

Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

## Вплив агоніста та антагоніста $\alpha 4\beta 2$ субодиниць Н-холінорецепторів на відтворення умовного рефлексу самиць щурів у різні фази естрального циклу

*Вивчали ефекти хронічного введення (14 діб) агоніста  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів RJR-2403 і антагоніста мекаміламіну (1,0 мг/кг, внутрішньоочередово) на умовно-рефлекторну діяльність з використанням моделей просторового та непросторового навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу. Процеси непросторового навчання оцінювали за допомогою умовної реакції пасивного уникнення, просторового – у водному тесті Морріса. Встановлено, що на тлі введення RJR-2403 поліпшувалося вироблення реакції пасивного уникнення у самиць у фазах проеструсу й еструсу порівняно з контрольними щурами. Застосування RJR-2403 подібним чином відновлювало здатність самиць до просторового навчання у фазу проеструсу та стимулювало його динаміку у фазу еструсу у водному тесті. Навпаки, хронічне введення мекаміламіну порушувало процеси непросторового і, особливо, просторового навчання незалежно від фаз статевого циклу. Результати цього дослідження свідчать про позитивний вплив стимуляції  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів на умовно-рефлекторне навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу.*

*Ключові слова: RJR-2403, мекаміламін,  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів, навчання, статевий цикл, самиці щурів.*

### ВСТУП

Н-холінорецептори являють собою лігандактивуючі рецептори з пентаметричною структурою, що складаються з  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць. Існування 9 типів  $\alpha$ -субодиниць і 3 типів  $\beta$ -субодиниць вказує на високу структурну та функціональну гетерогенність Н-холінорецепторів [1]. Встановлено, що  $\alpha 4\beta 2$  субодиниці Н-холінорецепторів експресуються в центральній нервовій системі [6]. Доведено, що вони розташовані переважно пресинаптично, та їх активація призводить до вивільнення різних нейромедіаторів [2]. Показано, що Н-холінорецептори залучені до механізмів навчання, пам'яті, тривожності, депресії, збудження, наркоманії [3, 4].

З іншого боку, численні клінічні та експериментальні дослідження вказують на існування функціонального взаємозв'язку вмісту ендогенних естрогенів, характеру когнітивних

© Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

функцій мозку та участю Н-холінореактивних структур головного мозку [5–8]. Вважають, що порушення в холінергічній системі при змінах вмісту ендогенних естрогенів насамперед зумовлюють розвиток цілої низки нейродегенеративних і мнестичних розладів [9]. Однак у літературі мало даних про вплив холінотропних речовин на умовно-рефлекторну діяльність у самиць щурів при дисбалансі естрогенів в організмі. Слід також зазначити, що більшість досліджень виконані на самицях після оваріоектомії в умовах змодельованого дефіциту естрогенів, і лише незначна кількість – на інтактних самицях з вільним циклом [7]. Крім того, немає відомостей про порівняльний фармакологічний аналіз дії агоністів і антагоністів різних типів Н-холінорецепторів на поведінковий статус самиць з різним вмістом ендогенних естрогенів в організмі.

Мета нашої роботи полягала в порівняльному аналізі участі  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холі-

норецепторів в умовно-рефлекторній діяльності дорослих самиць щурів при природній циклічній зміні вмісту статевих гормонів.

## МЕТОДИКА

Робота виконана в умовах хронічного експерименту на 270 білих безпорідних статевозрілих самицях щурів віком 4–5 міс, масою 190–220 г, отриманих з розплідника «Рапполово» РАМН. Тварин утримували у віварії в умовах 24-годинного фоторежиму (12 год день/12 год ніч, включення світла о 7:00), контрольованої температури ( $22 \pm 2$  °C) і вологості ( $65 \pm 10$  %) повітря при вільному доступі до води та стандартному раціоні (гранульований комбікорм). Для утримання тварин використовували пластмасові клітки ( $47 \times 35 \times 17$  см) з дротяною металевою кришкою та підстилкою з тирси.

Усі тварини були привчені до рук експериментатора до початку проведення поведінкових тестів, які здійснювали в ранкові години (10:00–13:00). Дослідження виконані згідно з «Міжнародними рекомендаціями щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин» (1985).

Використано агоніст  $\alpha 4\beta 2$  субодиноць Н-холінорецепторів RJR-2403 й антагоніст  $N\alpha 7$ -холінорецепторів мекаміламін («Sigma», США). Речовини розводили у фізіологічному розчині і вводили в дозі 0,1 мг/кг, внутрішньочеревино протягом 14 діб до початку поведінкових тестів і далі протягом усього періоду навчання та тестування під час виконання всіх досліджень. Щури контрольних груп отримували еквалентну об'єму кількість розчинника.

Для виконання кожної поведінкової методики щурів у фазі дієструсу, еструсу та проєструсу відповідно, розділяли на групи по 10 особин у кожній. Самиці 1-ї, 2-ї та 3-ї груп отримували фізіологічний розчин (контроль); 4-ї, 5-ї та 6-ї – RJR-2403; 7-ї, 8-ї та 9-ї – мекаміламін.

Для визначення фази статевого циклу протягом 7 послідовних діб до початку досліджен-

ня у щурів брали вагінальні мазки. В експерименти відбирали самиць, у яких спостерігали стабільний 4-добовий естральний цикл. Потім формували групи з однаковими фазами статевого циклу, які визначали за характерними морфологічними ознаками за мазками [10]. Протягом усього експериментального періоду і під час поведінкових серій проводили постійний моніторинг фаз статевого циклу.

Навчання проводили на моделях просторового і просторового навчання – умовної реакції (УР) пасивного уникнення водного тесту Морріса відповідно.

УР пасивного уникнення виробляли на основі одноразового електрошкірного підкріплення в установці, що складається з двох камер – великої (освітленої) і малої (темної) з електрифікованою підлогою, сполучених між собою круглим отвором [11]. При навчанні щура поміщали на 3 хв всередину освітленої камери хвостом до отвору в темну. Тварина досліджувала камеру, знаходила отвір в темну камеру та проникала в неї. Реєстрували латентний період (ЛП) першого потраплення і число заходів тварини в темну камеру. Через 15 с на ґратчасту підлогу камери подавали змінний струм (частота 50 Гц, тривалість 2–3 с, імпульсна активність 10 мс), розмір якого для кожної тварини підбирали індивідуально за вокалізацією. Отвір між камерами залишався відкритим. За щуром, що перебіг в освітлену камеру, спостерігали протягом 3 хв. Якщо протягом цього часу тварина не намагалася повернутися в темне приміщення, УР пасивного уникнення вважали виробленою з однієї спроби. Відтворення УР визначали через 24 год. Для цього щура поміщали в установку на 3 хв. Реєстрували ті самі показники, що й при навчанні. Збільшення ЛП заходження тварини в темну камеру або якщо вона не заходила зовсім розцінювали як відтворення УР пасивного уникнення, а вкорочення часу перебування в освітленій камері як амнезію навички.

Для виявлення здатності тварин до просторової орієнтації використовували водний

тест [12]. Басейн діаметром 130 і висотою 50 см заповнювали водою (глибина 35 см). Температуру води підтримували на рівні  $20 \pm 3$  °С. На периферії басейну в 15 см від борту знаходилася прозора платформа діаметром 10 см, прихована під водою на глибині 1 см. Воду в басейні затемнювали за допомогою спеціальної рідини. Протягом 7 днів тварин навчали пошуку цієї платформи. Розташування платформи щодня змінювали. Ділянку, в якій установлювали платформу, вибирали довільно. На 8-му добу (через 24 год після останнього сеансу навчання) платформу поміщали в центр басейну. Тварину опускали у воду на одне і те саме місце. В день експерименту тварині надавали дві спроби – тренувальна та експериментальна, інтервал між якими становив 60 с. Положення платформи для обох спроб було однаковим. Контрольний час перебування тварини в басейні – 3 хв для кожної спроби. Якщо тварина не знаходила платформу за відведений відрізок часу, її ставив на платформу експериментатор, а значення ЛП вважали рівним 180 с. Протягом 3 хв реєстрували час виявлення платформи протягом обох спроб.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням дисперсійного аналізу two-way ANOVA-test з

наступним post-hoc-тестом Ньюмана–Келсі за допомогою пакета програм SPSS 9.0. Відмінності між значеннями при  $P < 0,05$  вважали статистично значущими.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведені результати, двофакторний дисперсійний аналіз яких виявив ефекти дії препарату ( $F(3,90)=4,17$ ,  $P < 0,05$ ) і гормонального фактора (фаза статевого циклу) ( $F(3,90)=3,32$ ,  $P < 0,05$ ), а також взаємодії цих факторів ( $F(3,90)=5,87$ ,  $P < 0,001$ ) на відтворення УР пасивного уникнення. Post-hoc-аналіз також виявив відмінності між контрольними й експериментальними групами при аналізі результатів тесту УР пасивного уникнення ( $P < 0,05$ ).

У самиць контрольної групи тільки у фазу дієструсу зазначалося відтворення УР пасивного уникнення, тоді як в інших фазах статевого циклу спостерігалася його амнезія. Хронічне введення мекаміламіну (блокування  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів) у фазах проєструсу й еструсу повністю порушувало здатність до відтворення УР пасивного уникнення, що виражалось в зниженні ЛП заходження тварини в темний відсік через 24 год після навчання. Однак на тлі хронічного

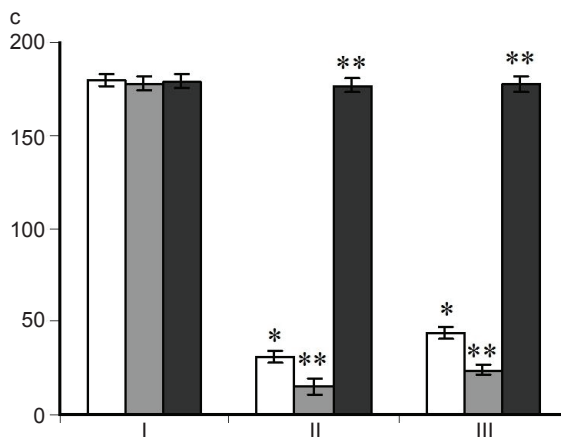


Рис. 1. Вплив хронічного введення агоніста  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів RJR-2403 і мекаміламіну на формування і відтворення умовної реакції пасивного уникнення у самиць щурів. За віссю абсцис – фази оваріального циклу: I – дієструс, II – проєструс, III – еструс. За віссю ординат – латентний період заходження тварин в темну камеру через 24 год. 1 – контроль, 2 – введення мекаміламіну, 3 – введення RJR-2403. \* $P < 0,05$  порівняно з самицями у фазі дієструсу; \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контрольними самицями у відповідних фазах статевого циклу

введення RJR-2403 (стимуляція  $\alpha 4\beta 2$  Н-холінорецепторів) в тих самих фазах статевого циклу ЛП заходження в темний відсік збільшувався ( $P < 0,05$ ), що свідчить про антиамнестичні ефекти RJR-2403 на процес відтворення УР пасивного уникнення (див. рис. 1).

Двофакторний дисперсійний аналіз результатів, отриманих у водному тесті при тренувальній та експериментальній серіях, дав змогу встановити ефекти препарату ( $F(3,90)=8,30, P < 0,05$ ), ( $F(3,90)=5,390, P < 0,05$ ) і гормонального фактора (фаза статевого циклу) ( $F(3,90)=2,40, P < 0,05$ ), ( $F(3,90)=2,41, P < 0,05$ ), а також взаємодії цих факторів ( $F(3,90)=5,37, P < 0,005$ ), ( $F(3,90)=2,88, P < 0,05$ ). Post-hoc-аналіз продемонстрував

відмінності між контрольними й експериментальними групами ( $P < 0,05$ ).

Встановлено, що у самиць у фазу проєструсу протягом перших 7 днів навчання значення ЛП знаходження прихованої платформи були вищі (рис. 2,  $P < 0,05$ ) порівняно з такими самими показниками у щурів у фазу дієструсу. На 8-му добу експерименту у групи щурів у фазу проєструсу ЛП знаходження прихованої платформи як при тренувальній, так і при експериментальній спробі були вищі ( $P < 0,05$ ) порівняно з показниками у щурів у фазу дієструсу. Слід зазначити, що пошук платформи у щурів у фазу проєструсу при тренувальних спробах характеризувався стереотипністю з явним переважанням рухів

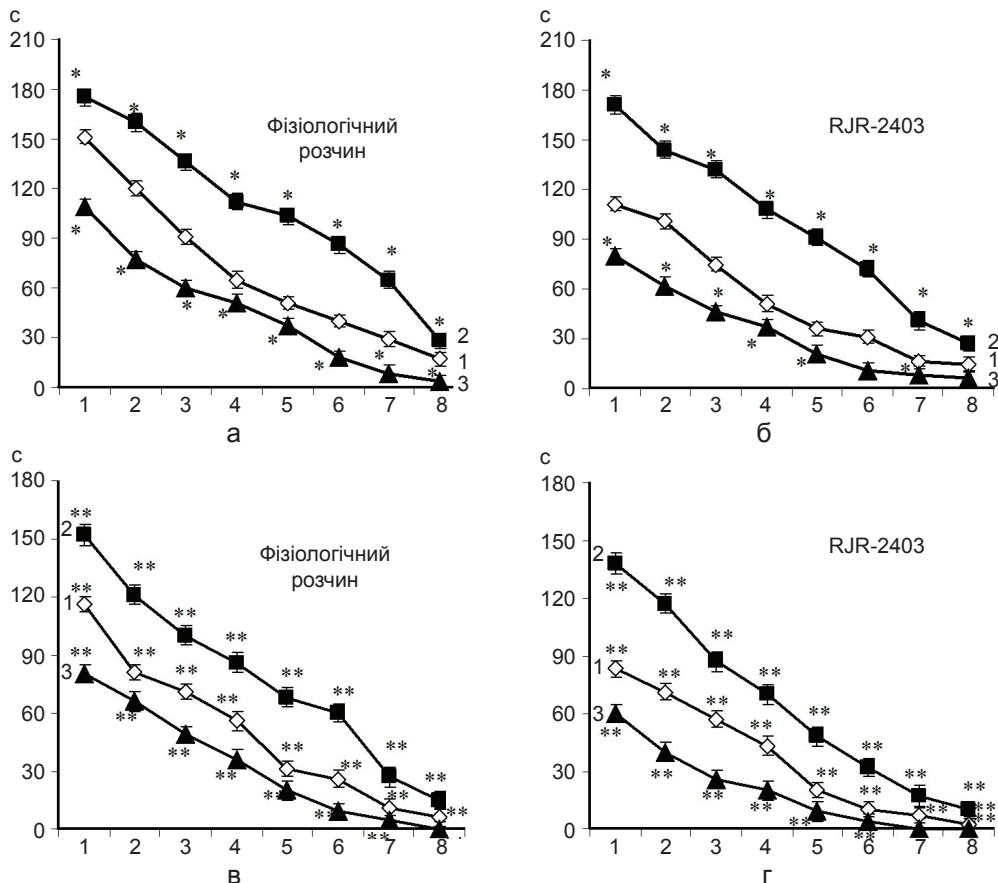


Рис. 2. Вплив агоніста  $\alpha 4\beta 2$  субодиноць Н-холінорецепторів RJR-2403 на просторове навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу. За віссю абсцис – дні експерименту: 1 – дієструс, 2 – проєструс, 3 – еструс; а, б – тренувальна спроба, в, г – експериментальна спроба. За віссю ординат – латентний період заходження твариною прихованої платформи (с). \* $P < 0,05$  порівняно з самицями у фазі дієструсу; \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контрольними самицями у відповідних фазах статевого циклу

вздовж борту басейну та наявністю «човникових» рухів. Подовження часу пошуку платформи при експериментальній спробі часто визначалося спочатку неправильним вибором напрямку руху. Водночас у самиць у фазу еструсу спостерігалось прискорення в динаміці знаходження прихованої платформи порівняно зі щурами у фазу діеструсу. На 8-му добу тестування при переміщенні прихованої платформи з периферії басейну в його центр у щурів контрольної групи у фазу еструсу ЛП знаходження прихованої платформи при тренувальній і експериментальній спробах були менші ( $P < 0,05$ ) порівняно з показниками контрольних щурів у фазу діеструсу.

На тлі хронічного застосування RJR-2403 відновлювалася здатність самиць до просторо-

рового навчання у фазу проеструсу та прискорювався процес просторового навчання у водному тесті у фазу еструсу. При блокаді  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів (введення метамізилу) незалежно від фази статевого циклу істотно пригнічувалася здатність самиць до просторового навчання (рис. 3).

Результати цього дослідження свідчать про неоднозначний вплив блокади або стимуляції  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів на просторове та непросторове навчання в умовах природної циклічної зміни вмісту естрогенів у самиць щурів. Показано, що при низькому вмісті ендогенних естрогенів у фазу еструсу порушується відтворення УР пасивного уникнення, тоді як на моделі просторового навчання в цю саму фазу статевого

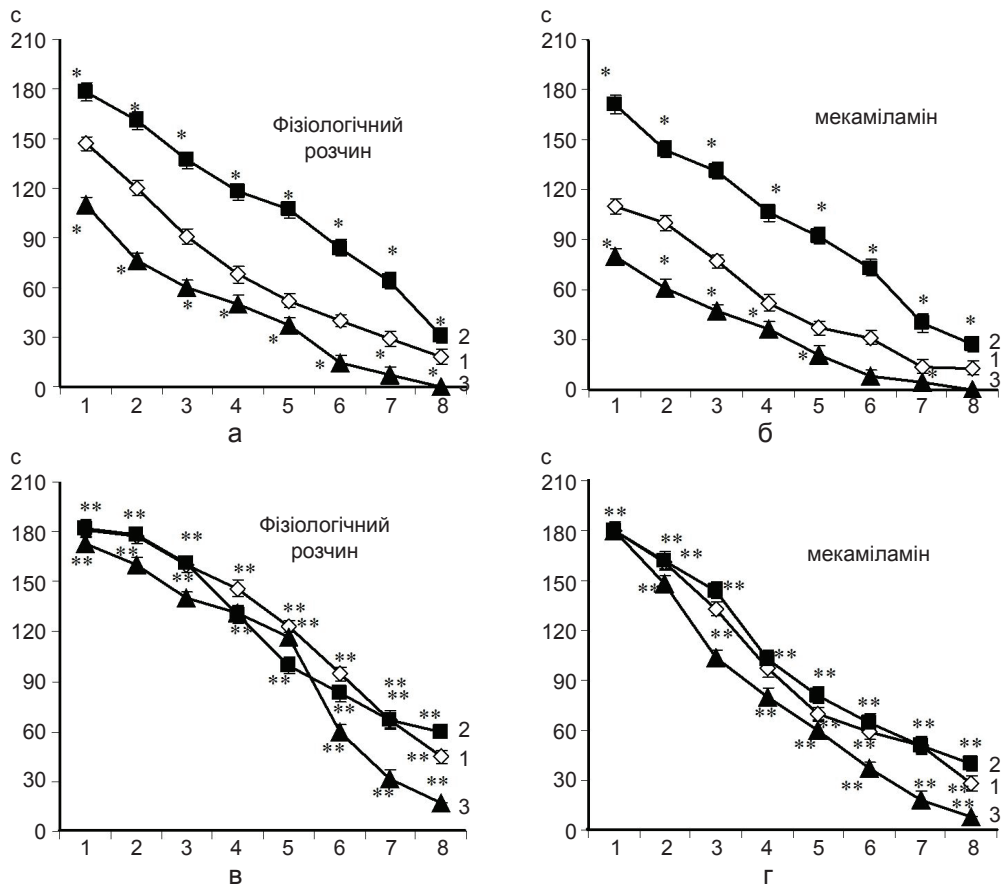


Рис. 3. Вплив мекаміламіну на просторове навчання у самиць щурів у різні фази статевого циклу. За віссю абсцис – дні експерименту: 1 – діеструс, 2 – проеструс, 3 – еструс; а, б – тренувальна спроба, в, г – експериментальна спроба. За віссю ординат – латентний період заходження твариною прихованої платформи (с). \* $P < 0,05$  порівняно з самицями у фазі діеструсу; \*\*  $P < 0,05$  порівняно з контрольними самицями у відповідних фазах статевого циклу



циклу формування і відтворення УР пошуку прихованої платформи поліпшується. З іншого боку, при високому вмісті ендogenous естрогенів у фазу проєструсу однонаправлено порушується як непросторове, так і просторове навчання. Можна говорити про те, що фізіологічні коливання вмісту естрогенів протягом оваріального циклу істотно впливають на динаміку та здатність до навчання і відтворення отриманої інформації, однак вектор спрямованості таких змін визначається не тільки вмістом естрогенів, а й застосовуваною методикою навчання (моделі просторового або непросторового навчання). Отримані результати добре узгоджуються з даними літератури про погіршення здатності самиць щурів при високому рівні ендogenous естрогенів до вироблення умовних рефлексів протягом оваріального циклу [8, 13–15].

Модель УР пасивного уникнення вперше показала, що хронічне введення RJR-2403 відновлювало відтворення цієї реакції у самиць у ключові фази статевих циклу, тобто стимуляція центральних  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів усуває розбіжності у виробленні рефлексу, пов'язані з природним гормональним статусом самиць. Навпаки, хронічне введення самицям мекаміламіну порушувало відтворення УР пасивного уникнення у фази проєструсу й еструсу. Отже, блокада  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів нівелює відмінності в здатності щурів до непросторового навчання протягом ключових фаз статевих циклу.

Модель просторового навчання у водному тесті вперше виявила виражений пригнічувальний ефект мекаміламіну на просторове навчання та здатність тварини до пошуку прихованої платформи в фазі проєструсу й еструсу. Разом з тим при стимуляції  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів на тлі застосування RJR-2403 відновлювалася здатність самиць до просторового навчання у фазу проєструсу та прискорювалося просторове навчання у водному тесті у фазу еструсу.

Результати тесту на просторове та непро-

сторове навчання вказують на те, що центральні  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів впливають на ці процеси на нейрохімічному рівні протягом статевих циклу.

Таким чином, результати дослідження свідчать про істотну роль  $\alpha 4\beta 2$  субодиниць Н-холінорецепторів у когнітивних процесах у самиць щурів в різні фази статевих циклу. Воно вказує на вплив холінергічної системи в умовно-рефлекторній діяльності при природних коливаннях вмісту статевих гормонів в організмі та сприяє кращому розумінню комплексної їх взаємодії з центральною холінергічною системою мозку. Отже, варто продовжувати вивчення ефектів Н-холінотропних речовин як засобів для фармакокорекції порушень вищих функцій мозку протягом статевих циклу.

## ВИСНОВКИ

1. Хронічне введення RJR-2403 повністю коригує відтворення рефлексу пасивного уникнення у самиць щурів при низькому і високому вмісті ендogenous естрогенів в організмі, відновлює здатність самиць до просторового навчання при високому вмісті естрогенів і стимулює просторове навчання при низькому їх вмісті.

2. Хронічне введення мекаміламіну порушує непросторове і, особливо, просторове навчання у самиць у ключові фази статевих циклу.

Ю.О. Федотова, Г.О. Фролова

## ЭФФЕКТЫ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА $\alpha 4\beta 2$ СУБЪЕДИНИЦ Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА САМОК КРЫС В РАЗНЫЕ ФАЗЫ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

Изучали эффекты хронического введения (14 сут) агониста холинорецепторов RJR-2403 и антагониста  $\alpha 4\beta 2$  субъединиц Н-холинорецепторов мекамилана (1,0 мг/кг, внутривбрюшинно) на условно-рефлекторную деятельность с использованием моделей пространственного и непространственного обучения у самок крыс в различные фазы полового цикла. Процессы непространственно-

го обучения оценивали с помощью условной реакции пассивного избегания, пространственного обучения – в водном тесте Морриса. Установлено, что на фоне введения RJR-2403 улучшалась выработка реакции пассивного избегания у самок в фазах проэструса и эструса по сравнению с контрольными крысами. Применение RJR-2403 сходным образом восстанавливало способность самок к пространственному обучению в фазу проэструса и стимулировало динамику пространственного обучения в фазу эструса в водном тесте. Напротив, хроническое введение мекамилamina нарушало процессы непространственного и, особенно, пространственного обучения независимо от фаз полового цикла. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о позитивном эффекте стимуляции  $\alpha 4\beta 2$  субъединиц Н-холінорецепторов на условно-рефлекторное обучение у самок крыс в различные фазы полового цикла. Ключевые слова: RJR-2403, мекамиламин,  $\alpha 4\beta 2$  субъединицы Н-холінорецепторов, обучение, половой цикл, самки крыс.

**Yu.O. Fedotova, G.O. Frolova**

### **THE INFLUENCE OF STIMULATION AND BLOCKADE OF $\alpha 4\beta 2$ NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS ON LEARNING OF FEMALE RATS IN KEY PHASES OF OVARY CYCLE**

The present work was devoted to the comparative analysis of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in learning/memory processes during ovary cycle assessed in adult female rats. RJR-2403 (1.0 mg/kg, i.p.),  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs agonist and mecamylamine (1.0 mg/kg, i.p.),  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs antagonist were injected chronically during 14 days. The processes of learning/memory were assessed in different models of learning: passive avoidance performance and Morris water maze. Chronic RJR-2403 administration to female rats improved the passive avoidance performance in proestrous and estrous as compared to the control animals. Also, RJR-2403 restored spatial learning during proestrous phases in Morris water maze, and stimulated the dynamics of spatial learning during estrous phases. On the contrary, chronic mecamylamine administration impaired non-spatial, and especially, spatial learning in females during key phases of ovary cycle. The results of the study suggest positive effect of  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs stimulation in learning/memory processes during ovary cycle in the adult female rats. Key words: RJR-2403, mecamylamine,  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs, learning, ovary cycle, female rats.

*Pavlov Institute of Physiology RAS, Snt Petersburg, Russia;  
Donetsk Natіonal University*

*Ін-т фізіології ім. І.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;  
Донецьк. нац. ун-т  
E-mail: gljukkk@ukr.net*

### **REFERENCES**

1. Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci.* 1997; 2: 259-266.
2. Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem.* 2005; 48: 4705- 4745.
3. Hogg RC, Ragenbass M, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003; 147: 1-46.
4. Picciotto MR. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted. *U Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 493-499.
5. Dumas J, Hancur-Bucci C, Naylor M, Sites C, Newhouse P. Estrogen treatment effects on anticholinergic-induced cognitive dysfunction in normal postmenopausal women. *Neuropsychopharmacol.* 2006; 31: 2065-2078.
6. Norbury R, Travis MJ, Erlandsson K, Waddington W, Ell PJ, Murphy DG. Estrogen therapy and brain muscarinic receptor density in healthy females: a SPET study. *Horm Behav.* 2007; 51: 249-257.
7. Pompili A, Tomaz C, Arnone B, Tavares MC, Gasbarri A. Working and reference memory across the estrous cycle of rat: a long term study in gonadally intact females. *Behav Brain Res.* 2010; 213: 10-18.
8. Pompili A, Benedetto AA., Gasbarri A. Estrogens and memory in physiological and neuropathological conditions. *Psychoneuroendocrinol.* 2012; 37: 1379-1396.
9. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2006; 16: 710-715.
10. Kirshenblat YaD. Workshop on Endocrinology. Moscow; 1969.
11. Bures J, Buresova O, Huston J. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. Moscow; 1991.
12. Ponomarev DB, Vinogradova EP. Comparative analysis of the learning ability in Morris water test in rats with the various rate of active acquisition of the avoidance conditioned reflex. *IP Pavlov J Higher Nervous Activity.* 2000; 50 (6): 974-981.
13. Daniel JM, Fader, Spencer AJ, Dohanich AL. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav.* 1997; 32: P.217-225.
14. Warren SG, Juraska JM. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosci.* 1997; 2: 259-266.
15. Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA., Wolfe BB, Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol.* 1992; 41: 31-37.

*Матеріал надійшов  
до редакції 20.12.2013*