



УДК 615.099.092:612.822.2

DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-1

«Журнал НАМН України» | 2020 | т. 26 | № 1-2 | С. 5-13

Нейропротекторна дія інтраназального введення нітропрусида натрію на функціональну активність мозку і тривожність щурів з алкогольною залежністю

А. В. Шляхова, О. В. Веселовська, О. Г. Берченко, А. М. Тіткова, О. О. Приходько

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», вул. Академіка Павлова, 46, Харків 61068, Україна

Вступ. Порушення молекулярних нітрозергічних механізмів регуляції активності мозку при алкогольній залежності лежить в основі зниження його захисних функцій. Однак питання розробки патогенетично обґрунтованих підходів щодо корекції дисбалансу вмісту оксиду азоту (NO) в структурах лімбіко-неокортикальної системи мозку (ЛНКСМ) лишаються недостатньо вивченими.

Мета: вивчення впливу інтраназального введення нітропрусида натрію (НПН) на тривожність, електричну активність ЛНКСМ і вміст NO в гіпокампі, гіпоталамусі та septum + nucleus accumbens у щурів з алкогольною залежністю.

Матеріали і методи. Дослідження проведені у хронічному експерименті на 50 нелінійних білих щурах-самцях статевозрілого віку в 3 групах: інтактні щури; щури з алкогольною залежністю; щури з алкогольною залежністю та інтраназальним введенням НПН. Модель алкогольної залежності створювали шляхом добровільного приймання алкоголю в дозі 1,25 г/кг маси тіла щура протягом

Neuroprotective effect of sodium nitroprusside intranasal administration on functional activity of the brain and anxiety of rats with alcohol dependence

Anna V. Shliakhova, Olena V. Veselovska, Olga G. Berchenko, Anna M. Titkova, Olena O. Prikhodko

SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", 46 Akademika Pavlova St., Kharkiv 61068, Ukraine

Introduction. Disturbances of the molecular nitrosergic mechanisms of brain activity regulation underlie the reduction of brain protective functions under alcohol dependence. However, development of pathogenetically substantiated approaches to the correction of nitrogen oxide (NO) imbalance in the structures of the limbico-neocortical system of the brain (LNCSB) remains insufficient.

Objective: to study the effect of intranasal sodium nitroprusside (SNP) administration on anxiety, electrical activity of the LNCSB and NO content in the hippocampus, hypothalamus and septum + nucleus accumbens of rats with alcohol dependence.

Materials and methods. The studies were carried out on 50 nonlinear white adult male rats in a chronic experiment in 3 groups: intact rats; rats with alcohol dependence; rats with alcohol dependence and intranasal SNP administration. The model of alcohol dependence was created by voluntary alcohol intake at a dose of 1.25 g/kg body weight of rat for 35 days. SNP was administered

35 діб. НПН вводили інтраназально в дозі 8 мкг/кг маси тіла тварини. Рівень тривожності визначали за нейроетологічними тестами: багатопараметрової комплексної оцінки тривожності, «відкритого поля» і «підвішування за хвіст». Електричну активність ЛНКМС реєстрували після стереотаксичного введення електродів. Концентрацію NO визначали у гіпокампі, гіпоталамусі та септум + nucleus accumbens.

Результати. Інтраназальне введення НПН щурам з алкогольною залежністю призводило до пригнічення судомної та пароксизмальної активності, викликані алкоголізацією та відміною вживання алкоголю, на електроенцефалограмі структур ЛНКМС і до підсилення абсолютної потужності біопотенціалів дельта- і альфа-діапазонів на спектрограмі гіпокампу. Виявлено зниження тривожності у щурів у групі з її високим базовим рівнем і відновлення в гіпоталамусі та гіпокампі рівня NO, виснаженого хронічною алкоголізацією.

Висновки. Інтраназальне введення щурам з алкогольною залежністю НПН, як донатора NO, викликає в стані відміни вживання алкоголю анксиолітичні ефекти, які залежать від базового рівня тривожності: у щурів з базовим високим рівнем тривожності – знижує її, а у тварин з базовим низьким рівнем – стримує тривожність на рівні приймання алкоголю. Інтраназальне введення НПН щурам в стані відміни вживання алкоголю викликає позитивні зміни на електроенцефалограмі ЛНКМС, що проявляється в пригніченні судомної та пароксизмальної активності та підсиленні потужності біопотенціалів мозку альфа- та дельта-діапазонів на спектрограмі гіпокампу зі збереженням ефекту протягом доби. Інтраназальне введення НПН є джерелом короточасного постачання NO в клітині головного мозку, що призводить до відновлення рівня NO в гіпоталамусі, гіпокампі, септум та nucleus accumbens – структурах, які задіяні в регуляції емоційно-мотиваційної поведінки.

Ключові слова: лімбіко-неокортикальна система мозку, модель алкогольної залежності, тривожність, оксид азоту, нітропрусид натрію.

Для цитування: Шляхова АВ, Веселовська ОВ, Берченко ОГ, Тіткова АМ, Приходько ОО. Нейропротекторна дія інтраназального введення нітропрусиду натрію на функціональну активність мозку і тривожність щурів з алкогольною залежністю. Журнал Національної академії медичних наук України. 2020;26(1-2):5–13. DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-1.

Стаття надійшла до редакції 28.03.2019 року
Направлена на рецензування 27.11.2019 року
Прийнята до друку 08.12.2019 року

intranasal at a dose of 8 µg/kg body weight of the animal. The level of anxiety was determined by means of neuroethological tests: multi-parameter comprehensive assessment of anxiety, “open field” and “tail suspension test”. The electrical activity of LNCSB was registered by the stereotactic introduction of electrodes. The concentration of NO was investigated in the hippocampus, hypothalamus, septum + nucleus accumbens.

Results. Intranasal administration of SNP to rats with alcohol dependence led to suppression of convulsive and paroxysmal activity, caused by alcoholization and withdrawal of alcohol, on the electroencephalogram of the structures of the LNCSB and increased the absolute power of biopotentials of the delta and alpha ranges on the spectrogram of the hippocampus. Reduction of anxiety was found in rats with a high baseline level of anxiety accompanied by recovery of NO level, which was depleted by chronic alcoholization, in the hypothalamus and hippocampus.

Conclusions. Intranasal administration of SNP as a NO donor causes anxiolytic effects in the state of alcohol withdrawal depending on the baseline level of anxiety: in rats with the high baseline level of anxiety – reduces this level; in rats with the low baseline level – restrains it at the level of anxiety after alcohol intake. Intranasal administration of SNP to the rats with alcohol withdrawal causes positive changes in the electroencephalogram of the LNCSB, which are manifested in suppression of convulsive and paroxysmal activity and enhancement of brain biopotentials in alpha and delta ranges on spectrogram of hippocampus with sustaining this effect for whole day. Intranasal administration of SNP is a source of short-term supply of NO to brain cells, which leads to the restoration of NO levels in the hypothalamus, hippocampus, septum and nucleus accumbens – structures that are involved in the regulation of emotional motivational behavior.

Key words. limbic-neocortical system of the brain, model of alcohol dependence, anxiety, nitric oxide, sodium nitroprusside.

For citation: Shliakhova AV, Veselovska OV, Berchenko OG, Titkova AM, Prikhodko OO. Neuroprotective effect of sodium nitroprusside intranasal administration on functional activity of the brain and anxiety of rats with alcohol dependence. Journal of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2020;26(1-2):5–13. DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-1.

The article was received on 28.03.2019
For review, 27.11.2019
Accepted for publication on 08.12.2019



ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

ЛАБОРАТОРІЯ НЕЙРОФІЗІОЛОГІЇ, ІМУНОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ

Шляхова Анна Володимирівна – к. б. н., старший науковий співробітник, ORCID: 0000-0002-3934-5888;

Веселовська Олена Валеріївна – к. б. н., старший науковий співробітник, ORCID: 0000-0002-5209-4606;

Берченко Ольга Григорівна – д. б. н., проф., завідувачка лабораторії, ORCID: 0000-0003-4201-4542;

Тіткова Анна Маратівна – к. б. н., провідний науковий співробітник, ORCID: 0000-0002-7161-4507;

Приходько Олена Олександрівна – молодший науковий співробітник, ORCID: 0000-0001-8239-0943.



INFORMATION ABOUT AUTHORS

LABORATORY OF NEUROPHYSIOLOGY, IMMUNOLOGY AND BIOCHEMISTRY


Anna V. Shliakhova – Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, ORCID: 0000-0002-3934-5888;

Olena V. Veselovska – Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, ORCID: 0000-0002-5209-4606;

Olga G. Berchenko – Dr. Sci. (Biology), Prof., Head of the Laboratory, ORCID: 0000-0003-4201-4542;

Anna M Titkova – Cand. Sci. (Biology), Principal Researcher, ORCID: 0000-0002-7161-4507;

Olena O. Prikhodko – Junior Researcher, ORCID: 0000-0001-8239-0943.

Olga G. Berchenko 
ORCID: 0000-0003-4201-4542
berchenko.olga@ukr.net

ВСТУП

В основі формування поведінки, залежної від алкоголю, лежать довготривалі нейропластичні зміни в емоціогенній лімбіко-неокортикальній системі мозку (ЛНКСМ), які зумовлені порушенням молекулярних механізмів регуляції із залученням оксиду азоту (NO) [1].

NO – сигнальна молекула, яка синтезується ензиматичним шляхом з L-аргініну трьома формами NO-синтаз: нейрональною, ендотеліальною та індукційною. Значна активність нейрональної NO-синтази відмічена в клітинах таких структур головного мозку, як префронтальна кора, гіпокамп (Hipp), мигдалеподібний комплекс, дорсальне ядро шва, блакитна пляма і гіпоталамус (Hpt). Ці структури тісно пов'язані з формуванням мотиваційної та емоційної поведінки та їх розладами при алкогольній залежності [2].

Залежно від концентрації в тканинах головного мозку NO через активацію ряду внутрішньоклітинних шляхів викликає як позитивні, так і негативні ефекти в центральній нервовій системі. Одним із провідних шляхів дії NO є система гуанілатциклаза-циклічної GMP-протеїнази G. В фізіологічних концентраціях NO чинить нейропротекторну дію шляхом зниження ступеня опосередкованого Fas-TNF-апоптозу через пригнічення каспази-3-подібної протеази. NO захищає клітини від оксидативного стресу та перекисного окислення ліпідів [3].

Показано, що при вживанні алкоголю захисні ефекти NO залежать від їх дози і здійснюються через активацію сигнального шляху NO-cGMP-PKG-фосфорилування цільових білків та активацію нейропротекторних властивостей нейротрофічних факторів [4, 5]. При блокуванні гена нейрональної NO-синтази на фоні дії алкоголю захисні ефекти NO знижуються, що призводить до апоптозу нейрональних клітин. В цих умовах найбільш вразливими до апоптозу стають нейрони нової кори, Hipp та їх клітини-попередники [6]. При тривалому вживанні алкоголю виявлено пригнічення постнатального нейрогенезу і зменшення їх об'єму [7].

Підвищений рівень NO при патологічних станах чинить цитотоксичну дію внаслідок утворення цитотоксичних сполук (так званих «активних форм азоту»), а процес, викликаний пошкодженням клітин, позначають як «нітрозативний стрес» [8, 9]. Надмірний синтез цитокинів при нітрозативному стресі призводить до збільшення продукції NO [10, 11]. Такі взаємопов'язані події у клітинах мозку формують порочне патологічне коло пошкодження з залученням нейромедіаторних, нейрогормональних і нейротрофічних регуляторних систем.

Високі концентрації NO в тканинах мозку впливають на механізми нейротрансмісії, насамперед, у Hipp, мигдалеподібному комплексі та Hpt [12]. У стані відміни алкоголю виявлені складні молекулярні взаємовідносини між рівнем NO і гамма-аміномасляною кислотою. Послаблення нейропротекторних властивостей NO при зниженні його рівня в nucleus accumbens (nAcc), мигдалеподібному комплексі та Hipp супроводжується підвищенням концентрації гальмівного медіатора гамма-аміномасляної кислоти [13, 14]. Як відомо, ці структури мозку

модулюють когнітивні процеси, мотиваційну і емоційну поведінку, розлади яких відзначаються при алкогольній залежності [1, 14].

В зв'язку з цим, важливою для клінічної наркології стає розробка та нейробіологічне обґрунтування нових фармакологічних підходів щодо корекції дисбалансу вмісту NO в структурах емоційної ЛНКСМ при алкогольній залежності. Оскільки в організмі NO може зв'язуватись у відносно стабільні комплекси, що містять атом заліза, і депонуватись в клітинах або переноситись на певні відстані [15], нас зацікавили донатори NO, а саме нітропрусид натрію (НПН) – $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$. В клітинах НПН зазнає біотрансформації з вивільненням молекули NO, що робить можливим його доставлення безпосередньо у мозок при інтраназальному введенні.

Мета дослідження. Вивчення впливу інтраназального введення НПН на тривожність, електричну активність ЛНКСМ та вміст NO в Hipp, Hpt та septum (Sept) + nucleus accumbens (nAcc) у щурів з алкогольною залежністю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі процедури з експериментальними тваринами виконані згідно із Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV від 21.02.2006 р. і Наказом МОН України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» № 249 від 01.03.2012 р.

Дослідження проведені у хронічному експерименті на 50 нелінійних білих щурах-самцях статевозрілого віку.

Модель алкогольної залежності створювали шляхом добровільного приймання щурами хліба, змоченого 25 % етанолом в дозі 1,25 г/кг маси тіла протягом 35 діб. Потяг до алкоголю визначали за ознакою переваги щурами алкогольної їжі безалкогольній [19].

Донатор NO НПН вводили інтраназально мікродозатором по 10 мкл у кожен ніздрю в дозі 8 мкг/кг маси тіла щура двічі за добу о 10.00 і 16.00 години (усього до 20 введення), які здійснювали на тлі приймання алкоголю і відміни його вживання.

Нейроетологічні та нейрофізіологічні дослідження проведені на 30 щурах. Індивідуальний рівень тривожності визначали за допомогою багатопараметрового методу оцінки тривожно-фобічних станів по сукупності поведінкових реакцій у наборі етологічних тестів, заснованих на створенні емоційної ситуації [16]. Використовували наступні показники етологічних тестів: латентний період спуску з висоти, латентний період проходження через отвір, латентний період виходу з «будиночку» і латентний період виходу із центру відкритого поля. Для усіх тестів були встановлені єдині межі зміни виразності відповідної реакції: від 0 балів до 3 балів. Більша загальна оцінка відповідала більш високому тривожно-фобічному рівню.

У тесті «відкрите поле» реєстрували: а) рухову активність: горизонтальну (кількість перетнутих квадратів) і вертикальну (кількість стійок), латентний період виходу з центрального квадрата, латентний період першого повернення і кількість повернень до центрального квадрата;

б) емоційні реакції: кількість актів грумінгу та вегетативної поведінки; в) пошукову діяльність: кількість заглядань до нірок. Тестування у «відкритому полі» відбувалось впродовж 3 хв [17].

Рівень тривожності в тесті «підвішування за хвіст» визначали по латентному періоду імовірності, який є кількісним показником поведінкової безпорадності (депресивного стану) [18]. Після оцінки тривожно-фобічних станів інтактних щурів розподілили на групи з базовим низьким ($n = 21$) та базовим високим ($n = 9$) рівнем тривожності.

Етологічні тестування, оцінку тривожно-фобічних станів і електричну активність мозку, яку реєстрували біполярно на комп'ютерно-діагностичному комплексі «НЕЙРОН СПЕКТР+» («Нейрософт», РФ), проводили в стані алкогольної залежності, на третю добу відміни вживання етанолу, після 20-разового введення НПН та через одну добу після останнього введення препарату. Електричну активність ЛНКСМ щурів зі сформованою алкогольною залежністю реєстрували після стереотаксичного введення довгострокових електродів в лобово-тім'яні відділи нової кори (Cort), Hipp, Hpt і nAcc [17].

Аналіз ЕЕГ здійснювали візуально та за допомогою пакету комп'ютерних програм, який дозволяв обчислювати абсолютну спектральну потужність ритмів біопотенціалів мозку. Аналізували три епохи запису по п'ять секунд кожна для 5 частотних діапазонів: дельта (δ) (від 1 до 3 Гц), тета (θ) (від 4 до 7 Гц), альфа (α) (від 8 до 12 Гц), бета низькочастотний ($\beta_{\text{ни}}$) (від 13 до 20 Гц) і бета високочастотний ($\beta_{\text{ви}}$) (від 21 до 35 Гц).

Біохімічні дослідження проведені на 30 щурах, які були розподілені на групи по 10 тварин: 1-а група – інтактні щури, 2-а група – щури зі сформованою алкогольною залежністю, 3-я група – щури зі сформованою алкогольною залежністю та інтраназальним введенням малих доз НПН. Матеріал для дослідження забирали вранці через 30 хв після останнього введення НПН.

Концентрацію NO визначали в гомогенатах Hipp, Hpt і Sept + nAcc. Ступінь абсорбції зразка вимірювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 («ЛОМО», РФ) при довжині хвилі $\lambda = 546$ нм при значенні довжини оптичного шляху рівному 10 мм [20].

Результати досліджень обробляли статистично за допомогою пакету програм Statistica 10.0 з використанням t -критерія Стьюдента і критерія Вілкоксона-Манна-Уїтні. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Формування алкогольної залежності у щурів призводило до розвитку гальмівних процесів на ЕЕГ структур ЛНКСМ. Найбільше виражені зміни на ЕЕГ у алкоголь-залежних щурів після приймання чергової дози алкоголю зареєстровані в nAcc та Hipp. В nAcc домінувала повільно-хвильова активність переважно δ - та θ -діапазону, також спостерігалися короткі відрізки низькоамплітудного β -ритму. Під час реєстрації ЕЕГ виникали генералізовані пароксизми складної структури, які частіше ініціював Hipp, іноді – Cort. За результатами спектрального

аналізу найвищу абсолютну спектральну потужність ритмів в діапазоні біопотенціалів δ -частот мали nAcc і Hipp (рис. 1).

Зміни тривожності у щурів після хронічної алкоголізації залежали від базового рівня, який визначали шляхом комплексної оцінки тривожно-фобічних станів щурів до алкоголізації. У щурів з базовим низьким рівнем тривожності, який знаходився в межах ($3,92 \pm 0,41$) бала, алкоголізація призводила до підвищення рівня тривожності до ($5,04 \pm 0,61$) бала ($p < 0,05$). У щурів з базовим високим рівнем тривожності, який складав ($8,68 \pm 0,61$) бала, приймання чергової дози алкоголю, навпаки, знижувало рівень тривожності до ($6,32 \pm 0,90$) бала ($p < 0,05$), тобто алкоголь у цих щурів викликав седативний ефект (рис. 2). Це збігалось з вірогідним ($p < 0,05$) пригніченням рухової горизонтальної та вертикальної активності, що свідчило про гальмування дослідницької активності у щурів (табл. 1).

На третю добу після відміни вживання алкоголю на ЕЕГ щурів з'являлися компоненти електричних проявів судомної та пароксизмальної активності. На електричній активності Cort, Hipp та Hpt реєструвалися гострі хвилі, піки, комплекси пік-хвиля і α -пароксизми у nAcc і Hpt. Тригерну роль в запуску пароксизмальної активності виконував Hipp. Аналіз біопотенціалів мозку показав зниження спектральної потужності ритмів α - та $\beta_{\text{ни}}$ -діапазону у Cort ($p < 0,05$) і δ -ритму у Hpt (рис. 1).

Такі зміни на ЕЕГ супроводжувались підвищенням тривожності у щурів з її низьким базовим рівнем. У цих щурів показник повернення до центру «відкритого поля» підвищувався майже на 50 %, що свідчило про надзвичайний страх простору і гальмування дослідницької активності. У тварин з високим базовим рівнем тривожності показники емоційного напруження, які пригнічувались алкоголізацією, в стані відміни вживання алкоголю – підвищувалися, як і у щурів з базовим низьким рівнем тривожності, і наближались до фонових значень (табл. 1). Відомо, що відміна алкоголю активує NO-продукуючі нейрони в структурах мозку, відповідальних за модуляцію експресії тривожної поведінки та її моторних і вегетативних компонентів [21].

Встановлено, що хронічне приймання алкоголю супроводжується зниженням рівня NO в Hpt на 47 % і в Hipp на 46 % при відсутності вірогідних змін в структурах переднього мозку (Sept + nAcc). В період відміни алкоголю рівень NO залишався низьким в Hpt та Hipp і знижувався на 31 % в Sept + nAcc (табл. 2).

Трактування отриманих результатів ускладнюється тими обставинами, що в головному мозку здійснюється експресія трьох ізоформ NO-синтази, яка відрізняється за складом багатьох факторів регуляції. Також показано, що етанол чинить різний вплив на продукцію NO в клітинах головного мозку [22–24]. Хронічна дія алкоголю підвищує глутамат-стимульований синтез NO в нейронах Cort. При цьому, в залежності від дози, може стимулювати (середні дози алкоголю) чи інгібувати (високі дози алкоголю) активність індукцибельної NO-синтази, стимульовану прозапальними цитокінами в клітинах мікроглії. В разі значної активації індукцибельної NO-синтази рівень NO може не підвищуватись, а навіть знижуватись завдяки

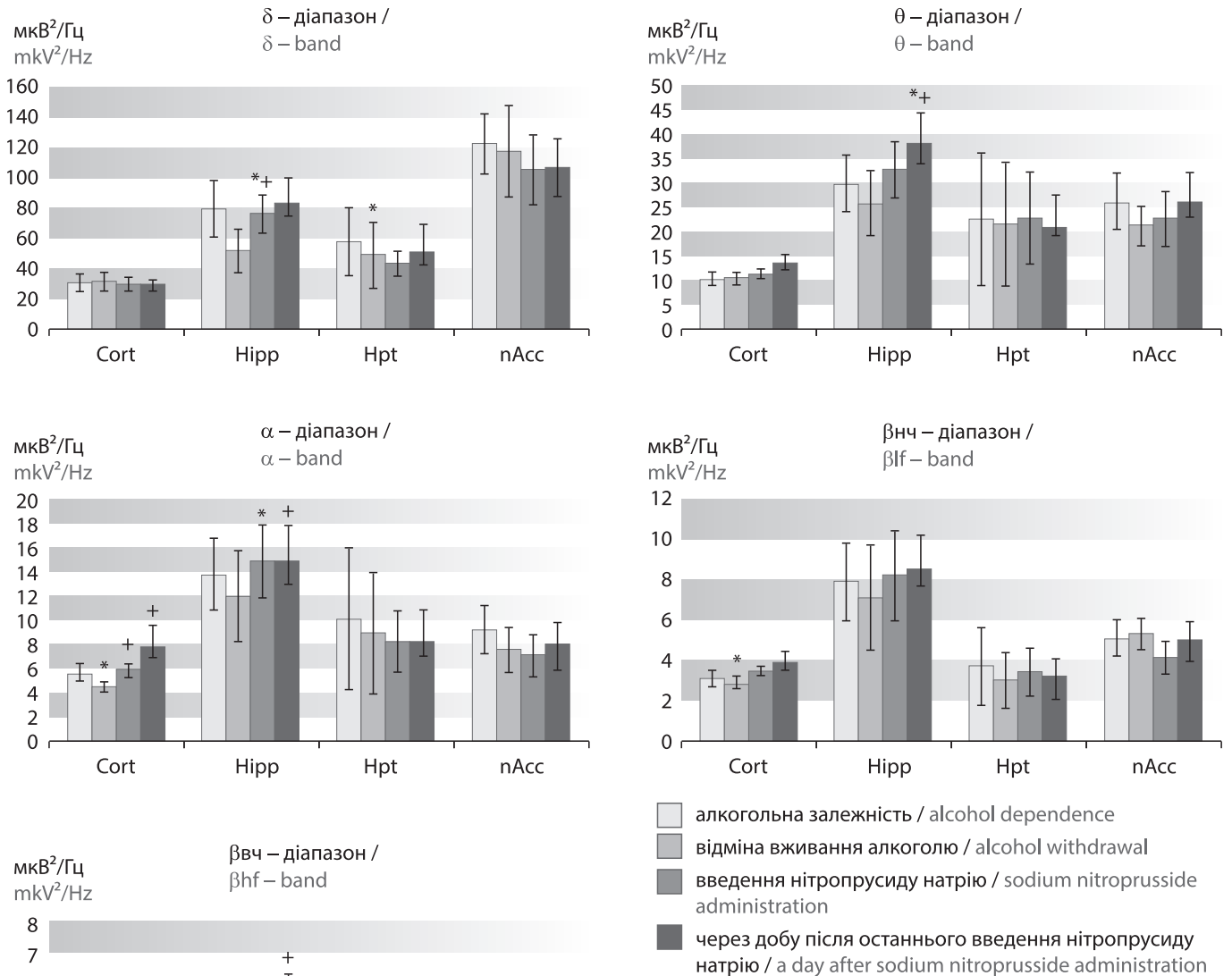


Рис. 1 / Fig. 1. Динаміка спектральної потужності ритмів ЕЕГ у щурів з алкобольною залежністю / Dynamics of the spectral power of the EEG rhythms of rats with alcohol dependence.

Примітка / Note: * – $p < 0,05$ у порівнянні з алкобольною залежністю, + – $p < 0,05$ у порівнянні з відміною вживання алкоголю, # – $p < 0,05$ у порівнянні з введенням НПН / * – $p < 0.05$ in comparison with alcohol dependence, + – $p < 0.05$ in comparison with alcohol withdrawal, # – $p < 0.05$ in comparison with sodium nitroprusside administration.

продукції супероксиду, що є одним з чинників розвитку процесів алкобольної інтоксикації і нейродегенерації.

Відомо, що хронічна дія алкоболью викликає оксидативний стрес [25], тому можна вважати, що Hpt і Hipp є найбільш вразливими структурами, в яких найбільш виражений токсичний вплив алкоболью і знижена протективна дія NO. В цьому сенсі, зменшення концентрації NO в зоні Sept + nAcc в стані відміни вживання алкоболью може посилювати негативні прояви абстиненції.

Інтраназальне введення донатора NO НПН протягом 10 діб призвело до позитивних змін в електричній активності мозку. Відзначалося пригнічення судомної та пароксизмальної активності на ЕЕГ структур ЛНКСМ, домінування ритмів θ- і α-діапазону у Cort, Hipp та Hpt, збільшення представленості модульованих δ- і θ-хвиль у nAcc. Прояви регулярних тривалих епох α-активності на ЕЕГ

Hipp та Hpt віддзеркалювали розвиток стану спокою. Спектральна потужність біопотенціалів мозку δ- і α-діапазонів вірогідно ($p < 0,05$) підвищувалась на спектрограмах Hipp (рис. 2). Показано зниження НПН негативного впливу хронічної алкобользації на електричну активність мигдалеподібного комплексу [26].

Слід зазначити, що позитивні ефекти дії НПН на електричну активність мозку щурів зберігалися і наступної доби після останнього введення. Так, на ЕЕГ відмічали подальше підсилення активаційних впливів на Cort, Hipp і Hpt: у цих структурах мозку виникали довготривалі (до 10 с) епохи регулярного α- або θ-ритму середньої амплітуди, а також пригнічення електрографічних проявів судомної активності. На спектрограмах Hipp виявлено α- і β_{нч}-ритмів у порівнянні зі станом алкобольної залежності та δ-ритму у порівнянні з третьою добою відміни вживання алкоболью; на

ТАБЛИЦЯ 1 / TABLE 1
ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ БАГАТОПАРАМЕТРОВОГО МЕТОДУ КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ ТРИВОЖНО-ФОБІЧНИХ СТАНІВ І ТЕСТУ «ВІДКРИТЕ ПОЛЕ»
У ЩУРІВ (M ± m) / DYNAMICS OF INDICATORS OF MULTIPARAMETER METHOD OF COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF ANXIETY-PHOBIC STATES
AND THE OPEN FIELD TEST IN RATS (M ± m)

Показник, одиниці вимірювання / Indicator, units	Тварини з базовим низьким рівнем тривожності (n = 21) / Animals with a baseline low level of anxiety (n = 21)				Тварини з базовим високим рівнем тривожності (n = 9) / Animals with a baseline high level of anxiety (n = 9)			
	Фон / Background	Алкогільна залежність / Alcohol dependence	Відміна вживання алкоголю / Alcohol withdrawal	Після введення НПН / After sodium nitroprusside administration	Фон / Background	Алкогільна залежність / Alcohol dependence	Відміна вживання алкоголю / Alcohol withdrawal	Після введення НПН / After sodium nitroprusside administration
Спуск з висоти, с / Lowering from a height, s	32,14 ± 11,71	52,21 ± 10,71 ¹⁾	88,33 ± 32,32	71,54 ± 16,12 ¹⁾	153,74 ± 27,33 ³⁾	104,83 ± 31,71 ³⁾	151,04 ± 20,04 ³⁾	120,95 ± 36,67
Прохід через отвір, с / Passing- through a hole, s	14,58 ± 2,87	41,61 ± 13,48	91,93 ± 32,55 ¹⁾	84,24 ± 15,56 ¹⁾	75,33 ± 34,21 ³⁾	39,24 ± 23,16	138,04 ± 23,5	148,43 ± 32,56 ^{1,2,3)}
Вихід з «будиночку», с / Coming out from a box, s	111,63 ± 17,59	121,57 ± 16,32	140,01 ± 26,56	131,83 ± 15,21	181,00 ± 0,00	148,23 ± 14,45	136,08 ± 25,37	132,02 ± 18,18
Спроби виконання тестів, кіл / Attempts of test performance, number	1,22 ± 0,21	1,56 ± 0,33	0,71 ± 0,31	0,71 ± 0,18 ^{1,2)}	2,73 ± 0,78 ³⁾	1,01 ± 0,45 ¹⁾	1,04 ± 0,56	0,81 ± 0,45 ¹⁾
Вихід з центру, с / Coming out from a center, s	18,43 ± 2,52	21,94 ± 3,79	24,04 ± 6,88	16,53 ± 3,09	22,67 ± 6,31	17,19 ± 3,67	25,63 ± 7,31	16,27 ± 3,45 ¹⁾
Повернення до центру, с / Coming back to the center, s	108,24 ± 14,89	88,33 ± 13,56	150,74 ± 20,67 ^{1,2)}	123,84 ± 15,09 ²⁾	113,78 ± 27,51	101,19 ± 27,45	133,73 ± 15,88	104,22 ± 32,37
Повернення до центру, кількість / Coming back to the center, number	1,22 ± 0,19	1,63 ± 0,33	0,74 ± 0,29	0,67 ± 0,09 ^{1,2)}	1,04 ± 0,41	1,01 ± 0,29	0,83 ± 0,21	1,42 ± 0,89
Горизонтальна активність, кількість / Horizontal activity, number	35,67 ± 4,31	35,01 ± 5,67	15,14 ± 5,71	19,54 ± 4,19 ^{1,2)}	35,67 ± 7,17	22,56 ± 4,55 ¹⁾	18,27 ± 5,25 ¹⁾	14,38 ± 6,09 ¹⁾
Вертикальна активність, кількість / Vertical activity, number	8,78 ± 1,81	5,42 ± 1,09 ¹⁾	2,11 ± 0,89	3,11 ± 0,67 ^{1,2)}	9,33 ± 2,61	2,41 ± 1,04 ^{1,3)}	5,27 ± 1,01 ³⁾	3,45 ± 0,87
Грумінг, кількість / Grooming, number	2,19 ± 0,36	1,91 ± 0,56	1,89 ± 1,09	2,56 ± 0,43	2,31 ± 0,81	1,56 ± 0,67	1,03 ± 0,32	3,38 ± 0,96
Вегетативні реакції, кількість / Vegetative reactions, number	1,58 ± 0,27	1,83 ± 0,21	0,10 ± 0,10	1,04 ± 0,22	0,71 ± 0,45	1,43 ± 0,21	0,45 ± 0,11	1,02 ± 0,56
Обстеження нірок, кількість / Holes exploration, number	2,48 ± 0,41	2,87 ± 0,56	2,56 ± 1,12	2,67 ± 0,45	1,33 ± 0,81	2,78 ± 1,79	2,34 ± 1,45	1,61 ± 0,88
Тест «підвішування за хвіст», с / Tail suspension test, s	13,13 ± 1,51	10,99 ± 0,89	14,93 ± 2,78	10,67 ± 1,04	13,01 ± 1,71	11,84 ± 2,53	15,02 ± 3,11	10,29 ± 1,36 ¹⁾

Примітка / Note: ¹⁾ – p < 0,05 у порівнянні з фоном; ²⁾ – p < 0,05 у порівнянні з алкогільною залежністю; ³⁾ – p < 0,05 у порівнянні з тваринами з базовим низьким рівнем тривожності; ^{1,2)} – p < 0,05 in comparison with the background; ²⁾ – p < 0,05 in comparison with the animals with alcohol dependence; ³⁾ – p < 0,05 in comparison with animals with the baseline low level of anxiety.

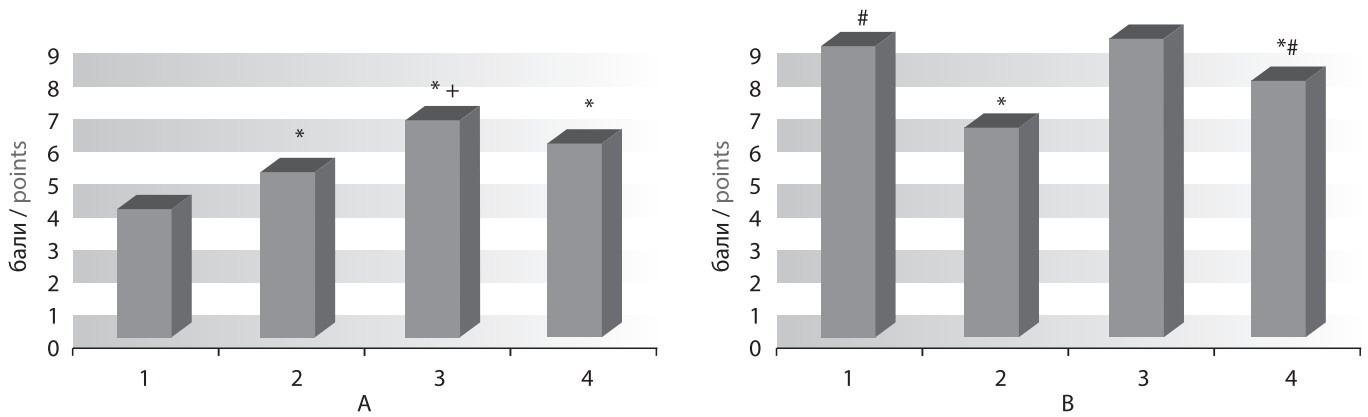


Рис. 2 / Fig. 2. Динаміка комплексної оцінки тривожно-фобічного стану щурів з базовим низьким (А) та базовим високим (Б) рівнем тривожності / Dynamics of a comprehensive assessment of the anxiety-phobic condition of rats with baseline low (A) and baseline high (B) levels of anxiety.

Примітка / Note: 1 – фон, 2 – алкогольна залежність, 3 – відміна вживання алкоголю, 4 – після введення НПН; * – $p < 0,05$ у порівнянні з фоном, + – $p < 0,05$ у порівнянні з алкогольною залежністю, # – $p < 0,05$ у порівнянні зі щурами з базовим низьким рівнем тривожності / 1 – background, 2 – alcohol dependence, 3 – alcohol withdrawal, 4 – after sodium nitroprusside administration; * – $p < 0.05$ in comparison with background, + – $p < 0.05$ in comparison with alcohol dependence, # – $p < 0.05$ in comparison with rats with a basic low level of anxiety.

спектрограмах Cort відзначали вірогідне підвищення спектральної потужності $\beta_{\text{вч}}$ -ритму у порівнянні з даними після прийому алкоголю та відміни його вживання (рис. 1).

За даними багатопараметрової комплексної оцінки тривожно-фобічного стану під впливом інтраназального введення НПН рівень тривожності у щурів, незалежно від її базового рівня, мав тенденцію до зниження у порівнянні зі значеннями після відміни вживання алкоголю. За результатами тесту «підвішування за хвіст» у тварин з

високим базовим рівнем тривожності спостерігали вірогідне ($p < 0,05$) зниження її рівня у порівнянні з фоновими даними. Орієнтовно-дослідницька активність, як проста форма когнітивної діяльності, у тесті «відкрите поле» була пригнічена (табл. 1, рис. 2). Певно, в нашому випадку НПН викликав анксиолітичні ефекти, що сприяло модуляції негативної емоційної поведінки.

Вивчаючи дію НПН на вміст NO в структурах, в яких спостерігалось виснаження рівня NO в результаті хроніч-

ТАБЛИЦЯ 2 / TABLE 2

КОНЦЕНТРАЦІЯ МЕТАБОЛІТІВ NO В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З АЛКОГОЛЬНОЮ ЗАЛЕЖНІСТЮ ПІСЛЯ ПРИЙМАННЯ АЛКОГОЛЮ, ВІДМІНИ ПРИЙОМУ АЛКОГОЛЮ ТА ВВЕДЕННЯ НПН ($M \pm m$; нмоль/г тканини) / CONCENTRATION OF NITROGEN OXIDE METABOLITES IN THE BRAIN STRUCTURES OF RATS WITH ALCOHOL DEPENDENCE AFTER ALCOHOL CONSUMPTION, ALCOHOL WITHDRAWAL AND SODIUM NITROPRUSSIDE ADMINISTRATION ($M \pm m$; nmol/g of tissue)

Структура мозку / Brain Structure	Інтактні щури / Intact rats (n = 10)	Алкогольна залежність / Alcohol dependence	
		Приймання алкоголю / Alcohol consumption (n = 10)	Відміна вживання алкоголю / Alcohol withdrawal (n = 10)
Hpt	519,13 ± 101,07	274,04 ± 36,33 ¹⁾	271,41 ± 45,89 ¹⁾
		Після введення нітропрусиду натрію / After sodium nitroprusside administration	
Hipp	371,04 ± 44,62	423,28 ± 97,78	665,41 ± 109,03 ²⁾
		Після введення нітропрусиду натрію / After sodium nitroprusside administration	
Sept + nAcc	342,05 ± 31,04	200,04 ± 29,27 ¹⁾	227,56 ± 35,61 ¹⁾
		Після введення нітропрусиду натрію / After sodium nitroprusside administration	
		342,41 ± 39,04	236,12 ± 42,56 ¹⁾
		Після введення нітропрусиду натрію / After sodium nitroprusside administration	
		239,04 ± 24,67 ¹⁾	411,57 ± 111,16 ²⁾

Примітка / Note: ¹⁾ – $p < 0,05$ у порівнянні з інтактними щурами / $p < 0.05$ in comparison with intact rats; ²⁾ – $p < 0,05$ у порівнянні з відповідною групою до прийому НПН / $p < 0.05$ in comparison with the corresponding group before sodium nitroprusside administration.

ної алкоголізації та відміни вживання алкоголю, було виявлено повне відновлення його рівня в Нрт і Нірт, тобто створювались умови для відновлення протекторної дії NO (табл. 2).

На фоні відсутності вірогідних змін рівня NO після приймання чергової дози алкоголю НПН знижував концентрацію NO в Sept + nAcc, а в стані відміни вживання алкоголю, навпаки, підвищував знижений рівень NO. Таким чином, ми спостерігали різноспрямований вплив НПН на вміст NO: підвищення – в разі його низького рівня, викликаного станом алкогольної залежності, та зниження – в разі його нормального або підвищеного рівня.

ВИСНОВКИ

1 Інтраназальне введення НПН, як донатора NO, щуром з алкогольною залежністю викликає в стані

відміни вживання алкоголю анксиолітичні ефекти в залежності від базового рівня тривожності: у тварин з базовим високим рівнем тривожності – знижує її, а у щурів з базовим низьким рівнем – стримує тривожність на рівні приймання алкоголю.

2 Інтраназальне введення НПН в стані відміни вживання алкоголю викликає позитивні зміни на ЕЕГ структур ЛНКСМ, що проявляється в пригніченні судомної і пароксизмальної активності та посиленні потужності біопотенціалів мозку альфа- і дельта-діапазонів на спектрограмах Нірт, зі збереженням ефекту протягом доби після останнього введення.

3 Інтраназальне введення НПН є джерелом короткочасного постачання NO в клітини головного мозку, що призводить до відновлення рівня NO в Нрт, Нірт, Sept + nAcc – структурах, які долучені до регуляції емоційно-мотиваційної поведінки.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ / REFERENCES

1. *Abraham KP, Salinas AG, Lovinger DM.* Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron.* 2017 Dec 20;96(6):1223-38. DOI: 0.1016/j.neuron.2017.10.032.
2. *Zhou QG, Zhu XH, Nemes AD, Zhu DY.* Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders. *IBRO Rep.* 2018 Nov 17;5:116-32. DOI: 10.1016/j.ibror.2018.11.004.
3. *Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM.* Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Oct;8(10):766-75. doi: 10.1038/nrn2214.
4. *Bonthius DJ, Karacay B, Dai D, Hutton A, Pantazis NJ.* The NO-cGMP-PKG pathway plays an essential role in the acquisition of ethanol resistance by cerebellar granule neurons. *Neurotoxicol Teratol.* 2004 Jan-Feb;26(1):47-57. DOI: 10.1016/j.ntt.2003.08.004.
5. *Karacay B, Bonthius DJ.* The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene and neuroprotection against alcohol toxicity. *Cell Mol Neurobiol.* 2015 May;35(4):449-61. DOI: 10.1007/s10571-015-0155-0.
6. *West JR, Goodlett CR, Bonthius DJ, Hamre KM, Marcussen BL.* Cell population depletion associated with fetal alcohol brain damage: mechanisms of BAC-dependent cell loss. *Alcohol Clin Exp Res.* 1990 Dec;14(6):813-8. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1990.tb01820.x.
7. *Taffe MA, Kotzebue RW, Crean RD, Crawford EF, Edwards S, Mandyam CD.* Long-lasting reduction in hippocampal neurogenesis by alcohol consumption in adolescent nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 15;107(24):11104-9. DOI: 10.1073/pnas.0912810107.
8. *Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424. DOI: 10.1152/physrev.00029.2006.
9. *Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N et al.* The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem.* 2004 Jan;385(1):1-10. DOI: 10.1515/BC.2004.001.
10. *Lancaster FE.* Alcohol and the brain: what's NO got to do with it? *Metab Brain Dis.* 1995 Jun;10(2):125-33. DOI: 10.1007/BF01991860.
11. *Feldman DE, McPherson KL, Biessecker CL, Wiers CE, Manza P, Volkow ND et al.* Neuroimaging of inflammation in alcohol use disorder: a review. *Sci China Inf Sci.* 2020;63:170102. DOI: 10.1007/s11432-019-2857-5.
12. *Zorumski CF, Izumi Y.* Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol.* 1993 Sep 1;46(5):777-85. DOI: 10.1016/0006-2952(93)90484-e.
13. *Titkova AM, Berchenko OG, Shlyakhova AV, Veselovskaya EV, Prikhodko EA.* [Interaction of dopamine, nitric oxide and testosterone in the brain system of motivational reinforcement in rats with alcohol dependence and under nitric oxide donor impact]. *The Journal of V N Karazin Kharkiv National University. Series «Biology».* 2018;30:95-102. Russian. DOI: 10.26565/2075-5457-2018-30-11.
14. *Cui C, Koob GF.* Titrating Topsy Targets: The Neurobiology of Low-Dose Alcohol. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 Jun;38(6):556-68. DOI: 10.1016/j.tips.2017.03.002.
15. *Lvova OA, Orlova AE, Kovtun OP, Gusev VV, Chegodaev DA.* [The role of nitric oxide in health and disease of the nervous system]. *System integration in healthcare.* 2010;4(10):20-35. Russian.
16. *Rodina VI, Krupina NA, Kryzhanovskii GN, Oknina NB.* [A multiparameter method for the complex evaluation of anxiety-phobic states in rats]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 1993 Sep-Oct;43(5):1006-17. Russian.
17. *Buresh J, Bureshova O, Houston DP.* [Methodology and Basic Experiments in Brain and Behavior Studies]. *Moskva: Vysshaya shkola;* 1991. 399 p. Russian.
18. *Loskutova LV, Shtark MB, Epstein OI.* Efficiency of ultralow doses of antibodies to S100 protein and delta sleep-inducing peptide in rats with anxious depression. *Bull Exp Biol Med.* 2003 Jan;135 Suppl 7:20-2. DOI: 10.1023/a:1024797722719.
19. *Berchenko OG, Titkova AM, Veselovskaya EV, Shlyakhova AV, Levicheva NO, Prikhodko EO.* Electrical Activity of the Cerebral Structures and Regulatory Effects of NO, Steroid Hormones, and BDNF in Rats with Experimental Alcohol Addiction. *Neurophysiology.* 2017 Nov;49(3):234-6. DOI: 10.1007/s11062-017-9668-0.
20. *Golikov PP, Nikolayeva NYU.* [Method of Nox determination in the spinal-marrow liquid in neurosurgical patients]. *Neirokhirurgiya.* 2003;3:35-7. Russian.
21. *Bonassoli VT, Milani H, de Oliveira RM.* Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. *Alcohol.* 2011 Nov;45(7):641-52. DOI: 10.1016/j.alcohol.2010.11.007.
22. *Davis RL, Syapin PJ.* Interactions of alcohol and nitric-oxide synthase in the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Nov;49(3):494-504. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.01.008.
23. *Davis RL, Syapin PJ.* Acute ethanol exposure modulates expression of inducible nitric-oxide synthase in human astroglia: evidence for a transcriptional mechanism. *Alcohol.* 2004 Apr;32(3):195-202. DOI: 10.1016/j.alcohol.2004.01.006.
24. *Davis RL, Sanchez AC, Lindley DJ, Williams SC, Syapin PJ.* Effects of mechanistically distinct NF-kappaB inhibitors on glial inducible nitric-oxide synthase expression. *Nitric Oxide.* 2005 Jun;12(4):200-9. DOI: 10.1016/j.niox.2005.04.005.
25. *Ward RJ, Lallemand F, de Witte P.* Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol.* 2009 Mar-Apr;44(2):128-35. DOI: 10.1093/alcal/agn100.
26. *Severynovska O, Babicheva V, Galinskiy A, Bogatyreva O, Boyko M.* Bioelectrical Activity of the Amygdala of Rats under Conditions of Chronic Alcoholism and Imbalance of Nitric Oxide. *International Letters of Natural Sciences.* 2015 Nov;49:1-6. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.49.1



Нейропротекторное действие интраназального введения нитропрусида натрия на функциональную активность мозга и тревожность крыс с алкогольной зависимостью

А. В. Шляхова, Е. В. Веселовская, О. Г. Берченко, А. М. Титкова, Е. А. Приходько

ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», ул. Академика Павлова, 46, Харьков 61068, Украина

Введение. Нарушение молекулярных нитрозергических механизмов регуляции активности мозга при алкогольной зависимости лежит в основе снижения его защитных функций. Однако, вопросы разработки патогенетически обоснованных подходов к коррекции дисбаланса содержания оксида азота (NO) в структурах лимбико-неокортикальной системы мозга (ЛНКСМ) остаются недостаточно изученными.

Цель: изучение влияния интраназального введения нитропрусида натрия (НПН) на тревожность, электрическую активность ЛНКСМ и содержание NO в гиппокампе, гипоталамусе и septum + nucleus accumbens у крыс с алкогольной зависимостью.

Материалы и методы. Исследования проведены в хроническом эксперименте на 50 нелинейных белых крысах-самцах половозрелого возраста в 3 группах: интактные крысы, крысы с алкогольной зависимостью, крысы с алкогольной зависимостью и интраназальным введением НПН. Модель алкогольной зависимости создавали после добровольного приема крысами алкоголя в дозе 1,25 г/кг массы тела в течение 35 суток. НПН вводили интраназально в дозе 8 мкг/кг массы тела животного. Уровень тревожности определяли по нейроэтологическим тестам: многопараметровой комплексной оценке тревожности, «открытое поле» и «подвешивание за хвост». Электрическую активность ЛНКСМ регистрировали после стереотаксического введения электродов. Концентрацию NO определяли в гиппокампе, гипоталамусе и септум + nucleus accumbens.

Результаты. Интраназальное введение НПН крысам с алкогольной зависимостью приводило к подавлению судорожной и пароксизмальной активности, вызванной алкоголизацией и отменной приема алкоголя, на электроэнцефалограмме структур ЛНКСМ и к усилению абсолютной мощности биопотенциалов дельта- и альфа-диапазонов на спектрограмме гиппокампа. Выявлено снижение тревожности у крыс в группе с ее высоким базовым уровнем и восстановление в гипоталамусе и гиппокампе уровня NO, истощенного хронической алкоголизацией.

Выводы. Интраназальное введение крысам с алкогольной зависимостью НПН, как донатора NO, вызывает в состоянии отмены употребления алкоголя анксиолитические эффекты, которые зависят от базового уровня тревожности: у крыс с высоким уровнем тревожности – снижает ее, а у животных с базовым низким уровнем – сдерживает тревожность на уровне приема алкоголя. Интраназальное введение НПН в состоянии отмены приема алкоголя вызывает позитивные изменения на электроэнцефалограмме ЛНКСМ, что проявляется в угнетении судорожной и пароксизмальной активности и усилении мощности биопотенциалов мозга альфа- и дельта-диапазонов на спектрограмме гиппокампа с сохранением эффекта на протяжении суток. Интраназальное введение НПН является источником кратковременного поступления NO в клетки головного мозга, что приводит к восстановлению уровня NO в гипоталамусе, гиппокампе, септум и nucleus accumbens – структурах, которые задействованы в регуляции эмоционально-мотивационного поведения.

Ключевые слова: лимбико-неокортикальная система мозга, модель алкогольной зависимости, тревожность, оксид азота, нитропруссид натрия.

Для цитирования: Шляхова АВ, Веселовская ЕВ, Берченко ОГ, Титкова АМ, Приходько ЕА. Нейропротекторное действие интраназального введения нитропрусида натрия на функциональную активность мозга и тревожность крыс с алкогольной зависимостью. *Журнал Национальной академии медицинских наук Украины.* 2020;26(1-2):5-13. DOI: 10.37621/JNAMSU-2020-1-2-1.

Статья поступила в редакцию 28.03.2019 | Направлена на рецензирование 27.11.2019 | Принята в печать 08.12.2019