

© Коллектив авторов, 2016
УДК 611.81.018:615.28:599.323.4

Г. А. Пьявченко^{1,2}, В. А. Пугач³, Н. С. Новикова³, Л. И. Шмаркова⁴, Е. А. Корнева³,
В. И. Ноздрин^{1,2}

СОДЕРЖАНИЕ c-Fos-ПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ В КОРЕ И ПОЛОСАТОМ ТЕЛЕ БОЛЬШОГО МОЗГА И ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ КРЫС ПРИ НАКОЖНОМ НАНЕСЕНИИ ПАСТЫ С АНТИСЕПТИКОМ-СТИМУЛЯТОРОМ ДОРОГОВА

¹ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. В. И. Ноздрин), Медицинский институт, Орловский государственный университет им. И. С. Тургенева; ² научный отдел (руков. — канд. биол. наук Г. В. Трунова), Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», Москва; ³ отдел общей патологии и патофизиологии (зав. — д-р биол. наук О. В. Шамова), ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; ⁴ кафедра математики, информатики и информационных технологий (зав. — проф. Л. И. Малявкина), Орловский государственный университет экономики и торговли

Исследование проведено на крысах-самцах линии Спрег-Дуули, которые были разделены на 3 группы (по 6 животных в каждой). 1-ю группу составили интактные животные; 2-ю группу — животные, получавшие основу препарата — цинковую пасту; 3-ю группу — третью фракцию антисептика-стимулятора Дорогова (АСД-3), которым смазывали кожу спины. Выявление c-Fos-позитивных нейронов в различных участках головного мозга и изучение поведенческих реакций показали активацию нейронов цингулярной, моторной, пириформной коры большого мозга и полосатого тела, увеличение двигательной и ультразвуковой активности, а также продемонстрировали корреляционную зависимость поведенческих реакций от активации нейронов в изучаемых зонах мозга. Результаты свидетельствуют о совместной регуляции поведения многими структурами мозга и о наличии у АСД-3 нейротропных свойств.

Ключевые слова: цингулярная, моторная, пириформная кора, полосатое тело, антисептик-стимулятор Дорогова, c-Fos, поведенческие реакции

Упоминания об антисептике-стимуляторе (АСД) приходится на первую половину прошлого века, когда он был получен А. В. Дороговым путем глубокого термического разложения тканей животных. По результатам проведенных исследований на животных и человеке был описан широкий положительный фармакологический эффект, охватывающий в том числе заболевания кожи (экзема, нейродермит, псориаз, аллергодерматозы и др.). При этом отмечено общее стимулирующее действие на нервную систему [3]. Фармакологическая характеристика фракций препарата подтверждала возможность влияния АСД на нервную систему, указывая на мускарино-, никотино- и холиномиметический эффект нанесения препарата [1]. Морфологические проявления этого эффекта изучены не были. Известно, что

поведенческие акты регулируются взаимодействием многих структур мозга: цингулярная кора — ответственна за сложные поведенческие реакции и ультразвуковые вокализации, моторная — регулирует четкие, избирательные движения, лежащие в основе поведения, соматосенсорная — чувствительность от большинства рецепторов тела, инсулярная — ответственна за процесс принятия решений, эмоциональный контроль поведения и является центром регуляции зависимости от наркотических веществ, пириформная кора ответственна за эмоциональный контроль поведения и полосатое тело, которое участвует в регуляции сложных поведенческих актов, в работе внутренних органов [16, 21]. Для гистологической оценки степени активации нейронов мозга в настоящее время используют определение содержания белка

Сведения об авторах:

Пьявченко Геннадий Александрович (e-mail: gjvis1992@mail.ru), лаборатория функциональных методов исследования, Центр доклинических исследований, Ноздрин Владимир Иванович (e-mail: science@retinoids.ru), ЗАО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», 111123, Москва, ул. Плеханова, 2/46, стр. 5

Пугач Виктория Александровна (e-mail: glandula_pinealis@mail.ru), Новикова Наталья Сергеевна (e-mail: novikiem@gmail.com), Корнева Елена Андреевна (e-mail: korneva_helen@mail.ru), отдел общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 9а

Шмаркова Лариса Ивановна (e-mail: shmarkova_lara@mail.ru), кафедра математики, информатики и информационных технологий, Орловский государственный институт экономики и торговли, 302028, г. Орел, ул. Октябрьская, 12

c-Fos (маркер ранней нейральной активации) [8, 10, 11, 20].

Цель настоящего исследования — изучение морфологических изменений нейронов в коре большого мозга и полосатом теле у крыс после кожного нанесения цинковой пасты с 5% АСД-3 (третьей фракции АСД).

Материал и методы. Исследование проведено на крысах-самцах линии Спрег-Дуоли массой тела 100–120 г, полученных из питомника филиала ИБХ РАН «Пушино». Животных содержали в условиях вивария Центра доклинических исследований ЗАО «Ретиноиды». Основные правила содержания и ухода за крысами соответствовали правилам по устройству, оборудованию и содержанию вивариев [4]. Крысы находились в контролируемых условиях окружающей среды и получали полнораціонный гранулированный комбикорм и очищенную воду без ограничений. Перед исследованием животных переводили в отдельное помещение на период адаптации в течение 14 сут, после чего их разделяли на следующие группы (по 6 в каждой): 1-я группа — интактные животные; 2-я группа — животные, получавшие основу препарата (цинковая паста) и 3-я группа — сам АСД-3. Крысам 2-й и 3-й групп выбривали участок в межлопаточной области спины площадью 4 см² и наносили основу и препарат в дозе 2 г/кг 2 раза в сутки в течение 7 сут. Через 2 ч после последнего нанесения в течение 15 мин с использованием синхронизированного по времени комплекса Laboras-Sonotrack (Metris, Нидерланды) [6] проводили запись двигательной активности, ультразвуковых вокализаций и надпороговых криков. В дальнейшем животных наркотизировали препаратом «Золетил 100» (Virbac, Франция). После интракардиальной перфузии иммунофикса (Bio-Optica, Италия) головной мозг фиксировали в течение 1 ч и переносили в 15% раствор сахарозы на иммунофиксе. Срезы толщиной 20–40 мкм получали на замораживающем микротоме Thermo Scientific HM 430 (Microm GmBH, Германия) с устройством для быстрого замораживания KS 34, c-Fos-позитивные (активированные) клетки выявляли авидин-биотиновым методом с детекцией 3,3'-диаминобензидином (Santa Cruz, США).

Объектами исследования служили цингулярная, моторная, соматосенсорная, инсулярная, пириформная кора и полосатое тело (рис. 1), соответствующие 13–17 уровням срезов мозга по атласу [15]. Подсчёт c-Fos-позитивных нейронов проводили в 3 полях зрения для каждого животного (об. 40, ок. 20) при помощи программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss, Германия), используя микроскоп Axioskop 2 (Carl Zeiss, Германия). Статистический анализ значимости различий средних величин (t-критерий Стьюдента), а также анализ корреляционной зависимости поведенческих реакций от количества нейронов (коэффициент корреляции *r*) проводили с помощью программы Statistica 6.1 [7].

Результаты исследования. Экспрессия гена c-Fos у крыс 1-й группы была выявлена в фоновом количестве. У животных 2-й группы наблюдалось большее количество c-Fos-позитивных нейронов, в особенности — в моторной и соматосенсорной коре. У крыс, получавших АСД, наблюдалось резкое увеличение количества активированных нейронов во всех исследованных зонах (рис. 2), особенно в цингулярной, моторной, пириформной коре и стриатуме (рис. 3). Результаты анализа поведенческой активности крыс после применения АСД-3 демонстрировали увеличение продолжительности и скорости движения, пройденного расстояния, а также общего количества зарегистрированных поведенческих актов (табл. 1). Анализ показателей ультразвуковых вокализаций показал, что крысы, получавшие АСД-3, издавали ультразвуков больше и ниже — по частоте (см. табл. 1). Корреляционный анализ в группе животных, получавших АСД-3, выявил наличие значимой зависимости между числом c-Fos-позитивных нейронов и поведенческой активностью крыс (табл. 2).

Таблица 1

Поведенческая и ультразвуковая активность крыс ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные показатели	Группа животных		
	контрольная — интактные животные	животные, получавшие цинковую пасту — основу препарата	животные, получавшие антисептик-стимулятор Дорогова
Продолжительность двигательных актов, с	6,5±2,7	40,2±1,2*	74±10*.*#
Скорость движения, мм/с	0,40±0,20	2,9±0,4*	6,5±0,7*
Пройденное расстояние, м	0,30±0,20	2,6±0,3*	5,9±0,6*.*#
Общее количество поведенческих актов	155±34	130±15*	413±13*.*#
Количество криков	9±4	6,7±1,5	49±7*.*#
Количество надпороговых криков	0	1,7±0,7*	19±5*.*#
Частота криков, Гц	49364±47	49191±150	48512±78*.*#

* Различия значимы по сравнению с показателями в контрольной группе; # по сравнению с показателями у животных, получавших основу препарата при $P \leq 0,05$.

Примечание. Частота криков в данном случае — время записи криков животных за 5 мин.

Таблица 2

Коэффициент корреляции между количеством c-Fos-позитивных нейронов в зонах головного мозга и поведенческими реакциями крыс в условиях воздействия антисептика-стимулятора Дорогова

Зоны головного мозга	Параметры поведения	Коэффициент корреляции (r)
Моторная кора	Средняя скорость движения, мм/с	0,93
Полосатое тело		0,92
Пириформная кора		0,92
Цингулярная кора	Крики	0,94
	Средняя частота криков, Гц	-0,92
	Надпороговые крики	0,91

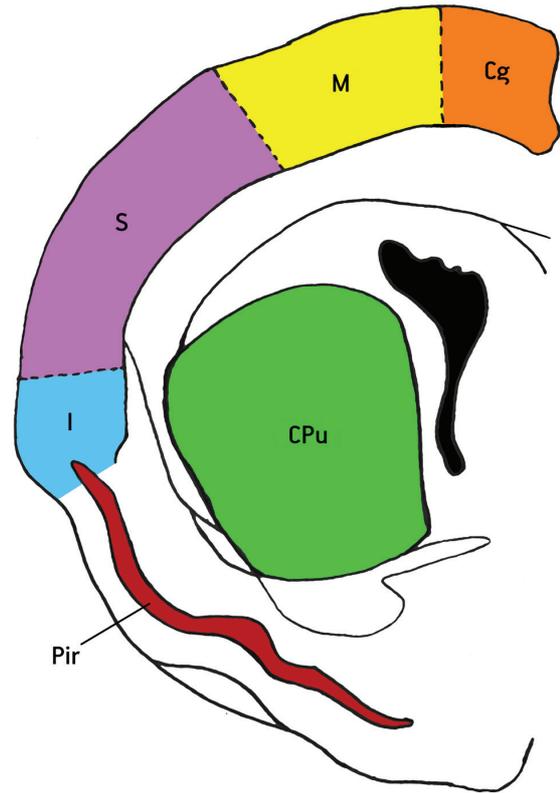


Рис. 1. Схема строения коры и стриатума правого полушария головного мозга крысы. Фронтальный срез на 13–17 уровнях.

Обозначения структур, в которых выявлены c-Fos-позитивные нейроны: цингулярная (cingularis) — Cg; моторная (motorius) — M; соматосенсорная (somatosensorius) — S; инсулярная (insularis) — I; пириформная кора (cortex piriformis) — Pir и стриатум (corpus striatum) — CPu. Рисунок Е.В.Сень

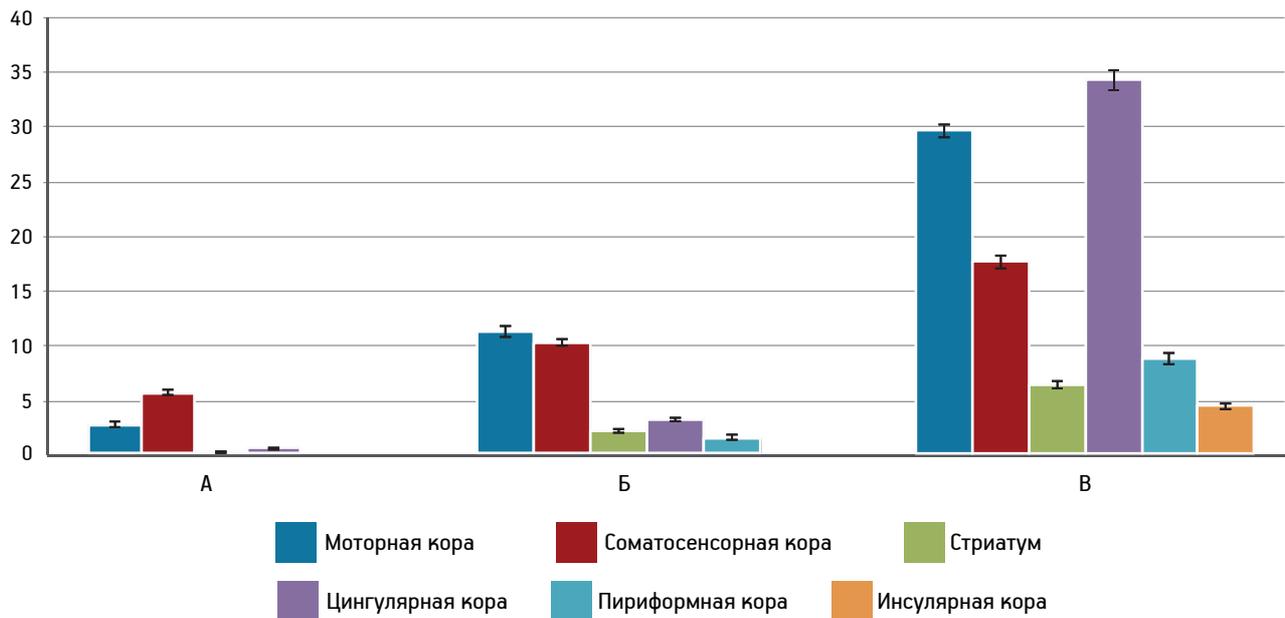


Рис. 2. Количество c-Fos-позитивных нейронов у крыс в коре большого мозга и полосатом теле.

По горизонтальной оси — группы крыс: А — интактные; Б — после нанесения цинковой пасты — основы препарата; В — после нанесения цинковой пасты с 5% антисептика-стимулятора Дорогова-3; по оси ординат — количество активированных нейронов в поле зрения. Вертикальные отрезки — значение стандартной ошибки

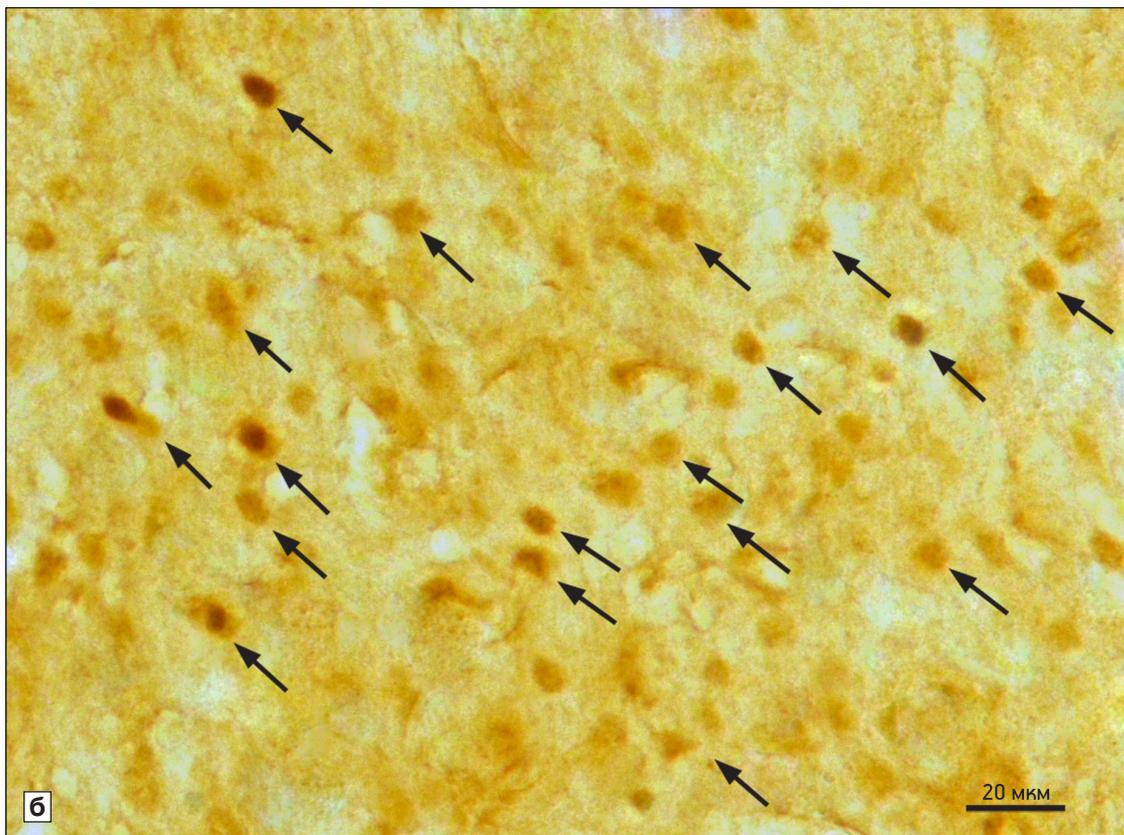
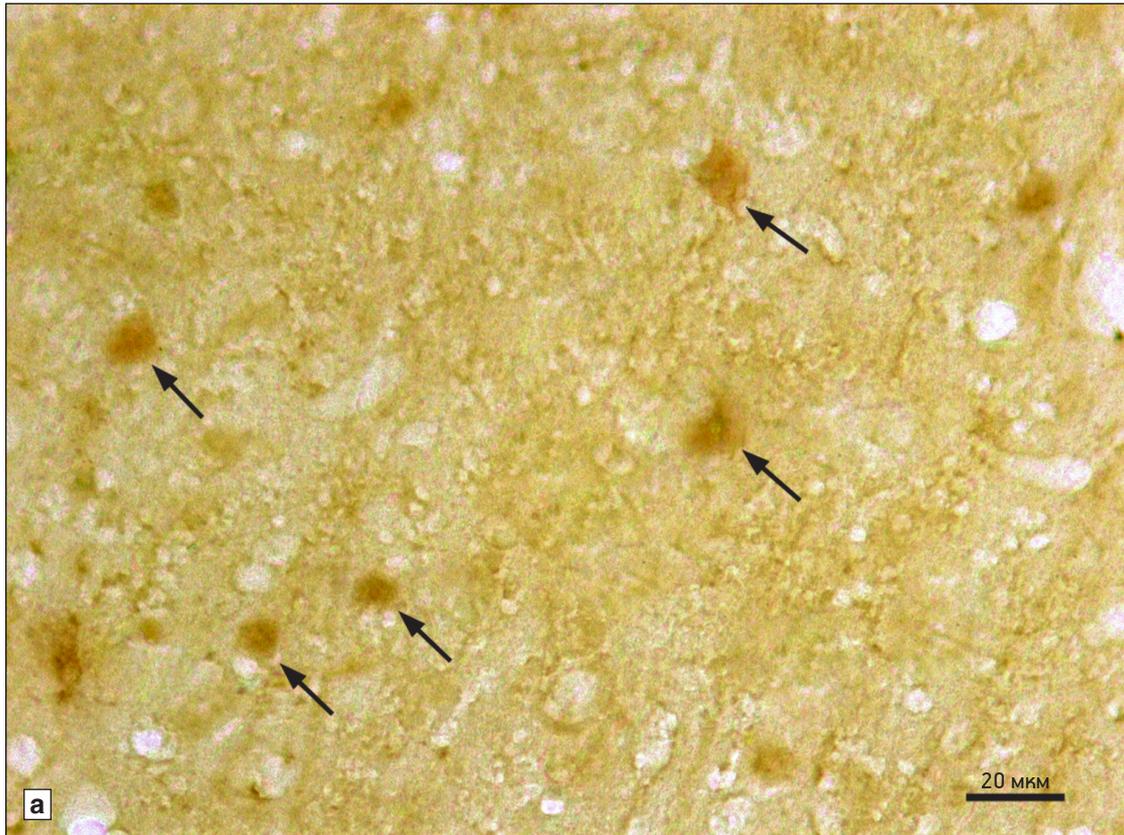


Рис. 3. Моторная (а, б) и пириформная (в, г) кора большого мозга крыс, получавших цинковую пасту с антисептиком-стимулятором Дорогова-3 (б, г) и только ее основу (а, в).

Стрелки — с-Fos-позитивные нейроны с разной интенсивностью окраски. Гистохимическая реакция на с-Fos. Об. 40, ок. 20

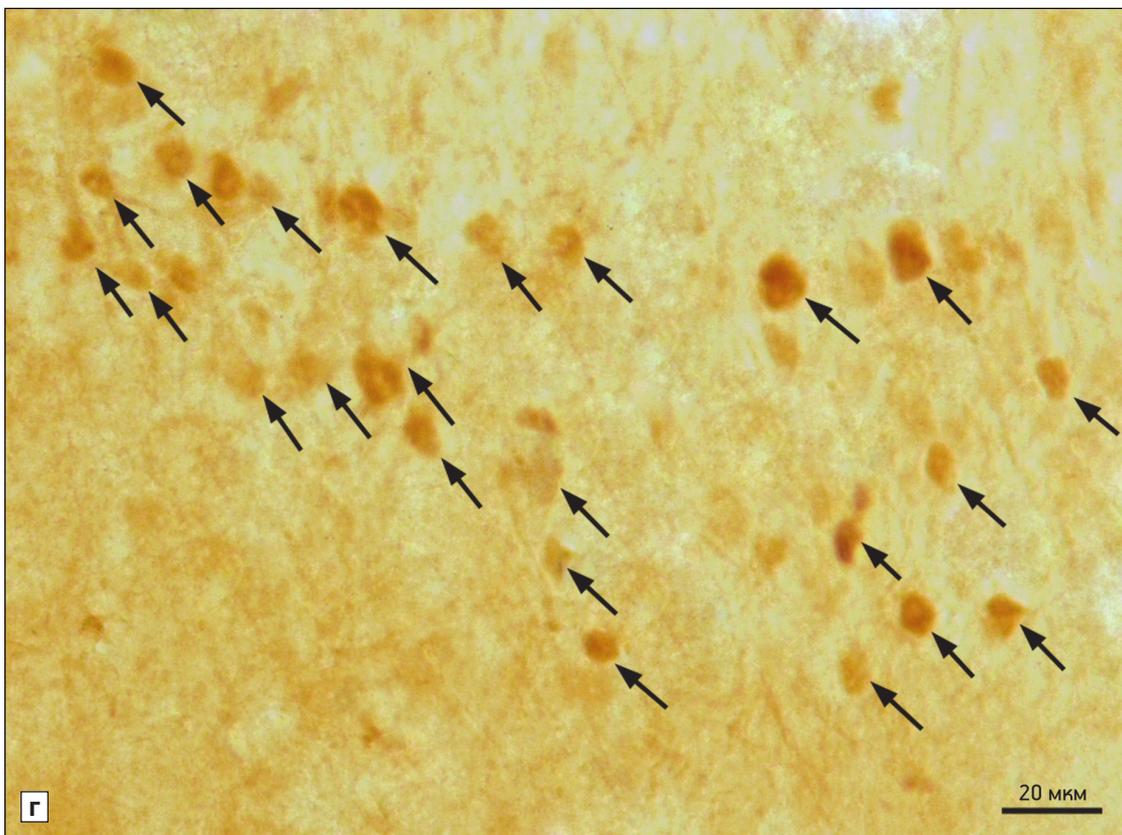


Рис. 3. Продолжение

тверждает многочисленные литературные данные о связях коры и подкорковых ядер головного мозга в осуществлении двигательных актов и их регуляции [2, 5, 12, 14]. В работе показано, что накожное нанесение АСД-3 сопровождается активацией нейронов полосатого тела, цингулярной, моторной и пириформной коры и изменениями в поведении животных. А. Sayin и соавт. [18] в своем исследовании отмечали, что введение крысам-самкам циталопрама коррелирует с тревожным поведением и увеличением содержания с-Fos-позитивных нейронов в цингулярной коре, миндалевидном теле и паравентрикулярном таламическом ядре. О том же свидетельствуют результаты исследования О. Babaev и соавт. [9], согласно которым воздействие на белки нейрוליгины приводит к активации с-Fos-позитивных нейронов в зонах, ассоциирующихся с тревогой.

В нашем исследовании выявлена корреляционная связь между количеством с-Fos-позитивных нейронов цингулярной коры и параметрами ультразвуковых вокализаций в группе животных, получавших АСД-3. В статье S. S. Pertsov и соавт. [17] также отмечено, что различные эмоциональные состояния у крыс сопровождаются изменениями параметров ультразвуковых вокализаций. Увеличение содержания белка с-Fos в соматосенсорной и инсулярной коре мозга свидетельствует об активации нейронов в ответ на процесс накожного нанесения АСД-3 и связанными с этим ощущениями.

Итак, нанесение цинковой пасты с 5% АСД-3 фракции на кожу межлопаточной области крыс линии Sprague Dawley приводит к значительному увеличению числа с-Fos-позитивных нейронов в цингулярной, моторной, инсулярной и пириформной коре, а также — в полосатом теле головного мозга и к увеличению двигательной и ультразвуковой активности крыс. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о высокой степени вероятности наличия связи между количеством активированных нейронов и поведенческой активностью животного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерябина З. И., Николаев А. В. Химико-фармакологическая характеристика препарата АСД // Труды Всес. ин-та экспер. ветеринар. 1968. Т. 35. С. 326–339.
2. Ивлиев Д. А. Влияние микроинъекции атропина в моторную кору крысы на выработку двигательного навыка // Журн. высш. нервн. деят. 1998. № 3. С. 478–484.
3. Леонов Н. И. Новое в тканевой терапии // Наука и жизнь. 1951. № 8. С. 17–19.
4. Ноздрин В. И., Пьявченко Г. А. Опыт проведения доклинических исследований лекарственных препаратов дерматотропного действия // Технологии живых систем. 2013. Т. 10, № 8. С. 31–37.
5. Перекрест С. В., Гаврилов Ю. В., Абрамова Т. В. и др. Активация клеток гипоталамических структур при введении антигенов различной природы (по экспрессии с-Fos гена) // Мед. иммунол. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 631–636.
6. Пьявченко Г. А., Урываев Ю. В., Ноздрин В. И. Совместное применение комплексов Laboras и Sonotrack при исследовании поведенческих реакций у крыс // Учен. записки Орловск. гос. ун-та. 2013. Т. 56, № 6. С. 238–242.
7. Пьявченко Г. А., Шмаркова Л. И., Ноздрин В. И. Изменение количества нейронов в моторной коре крыс и их двигательная активность в возрастном аспекте // Морфология. 2015. Т. 147, вып. 3. С. 7–10.
8. Сварник О. Е. Формирование индивидуального опыта и его нейрогенетическое обеспечение: экспрессия гена с-fos: Автореф. дис. ... канд. психол. наук. М., 2003.
9. Babaev O., Botta P., Meyer E. et al. Neuroigin 2 deletion alters inhibitory synapse function and anxiety-associated neuronal activation in the amygdala // Neuropharmacology. 2016. Vol. 100. P. 56–65.
10. Binder M. D., Hirokawa N., Windhorst U. Encyclopedia of Neuroscience. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag GmbH, 2009. P. 685.
11. Carter M., Shieh J. C. Guide to Research Techniques in Neuroscience. San Diego: Elsevier Academic Press, 2015. P. 168–169.
12. Hearing M. C., See R. E., McGinty J. F. Relapse to cocaine-seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the striatum and cerebral cortex of rats following short or long periods of abstinence // Brain Structure and Function. 2008. Vol. 213, № 1–2. P. 215–227.
13. Matyas F., Sreenivasan V., Marbach F. et al. Motor control by sensory cortex // Science. 2010. Vol. 330. P. 1240–1243.
14. Murray R. C., Gilbert Y. E., Logan A. S. et al. Strial patch compartment lesions alter methamphetamine-induced behavior and immediate early gene expression in the striatum, substantia nigra and frontal cortex // Brain Structure and Function. 2014. Vol. 219, № 4. P. 1213–1229.
15. Paxinos G., Watson C. The rat atlas in stereotaxic coordinates. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007.
16. Paxinos G. The rat nervous system. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.
17. Pertsov S. S., Koplik E. V., Karkishchenko N. N., Sudakov K. V. Ultrasonic vocalization of rats in various motivational and emotional states // Bulletin Exper. biology and medicine. 2012. Vol. 153, № 6. P. 805–808.
18. Sayin A., Derinoz O., Vüksel N. et al. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats // Pharmacol. Biochem. Behav. 2014. Vol. 124. P. 180–187.
19. Sippy T., Lapray D., Crochet S., Petersen C. H. Cell-type-specific sensorimotor processing in striatal projection neurons during goal-directed behavior // Neuron. 2015. Vol. 88. P. 1–8.
20. Squire L. R., Berg D., Bloom F. E. et al. Fundamental neuroscience. San Diego: Elsevier Academic Press, 2013.
21. Watson C., Paxinos G., Puelles L. The Mouse Nervous System. San Diego. Elsevier Academic Press, 2011.

Поступила в редакцию 08.07.2016
Получена после доработки 08.10.2016

**C-Fos-POSITIVE NEURON CONTENT
IN THE CORTEX AND STRIATUM
OF RAT BRAIN AND BEHAVIORAL CHANGES
AFTER EPICUTANEOUS APPLICATION
OF DOROGOV'S ANTISEPTIC-STIMULATOR
PASTE**

*G.A.Piavchenko^{1,2}, V.A.Pugach³, N.S.Novikova³,
L.I.Shmarkova⁴, Ye.A.Korneva, V.I.Nozdin^{1,2}*

The study was performed on Sprague Dawley male rats, which were divided into 3 groups (6 animals in each). The 1st group consisted of intact animals; the 2nd group — of animals treated with the preparation basis (zinc paste); the 3rd group included the animals that received the application of a third fraction of Dorogov's antiseptic-stimulator (DAS) on their dorsal skin. The study of c-Fos positive neurons in different regions of the brain

and the registration of behavioral reactions showed the activation of neurons in the cingulate, motor, piriform cortex and striatum, as well as the increase in motor and ultrasonic activity. It has also demonstrated the correlation of behavioral reactions with the neuronal activation in the brain regions studied. The results suggest a co-regulation of the behavior by many brain structures and indicate the presence of DAS neurotrophic effect.

Key words: *cerebral cortex, striatum, neurons, c-Fos, Dorogov's antiseptic-stimulator*

¹ Department of Histology, Cytology and Embryology, Medical Institute of Oryol I.S.Turgenev State University; ² Scientific Department, "Retinoids" Pharmaceutical Joint-Stock Company, Moscow; ³ Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine; ⁴ Department of Mathematics, Informatics and Informatical Technologies, Orel State Institute of Economics and Trade