

ФИЗИОЛОГИЯ ПОВЕДЕНИЯ; ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ

УДК 612.822.5 + 577.352 + 612.833

ДЕЙСТВИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА СЕРОТОНИНА 5-ОКСИТРИПТОФАНА И НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО АНАЛОГА 5,7-ДИГИДРОКСИТРИПТАМИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА У ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

© 2010 г. Р. Р. Тагирова, И. Б. Дерябина, Т. Х. Гайнутдинова, В. В. Андрианов, Х. Л. Гайнутдинов

*Лаборатория биофизики Казанского физико-технического института КНЦ РАН,
e-mail: gainutdinov@mail.knc.ru; kh_gainutdinov@mail.ru*

Поступила в редакцию 01.05.2009 г.

Принята в печать 26.10.2009 г.

Работа посвящена исследованию влияния метаболического предшественника серотонина 5-окситриптофана и нейротоксического аналога 5,7-дигидрокситриптамина на выработку условного оборонительного рефлекса и на электрофизиологические параметры командных нейронов оборонительного поведения у улиток после обучения. Инъекции 5-окситриптофана внутрь улитки через синусный узел приводили к ускорению выработки условного оборонительного рефлекса. У улиток, инъецированных 5,7-дигидрокситриптамином, не происходило формирования условного рефлекса, а последующее применение 5-окситриптофана предотвращало эту блокаду. Если на поведенческом уровне 5-окситриптофан препятствовал действию 5,7-дигидрокситриптамина, то на уровне электрических характеристик командных нейронов подобный эффект отсутствовал.

Ключевые слова: обучение, условный рефлекс, серотонин, 5-окситриптофан, 5,7-дигидрокситриптамиин.

The Effect of Serotonin Precursor 5-Hydroxytryptophane and Neurotoxic Analogue 5,7-Dihydroxytryptamine on Defensive Conditioning in a Snail

R. R. Tagirova, I. B. Deryabina, T. Kh. Gainutdinova, V. V. Andrianov, Kh. L. Gainutdinov

*Laboratory of Biophysics, Kazan Physical-Technological Institute, Russian Academy of Sciences, Kazan,
e-mail: gainutdinov@mail.knc.ru; kh_gainutdinov@mail.ru*

This study is devoted to investigation of the influence of precursor of serotonin 5-hydroxytryptophane (5-HTP) and neurotoxic analogue 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) on defensive conditioning and electrical characteristics of command neurones of defensive behaviour after learning. Snails injected with 5-HTP learned faster as compared to control group injected with physiological solution. After the 5,7-DHT injection, snails failed to form the conditioned reflex. Injection of 5-HTP after the preliminary injection of neurotoxin 5,7-DHT restored the capability of snails for learning. Injections of 5-HTP prevented the effect of 5,7-DHT at the behavioural level, but not at the level of electrical characteristics of the command neurones.

Key words: learning, defensive conditioning, serotonin, 5-hydroxytryptophane, 5,7-dihydroxytryptamine.

Серотонин является одним из широко распространенных и наиболее изученных медиаторов нервной системы [13, 18]. Изучение функциональной роли серотонина показало его важную роль в деятельности центральной нервной системы, а также в механизмах обучения и памяти [1–5, 15, 21].

Для исследования роли серотонинергической системы широко применяется апплика-

ция или инъекция серотонина либо его метаболического предшественника 5-окситриптофана (5-НТР) [2, 13, 15]. Для повышения содержания серотонина наиболее эффективно введение 5-окситриптофана – непосредственного предшественника в биологическом синтезе этого амина. Фармакологические эффекты 5-НТР проявляются в том, что уже через 30 мин содержание серотонина зна-

чительно повышается, достигая максимального развития в течение 1 ч, и продолжают в течение нескольких часов, полностью исчезая через 1 сут [10]. Для специфического нарушения работы серотонинергической системы эффективно применение нейротоксических аналогов серотонина 5,6- и 5,7-дигидрокситриптамина (5,6- и 5,7-ДОТ), что ведет к дегенерации серотониновых терминалей и значительному снижению концентрации серотонина в ЦНС [17, 19, 20].

К настоящему времени накопился большой экспериментальный материал, свидетельствующий о связи уровня серотонина в нервной системе со способностью к обучению [1–3, 12, 15, 18, 21]. Эти работы включают исследования эффектов предшественника серотонина 5-НТР и нейротоксинов 5,6- и 5,7-ДОТ по отдельности. Однако в литературе нет сведений о том, какой пул серотонина затрагивает применение нейротоксинов 5,6- и 5,7-ДОТ и как действует в этом случае предшественник серотонина. Поэтому мы провели исследование влияния предшественника серотонина 5-НТР и нейротоксина 5,7-ДОТ на выработку условного оборонительного рефлекса и на электрические характеристики командных нейронов оборонительного поведения обученных животных.

МЕТОДИКА

В эксперименте использовали половозрелых особей *Helix lucorum*, однородных по массе и размеру, которые две недели находились в активном состоянии. Выработка условного оборонительного рефлекса закрытия пневмостома (УОР) происходила по отработанной схеме [9]. В качестве условного стимула (УС) использовали постукивания по раковине, которые в норме не вызывали оборонительной реакции улитки. Безусловным стимулом (БС) служило вдувание струи воздуха в пневмостом, что вызывало у животных безусловную реакцию его закрытия. В день предъявляли 60 сочетаний УС и БС. Полное закрытие пневмостома в ответ на УС отмечалось как положительная реакция. УОР считался выработанным, если животное давало положительные реакции на 30 УС подряд. После этого оценивали число сочетаний, необходимых для обучения.

Для истощения серотонина применяли инъекцию внутрь улитки через синусный узел 5,7-дигидрокситриптамина фирмы “Sigma” (USA) в дозе 20 мг/кг массы. Нейроток-

син был растворен в 0.1 мл физиологического раствора (ФР) для виноградной улитки, в раствор также добавляли 0.1%-ную аскорбиновую кислоту в качестве антиоксиданта. Физиологический раствор для виноградной улитки содержал (ммоль/л): NaCl – 78, KCl – 4.5, CaCl₂ – 10, MgCl₂ – 6.7 и NaHCO₃ – 4.5; pH 7.6–7.8. Метаболический предшественник серотонина 5-НТР в дозе 10 мг/кг массы был растворен в 0.1 мл ФР. Части улиток производили инъекции ФР (контроль) в том же количестве и в те же сроки, что и в экспериментальных сериях. УОР начинали вырабатывать спустя 5 дней после инъекции 5,7-ДОТ или ФР. Каждую из этих групп разделили на две подгруппы и за 1 ч до сеанса обучения улиткам одной подгруппы делали инъекцию 5-НТР, другой – инъекцию ФР. Таким образом, УОР вырабатывался у четырех подгрупп животных: 1) ФР + 5НТР + УОР, 2) ФР + ФР + УОР, 3) ДОТ + 5НТР + УОР, 4) ДОТ + ФР + УОР. Кроме того, в электрофизиологическом эксперименте использовались две контрольные подгруппы: (интактные улитки) и (улитки после инъекции 5-НТР).

После окончания поведенческой части производили регистрацию электрических характеристик командных нейронов оборонительного поведения: ЛПа3, ППа3, ЛПа2 и ППа2. Для электрофизиологических экспериментов использовался препарат изолированной центральной нервной системы улитки. Перед изготовлением препарата животных охлаждали в холодной воде со льдом в течение 30 мин. Измерения проводили с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, имеющих сопротивление 5–25 МОм. В ходе эксперимента регистрировались следующие параметры электрической активности нейронов: мембранный потенциал покоя (V_m), порог генерации потенциалов действия (V_t) и амплитуда потенциала действия (V_s) Производилась компьютерная регистрация. Результаты статистически обрабатывались с одновременным применением t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна–Уитни. В статье приведены средние значения измеряемых величин и стандартные ошибки среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выработка УОР (число улиток $n = 5$) достигалась в результате предъявления 330 сочетаний (рис. 1). Ежедневная инъекция внутрь улитки через синусный узел 5-НТР

($n = 7$) ускоряла формирование условного оборонительного рефлекса (выработка за 260 сочетаний). Введение внутрь улитки через синусный узел нейротоксина 5,7-ДОТ препятствовало обучению ($n = 3$) (рис. 2). Данный эксперимент повторяет полученные нами ранее результаты по блокированию нейротоксином 5,6-ДОТ выработки условного рефлекса [3]. В то же время ежедневная инъекция 5-НТР после инъекции нейротоксина 5,7-ДОТ внутрь улитки через синусный узел возвращала способность животного к обучению ($n = 6$). Так как 5-НТР приводит к синтезу серотонина в нервной системе, можно предположить, что таким образом 5-НТР предотвращает блокаду обучения веществом 5,7-ДОТ. Это указывает на то, что блокада выработки условного рефлекса, по-видимому, связана со снижением уровня серотонина, а не с деградацией серотонинергических синаптических терминалей и не с токсическим действием 5,7-ДОТ.

При регистрации электрических характеристик командных нейронов оборонительного поведения мы получили следующие результаты: по сравнению с интактными улитками (контрольная группа) в нейронах обученных улиток (группа ФР + ФР + УОР), как было показано ранее в нашей лаборатории [5], происходил деполяризационный сдвиг V_m и снижение V_t (таблица). Ранее также было показано, что инъекция интактным улиткам 5,7-ДОТ приводит к еще большему сдвигу мембранного и порогового потенциалов в сторону деполяризации, чем при обучении улиток, инъектированных ФР [3, 4]. После процедуры обучения у улиток, предварительно инъектированных 5,7-ДОТ, не происходит дальнейшей деполяризации и снижения порогового потенциала.

Инъекция 5-НТР контрольным улиткам достоверно не изменяла электрические ха-

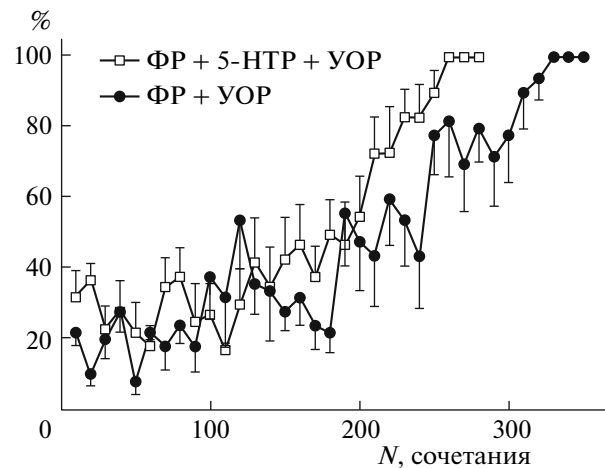


Рис. 1. Влияние инъекции 5-НТР на выработку условного оборонительного рефлекса (УОР) у виноградных улиток. По оси абсцисс — количество сочетаний условных и безусловных стимулов, по оси ординат — количество положительных ответов в процентах за 10 сочетаний условных и безусловных стимулов. Показаны стандартные ошибки среднего. ФР — физиологический раствор, 5-НТР — 5-окси-триптофан.

Fig. 1. Influence of 5-HTP injections on elaboration of defensive conditioned reflex in terrestrial snails. Abscissa — the quantity of pairs of conditioned and unconditioned stimulus. Ordinate — the quantity of positive responses in percents for ten pairs of conditioned and unconditioned stimulus. The standard errors of the mean are shown.

рактеристики нейронов. Обучение после инъекции 5-НТР вызывало лишь небольшой (недостоверный) деполяризационный сдвиг V_m и недостоверное увеличение V_t по сравнению с контролем. У улиток при обучении после инъекций 5-НТР и 5,7-ДОТ внутрь улитки через синусный узел происходит достоверное снижение V_m и V_t до уровня показателей этих параметров у улиток, инъектированных только 5,7-ДОТ (таблица).

Среднее значение электрических характеристик командных нейронов оборонительного поведения
The mean magnitude of electrical characteristics of command neurons of defensive behaviour

Группы и подгруппы улиток	Мембранный потенциал (V_m), мВ	Порог генерации потенциалов действия (V_t), мВ	Амплитуда потенциала действия (V_s), мВ
Контроль	-59.6 ± 1.1 ($n = 9$)	16.6 ± 0.4 ($n = 7$)	62.2 ± 1.9 ($n = 9$)
Контроль + 5-НТР	-58 ± 1.5 ($n = 5$)	17.9 ± 1.1 ($n = 7$)	59.2 ± 4.1 ($n = 6$)
ФР + ФР + УОР	-55.3 ± 1.3 ($n = 15$)*	13.9 ± 0.7 ($n = 9$)*	55.8 ± 2.9 ($n = 9$)
ФР + 5-НТР + УОР	-57.2 ± 1.2 ($n = 15$)	15.3 ± 0.5 ($n = 15$)	61.6 ± 2.1 ($n = 15$)
ДОТ + ФР + УОР	-54.2 ± 1.7 ($n = 5$)*	13.5 ± 1 ($n = 4$)*	58.9 ± 2.2 ($n = 7$)
ДОТ + 5-НТР + УОР	-5.1 ± 1.4 ($n = 15$)*	14.5 ± 0.5 ($n = 18$)*	58.6 ± 1.8 ($n = 21$)

Примечание. * — достоверное отличие от значений в контрольной группе, $p < 0.005$.

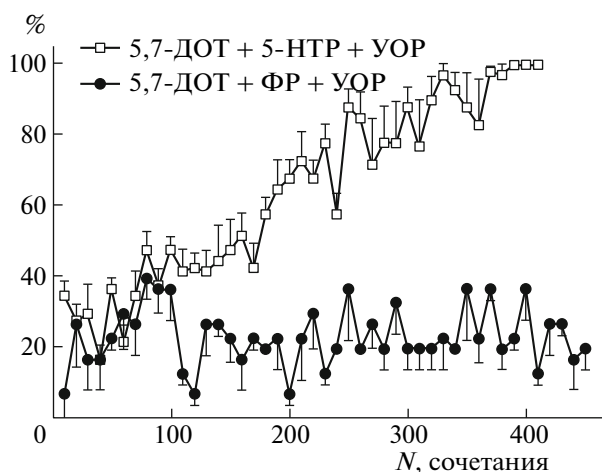


Рис. 2. Влияние инъекции 5,7-ДОТ и 5-НТР на выработку условного оборонительного рефлекса виноградных улиток. По оси абсцисс — количество сочетаний условных и безусловных стимулов, по оси ординат — количество положительных ответов в процентах за 10 сочетаний условных и безусловных стимулов. Показаны стандартные ошибки среднего. 5,7-ДОТ — 5,7-дигидрокситриптамин.

Fig.2. Influence of 5,7-DHT and 5-HTP injections on elaboration of defensive conditioned reflex in terrestrial snails. Abscissa — the quantity of pairs of conditioned and unconditioned stimulus. Ordinate — the quantity of positive responses in percents for ten pairs of conditioned and unconditioned stimulus. The standard errors of the mean are shown.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования механизмов обучения и памяти привели к новым экспериментальным подходам в изучении нейромедиаторных и модуляторных эффектов серотонина, а также механизмов участия соответствующих систем в явлениях пластичности поведения [12, 14, 18]. Применение нейротоксических аналогов серотонина 5,6- или 5,7-ДОТ и предшественника синтеза серотонина 5-НТР является важным экспериментальным приемом для изучения механизмов участия серотонина в обучении и контроле разных форм поведения [4, 13, 16].

В настоящей работе было показано, что введение предшественника синтеза серотонина 5-НТР внутрь улитки ускоряет выработку условного рефлекса, но не влияет на электрические характеристики командных нейронов. Такой результат, видимо, связан с тем, что серотонин, играющий ключевую роль в оборонительном поведении моллюсков [6,

12], участвует в системе подкрепления рефлекса и поэтому способствует ускорению обучения. В то же время мембранные корреляты обучения [5] не зависят от скорости выработки условного рефлекса, а определяются тем, выработался условный рефлекс или нет.

Нами было найдено также, как и ранее [3, 4], что нейротоксин 5,7-ДОТ вызывает деполяризационный сдвиг мембранного потенциала. В этой серии экспериментов у нас нет удовлетворительного ответа на вопрос, почему применение нейротоксина 5,7-ДОТ вызывает деполяризационный сдвиг мембранного потенциала.

Нами продемонстрировано, что в случае как эффектов 5-НТР, так и эффектов 5,7-ДОТ, нет прямой связи возбудимости командных нейронов с наличием сформированного условного рефлекса. Если на поведенческом уровне 5-НТР препятствовал действию 5,7-ДОТ, то на уровне электрических характеристик командных нейронов подобный эффект 5-НТР отсутствовал. Исследования эффекта временного дефицита серотонина при помощи 5,7-ДОТ на обучение показывают, что при истощении серотонина условный рефлекс не вырабатывается, как и в работах П.М. Балабана и сотр. [1, 2]. Такой результат был получен ранее и нами [3]. В продолжение предыдущих исследований мы провели эксперименты по совместным эффектам инъекций 5-НТР и 5,7-ДОТ внутрь улитки через синусный узел на формирование УОР. Было показано, что ежедневная инъекция 5-НТР внутрь улитки через синусный узел перед началом сеанса обучения в случае применения нейротоксина 5,7-ДОТ возвращала способность животного к обучению. В то же время электрические характеристики командных нейронов (мембранный и пороговый потенциалы) не возвращались к исходному уровню, намечалась только тенденция. По-видимому, наблюдаемое различие в эффектах веществ является следствием того, что нейротоксин действует преимущественно (а может быть, только) на уровне серотонинергических терминалей, а влияния на мембранный потенциал нейронов (в данном случае командных нейронов) зависят также и от рецепторов на соматических командных нейронов, которые были показаны А.С. Пивоваровым [11]. Это предположение находится в соответствии с результатами, полученными Д.А. Сахаровым с сотр. [7, 8].

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что ежедневная инъекция предшественника серотонина 5-НТР внутрь улитки через синусный узел ускоряет формирование условного оборонительного рефлекса.

2. Показано, что введение нейротоксина 5,7-ДОТ внутрь улитки через синусный узел блокирует выработку условного оборонительного рефлекса, а ежедневная инъекция 5-НТР после введения внутрь улитки через синусный узел нейротоксина 5,7-ДОТ возвращает способность животного к обучению.

3. После инъекции 5-НТР внутрь улитки через синусный узел электрические характеристики (мембранный и пороговый потенциалы) командных нейронов как интактных, так и обученных улиток не изменяются.

4. У улиток при обучении после инъекций 5-НТР и 5,7-ДОТ внутрь улитки через синусный узел происходит достоверное снижение мембранного и порогового потенциалов до уровня показателей этих параметров у улиток, инъекцированных только 5,7-ДОТ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-00224).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балабан П.М., Захаров И.С. Обучение и развитие — основа двух явлений. М.: Наука, 1992. 151 с.
2. Балабан П.М., Максимова О.А., Браваренко Н.И. Пластические формы поведения виноградной улитки и их нейронные механизмы. Журн. высш. нерв. деят. 1992. 42(6): 1208–1220.
3. Гайнутдинова Т.Х., Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л. Электрофизиологические исследования влияния 5,6-дигидрокситриптамина на выработку условного оборонительного рефлекса у улитки. Рос. физиол. журн. 2002. 88(2): 205–212.
4. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х. Воздействие нейротоксинов 5,6-дигидрокситриптамина и р-хлорфенилаланина на параметры электрической активности командных нейронов при долговременной сенситизации и обучении у виноградной улитки. Журн. высш. нерв. деят. 1999. 49(1): 48–58.
5. Гайнутдинов Х.Л., Гайнутдинова Т.Х., Чекареев Л.Ю. Изменение электрических характеристик командных нейронов при выработке условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки. Журн. высш. нерв. деят. 1996. 46(3): 614–617.
6. Дьяконова В.Е. Поведенческие функции серотонина и октопамина: некоторые парадоксы сравнительной физиологии. Успехи физиол. наук. 2007. 38(3): 3–20.
7. Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А. Изолированный серотониновый нейрон: уровень синтеза нейротрансмиттера влияет на импульсацию. Докл. АН СССР. 2001. 376(2): 267–270.
8. Дьяконова В.Е., Сахаров Д.А. Изолированный серотониновый нейрон: механизм возбуждения, вызванного активацией синтеза нейротрансмиттера. Докл. АН СССР. 2001. 378(5): 694–696.
9. Максимова О.А., Балабан П.М. Нейронные механизмы пластичности поведения. М.: Наука, 1983. 127 с.
10. Науменко Е.В., Попова Е.К. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. Новосибирск: Наука, 1975. 220 с.
11. Пивоваров А.С., Нистратова В.Л. Модуляторные серотониновые рецепторы на some командных нейронах виноградной улитки. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2003. 136(8): 132–134.
12. Сахаров Д.А. Интегративная функция серотонина у примитивных *Metazoa*. Журн. общ. биологии. 1990. 51(4): 437–449.
13. Сахаров Д.А., Каботянский Е.А. Интеграция поведения крылоногого моллюска дофамином и серотонином. Журн. общ. биологии. 1986. 47(2): 234–245.
14. Balaban P.M., Korshunova T.A., Bravarenko N.I. Postsynaptic calcium contributes to reinforcement in a three-neuron network exhibiting associative plasticity. Eur. J. Neurosci. 2004. 19: 227–233.
15. Burrell B.D., Sahley C.L. Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability. Neurophysiology. 2005. 94: 4002–4010.
16. Clark G.A., Kandel E.R. Induction of long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurones by local application of serotonin to remote synapses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. 90(23): 1411–1415.
17. Gadotti D., Bauce L.G., Lukowiak K., Bulloch A.G.M. Transient depletion of serotonin in the nervous system of *Helisoma*. J. Neurobiol. 1986. 17(5): 431–447.
18. Gillette R. Evolution and function in serotonergic systems. Integrat. Comp. Biol. 2006. 46(6): 838–846.
19. Hernadi L., Hiripi L., Vehovszky A., Kemenes G., Rozsa K. Ultrastructural, biochemical and electrophysiological changes induced by 5,6-dihydroxytryptamine in the CNS of the snail *Helix pomatia* L. Brain Res. 1992. 578(1–2): 221–234.
20. Kemenes G., Hiripi L., Benjamin P.R. Behavioural and biochemical changes in the feeding system of *Lymnaea* induced by the dopamine and serotonin neurotoxins 6-hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1990. 329: 243–255.
21. Levenson J., Byrne J.N., Eskin A. Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light/dark cycles and sensitization training. J. Neurosci. 1999. 19(18): 8094–8103.