям в 2006 г. распространённость БА в мире составляла 0,40 % (что в абсолютных числах соответствует - 26,6 млн человек с разбросом 11,4 - 59,4 млн). К 2050 г. ожидают трехкратный прирост заболеваемости, при этом абсолютное количество больных возрастет вчетверо [2]. По оценкам некоторых специалистов в 2017 г. БА диагностирована у 40 миллионов человек во всем мире [3], вследствие чего она по праву называется «эпидемией XXI века».

БА приводит к когнитивной дисфункции мозга, развивающейся вследствие массивной дегенерации нейронов и потере кортикальной холинергической иннервации [4; 5]. Так, проекции холинергических нейронов формируют базальный холинергический комплекс, интегрирующий ключевые структуры, участвующие в формировании памяти [6; 7]. Доказательством такой теории служит широкое применение М-холинолитиков в эксперименте в качестве модельных веществ для достижения фармакологической амнезии, как одного из ведущих симптомов прогрессирования БА [5; 8]. С увеличением тяжести заболевания снижение памяти подкрепляют другие механизмы дегенерации нейронов путем накопления β -амилоида [9] и избытка продуктов перекисного окисления липидов [10], сопровождающих увеличение доли апоптоза нервных клеток [11]. В этой связи становится очевидным использование комплексного подхода к профилактике и лечению БА.

Для оценки эффективности лекарственных средств, влияющих на когнитивные способности, используют комплекс методических подходов, основанных на исследованиях отдельных паттернов поведения. Условная реакция пассивного избегания (УРПИ) в сочетании с другими методиками, позволяющими оценить процессы формирования и воспроизведения памяти, составляет стандарт изучения когнитивной функции у мелких лабораторных животных на этапе доклинического исследования [8; 12]. В сравнении с другими подходами к исследованию когнитивной функции в эксперименте УРПИ обладает преимуществами, к которым можно отнести возможность модификации метода для оценки влияния физиологически активных лекарственных средств на различные этапы (формирование, фиксация и воспроизведение) приобретения навыка избегания, скорость выработки условной реакции, пригодность для скрининга модельных веществ и достаточность одного электроболевого стимула (ЭБС) для формирования

устойчивой энграммы, что позволяет точно установить срок её появления и значимо судить об её воспроизведении во времени [13; 8].

Несмотря на многочисленные работы с использованием скополамина (в диапазоне доз от 0,2 до 30 мг/кг в зависимости от условий эксперимента) в качестве модельного вещества не определены корреляции между его дозовым диапазоном и нарушениями кратковременной и долговременной памяти (КП и ДП, соответственно) при индукции различных видов амнезий (антеро-, ретроградной), а также не определено влияние напоминаний на особенности формирования ДП в тесте УРПИ. Полученные данные позволяют существенно расширить представления об участии холинергической нейротрансмиттерной системы в процессах формирования и консолидации энграмм при моделировании БА, а также определить наиболее чувствительные модификации теста УРПИ к скополамин-индуцированным нарушениям памяти.

Цель исследования

Проведение сравнительного анализа различных модификаций теста УРПИ по чувствительности выявления скополамин-индуцированной ретро- и антероградной амнезии у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 200 самцах белых беспородных крыс с массой тела 180-220 г., полученных из питомника «Рапполово». Эксперименты проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г N 199н).

Для проведения исследования применяли установку, сочетающую две смежные камеры размером 68 * 22 * 30 см (Д * Ш * В), изготовленные из легко моющегося пластмассового материала. Между собой камеры разделены перегородкой с отверстием размером 7 * 7 см (Ш * В) для перемещения животных. Освещённая лампой первая камера выполнена из пластика белого цвета, крышка прозрачная; вторая – темная, стены и крышка которой изготовлены из пластика чёрного цвета. Пол темной камеры электрифицирован - сделан из стальных стержней диаметром 2 мм с расстоянием между ними не более 5 мм. К нему через реостат подключён источник питания (220 В). Напряжение регулируют с помощью лабораторного автотрансформатора ЛАТР-1-М от 0 до 130 В под контролем показаний цифрового мультиметра DT-832.

Перед проведением эксперимента проводили отбор животных по инстинктивному стремлению находиться в тёмном помещении – наличию «норкового» рефлекса. Крыс помещали в светлый отсек хвостом к отверстию – входу в темную камеру. Критерием наличия рефлекса считали нахождение крысы в светлом отсеке в течение латентного периода (ЛП) от 5 до 60 с, за который животное переходило в темную камеру таким

образом, чтобы все четыре конечности касались электрического пола. Оценку ЛП проводили трижды с интервалом 30 мин. Животных, показатели которых выходили за пределы интервала, исключали из эксперимента. Выбраковка составляла от 5 до 40 % животных, взятых в эксперимент. Отбор животных для эксперимента осуществляли в отсутствии электростимуляции.

Анализ информативности используемых в работе модификаций теста УРПИ основан на сравнительной оценке поведения животных на фоне введения М-холиноблокатора скополамина гидрохлорида (субстанция Sigma Aldrich) в диапазоне доз 0,5-20 мг/кг. Препарат вводили самцам крыс опытных групп при всех вариантах тестирования однократно внутривенно (в/в) после третьего захода в темную камеру (при моделировании ретроградной амнезии) и после второго захода в темную камеру (при моделировании антероградной амнезии) из расчета 0,1 мл на 100 г веса животного. Животные контрольных групп получали в/в физиологический раствор в аналогичном объеме.

После третьего захода экспериментального животного в темную камеру подавали электролевой стимул (ЭБС) напряжением 130 В. Продолжительность ЭБС ограничивали выходом животного из темной камеры в светлую. Далее выполняли исследование по проверке сохранности памятного следа через 2 (КП) и 24 (ДП) ч после ЭБС [8; 14; 15].

Оценивали три модификации описанной методики:

- модификация 1 предусматривала внутривенное введение скополамина сразу после ЭБС, повторные помещения животных в светлую камеру установки через 30 мин, 1, 2, 4, 6 ч и контрольное тестирование через 24 ч после ЭБС. Предлагаемый вариант позволял моделировать один из сценариев ретроградной амнезии, характеризующийся многократным посещением животным светлой камеры (знакомой обстановки), что вызывает повторное воспроизведение энграммы и представляет собой напоминание. В виде схемы последовательность действий в модификации 1 теста УРПИ отражена на рисунке 1.

- модификация 2 сопряжена с введением животным скополамина сразу после ЭБС без последующих напоминаний. Тестирование сохранения энграммы осуществляли через 2 и 24 ч. Модификация 2 представляла собой один из вариантов ретроградной амнезии. В виде схемы последовательность действий в модификации 2 метода УРПИ отражена на рисунке 2.

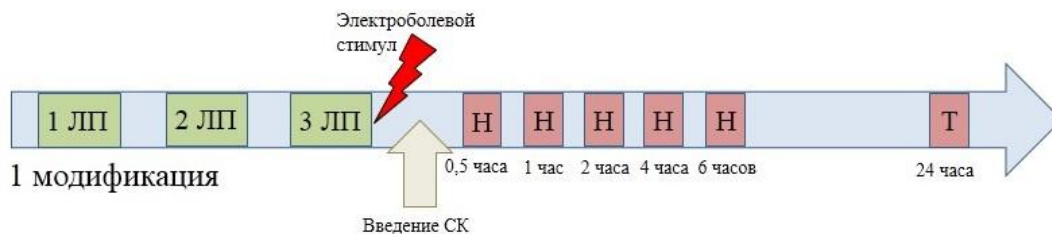


Рисунок 1. Схема последовательности действий в модификации 1 теста УРПИ.

Примечание: 1 ЛП, 2 ЛП, 3 ЛП – 1, 2, 3 латентные периоды между проверками рефлекса, СК – скополамин, Н – напоминание (тренировка), Т – тестирование.

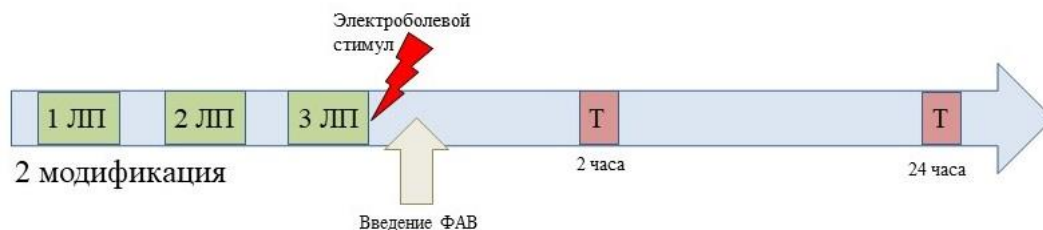


Рисунок 2. Схема последовательности действий в модификации 2 теста УРПИ.

Примечание: 1 ЛП, 2 ЛП, 3 ЛП – 1, 2, 3 латентные периоды между проверками рефлекса, СК – скополамин, Т – тестирование.

- модификация 3 предполагала введение крысам скополамина за 30 мин до ЭБС сразу после 2 ЛП. Оценку сохранности памятного следа осуществляли через 2 ч (КП), и 24 ч (ДП) после ЭБС. Модификация 3 теста УРПИ позволяла моделировать вариант антероградной амнезии и установить закономерности воздействия скополамина не только на саму память, но и на роль внимания в формировании энграмм. В виде схемы последовательность действий в модификации 3 теста УРПИ отражена на рисунке 3.

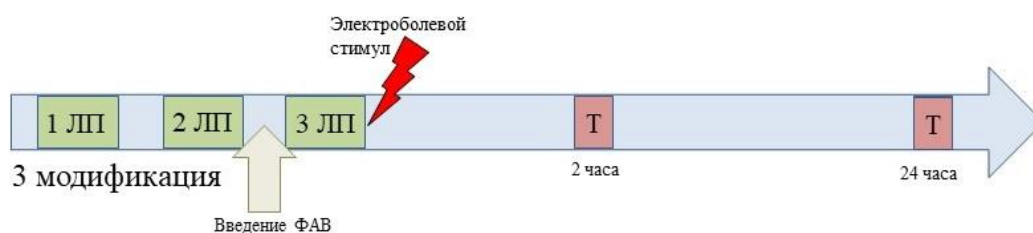


Рисунок 3. Схема последовательности действий в модификации 3 теста УРПИ.

Примечание: 1 ЛП, 2 ЛП, 3 ЛП – 1, 2, 3 латентные периоды между проверками рефлекса, СК – скополамин, Т – тестирование.

Правильная реакция на электрокожное раздражение вследствие удара электрическим током формирует след памяти об опасности и избегания тёмного помещения установки. В ответ на введение скополамина проводили оценку двух параметров: доля животных в группе с нарушением памяти о болевом стимуле и среднее

время нахождения животных в светлом отсеке. Критерием амнезии считали переход животного из светлой камеры в темную в течение 3 мин.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 и Excel 2010. Полученные данные выражали в виде среднего и ошибки среднего значения. Сравнительный анализ времени до события осуществляли с помощью метода Каплана-Майера. Для анализа данных использовали непараметрические методы статистики: для сравнения количественных показателей - критерий Манна-Уитни, для сравнения качественных показателей – критерий χ^2 и точный метод Фишера. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05. Долю животных представляли в процентах. Расчет эффективных доз модельного препарата проводили методом пробит-анализа по Финни.

Результаты исследования

Результаты исследования скополамин-индуцированных нарушений КП у крыс по показателям «средняя продолжительность нахождения животных в светлой камере» и «доля животных с амнезией» через 2 ч после ЭБС при тестировании в модификациях 2 (модель ретроградной амнезии) и 3 (модель антероградной амнезии) представлены на рисунках 4-6.

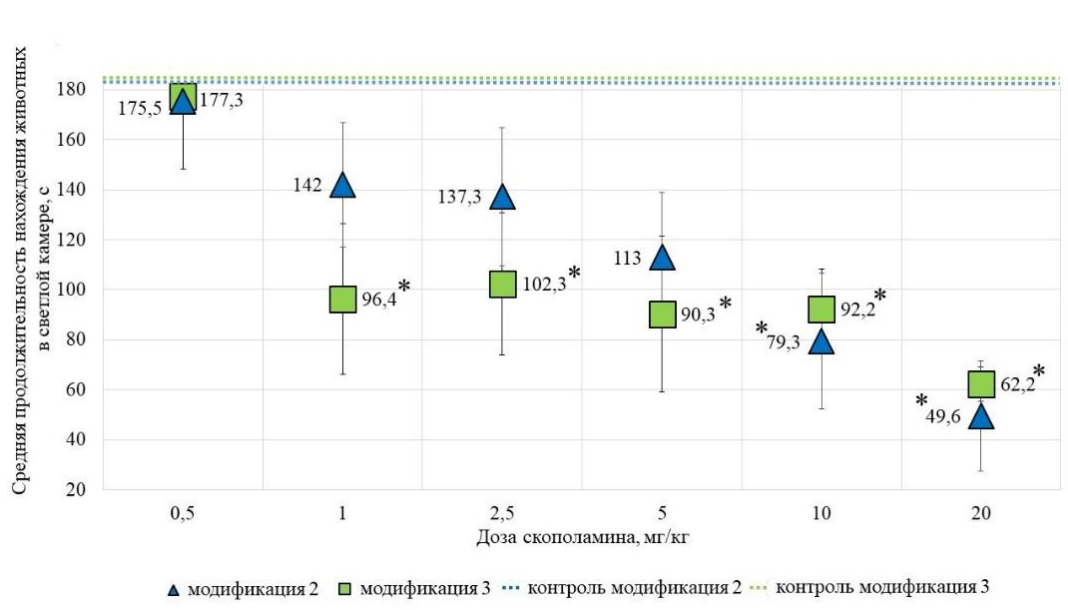


Рисунок 4. Средняя продолжительность нахождения животных в светлой камере при тестировании через 2 ч после ЭБС на фоне в/в введения скополамина в различных дозах (модификации 2 и 3 теста УРПИ).

Примечание: * - значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$.

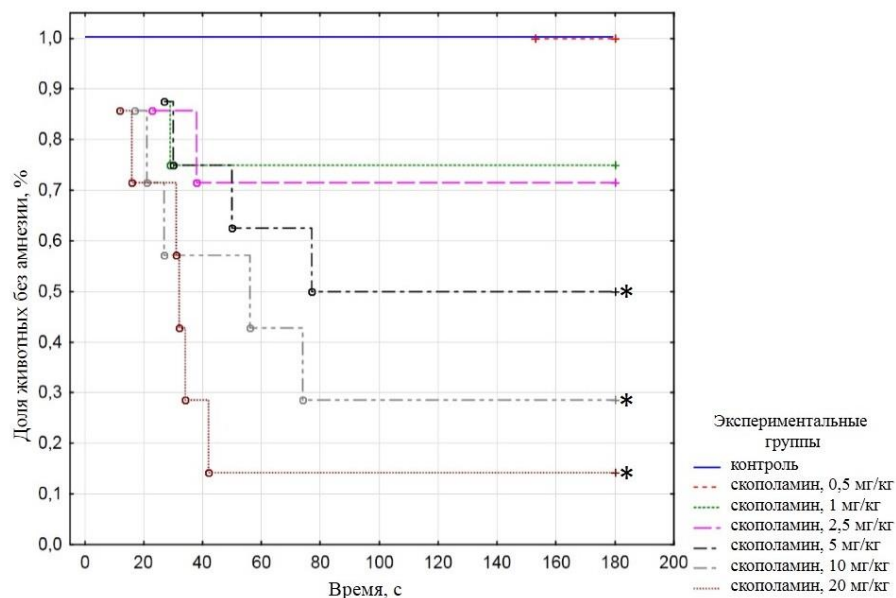


Рисунок 5. Доля животных и ЛП захода в темную камеру крыс после в/в введения скополамина при тестировании животных через 2 ч после ЭБС (модификация 2 теста УРПИ). Распределение длительностей ЛП представлены в виде кривых Каплана-Майера.

Примечание: ○ – обозначены животные с развитием амнезии; + - обозначены животные без амнезии; * - значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$ ($df=1$).

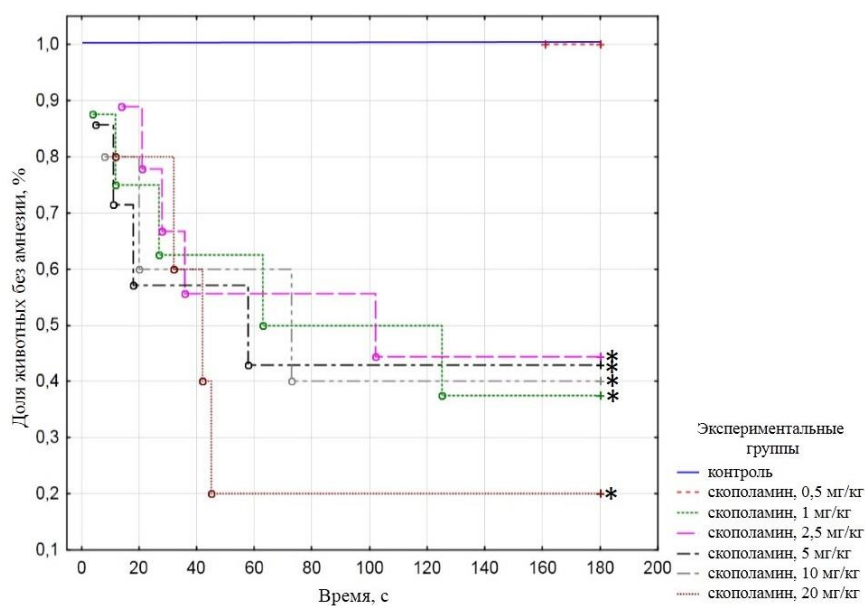


Рисунок 6. Доля животных и ЛП захода в темную камеру крыс после в/в введения скополамина при тестировании животных через 2 ч после ЭБС (модификация 3 теста УРПИ). Распределение длительностей ЛП представлены в виде кривых Каплана-Майера.

Примечание: ○ – обозначены животные с развитием амнезии; + - обозначены животные без амнезии; * - значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$ ($df=1$).

На модели ретроградной амнезии (модификация 2 теста УРПИ) эффективность скополамина по развитию нарушений КП у крыс прослежена при введении в дозах 10 и 20 мг/кг. Длительность пребывания животных в светлой камере при тестировании через 2 ч после ЭБС составила $79,3 \pm 27,1$ с и $49,6 \pm 22,1$ с, соответственно, что статистически значимо отличалось от значений контроля (при $p < 0,05$).

На модели антероградной амнезии (модификация 3 теста УРПИ) установлено, что введение скополамина в дозе 1 мг/кг и более сопровождается статистически значимым снижением ЛП захода опытных животных в темную камеру через 2 ч после ЭБС. Средние значения показателя находятся в диапазоне 90,3 - 102,3 с по сравнению с контролем, составившим 180 с. Максимальное развитие скополамин-индуцированных амнестических эффектов отмечали в группе с введением модельного препарата в дозе 20 мг/кг. Продолжительность пребывания животных в светлой камере не превышала 62 ± 30 с.

При оценке нарушений КП у крыс на модели ретроградной амнезии (модификация 2 теста УРПИ) отмечали дозозависимое статистически значимое увеличение доли животных с развитием амнезии в группах с введением скополамина в дозах 5, 10 и 20 мг/кг. В указанных группах эффект регистрировали в 50 %, 71 % и 86 % случаев, соответственно.

Анализ данных, полученных в ходе выполнения модификации 3 теста УРПИ (модель антероградной амнезии), показал, что нарушения КП у крыс развиваются на фоне введения скополамина в дозах более 1 мг/кг. Статистически значимое дозозависимое увеличение доли животных с амнезией в опытных группах регистрировали в 56-100 % случаев в зависимости от дозы модельного препарата.

Результаты расчета логарифма эффективных доз скополамина по развитию нарушений КП у крыс в модификациях 2 и 3 теста УРПИ представлены на рисунке 7.

Установлено, что значение ED_{50} скополамина, рассчитанного по результатам тестирования крыс в модификации 3 теста УРПИ более чем в 2 раза ниже аналогичного показателя в модификации 2 теста УРПИ и составляет $2,1 \pm 1,1$ мг/кг против $4,7 \pm 1,6$ мг/кг. Логарифм средней эффективной дозы скополамина равен значениям 3,3 и 3,7 для модификаций 3 и 2, соответственно. Расчет тангенса угла наклона кривых фармакологической активности скополамина, проведенных через значения эффективных доз и полученных при тестировании животных на моделях ретро- и антероградной амнезии, показал, что значение $tg(\alpha_2)$ составляет 37, $tg(\alpha_3) - 52,7$. Отмечено пересечение кривых в точке, равной логарифму эффективной дозы скополамина 4,3, что соответствует дозе препарата $ED_{85} = 20$ мг/кг.

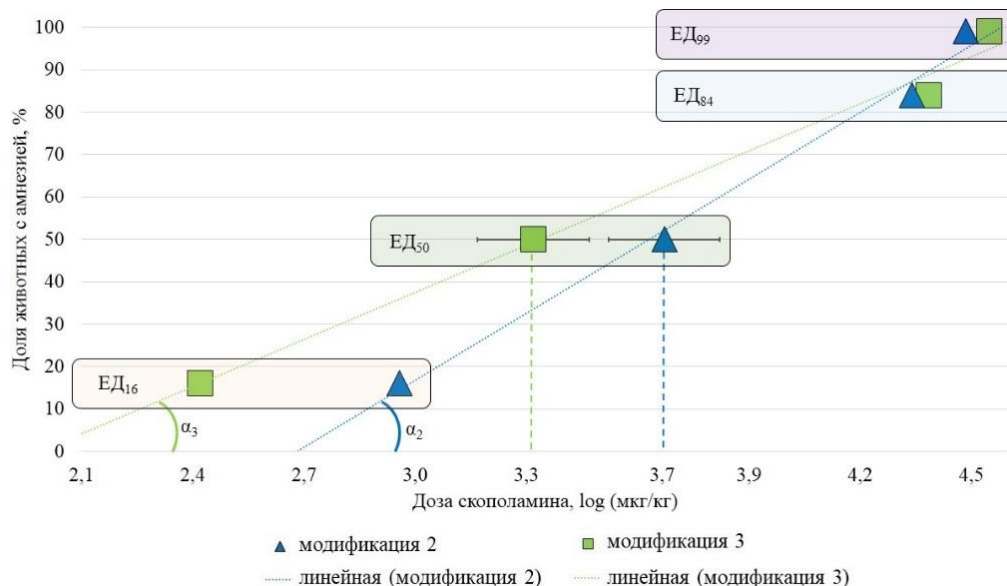


Рисунок 7. Зависимости «доза–эффект» по нарушению КП у крыс при в/в введении скополамина (модификации 2 и 3 теста УРПИ).

Примечание: ED_{16} , ED_{50} , ED_{84} , ED_{99} – эффективные дозы скополамина по индукции амнезии; α_2 , α_3 – углы наклона кривой фармакологической активности скополамина, проведенные через значения эффективных доз.

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности модификации 3 теста УРПИ для количественной оценки животных с нарушениями КП (модель антероградной амнезии) при моделировании скополамин-индуцированной амнезии препаратом в низких дозах. В то же время увеличение дозы модельного препарата приводит к снижению чувствительности методики. Схожие результаты, полученные в модификациях 2 и 3 при использовании холиноблокатора в высокой дозе (20 мг/кг), подтверждают данное предположение и свидетельствуют о равной чувствительности ретро- и антероградной моделей.

Результаты исследования скополамин-индуцированных нарушений ДП у крыс по показателям «средняя продолжительность нахождения животных в светлой камере» и «доля животных с амнезией» через 24 ч после ЭБС при различных вариантах тестирования представлены на рисунках 8-11.

При тестировании животных через 24 ч после ЭБС в модификации 1 теста УРПИ на фоне в/в введения скополамина в дозах 10 и 20 мг/кг отмечали статистически значимое снижение длительности пребывания крыс в светлом отсеке до $80,4 \pm 26,6$ с и $38,4 \pm 5,9$ с, соответственно, при $p < 0,05$.

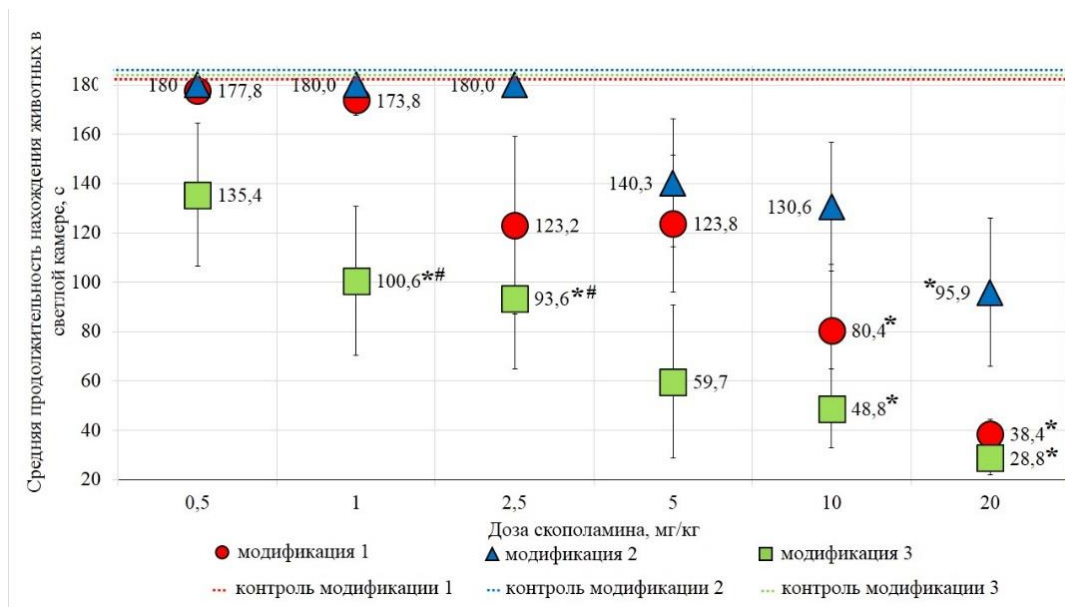


Рисунок 8. Средняя продолжительность нахождения животных в светлой камере при тестировании через 24 ч после ЭБС на фоне в/в введения скополамина в различных дозах (модификации 1,2,3 теста УРПИ).

Примечание: * - статистически значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$; # - статистически значимые отличия показателей при тестировании в модификации 3 от значений в модификации 2, при $p < 0,05$.

Доза скополамина, в которой препарат вызывает нарушения ДП у крыс при тестировании в модификации 2, составила 20 мг/кг. Введение препарата в этой дозе сопровождалось снижением ЛП нахождения опытных животных в светлой камере в 1,9 раза по сравнению с контрольными значениями. Дозозависимое снижение значений показателя ДП отмечали при тестировании животных в модификации 3 теста УРПИ. Статистически значимые по отношению к контролю изменения регистрировали при введении скополамина в дозах 1 мг/кг (в 1,8 раза), 2,5 мг/кг (в 1,9 раза), 5 мг/кг (в 3 раза), 10 мг/кг (в 3,6 раза), 20 мг/кг (в 6,2 раза), при $p < 0,05$.

Кроме того, на модели антероградной амнезии (модификация 3 теста УРПИ) были получены достоверные отличия средней продолжительности нахождения подопытных животных в светлой камере при в/в введении скополамина в дозах 1 и 1,25 мг/кг по сравнению с аналогичными данными, полученными при тестировании в модификации 2. Это позволяет утверждать о более высокой чувствительности модели антероградной амнезии для оценки ДП у крыс по рассмотренному показателю в сравнении с представленными моделями ретроградной амнезии. В ходе выполнения теста УРПИ в различных модификациях при введении скополамина отмечали дозозависимое увеличение доли животных с нарушениями ДП.

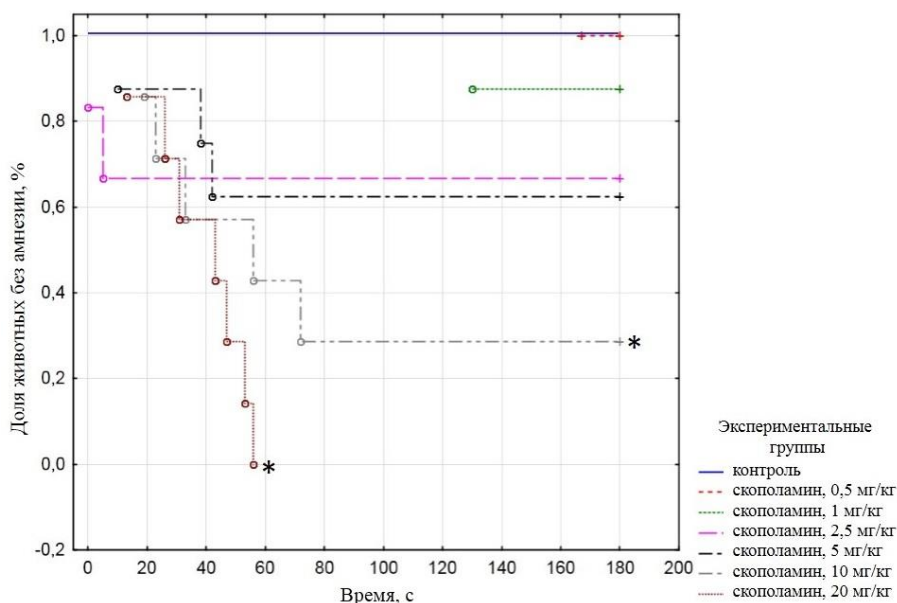


Рисунок 9. Доля животных и ЛПП захода в темную камеру крыс после в/в введения скополамина при тестировании животных через 24 ч после ЭБС (модификация 1 теста УРПИ). Распределение длительностей ЛПП представлены в виде кривых Каплана-Майера.

Примечание: ○ – обозначены животные с развитием амнезии; + - обозначены животные без амнезии; * - значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$ ($df=1$).

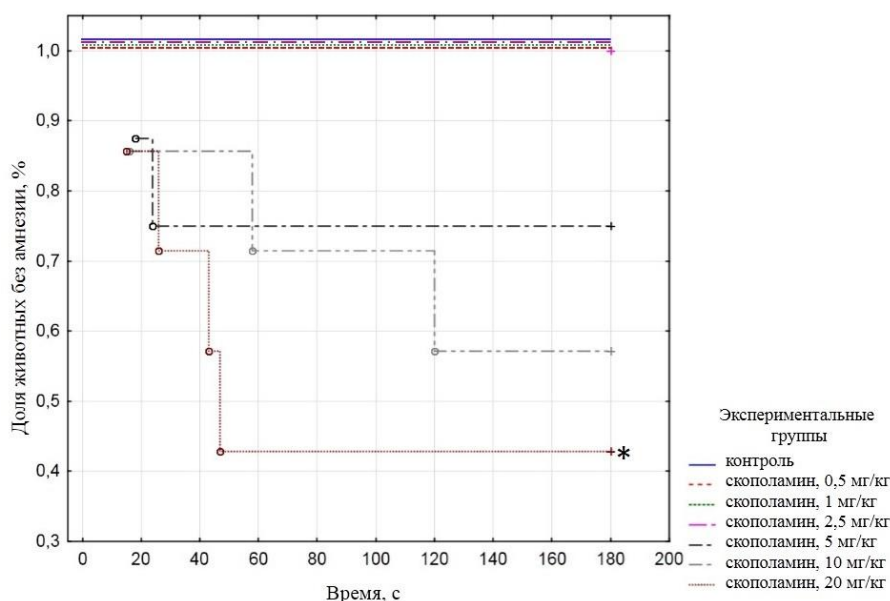


Рисунок 10. Доля животных и ЛПП захода в темную камеру крыс после в/в введения скополамина при тестировании животных через 24 часа после ЭБС (модификация 2 теста УРПИ). Распределение длительностей ЛПП представлены в виде кривых Каплана-Майера.

Примечание: ○ – обозначены животные с развитием амнезии; + - обозначены животные без амнезии; * - значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$ ($df=1$).

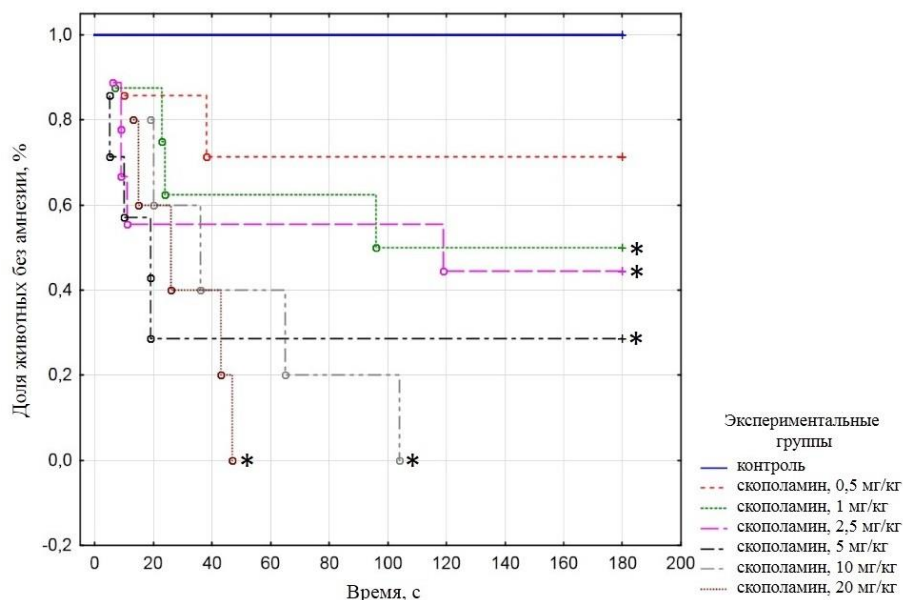


Рисунок 11. Доля животных и ЛП захода в темную камеру крыс после в/в введения скополамина при тестировании животных через 24 часа после ЭБС (модификация 3 теста УРПИ). Распределение длительностей ЛП представлены в виде кривых Каплана-Майера.

Примечание: ○ – обозначены животные с развитием амнезии; + - обозначены животные без амнезии; * - значимые отличия от показателя животных контрольных групп, при $p < 0,05$ ($df=1$).

При тестировании животных через 24 ч после ЭБС в модификации 1 статистически значимый рост доли крыс с амнезией относительно контроля регистрировали в группах животных, получавших скополамин в дозах 10 и 20 мг/кг. В модификации 2 значимое изменение показателя отмечали при введении модельного препарата в максимальной дозе – 20 мг/кг. Доля животных с нарушением ДП составила 57,1 %. Наиболее чувствительной по оценке амнестического действия скополамина стала модификация 3 теста УРПИ. Развитие амнезии у большей части животных регистрировали при введении скополамина в дозах 1 мг/кг и более. Полученные результаты статистически значимо отличались от показателей контроля.

Результаты расчета логарифма эффективных доз скополамина по развитию нарушений ДП у крыс в модификациях 1, 2 и 3 теста УРПИ отражены на рисунке 12. ED_{50} скополамина по индукции амнезии в модификации 1 составила $6,0 \pm 2,5$ мг/кг (логарифм равен 3,8). Среди моделей ретроградной амнезии наименее чувствительной по оценке нарушений ДП была модификация 2 теста УРПИ. ED_{50} М-холиноблокатора составила $19,7 \pm 1,7$ мг/кг (логарифм равен 4,3). Минимальные значения ED_{50} скополамина были получены при анализе данных, собранных в ходе тестирования животных на модели антероградной амнезии в модификации 3 теста УРПИ. ED_{50} составила $1,4 \pm 0,6$ мг/кг (логарифм равен 3,1).

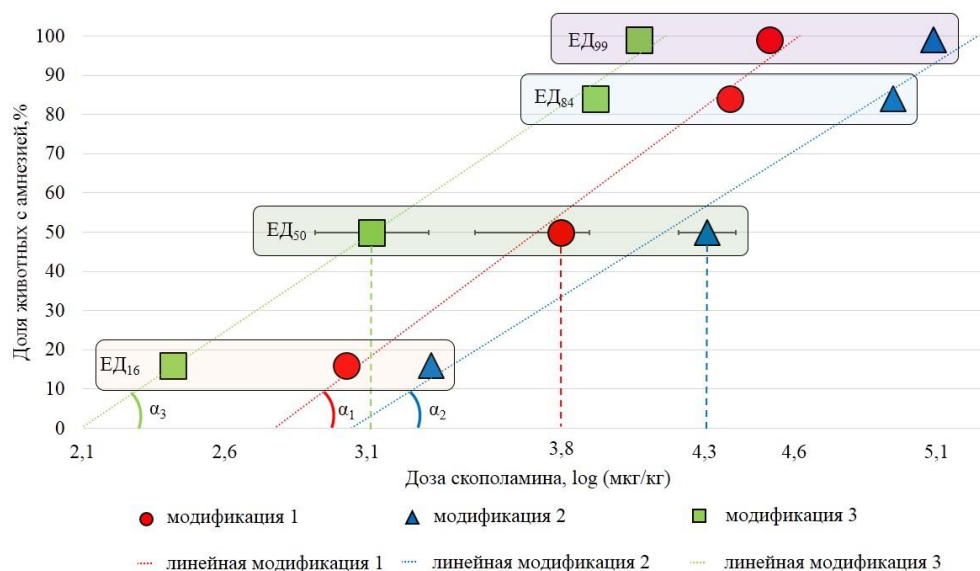


Рисунок 12. Зависимости «доза–эффект» по нарушению ДП у крыс при в/в введении скополамина (модификации 1, 2, 3 теста УРПИ).

Примечание: ЕД₁₆, ЕД₅₀, ЕД₈₄, ЕД₉₉ –эффективные дозы скополамина по индукции амнезии; α_1 , α_2 , α_3 – углы наклона кривой фармакологической активности скополамина, проведенные через значения эффективных доз.

$\text{tg}(\alpha_1)$ угла наклона фармакологической активности скополамина для модификации 1 численно равен 54,4, для модификаций 2 ($\text{tg}(\alpha_2)$) и 3 ($\text{tg}(\alpha_3)$) аналогичные показатели составили 45,4 и 48,7, соответственно. Распределение значений tg угла наклона зависимостей, полученных в трех вариантах тестирования, указывает на то, что в отношении нарушения ДП более выраженная динамика формирования амнезии от дозы модельного препарата прослежена при тестировании в модификации 1, наименьшей чувствительностью обладает модификация 2 теста УРПИ.

Обсуждение результатов исследования

КП и ДП функционируют в едином, динамично изменяющемся континууме, поэтому их оценка, в том числе в случае экспериментального моделирования амнезии, как ведущего симптома болезни Альцгеймера, должна осуществляться параллельно. Нами рассмотрены три подхода принципиально отличающиеся критериями нарушений КП и ДП. Модификация 3 теста УРПИ была наиболее чувствительной как в отношении оценки КП, так и ДП у крыс. При оценке показателей КП крыс через 2 ч после ЭБС статистически значимой разницы между модификациями 3 и 2 не выявлено, что, вероятнее всего, можно объяснить прямым антагонистическим действием скополамина на М1-холинорецепторы в префронтальной коре [15; 17]. Однако модификация 3 теста УРПИ позволила более широко оценить влияние скополамина в различных дозах на КП крыс по показателю «средняя продолжительность нахождения в светлой камере», при этом ЕД₅₀ препарата по

развитию амнезии была значительно ниже, чем при использовании в других модификациях [15]. За счет заблаговременного введения препарата достигали фармакологически ассоциированное ухудшение процессов внимания, играющего важную роль в консолидации памяти [18].

При введении скополамина в больших дозах практически отсутствует разница между значениями исследованных показателей КП. Такое распределение полученных значений могло возникнуть вследствие проявления Н-холинолитических свойств скополамина при введении его в дозе 10 мг/кг и более [15; 19; 20], преимущественно в результате увеличения аффинности к α_7 субъединице, ассоциированной с глутаматергическими синапсами префронтальной коры [17]. Именно с последними связывают переход из КП в ДП при консолидации памяти. Считают, что в основе консолидации лежит приспособительный механизм работы глутаматергического синапса, так называемая долговременная потенция, которая характеризуется приростом синаптической передачи во времени (до нескольких часов в ответ на короткую высокочастотную стимуляцию (тетанизацию) постсинаптической мембраны [20; 22]. Долговременная потенция представляет собой сложный, многокомпонентный процесс, при нарушении которого блокируется консолидация в ДП [23; 24; 25]. Так, индуцированная скополамином «утечка» ионов калия нарушает трансмембранный потенциал в пирамидных клетках гиппокампальной формации, что препятствует формированию долговременной потенции [26; 27], а также вызывает нарушение памяти на уровне воспроизведения сформированных энграмм [28], в том числе связанных со страхом [29].

Результаты проведенных исследований ДП в тесте УРПИ соответствуют ранее полученным данным [29]. Модель антероградной амнезии при введении скополамина в дозах 1 и 2,5 мг/кг по рассмотренным показателям можно считать наиболее эффективной. Это сопряжено с заблаговременным поступлением М-холинолитика до ЭБС и его воздействием на процессы внимания [15; 20]. Наиболее интересным представляется факт большей чувствительности модели ретроградной амнезии с напоминаниями (модификация 1 теста УРПИ) к оценке нарушений ДП по сравнению с модификацией 2 теста УРПИ. Эта модель позволила дополнительно оценить роль процессов реконсолидации. По всей видимости каждое новое посещение животным светлой камеры установки после ЭБС (через 0,5, 1, 2, 4 и 6 ч) приводит к повторному воспроизведению (проработке) информации, которое характеризуется аналогичными биохимическими механизмами, что и процессы получения новой информации, другими словами схожесть процессов консолидации и реконсолидации [24]. Согласно полученным данным при повторных напоминаниях животным обстановки тестирования введение скополамина

приводит к статистически значимому увеличению доли животных с нарушением ДП. В то же время на модели ретроградной амнезии без напоминаний аналогичных изменений не прослежено. Учитывая, что полученные в модификации 1 теста УРПИ значения ED_{50} скополамина по эффекту развития амнезии меньше, а tg угла наклона кривой «доза-эффект» по сравнению с модификацией 2 больше, для более эффективного моделирования ретроградной амнезии в УРПИ необходимо использование модели с повторным воспроизведением полученного навыка.

Выводы

Для количественной оценки нарушений КП у крыс, вызванных введением скополамина в низких дозах (до 2,5 мг/кг), наиболее предпочтительна модель антероградной амнезии (модификация 3 теста УРПИ). С увеличением дозы М-холиноблокатора ее преимущество утрачивается. При использовании скополамина в высоких дозах (20 мг/кг) модели ретро- и антероградной амнезии (модификации 2 и 3 теста УРПИ) обладают схожей чувствительностью.

Оценку нарушений ДП у крыс в тесте УРПИ целесообразно проводить на модели скополамин-индуцированной антероградной амнезии (модификация 3 теста УРПИ), обладающей большей чувствительностью по сравнению с моделями ретроградной амнезии.

Для оценки нарушений ДП у крыс в тесте УРПИ среди рассмотренных моделей ретроградной амнезии наиболее информативной является модификация 1, предусматривающая периодические повторные размещения животных в светлой камере в течение первых 6 –ти часов после ЭБС.

Список литературы

1. Soria Lopez J.A., González H.M., Léger G.C.; Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*; 2019; 167: 231-255.
2. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007; 3 (3): 186-191.
3. Esquerda-Canals, G.; Montoliu-Gaya, L.; Güell-Bosch, J., Villegas, S. Mouse models of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. 2017; 57: 1171–1183.
4. Лобзин С.В., Соколова М.Г., Налькин С.А. Влияние дисфункции холинергической системы головного мозга на состояние когнитивных функций (обзор литературы). *Вестн. Сев.-зап. гос. мед. ун-та*. 2017; 9 (4): 53-58.
5. Tang K.S. The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. *Life Sci*. 2019; 15: 233.
6. Haam J., Yakel J.L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function *J. Neurochem*. 2017; 142 (2): 111-121.
7. Aitta-Aho T., Hay Y.A., Phillips B.U. Basal Forebrain and Brainstem Cholinergic Neurons Differentially Impact Amygdala Circuits and Learning-Related Behavior. *Curr. Biol*. 2018; 28 (16): 2557-2569.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая: Москва: Гриф и К; 2012.
9. Safar M.M., Arab H.H., Rizk S.M., El-Maraghy S.A. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect against scopolamine-induced Alzheimer-like pathological aberrations. *Mol. Neurobiol*. 2016; 53: 1403–1418.
10. Zhang S.J., et al. Ethyl acetate extract components of Bushen-Yizhi formula provides neuroprotection against scopolamine-induced cognitive impairment. *Sci*. 2017; 7: 9824.
11. Puangmalai N., et al. Neuroprotection of N-benzylcinnamide on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neural Regen*. 2017; 12: 1492–1498.
12. Фатеев И.В., Субботина С.Н., Курпякова А.Ф., Тюнин М.А. Изучение возможности применения структурного аналога аминостигмина для лечения когнитивных расстройств токсического генеза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156 (9): 331-334.
13. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: Москва: «Высшая школа»; 1991.
14. Suárez-Pereira I., Canals S., Carrión A.M. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: the distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. *Hippocampus*. 2015; 25 (1): 51-61.

15. Llorca-Torralba M., Suárez-Pereira I., Bravo L., Camarena-Delgado C., Garcia-Partida J.A., Mico J.A., Berrocoso E. Chemogenetic Silencing of the Locus Coeruleus-Basolateral Amygdala Pathway Abolishes Pain-Induced Anxiety and Enhanced Aversive Learning in Rats. *Biol Psychiatry*. 2019; 85 (12): 1021-1035.
16. Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav*. 2010; 34 (8): 1307-1350.
17. Galvin V.C., Arnsten A.F.T., Wang M. Involvement of Nicotinic Receptors in Working Memory Function. *Curr Top Behav Neurosci*. 2020; 45: 89-99.
18. Parikh V, Ji J, Decker MW, Sarter M. Prefrontal beta2 subunit-containing and alpha7 nicotinic acetylcholine receptors differentially control glutamatergic and cholinergic signaling. *J Neurosci*. 2010; 30 (9): 3518–3530.
19. Schmeller, T., Sporer, F., Sauerwein, M., Wink, M. Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie*. 1995; 50: 493–495.
20. Yang Y., Paspalas C.D., Jin L.E., Picciotto M.R., Arnsten A.F., Wang M. Nicotinic alpha7 receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (29): 12078–12083.
21. Axmacher N. Rasch B. Cognitive neuroscience of memory consolidation: Switzerland: Springer, 2017.
22. Бородинова А.А, Зюзина А.Б., Балабан П.М.; Роль атипичных протеинкиназ в поддержании долговременной памяти и синаптической пластичности. *Биохимия*. 2017; 82 (3): 372-388.
23. Полунина А.Г., Брюн Е.А. Эпизодическая память: неврологические и нейромедиаторные механизмы; *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*; 2012; 6 (3): 53-60
24. Clark R.E., Martin S.J. Behavioral Neuroscience of Learning and Memory. Switzerland: Springer; 2018.
25. Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Строение и развитие гиппокампа крысы. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2018; 16 (2): 132-138.
26. Buchanan K.A., Petrovic M.M., Chamberlain S.E-L., Marrion N.V., Mellor J.R. Facilitation of long-term potentiation by muscarinic M1 receptors is mediated by inhibition of SK channels. *Neuron*. 2010; 68: 948-963.
27. Catterall W.A., Wisedchaisri G., Zheng N. The chemical basis for electrical signaling. *Nat. Chem. Biol*. 2017; 13 (5): 455-463.

28. Cui E.D., Strowbridge B.W. Selective attenuation of Ether-a-go-go related K(+) currents by endogenous acetylcholine reduces spike-frequency adaptation and network correlation. *Elife*. 2019; 8: e44954.
29. Robinson L, Platt B, Riedel G. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res*. 2011; 221 (2): 443-465.
30. Nomura, Y., Nishiyama, N., Saito, H., Matsuki, N. Role of cholinergic neurotransmission in the amygdala on performances of passive avoidance learning in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 1994; 17: 490–494.

References

1. Soria Lopez J.A., González H.M., Léger G.C.; Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*; 2019; 167: 231-255.
2. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007; 3 (3): 186-191.
3. Esquerda-Canals, G.; Montoliu-Gaya, L.; Güell-Bosch, J., Villegas, S. Mouse models of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. 2017; 57: 1171–1183.
4. Lobzin S.V., Sokolova M.G., Nal'kin S.A. Influence of dysfunction of the cholinergic system of the brain on the state of cognitive functions (literature review). *Vestn. Sev.-zap. gos. med. un-ta*. 2017; 9 (4): 53 58.
5. Tang K.S. The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. *Life Sci*. 2019; 15: 233.
6. Haam J., Yakel J.L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function *J. Neurochem*. 2017; 142 (2): 111-121.
7. Aitta-Aho T., Hay Y.A., Phillips B.U. Basal Forebrain and Brainstem Cholinergic Neurons Differentially Impact Amygdala Circuits and Learning-Related Behavior. *Curr. Biol*. 2018; 28 (16): 2557-2569.
8. Part one: Moskva: Grif i K; 2012.9. Safar M.M., Arab H.H., Rizk S.M., El-Maraghy S.A. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect against scopolamine-induced Alzheimer-like pathological aberrations. *Mol. Neurobiol*. 2016; 53: 1403–1418.
10. Zhang S.J., et al. Ethyl acetate extract components of Bushen-Yizhi formula provides neuroprotection against scopolamine-induced cognitive impairment. *Sci*. 2017; 7: 9824.
11. Puangmalai N., et al. Neuroprotection of N-benzylcinnamide on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neural Regen*. 2017; 12: 1492–1498.
12. Fateyev I.V., Subbotina S.N., Kurpyakova A.F., Tyunin M.A. Study of the possibility of using a structural analogue of aminostigmine for the treatment of cognitive disorders of toxic genesis. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2013; 156 (9): 331-334.
13. Methods and basic experiments for studying the brain and behavior: Moskva: «Vysshaya shkola»; 1991.
14. Suárez-Pereira I., Canals S., Carrión A.M. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: the distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. *Hippocampus*. 2015; 25 (1): 51-61.
15. Llorca-Torralba M., Suárez-Pereira I., Bravo L., Camarena-Delgado C., Garcia-Partida J.A., Mico J.A., Berrocoso E. Chemogenetic Silencing of the Locus Coeruleus-Basolateral Amygdala Pathway Abolishes Pain-Induced Anxiety and Enhanced Aversive Learning in Rats. *Biol Psychiatry*. 2019; 85 (12): 1021-1035.
16. Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav*. 2010; 34 (8): 1307-1350.

17. Galvin V.C., Arnsten A.F.T., Wang M. Involvement of Nicotinic Receptors in Working Memory Function. *Curr Top Behav Neurosci.* 2020; 45: 89-99.
18. Parikh V, Ji J, Decker MW, Sarter M. Prefrontal beta2 subunit-containing and alpha7 nicotinic acetylcholine receptors differentially control glutamatergic and cholinergic signaling. *J Neurosci.* 2010; 30 (9): 3518–3530.
19. Schmeller, T., Sporer, F., Sauerwein, M., Wink, M. Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie.* 1995; 50: 493–495.
20. Yang Y., Paspalas C.D., Jin L.E., Picciotto M.R., Arnsten A.F., Wang M. Nicotinic alpha7 receptors enhance NMDA cognitive circuits in dorsolateral prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110 (29): 12078–12083.
21. Axmacher N. Rasch B. Cognitive neuroscience of memory consolidation: Switzerland: Springer, 2017.
22. Borodinova A.A, Zyuzina A.B., Balaban P.M.; The role of atypical protein kinases in maintaining long-term memory and synaptic plasticity. *Biokhimiya.* 2017; 82 (3): 372-388.2017; 82 (3): 372-388.
23. Polunina A.G., Bryun Ye.A. Episodic memory: neurological and neurotransmitter mechanisms..*Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii;* 2012; 6 (3): 53-60
24. Clark R.E., Martin S.J. Behavioral Neuroscience of Learning and Memory. Switzerland: Springer; 2018.
25. Bon' E.I., Zimatkin S.M. The structure and development of the rat hippocampus. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* 2018; 16 (2): 132-138.
26. Buchanan K.A., Petrovic M.M., Chamberlain S.E-L., Marrion N.V., Mellor J.R. Facilitation of long-term potentiation by muscarinic M1 receptors is mediated by inhibition of SK channels. *Neuron.* 2010; 68: 948-963.
27. Catterall W.A., Wisedchaisri G., Zheng N. The chemical basis for electrical signaling. *Nat. Chem. Biol.* 2017; 13 (5): 455-463.
28. Cui E.D., Strowbridge B.W. Selective attenuation of Ether-a-go-go related K(+) currents by endogenous acetylcholine reduces spike-frequency adaptation and network correlation. *Elife.* 2019; 8: e44954.
29. Robinson L, Platt B, Riedel G. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res.* 2011; 221 (2): 443-465.
30. Nomura, Y., Nishiyama, N., Saito, H., Matsuki, N. Role of cholinergic neurotransmission in the amygdala on performances of passive avoidance learning in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 1994; 17: 490–494.