

ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕНАТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ М- И Н-ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Е.В.Сташина*, А.А.Байрамов***, В.В.Глущенко**, П.Д.Шабанов***

LONG-TERM EFFECTS OF PRENATAL USE OF M- AND N-CHOLINERGIC DRUGS

E.V.Stashina*, A.A.Bayramov***, V.V.Glushchenko**, P.D.Shabanov***

* Институт экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, lena-stashina@mail.ru

** Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого, vitaglu@mail.ru

Установлено, что пренатальное введение беременным самкам ганглерона и метамизила как экзогенных лигандов Н- и М-холинорецепторов мозговых структур приводит к отдаленным последствиям в деятельности ЦНС у половозрелых самцов: нарушаются такие высшие интегративные функции головного мозга крыс, как обучение и память в экспериментальной модели условного рефлекса активного избегания. Пренатальное введение ганглерона беременным самкам крыс на 9–11 и 12–14 дни гестации нарушало способности как к приобретению, так и к воспроизведению условного рефлекса активного избегания у половозрелых самцов из потомства этих самок. В аналогичной ситуации метамизил оказывал негативный эффект только на процесс воспроизведения условного рефлекса активного избегания. Таким образом, долговременный негативный эффект холинотропных соединений на процессы обучаемости и памяти у половозрелого потомства может реализоваться посредством как М-, так и Н-холинергических механизмов развивающегося мозга.

Ключевые слова: пренатальное воздействие, М- и Н-холиноблокаторы, потомства крыс, условный рефлекс активного избегания (УРАИ), отдаленные эффекты

Для цитирования: Сташина Е.В., Байрамов А.А., Глущенко В.В., Шабанов П.Д. Долговременные эффекты пренатального применения М- и Н-холинергических соединений // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. 2021. №3(124). С.90-93. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.3\(124\).90-93](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.3(124).90-93)

It was found that embryonic exposure to Gangleron and Metamizil as exogenous ligands H- and M-cholinergic receptors leads to long-term effects in the activities of central nervous system in adult young rats. It decreases learning ability in young adult rats. Cognitive functions were studied in active avoidance test. The results obtained suggest that prenatal administration of Gangleron to pregnant rats on 9-11 and 12-14 days of gestation violated the ability to acquire and reproduce active avoidance reflex in adult offspring. In the similar situation, Metamizil has a negative effect only on ability to reproduce active avoidance reflex. Thus, the long-term negative effect of cholinotropic compounds on learning and memory abilities in young adult rats can be realized through both M- and N-cholinergic mechanisms of the developing brain.

Keywords: prenatal exposure, cholinolytics, rats' progeny, conditioned reflex of active avoidance, long-term effects

For citation: Stashina E.V., Bayramov A.A., Glushchenko V.V., Shabanov P.D. Long-term effects of prenatal use of M- and N-cholinergic drugs // Vestnik NovSU. Issue: Medical Sciences. 2021. №3(124). P.90-93. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.3\(124\).90-93](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.3(124).90-93)

Введение

В настоящее время важность пренатального периода в развитии ребенка не вызывает сомнений. Влияние многих факторов внешней среды может привести к нарушению нормального течения эмбриогенеза, а именно нарушению дифференцировки нейронов, формирования связей между нейронами и созревания нейромедиаторных систем [1-4]. Головной мозг плода в критические периоды своего развития проявляет высокую чувствительность к воздействию экологических токсикантов и препаратов с холинотропными свойствами (никотина, хлорорганических соединений, барбитуратов и др.) [5-8].

Мускариновые и никотиновые холинорецепторы (М- и Н-холинорецепторы) широко представлены в структурах мозга, связанных с процессами обучения, памяти [4,9]. Холинотропные вещества (лекарственные препараты, никотин, наркотики), связываясь М- и Н-холинорецепторами нейронов

мозга в эмбриональном периоде, приводят к формированию в этих клетках стойких изменений, сохраняющихся и после рождения [4,10-12]. Учение И.П.Павлова об условных рефлексах имеет фундаментальное значение и актуально для изучения связи мозг-поведение. Согласно определению, условные рефлексы формируются на базе безусловных рефлексов при участии высших отделов мозга. Способность к формированию новых рефлекторных связей является базовым свойством ЦНС высших позвоночных животных.

В связи с изложенным, целью настоящей работы явилось сравнительное исследование отдаленных эффектов пренатального воздействия центральных блокаторов М- и Н-холинорецепторов на деятельность ЦНС в процессе активного обучения у половозрелых самцов крыс в тесте условного рефлекса активного избегания (УРАИ) как общепринятой экспериментальной модели приобретенной памяти.

Методы исследования

В работе было использовано потомство от 42 первородящих самок крыс линии Вистар. Все животные содержались в виварии в одинаковом положении в условиях 24-часового светового режима (12 ч день : 12 ч ночь), при свободном доступе к воде и стандартному корму (гранулированный комбикорм). Эксперименты проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986).

Введение холинотропных препаратов беременным самкам ($n = 42$) осуществляли трехкратно на 9-11, 12-14 и 17-19 дни гестации, что условно соответствует триместрам беременности. Метамизил и ганглерон растворяли в 0,9% растворе NaCl и вводили внутримышечно дозах 2,0 мг/кг и 10,0 мг/кг соответственно. Контрольным крысам вводили эквивалентное количество растворителя. Самцам, подвергшихся пренатальному введению М- и Н-холиноблокаторов, по достижению ими 3,5-4-месячного половозрелого возраста выполняли тесты на УРАИ.

Для выполнения поведенческих тестов полученное потомство самцов случайным образом разделяли на интактный контроль и на шесть опытных групп: группы Г-10, Г-13 и Г-18 — для ганглерона и группы М-10, М-13 и М-18 — для Метамизила соответственно.

Условный рефлекс у крыс вырабатывали в челночной камере (Ugo Basile, Италия) [13]. При этом каждый отсек становился то стартовым, то целевым и наоборот. При обучении крысу помещали в лабиринт на 5 мин для адаптации к обстановке. Условным стимулом служило включение света на 10 сек. в одном из отсеков, безопасном для животного. Если крыса в течение этого времени не перебежала в безопасную часть установки, то на электродный пол остальных отсеков подавали электрический ток (50 Гц, 10 мсек), побуждавший ее перебежать в освещенный отсек. Пороговые значения тока (2-4 мА) определяли по вокализации. В освещенном отсеке крыса находилась в течение 30 сек.

Обучение проводили в режиме постоянного подкрепления. Ежедневно животным предъявляли 20 сочетаний условного (свет) и безусловного (ток) сигналов. Выполнение реакции считалось правильным, если животное перебежало в безопасный отсек до включения тока. Обучение проводили в течение 5 дней. Тестирование сохранения выработанного УРАИ осуществляли спустя 5 дней. Крысу помещали в установку и предъявляли такое же количество условных сигналов, но без подкрепления током.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием дисперсионного анализа ANOVA с помощью пакета программ ORIGIN 7,0.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе динамики формирования УРАИ было установлено, что введение метамизила в пренатальном периоде у группы М-10 вызывало достоверное увеличение количества правильно выполняемых реакций на условный сигнал на 2-й и 3-й дни обучения по сравнению с контрольной группой (рис.1,

$p < 0,05$). На 4-й и 5-й дни эксперимента количество правильных ответов на условный сигнал у этой группы крыс достоверно не отличалось от таких же показателей контрольных крыс. У крыс М-13 динамика выработки УРАИ также существенно не отличалась от таковой у контрольной группы крыс, тогда как у самцов группы М-18, начиная с 4-го дня обучения, наблюдалось снижение количества правильных ответов по сравнению с контролем и группами М-10-13 (рис.1).

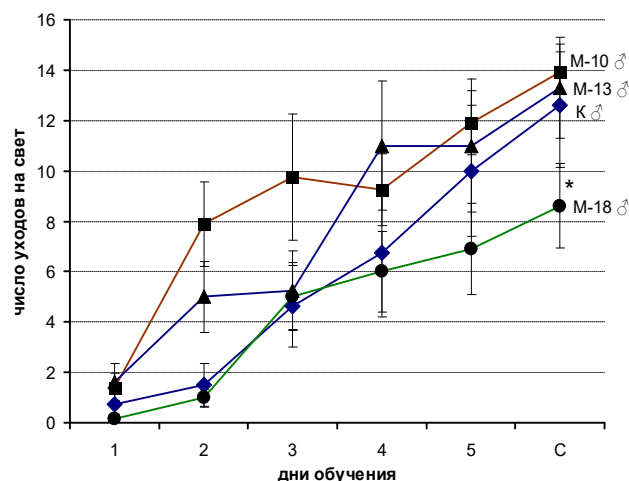


Рис.1. Динамика выработки условного рефлекса активного избегания, у потомств крыс, подвергнутых пренатальному воздействию метамизила в различные сроки гестации. По оси X — дни обучения, по оси Y — количество правильных переходов, С — сохранение приобретенного опыта через 5 дней. М-10, М-13, М-18 — группы с воздействием метамизила в 9-11, 12-14 и 17-19 сутки гестации соответственно; * — достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0,05$

Результаты сохранности выработанного навыка активного избегания у крыс показали достоверно низкий уровень воспроизведения УРАИ в группах с введением ганглерона (Г-10 и Г-13) и в группе с введением метамизила (М-18) по сравнению с контролем (рис.2, $p < 0,05$). Среди тестируемых опытных групп, только у животных группы Г-10 наблюдалась достоверно отрицательная динамика сохранения УРАИ по сравнению с 5-м днем тестирования.

Анализ результатов настоящей работы показывает, что блокада М- или Н-холинорецепторов в «критические сроки» гестации оказывает выраженное и разнонаправленное воздействие на процессы обучения и памяти крыс при формировании и воспроизведения у них УРАИ.

Совершенно иная картина наблюдалась при формировании УРАИ у самцов крыс, матери которых подверглись пренатальному воздействию ганглерона (рис.2). Так, у группы Г-18 с 4-го по 5-й день обучения число правильных побегов на условный сигнал было достоверно выше по сравнению с параметрами контрольной группы. У группы Г-13 начиная с 4-го дня обучения наблюдался достоверно более низкий уровень воспроизведения УРАИ по сравнению с контролем (рис.2, $p < 0,05$). В группе Г-10 количество правильных ответов практически не отличалась от значений контрольной группы.

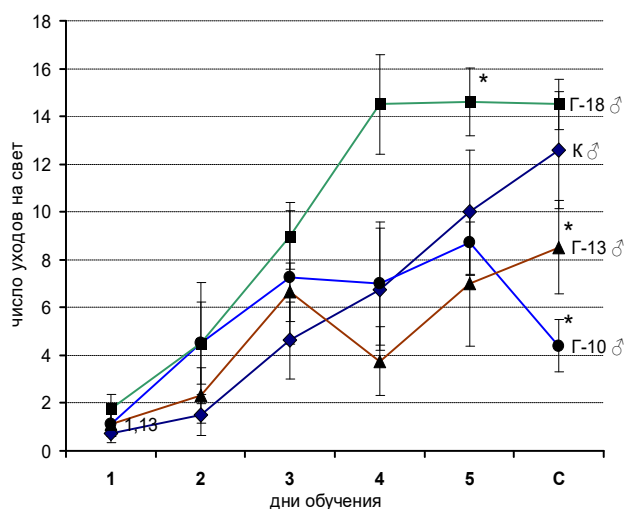


Рис.2. Динамика выработки условного рефлекса активного избегания, у потомств крыс, подвижных пренатальному воздействию Ганглера в различные сроки гестации. По оси X — дни обучения, по Y — количество правильных переходов, С — сохранение приобретенного опыта через 5 дней. Г-10, Г-13, Г-18 — группы с воздействием ганглера на 9-11, 12-14 и 17-19 сутки гестации соответственно; * — достоверное отличие от контрольной группы, $p < 0.05$

Далее мы изучили влияние холинотропных препаратов на долговременную память потомств самцов, протестировав на сохранность во времени выработанного УРАИ через 5 дней после последнего сеанса обучения.

Прежде всего, следует отметить, что воздействие ганглера в ранние сроки гестации оказывает наиболее негативное влияние на способность к обучению и последующему воспроизведению полученной информации у взрослых крыс. Блокада Н-холинорецепторов на 12-14 дни гестации полностью нарушает способность взрослых крыс группы Г-13 к приобретению и сохранению навыка активного избегания. У групп с метамизилом таким критическим периодом являются поздние сроки гестации, когда есть высокая вероятность нарушения сохранности приобретенных навыков.

Вместе с тем, пренатальное введение М-холинорецепторов в ранние сроки, а Н-холинорецепторов — в поздние сроки гестации (группы М-10 и Г-18 соответственно), способствовало улучшению выработки и сохранению УРАИ при последующем тестировании у взрослых крыс.

Результаты наших предыдущих исследований свидетельствуют, что модуляция активности как М-холинорецептивной, так и Н-холинорецептивной системы развивающегося мозга плода может вызывать долговременные изменения в нейромедиаторной активности в структурах мозга, в частности, участвующих в регуляции поведенческих функций организма [14-16]. Механизмы пренатального воздействия различных химических факторов с холинотропными свойствами также могут быть опосредованы как М-холинорецептивной, так и Н-холинорецептивными механизмами [5,6,17,18]. Доказано, что эмбриональная экспозиция к никотину, эндогенному лиганду Н-холинорецепторов, нарушает процессы пролиферации и дифференциации нервных кле-

ток мозга и вызывает отдаленные дефициты в синаптической функции и поведенческой деятельности взрослых особей [4,8,10].

Таким образом, пренатальные негативные эффекты метамизила и ганглера, введенных матерям в различные периоды гестации, могут быть следствием как стойких изменений нейромедиаторной активности, так и изменением чувствительности М- или Н-холинорецепторов в структурах головного мозга, что приводит к нарушениям процессов обучения и памяти.

Выводы

1. Введение Н-холинорецепторов ганглера в дозе 10,0 мг/кг самкам крыс во I и II триместрах беременности снижает способность к приобретению и воспроизведению рефлекса активного избегания у взрослого потомства мужского пола.

2. Введение М-холинорецепторов метамизила в дозе 2,0 мг/кг беременным самкам в поздние сроки гестации (17–19 дни) нарушает процесс сохранения приобретенного рефлекса активного избегания у взрослого потомства мужского пола.

3. Введение самкам крыс метамизила в I триместре и ганглера в III триместре беременности увеличивало способность к выработке рефлекса активного избегания и сохранению приобретенного опыта у половозрелого потомства мужского пола.

1. Байрамов А.А., Новикова Е.Н., Прошин С.Н. Влияние пренатального стресса на половое поведение // Медико-биол. и социально-психол. проблемы безопасности чрезвычайных ситуаций. 2008. №2. С.53-61
2. Торкунова О.В., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Холинергическая модуляция и нейробиологические аспекты врожденного поведения крыс при действии низкочастотных акустических колебаний // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2015. Т.13, №1. С.32-40.
3. Beer A., Slotkin T.A., Seidler F.J. et al. Nicotine Therapy in Adulthood Reverses the Synaptic and Behavioral Deficits Elicited by Prenatal Exposure to Phenobarbital // Neuropsychopharmacology. 2005. Vol.30. P.156-165.
4. Levin E.D., Simon B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals // Psychopharmacology. 1998. Vol.138. P.217-230.
5. Байрамов А.А., Сапронов Н.С. Влияние М- и Н-холинорецепторов на пренатальное развитие моноаминергической системы головного мозга // Медицинский академический журнал. 2007. Т.7, №4. С.52-58.
6. Байрамов А.А., Прошин С.Н., Гаврилов Н.А. и др. Нейрохимические эффекты пренатального введения холинергических средств на постнатальное развитие моноаминергической системы головного мозга // Медицинский академический журнал. 2010. Т.10, №1. С.31-40.
7. Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // Brain Res Bull. 2001. Vol.56. P.413-424.
8. Slotkin T.A., Tate C.A., Cousins M.M., Seidler F.J. Functional alterations in CNS catecholamine systems in adolescence and adulthood after neonatal chlorpyrifos exposure // Dev. Brain Res. 2002. Vol.133. P.163-173.
9. Dunnett S.B. Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats // Psychopharmacology. 1985. Vol.87, №3. P.357-363.
10. Slotkin T.A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxins: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2004. Vol.198. P.132-151.

11. Slotkin T.A. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? // *J. Pharm. Exp. Therapy*. 1998. Vol.285. P.931-945.
12. Slotkin T.A. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? // *Neurotoxicol Teratol*. 2008. Vol.30, №1. P.1-19.
13. Буреш Л., Бурешова О., Хьюстон Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа, 1991. 399 с.
14. Байрамов А.А. Холинергические механизмы в нервной и эндокринной регуляции половой функции // *Психонейро-эндокринология* / под ред. П.Д.Шабанова и Н.С.Сапронова. СПб.: Информ-Навигатор. 2010. С.305-360.
15. Bairamov A.A., G.Yu.Yukina, A.Yu.Babenko et al. Development of Male Sexual Function after Prenatal Modulation of Cholinergic System // *Sexual Dysfunctions. Special Issues*. EU, Croatia: InTech, 2011. 250 p.
16. Bairamov.A.A., Poletaeva A.O., Proshin S. N. et al. Sexual Function in Adult Male Rats after Prenatal Modulation of the Cholinergic System // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2009. Vol.39, №5. P.463-470.
17. Байрамов А.А., Поletaева А.О., Юкина Г.Ю., Богданова Л.А. Отдаленные нейрхимические эффекты пренатального воздействия селективных М- и Н-холинолитиков // *Российский биомед. журнал*. 2008. Т.9. С.90-100.
18. Сапронов Н.С., Байрамов А.А. Холинергические механизмы регуляции мужской половой функции. СПб.: Арт-Экспресс, 2013. 272 с.
7. Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull.*, 2001, vol. 56, pp. 413-424.
8. Slotkin T.A., Tate C.A., Cousins M.M., Seidler F.J. Functional alterations in CNS catecholamine systems in adolescence and adulthood after neonatal chlorpyrifos exposure. *Dev. Brain Res.*, 2002, vol.133, pp.163-173.
9. Dunnett S.B. Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats. *Psychopharmacology*, 1985, vol.87, no.3, pp.357-363.
10. Slotkin T.A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, vol.198, pp.132-151.
11. Slotkin T.A. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J. Pharm. Exp. Therapy*, 1998, vol.285, pp. 931-945.
12. Slotkin T.A. If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicol Teratol.*, 2008, vol. 30, no.1, pp.1-19.
13. Bures J., Buresova O., Huston J. *Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1976. (Rus. edition: Buresh L., Bureshova O., Kh'yuston Dzh. *Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya*. Moscow, Mir Publ., 1991, 399 p.).
14. Bayramov A.A. Kholinergicheskie mekhanizmy v nervnoy i endokrinnoy regulatsii polovoy funktsii [Cholinergic mechanisms in nervous and endocrine regulation of sexual function]. In: *Psikhoneyroendokrinologiya*. Saint Petersburg, 2010, Inform-Navigator Publ., pp.305-360.
15. Bairamov A.A., Yukina G.Yu., Babenko A.Yu. et al. Development of Male Sexual Function after Prenatal Modulation of Cholinergic System, pp.93-117. In: *Sexual Dysfunctions — Special Issues*. — EU, Croatia, InTech Publ., 2011, 250 p.
16. Bairamov.A.A., Poletaeva A.O., Proshin S. N. et al. Sexual Function in Adult Male Rats after Prenatal Modulation of the Cholinergic System. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2009, vol. 39, no.5, pp. 463-470.
17. Bayramov A.A., Poletaeva A.O., Yukina G.Yu. et al. Otdalennye neyrokhimicheskie efekty prenatal'nogo vozdeystviya selektivnykh M- i N-kholinolitikov [Long-term neurochemical effects of prenatal exposure to selective M- and H-anticholinergics]. *Russian Biomed. Journal*, 2008, vol.9, pp.90-100.
18. Sapronov N.S., Bayramov A.A. Kholinergicheskie mekhanizmy regulatsii muzhskoy polovoy funktsii [Cholinergic mechanisms of regulation of male sexual function]. Saint Petersburg, Art-Ekspress Publ., 2013, 272 p.

References

1. Bayramov A.A., Novikova E.N., Proshin S.N. Vliyanie prenatal'nogo stressa na polovoe povedenie [Influence of prenatal stress on sexual behaviour]. *Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations*, 2008, no. 2, pp.53-61..
2. Torkunova O.V., Bayramov A.A., Shabanov P.D. Kholinergicheskaya modulyatsiya i neyrokhimicheskie aspekty vrozhdennogo povedeniya krysa pri deystvii nizkochastotnykh akusticheskikh kolebaniy [Cholinergic modulation and neurochemical aspects of innate behavior of rats under the action of low-frequency acoustic vibrations]. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*, 2015, vol.13, no.1, pp.32-40.
3. Beer A., Slotkin T.A., Seidler F.J. Nicotine Therapy in Adulthood Reverses the Synaptic and Behavioral Deficits Elicited by Prenatal Exposure to Phenobarbital. *Neuropsychopharmacology*, 2005, vol. 30, pp.156-165.
4. Levin E.D., Simon B.B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, 1998, vol.138, pp. 217-230.
5. Bayramov A.A. Sapronov N.S. Vliyanie M- i N-kholinolitikov na prenatal'noe razvitie monoaminergicheskoy sistemy golovno mozga [Influence of M- and H-anticholinergics on prenatal development of the monoaminergic system of the brain]. *Medical Academic Journal*, 2007, vol.7, no. 4, pp.52-58.
6. Bayramov A.A., Proshin S.N., Gavrilov N.A. et al. Neyrokhimicheskie efekty prenatal'nogo vvedeniya