

УДК 591

НЕОНАТАЛЬНЫЕ ИНЪЕКЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ГЕНОТИП-ЗАВИСИМЫЕ ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ У МЫШЕЙ И КРЫС

© 2012 г. И. И. Полетаева*, О. В. Перепелкина*, О. С. Бояршинова*, И. Г. Лильп*, Н. В. Маркина*, Т. В. Тимошенко*, А. В. Ревещин**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

119992 Москва, Воробьевы горы

**Институт биологии гена РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 26.10.10 г.

Окончательный вариант получен 14.02.11 г.

Представлен обзор экспериментальных данных, свидетельствующих, что введение новорожденным мышам и крысам ряда биологически активных соединений (АКТГ₄₋₁₀, его синтетический аналог семакс, пирарцетам, кофеин, леветирацетам, бусперон и др.) обнаруживает свой эффект во взрослом возрасте в виде изменений поведения и физиологических реакций, а также некоторых морфологических показателей. Анализировали предрасположенности к аудиогенным судорогам, выраженность реакций страха—тревоги, исследовательской активности, болевой чувствительности. Обнаруженные отдаленные эффекты неонатального введения этих веществ мышам и крысам разных генотипов по своему направлению либо совпадали с таковыми при введении их взрослым животным, так и имели противоположный знак. Подобное фармакологическое вмешательство в процессы развития ЦНС в период раннего постнатального онтогенеза видоизменяют ход нормального развития мозга. Эти модулирующие влияния предположительно можно связать с воздействием на формирование нейротрансмиттерных систем мозга. Они могут сказываться и на морфологических признаках ЦНС (число катехоламинергических нейронов, нейрогенез взрослого мозга).

Ключевые слова: онтогенез, неонатальные воздействия, генотип, аудиогенная эпилепсия, болевая чувствительность, тревожность, исследовательское поведение, мышцы, крысы.

Начало серии работ, обзору которых посвящена статья, было положено сообщением Л.И. Корочкина о результатах одной из его ранних работ. В ней было обнаружено, что введение дексаметазона крысам в ранний постнатальный период вызвало у взрослых животных увеличение числа холинергических нейронов в шейном симпатическом ганглии. Предложив исследовать этот феномен, Л.И. Корочкин высказал предположение, что если нервные клетки, проходящие дифференцировку, испытывают влияние низкомолекулярных биологически активных веществ, то может произойти изменение числа нейронов той или иной “эргичности”, и этот эффект можно будет обнаружить и у взрослых животных. Сейчас очевидно, что изучение отдаленных последствий ранних воздействий на развивающийся мозг важно как в теоретическом, так и в практическом отношении (Slotkin, 1998; Viggedal et al., 1993; Vorhees, 1994; Mothes et al., 1996; Maguire, Mody, 2008). Эти феномены интенсивно исследуют, однако они остаются малоизученными в аспекте механизмов их отложенного действия. Согласно предположению О. Краера (Otto Krayer) уровни экспрессии генов

при стимуляции рецепторов в критические периоды развития изменяются по-иному, чем при такой же стимуляции зрелой ЦНС (цитировано по Slotkin, 1998). Оценка генотипических особенностей в реализации отдаленных эффектов ранних воздействий на мозг практически отсутствует. Один и тот же рецептор при этом может участвовать в сигнальных каскадах, связанных с пролиферацией, с ее остановкой, с ростом клеток и их смертью. В качестве примера Т. Слоткин приводит разную роль бета-адренергических рецепторов, стимуляция которых в раннем постнатальном онтогенезе усиливает деление клеток, а более поздняя стимуляция вызывает остановку деления клеток (Slotkin, 1998).

Обнаружены отдаленные изменения различных признаков поведения взрослых мышей и крыс после раннего введения целого ряда препаратов: этанола (Pick et al., 1993; Middaugh et al., 1994), морфина (D’Amato et al., 2001), хлорпирифоса (Venerosi et al., 2008), азид-тимидина (Venerosi et al., 2002), анестетиков (Schroeder et al., 1997, Koch et al., 2008; Loepke et al., 2009; Agrawal, Shapiro, 2005; Wang et al., 2008), никотина (Counotte et al.,

2009), кофеина (Guillet, 1995; Алексеев и др., 2003а; Tchekalarova et al., 2007), анксиолитиков (Shibuya et al., 1986), пептидов ряда групп (McGivern et al., 1987; Полетаева и др., 1996а; Шилова и др., 2000; Дубынин и др., 2000; Алексеев и др., 2003а; Бояршинова и др., 2004а, б), агонистов и антагонистов нейромедиаторов (File, Tucker, 1983; Kaindl, Ikonomidou, 2007; Mehta et al., 2007, Ammassari-Teule et al., 1990; Táira et al., 1992, 1993; Costei et al., 2002; Morford et al., 2002; Шилова и др., 2004; Cohen et al., 2005; Maple et al., 2007; Maguire, Mody, 2008; Vorhees et al., 2009; Williamsa et al., 2003, 2004; Noorlander et al., 2008; Vorhees et al., 2009 и др.), ингибитора NO-синтазы NG-нитро-L-аргинин-метил-эфир — L-NAME (Тимошенко и др., 2009а, б) и других веществ.

Ниже дается краткий обзор результатов анализа изменений поведения, физиологических и морфологических признаков, полученных нашей группой в течение ряда лет. Биологически активные агенты вводили в течение 1-й (реже — в течение 2-й) недели жизни крыс или мышей с последующей оценкой их физиологического статуса в возрасте 1 мес. или в половозрелом возрасте. Были также показаны морфологические изменения в ЦНС.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

В разных сериях опытов были использованы крысы линий КМ, Вистар и Wag/Rij, а также мыши линий СВА/Lac/Sto, СЗН/He, С57BL/6J, DBA/2J, 101/HY, RLB, RSB.

Линии крыс. Инбредная линия крыс Крушинского-Молодкиной (КМ) характеризуется предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии с почти 100% пенетрантностью и высокой экспрессивностью этого признака (Семиохина и др., 2006). Аутбредная линия Вистар в конце 40-х годов послужила основой для селекции крыс линии КМ. В настоящее время небольшая и изменчивая доля (12–23%) крыс Вистар обнаруживает аудиогенные судорожные припадки невысокой интенсивности, практически никогда не имеющие тонического компонента. Крысы линии Wag/Rij, использованные в одном из исследований (Алексеев и др., 2002а), характеризуются спонтанными приступами кратковременных “малых припадков” (Kuznetsova et al., 1996). Примерно у трети животных этой линии обнаруживаются также и аудиогенные судорожные припадки (Midzyanovskaya et al., 2004).

Линии мышей. Инбредные линии СВА, DBA/2J, СЗН и С57BL/6J — коммерческие стандартные линии (Бландова и др., 1983). Мыши линии DBA/2J в высоком проценте случаев предрасположены к аудиогенной эпилепсии и обнаруживают ее с 20 до 42–45-дневного возраста. Мыши линий СВА и СЗН не обнаруживают аудиогенных

судорожных припадков. Линия С57BL/6J — устойчива к действию звука, однако могут стать чувствительными после процедуры прайминга (предварительному воздействию звука в возрасте 14–18 дней (Henry, 1967)). Мыши линии 101/HY обладают нестабильностью хромосомного аппарата и имеют дефекты в системе репарации ДНК, которые наследуются рецессивно и обусловлены мутацией одного гена, обозначенного *mut-1* (Карагодина, Сьяксте, 1981). Для мышей линии 101/HY характерны редко встречающееся нарушение локомоции, выражающееся в попятных движениях в новой ситуации (Полетаева и др., 1992) и предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, которая, в отличие от мышей DBA/2J, наиболее сильно выражена у них в возрасте 2–3 мес. (Полетаева и др., 1996б). Мыши линий RLB и RSB (Russian Large Brain, Russian Small Brain) были получены каждая от одной самки линий БМ и ММ, селективированных, соответственно, на большой и малый вес мозга, и подвергнутых процедуре пересадки эмбрионов (Маркина и др., 2004).

Использованные вещества, их введение. Новорожденным мышам и крысам ряда генотипов (см. ниже) в возрасте со 2-го по 6-й дни жизни вводили АКТГ₄₋₁₀, семакс (устойчивый к расщеплению пептидазами аналог АКТГ₄₋₁₀), кетамин (неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов), кофеин (антагонист аденозиновых А-1 рецепторов), пирacetам, мелатонин (данные не представлены), бупирон (агонист 5HT-2A рецепторов), L-NAME (ингибитор NOS), леветирацетам (противосудорожное средство). Вещества, растворенные в дистиллированной воде или физиологическом растворе, вводили в течение 5 дней подкожно в область холки детенышам крыс и мышей, начиная с 2-дневного возраста, за исключением нескольких серий, в которых сроки введения были иными (см. ниже). Контрольными во всех экспериментах были две группы — 1) контроль эффекта болевой стимуляции (введение растворителя) и 2) интактные животные. Контрольные и экспериментальные животные принадлежали одному и тому же помету.

В возрасте 4 недель животных индивидуально метили, рассаживали самцов и самок и содержали до достижения ими взрослого возраста (в большинстве серий — 8 нед. и старше). Воду и корм (фирмы МЭСТ и Лабораторкорм, Москва) животные получали *ad lib*. При выполнении работы авторы придерживались биоэтических правил, изложенных в декларации 86 ЕС.

ТЕСТИРОВАНИЕ НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Аудиогенная эпилепсия

Методика. Животное помещали в звукоизолирующую камеру, в которую подавали звук (звонок, сила 100 дБ). В случае развития аудиогенного судорожного припадка животное немедленно вынимали из камеры.

Таблица 1. Средний балл (\pm ошибка средней) аудиогенного припадка мышей разных генотипов в возрасте 1 мес. у интактных мышей, а также после неонатального введения семакса и болевой неонатальной стимуляции

Линия	Воздействие		
	семакс	бол. стимул.	интактные
DBA/2	1.16***# \pm 0.23	4.00*** \pm 0.30	2.00 \pm 0.29
СВА	1.21 \pm 0.18	0.08 \pm 0.26	0.84 \pm 0.24
101/НУ	1.21 \pm 0.19	0.96 \pm 0.18	0.95 \pm 0.19
СЗН	0.85 \pm 0.25	0.08 \pm 0.26	1.21 \pm 0.26
С57BL/6	0.08 \pm 0.26	0.00 \pm 0.27	0.00 \pm 0.38

*** – достоверно отличается от группы интактных мышей при $p < 0.001$;

– достоверно отличается от группы с неонатальной болевой стимуляцией при $p < 0.05$.

Таблица 2. Средний балл (\pm ошибка средней) аудиогенного припадка мышей разных генотипов в возрасте 1 мес. у интактных мышей, а также после неонатальной болевой стимуляции, введения кофеина и пирацетама

Линия	Неонатальное воздействие			
	Интактные	Бол. стимуляция	Кофеин	Пирацетам
DBA/2J	1.42 \pm 0.18	1.18 \pm 0.20 [@]	1.59 \pm 0.22	0.65 \pm 0.24**
101/НУ	1.56 \pm 0.17	1.05 \pm 0.25	3.12 \pm 0.22***#	1.96 \pm 0.18**
СВА/Lac/Sto	0.27 \pm 0.21	0.82 \pm 0.20 [@]	0.86 \pm 0.25 ^{&}	0.54 \pm 0.32

*, **, *** – достоверно отличается от группы интактных мышей при $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно (критерий Фишера);

– достоверно отличается от группы мышей с болевой стимуляцией при $p < 0.001$ (критерий Фишера);

[@] – достоверно отличается от группы интактных мышей (тест медианы);

[&] – отличается от группы интактных мышей $p = 0.069$ (тенденция);

[§] – отличается от группы интактных мышей $p = 0.055$ (тенденция).

рожного приступа (АП) регистрировали латентный период (ЛП) его начала, а также начала его последующих фаз и интенсивность приступа в условных баллах (Семиохина и др., 2006).

Эксперименты на мышах. В разных сериях опытов мышам линий DBA/2J, 101/НУ и СВА/Lac/Sto, СЗН, С57BL/6J в возрасте 2–6 дней вводили семакс (40 мг/кг), кофеин (200 мг/кг), пирацетам (50 мг/кг) или растворитель. Небольшой группе мышей линии 101/НУ в неонатальный период вводили фрагмент АКТГ 4-10 (40 мг/кг). Эти воздействия изменили зависимым от генотипа образом интенсивность и временные показатели аудиогенных судорожных припадков этих животных в возрасте 1 мес. (табл. 1 и 2).

Интенсивность АП у взрослых мышей линии 101/НУ после неонатальной болевой стимуляции была недостоверно выше, а после введения АКТГ 4-10 – ниже, чем у интактных. Неонатальное введение семакса и болевая стимуляция резко изменили показатели АП только у мышей линии DBA/2, но не у 101/НУ (табл. 1). АП был причиной гибели некоторых животных, причем среди мышей DBA/2 погибших мышей было достоверно больше, чем среди животных других линий (21 животное – DBA/2 и 6 мышей – всех остальных линий). Это связано с тестированием их в период

наибольшей подверженности мышей данной линии аудиогенной эпилепсии. У мышей DBA/2 доля погибших животных после неонатальной болевой стимуляции ($p < 0.001$, метод ф) была достоверно выше, чем у интактных, тогда как после введения семакса она была достоверно ниже, чем при болевой стимуляции ($p < 0.01$) (Бояршинова и др., 2008).

Анализ длительности АП и его тяжести (табл. 2) с помощью двухфакторного ANOVA (по выборке мышей двух линий – DBA/2J и 101/НУ, подверженных аудиогенной эпилепсии) выявил достоверное влияние факторов “линия” и “неонатальное воздействие” (неонатальное введение кофеина и пирацетама), а также достоверный эффект их взаимодействия (Маркина и др., 2006).

Таким образом, “неонатальное” введение нейрорепептидов, кофеина и пирацетама имело отдаленные последствия в виде модуляции АП у мышей, и выявило генотипические особенности в этих реакциях. Даже у двух линий мышей, предрасположенных к АП, отдаленные эффекты неонатальных воздействий различались. Столь разные по механизму действия кофеин и пирацетам сходным образом усилили АП у линии 101/НУ, но изменили его в разных направлениях у мышей линии DBA/2J.

Эксперименты на крысах. Неонатальная болевая стимуляция снизила интенсивность АП у крыс КМ и Вистар, тогда как последующее введение семакса возвратило эти показатели к уровню интактной группы. Неонатальное введение кофеина крысам КМ парадоксально ослабило интенсивность АП (у взрослых крыс кофеин усиливает предрасположенность к АП). Неонатальные воздействия были менее эффективными у крыс Вистар, и, в особенности, у крыс линии WAG/Rij (Алексеев и др., 2003а).

Неонатальное воздействие (болевая стимуляция и введение леветирацетама, эффективно снижающего интенсивность АП при введении взрослым животным, достоверно снизило интенсивность АП у молодых крыс КМ. По данным однофакторного ANOVA ($F_{1,2} = 4.96$, $p = 0.0013$) эффект введения леветирацетама был достоверным (достоверные отличия от группы с неонатальной БС $p = 0.0041$ и интактной группы, $p = 0.0002$, LSD тест). У всех животных, получавших леветирацетам, при включении звука наблюдалась мощная стартл-реакция, которая по своей интенсивности напоминала начальные фазы АП, но была очень короткой, после чего в некоторых случаях развивался АП. Кроме того, неонатальное введение леветирацетама резко изменило характер мышечных сокращений в судорожной фазе припадка – все судороги происходили в положении на спине. Сходное явление было отмечено у крыс и после неонатального введения кофеина. Подобный феномен описан впервые. Он может быть результатом изменений в распространении возбуждения по нейронным цепям, участвующим в генерации АП.

Неонатальное введение семакса и L-NAME крысам КМ и Вистар изменило интенсивность АП генотип-зависимым образом (Тимошенко и др. 2009а), а введение кетамина и мелатонина привело к видоизменению предрасположенности к АП (Салонин и др., 2004; Савина и др., 2005).

Болевая чувствительность

Методика. Болевой порог оценивали методом “tail flick”, при локальном термическом раздражении средней части хвоста. Каждое животное тестировали 3 раза с интервалом 5–6 мин, регистрируя ЛП отдергивания хвоста (в с).

У мышей линии СВА и DBA неонатальное введение пиретама (а у мышей DBA – и леветирацетама) вызвало у взрослых животных достоверное ($p < 0.05$, LSD тест Фишера) снижение болевых порогов, т.е. повышение болевой чувствительности. В то же время у взрослых мышей СЗН неонатальное введение пиретама, напротив, понизило болевой порог ($p < 0.05$).

У 2 мес. мышей СВА при неонатальном введении семакса болевой порог повысился (отличие от группы с болевой стимуляцией, $p = 0.0492$).

Болевая чувствительность взрослых мышей и крыс контрольных групп, получавших в неонатальном возрасте инъекции растворителя, т.е. испытывавших в течение пяти дней болевую стимуляцию, была изменена, а во многих случаях повышена (см. рис. 1, Бояршинова и др., 2003б; Алексеев и др., 2003б). У мышей нескольких генотипов (СВА, DBA/2J, их гибридов, 101/HY, СЗН, RSB и RLB и др.) неонатальная болевая стимуляция вызвала изменение болевого порога, выраженность которого зависела от пола и генотипа (рис. 1). Двухфакторный ANOVA для данных по первой пробе “tail-flick” показал приближающееся к достоверности влияние фактора “генотип” ($F_{1,4} = 3.8531$, $p = 0.0506$), фактора “воздействие” ($F_{1,4} p = 0.0531$) и достоверное взаимодействие двух факторов ($F_{1,15} = 2.0504$, $p = 0.0125$). Снижение болевых порогов после неонатальной болевой стимуляции было достоверным у взрослых самцов линий DBA, 101/HY и RSB ($p = 0.0351$, $p = 0.0318$ и $p = 0.0424$, соответственно) и недостоверным у взрослых самок этих генотипов, тогда как у всех мышей линии СВА болевые пороги были также снижены, но недостоверно (Бояршинова и др., 2003б).

У крыс неонатальная болевая стимуляция также изменила уровень болевой чувствительности в возрасте 3 мес., причем этот эффект был обнаружен у крыс линии КМ и Вистар, но отсутствовал у WAG/Rij, что, возможно, отражает описанную у них аномалию опиоидной системы (Алексеев и др., 2003б).

Поскольку проблема снижения болевых порогов после болезненных вмешательств в неонатальный период существует и в клинической неонатологии (Fitzgerald, Beggs; 2001, Anand, Bhutta, 2002; Peters et al., 2005; Grunau, 2002), в частности с демонстрацией половых различий (Rasakham, Chen, 2011), демонстрация в эксперименте генетических различий в характере этого эффекта показывает новый и важный в практическом отношении аспект этого феномена.

ТЕСТИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Тест “открытое поле”

Методика. Тест проводили в круглой арене диаметром 1 м с высотой стенок 60 см. В полу арены, расчерченном на квадраты (8×8 см для мышей и 16×16 см для крыс), имелись отверстия для выявления заглядываний в них (норковая реакция). В полуавтоматическом режиме регистрировали число пересеченных сторон квадратов, стойки, норковые реакции, реакции замирания, эпизоды группинга и число фекальных болюсов.

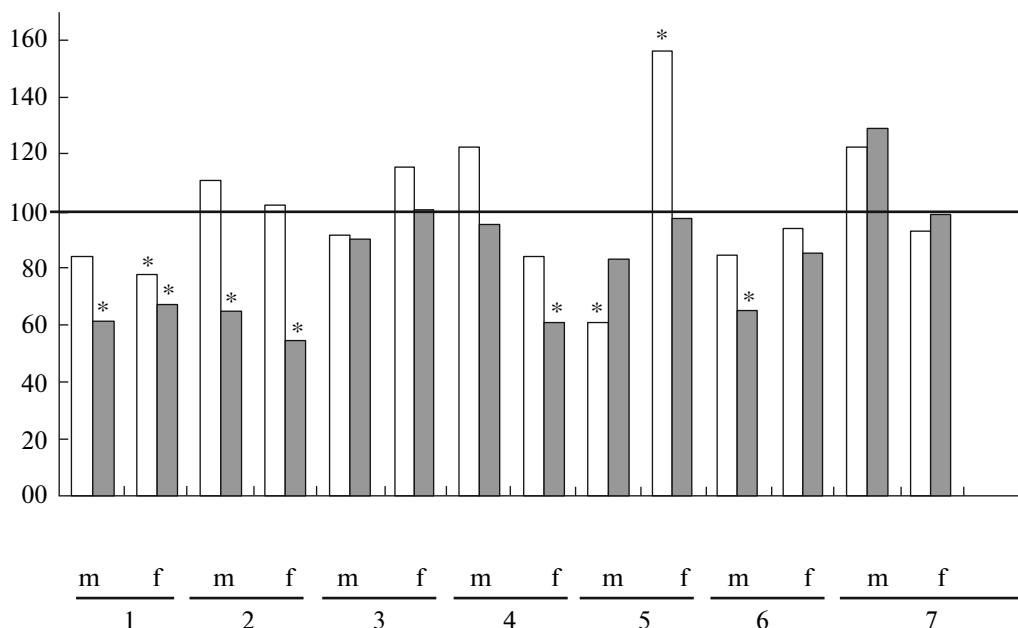


Рис. 1. Отдаленный эффект болевой стимуляции в неонатальный период. Уровень порогов болевой чувствительности 2 мес. самцов и самок мышей линий DBA/2J (1, $n = 70$), CBA/Lac/Sto (2, $n = 74$), гибридов F1 этих линий (3, $n = 56$), 101/HY (4, $n = 85$), C3H/He (5, $n = 48$), RLB и RSB (6, 7, $n = 84$, выведены от единственных самок линий мышей, селективных на малый и большой вес мозга, эмбрионы которых подверглись процедуре пересадки). Болевая чувствительность выражена как доля (в %) от 100% уровня болевой чувствительности интактных контрольных животных. m – самцы, f – самки. * – достоверно отличается от уровня контроля ($p < 0.05$).

Исследования на мышах. Оценка отдаленных эффектов ранних воздействий проводилась в данном тесте в 2 сериях экспериментов (Шилова и др., 2004). Приведем некоторые из полученных результатов. Неонатальное (2–6 дни жизни) введение семакса (7 мкг/мышь) и растворителя мышам линий DBA/2, CBA, и их гибридам, а в другой серии – мышам линий 101/HY и C3H вызывали зависимые

от генотипа изменения поведения у взрослых животных в возрасте 2–3.5 мес.

Были отмечены, в частности, изменения (рост или снижение) числа эпизодов и длительности реакции замирания, эпизодов чистки шерсти (груминга), уровня двигательной активности, а также числа вставаний на задние лапы и “норковых реакций” (см. рис. 2).

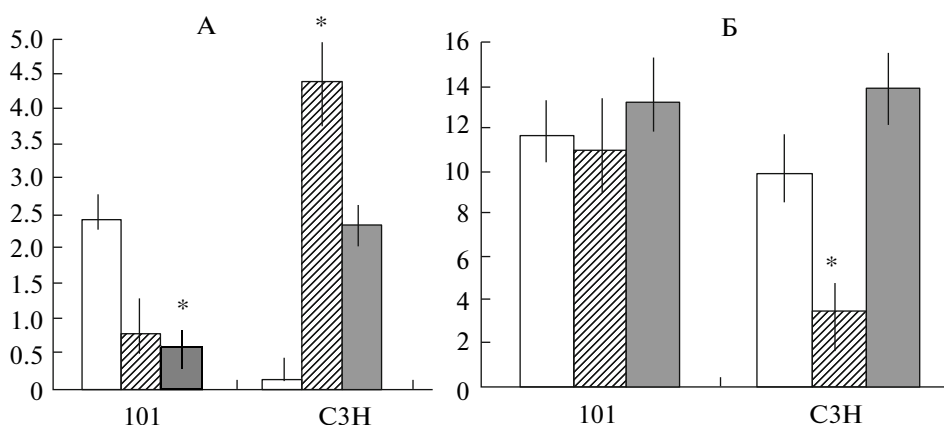


Рис. 2. Отдаленный эффект неонатального введения семакса мышам двух линий. Тест “открытое поле”. А – число эпизодов груминга за 3 мин теста суммарно. Б – число “стоек” за 3 мин теста суммарно. Обозначения: белые столбики – интактные мыши, косяя штриховка – неонатальная болевая стимуляция, серые – неонатальное введение семакса. По оси ординат – число элементов поведения.

* – достоверное отличие ($p < 0.05$) от интактной группы.

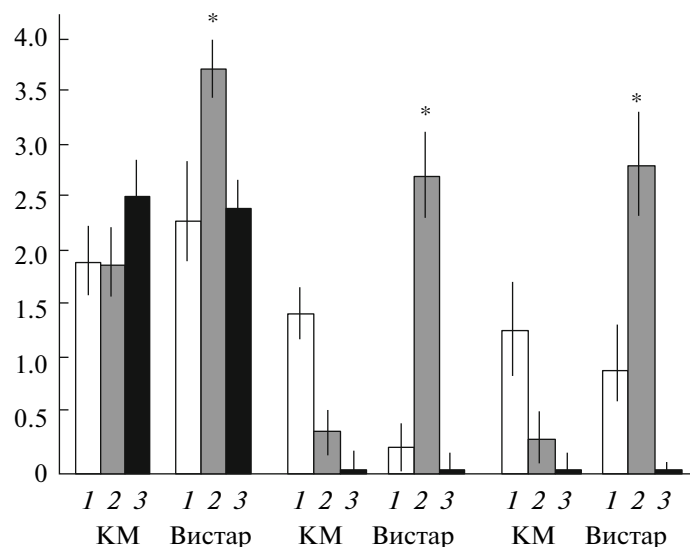


Рис. 3. Отдаленный эффект неонатального введения семакса и L-NAME самцам крысам двух линий. Тест “открытое поле”, двигательная активность крыс двух линий в центре поля за последовательные мин теста. Ось ординат — число квадратов, пересеченных в центре поля. 1 — интактная группа, 2 — введение семакса, 3 — введение L-NAME. * — достоверное отличие от интактной группы при $p < 0.05$.

В ряде случаев изменения числа поведенческих актов, характерных для исследовательского поведения (стойки, норковые реакции и др.) обнаруживались только в группах с неонатальной болевой стимуляцией (контрольного введения растворителя), тогда как между группами интактных мышей и после неонатального семакса достоверные различия нередко отсутствовали. Это позволяет предполагать, что неонатальное введение семакса (т.е. болевая стимуляция + семакс) “возвращало к норме” поведение, которое было бы изменено неонатальной болевой стимуляцией. Достоверных сдвигов поведения в ответ на неонатальные воздействия у мышей линии DBA/2 было больше, чем у CBA и гибридов этих линий, а у СЗН — больше, чем у 101/НУ. Направление этих изменений у мышей разных генотипов в ряде случаев было противоположным. Двигательная активность в центре “поля” изменилась только у мышей линии DBA/2, число заглядываний в отверстия изменилось только у мышей CBA, реакция замирания и чистка шерсти изменились у DBA/2 и СЗН. Известно, что у интактного животного усиление проявлений страха и тревоги сопровождается подавлением проявления инстинктивных движений (фиксированных комплексов действий), направленных на исследование среды. Однако в наших экспериментах при тестировании поведения взрослых животных после неонатальных воздействий иногда обнаруживалось *одновременное* усиление (или ослабление) как поведенческих актов, связанных с тревожностью (груминг), так и с исследовательским поведением (стойки и норковые реакции). Это заставляет предположить, что вмешательство в нормальное развитие ЦНС в не-

натальном периоде может изменить внутримозговые координации — основу врожденных двигательных координаций, нарушив характерные для нормы соотношения (Шилова и др., 2004).

Исследования на крысах. Неонатальное введение семакса и L-NAME (ингибитор NOS) крысам KM и Вистар также изменило целый ряд показателей поведения взрослых крыс в тесте ОП. Эти изменения затронули проявления исследовательского поведения, которые достоверно изменились в противоположном направлении у двух генотипов — снизились у KM и усилились у Вистар. Изменения уровня локомоции в центре арены (как “отрицательный” показатель тревожности) зависели и от генотипа, и от вводимого препарата, и от пола (рис. 3). При этом обнаруживалось также достоверное взаимодействие факторов “генотип” и “воздействие”. Последнее отражало тот факт, что неонатальное введение семакса почти не изменило этот показатель у взрослых крыс KM, но достоверно усилило его у Вистар. Крысы Вистар, в отличие от KM, после неонатального семакса обнаруживали ослабление проявлений страха. Поскольку оба вещества усиливали нейрогенез (см. ниже) у обеих линий, подобные расхождения в эффектах могут, возможно, означать различия в реакции развивающегося мозга крыс двух линий на усиление продукции новых клеток (а возможно и на снижение уровня NO).

Тест приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ)

Методика. Крестообразная платформа лабиринта приподнята над полом на 73 см (у него 2 от-

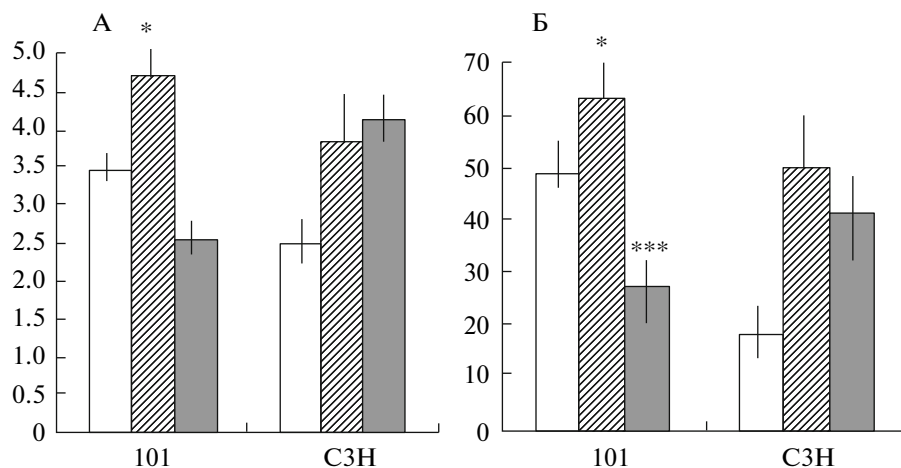


Рис. 4. Отдаленный эффект неонатального введения семакса мышам линий 101/НУ и СЗН. Тест ПКЛ. А — число выходов в светлые рукава лабиринта. Б — время пребывания в открытых рукавах. Белые столбики — интактные животные, штриховка — неонатальная болевая стимуляция, серые — введение семакса *,*** — достоверно отличается от показателей интактной группы, при $p < 0.01$, $p < 0.001$ соответственно.

крытых и 2 закрытых рукава, размер 50×10 см для крыс и 35×7 см для мышей, высота стенок 30 см). Длительность теста 3 мин. Определяли число выходов животного в светлые рукава и время, там проведенное, а также число “свешиваний” с открытых рукавов.

Исследования на мышах. Двухфакторный ANOVA выявил достоверное влияние фактора “воздействие” ($F = 4.41$, $p = 0.038$) на число выходов в открытые лучи лабиринта — один из показателей тревожности. У мышей линий 101/НУ и СЗН, неонатальное болевое раздражение снижало тревожность по этому показателю. Неонатальное введение семакса снижало число выходов в открытые рукава у мышей 101/НУ (т.е. усиливало тревожность), а также уменьшало время, проведенное в открытых рукавах ПКЛ (рис. 4). Этот эффект отсутствовал у мышей СЗН.

Исследования на крысах. Неонатальное введение семакса и L-NAME отчетливо снизили стремление крыс находиться на свету в период теста, и это снижение у крыс КМ было высоко достоверным ($p = 0.0049$ для семакса и $p = 0.0008$ для L-NAME). Время, проведенное в открытых рукавах, было максимальным у крыс интактных групп и достоверно ($p = 0.0164$) выше у линии КМ по сравнению с Вистар. Таким образом, у крыс КМ тревожность после неонатальных воздействий была достоверно выше, чем в контроле, а у Вистар отличия были недостоверными.

Межсамцовая агрессивность в тесте со “стандартным оппонентом”

Методика. Двух самцов 2 мес. возраста (тестируемой группы и “стандартного оппонента” — самца линии A/Sn) помещали одновременно в новую для них пластиковую клетку ($40 \times 25 \times 14$ см) и

наблюдали за их поведением (20 мин). Регистрировали проявления агрессивного поведения, в том числе прямые атаки партнера. Тест проводили ежедневно в течение 5 дней.

Буспирон, агонист 5HT-1A рецепторов, вводили в неонатальный период мышатам двух линий — RLB и RSB (см. выше). Это неонатальное воздействие вызвало у взрослых мышей противоположные по направлению изменения межсамцовой агрессивности. У агрессивных мышей RSB произошло усиление агрессивности, тогда как у низко агрессивных мышей линии RLB агрессивность ослабла. В то же время показано, что введение буспилона взрослым животным снижает их межсамцовую агрессивность (Sanchez, 1993). Уровни моноаминов (дофамина, серотонина и их метаболитов) у интактных мышей линий RLB и RSB были одинаковыми, но в группах после неонатального введения буспилона их величины отклонялись от контроля, причем часто в противоположных направлениях (см. Маркина и др., 2004).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование возможных изменений морфологических характеристик ЦНС взрослых животных, как следствия неонатальных воздействий, проводилось по двум направлениям.

Исследования изменений количества катехоламинергических нейронов

Иммуногистохимическое окрашивание срезов мозга мышей на тирозин-гидроксилазу позволило обнаружить отдаленные эффекты неонатального введения АКТГ₄₋₁₀ и семакса (рис. 6). Подсчет нейронов, содержащих тирозингидроксилазу в zona inserta дорсального гипоталамуса взрослых мы-

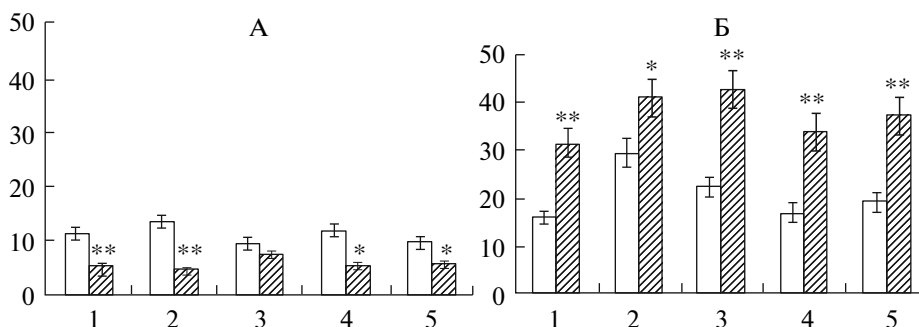


Рис. 5. Отдаленные эффекты неонатального введения буспирона мышам линий RSB и RLB на межсамцовую агрессивность (по оси ординат - число атак, по оси абсцисс - последовательные дни эксперимента) в тесте со стандартным оппонентом (самцы линии А/Не). А - линия RLB, Б - линия RSB. Неонатальная болевая стимуляция не изменила показателей агрессивности у обеих линий и данные по двум контрольным группам были суммированы. Белые столбики - интактные мыши и мыши с неонатальной болевой стимуляцией, штрихованные - неонатальное введение буспирона. * - достоверно отличается от показателя контрольной группы при $p < 0.05$.

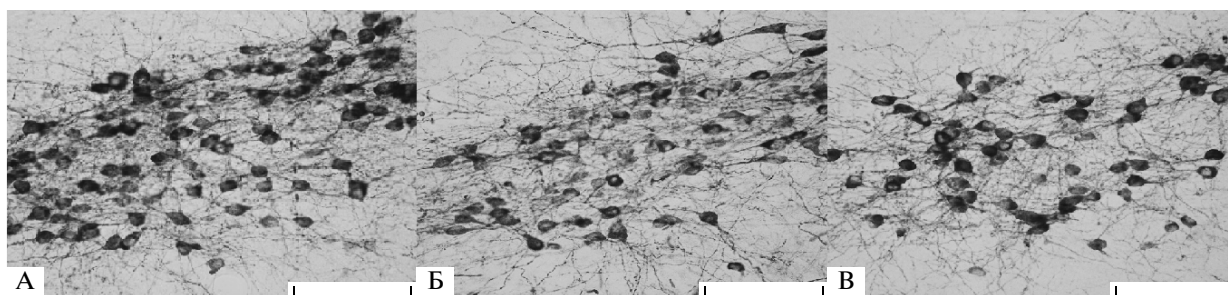


Рис. 6. Микрофотографии zona incerta промежуточного мозга взрослых мышей линии 101/НУ: А - неонатальное введение АКТГ₄₋₁₀; Б - контроль; В - неонатальное введение семакса. Масштаб - 1 мм.

шей, проведенный методом оптического диссектора, показал генотип-зависимое увеличение их количества (рис. 7). Неонатальный АКТГ₄₋₁₀ (который вводили только мышам линии 101/НУ) увеличил их число, а семакс (у линий 101/НУ, СВА и DBA/2J), напротив, достоверно снизил (Бояршинова и др., 2004б). Следует отметить, что указанное влияние неонатального введения пептидов на число нейронов сказывается, по-видимому, лишь на катехоламинергические нейроны, поскольку иммуногистохимическая окраска на триптофангидроксилазу не выявила эффекта неонатальных воздействий - различий между интактными и в числе серотонинергических нейронов ядер шва (данные не приводятся) не было.

Исследования пролиферативной активности в зубчатой фасции гиппокампа

Используя иммуногистохимический метод окрашивания срезов мозга на маркер делящихся клеток Ki67, было показано, что неонатальное введение и семакса, и L-NAME детенышам мышей (линии 101/НУ и СЗН) и крыс (КМ и Вистар) приводит к усилению нейрогенеза в пролиферативной зоне зубчатой фасции гиппокампа (рис. 8). На сре-

зах мозга мышей, получавших инъекции семакса, было обнаружено достоверное увеличение числа клеток, иммунопозитивных к Ki67, по сравнению с контрольными животными (табл. 3). В таблице приведены данные по нескольким сериям экспериментов, которые различались сроками введения семакса. За исключением серии 1 перфузия мозга производилась спустя 7-10 дней после окончания инъекций, из чего можно заключить, что стимулирующий деление клеток эффект семакса продолжался и после прекращения его введения. Кроме того, в мозге мышей СЗН (серия 3) оценили экспрессию даблкортина, белка, который экспрессируется в нейробластах. Подсчет клеток (табл. 3) показал, что введение семакса вызвало достоверное увеличение числа нейробластов, из чего следует, что введение семакса усиливает и собственно нейрогенез. Неонатальное введение L-NAME мышам обеих линий также увеличивало число делящихся клеточных элементов в этой зоне мозга, что можно было обнаружить спустя разные сроки после прекращения воздействий (данные не приводятся). Усиление пролиферативной активности в рамках проведенных экспериментов не обнаружило межлинейных различий в своей интенсивности.

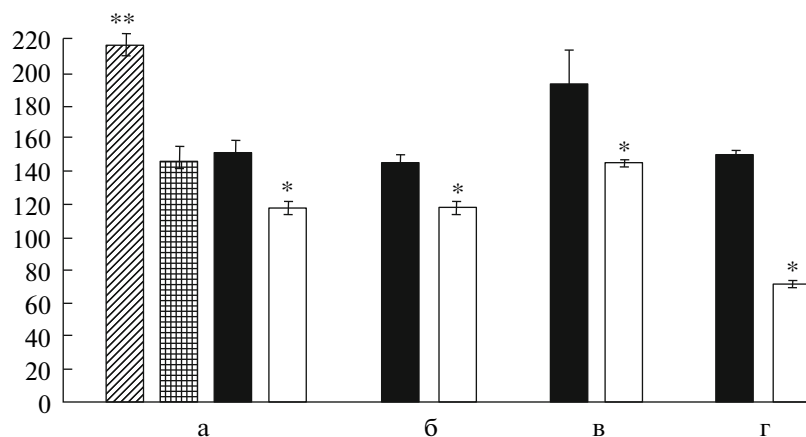


Рис. 7. Средние величины количества клеток, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе, в *zona inserta* промежуточного мозга мышей (подсчет методом оптического дисектора). а – 4-мес. мыши линии 101/НУ; б – 3-нед. мыши линии DBA/2; в – 4-мес. мыши DBA/2; г – 4-мес. мыши линии СЗН. Черные столбики – контроль (неонатальные инъекции растворителя); двойная штриховка – контроль (хэндлинг); штриховка – неонатальное введение АКТГ₄₋₁₀; белые столбики – неонатальное введение семакса (см. подпись к рис. 1). *, ** – различия достоверны при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно. По оси ординат – число клеток, содержащих тирозин-гидроксилазу (Бояршинова и др., 2004).

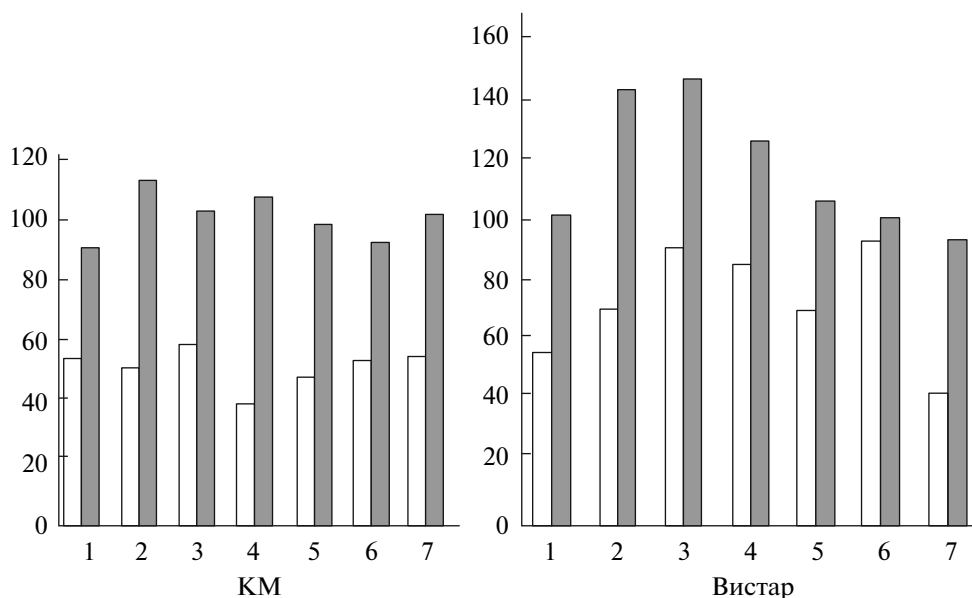


Рис. 8. Число клеток, иммунопозитивных к Ki67, в зубчатой фасции взрослых крыс линии KM и Вистар. Белые столбики – интактные животные, серые – неонатальное введение семакса. По оси ординат – число клеток, по оси абсцисс – данные по отдельным животным.

Введение семакса и L-NAME новорожденным крысам также усилило пролиферативную активность в субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа более поздние периоды жизни. Как и в опытах с мышами, у крыс обеих линий число новых клеток в данной области мозга было достоверно больше, чем в контрольной группе (рис. 8). Влияние введения этих препаратов (данные по L-NAME не приводятся) было отмечено и через 2 недели после окончания введения препаратов (Тимошенко и др., 2009б). Если активирующее пролиферацию влияние ингибитора NO-синтазы

было описано и ранее (Peunova et al., 2001), то такой же эффект семакса был получен впервые.

В наших экспериментах не было обнаружено существенных различий в уровне активирующего эффекта неонатального введения семакса на клеточную пролиферацию в зубчатой фасции гиппокампа между крысами линий KM и Вистар и между мышами линий 101/НУ и СЗН. Однако в эффекте увеличения числа катехоламинергических нейронов в *zona incerta* мозга мышей разных линий, также показанном в нашей работе, межлинейные различия были обнаружены.

Таблица 3. Число пролиферирующих клеток в субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа мышей линий 101/НУ и СЗН после неонатального введения семакса. Иммуногистохимическая окраска на антитела к Ki67 и на даблкортин (последняя строка), среднее число клеток на срезе по группе

Линия	№ серии, возраст инъекций (дни жизни)	Семакс	Контроль
101/НУ	1. 5 – 10	153.5 ± 13.6*	109.3 ± 2.7
	2. 7 – 11	35.8 ± 1*	26.2 ± 2.1
	3. 7 – 11	53.2 ± 0.5*	38.8 ± 2.8
	4. 11 – 15	30.1 ± 2**	11 ± 1.3
СЗН	1. 5 – 11	135.1 ± 5.4*	116.6 ± 1.6
	2. 7 – 11	47.7 ± 1.6*	32 ± 2.9
	3. 10 – 14	31.3 ± 2.5**	22.9 ± 0.9
	4. 16 – 20	50 ± 0.2*	35.8 ± 1
СЗН (DCX)	3. 10 – 14	36 ± 2.8*	21.8 ± 1.2

* – достоверно отличается от значений контрольной группы при $p < 0.05$; ** – при $p < 0.01$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование физиологических реакций и поведения мышей и крыс разных генотипов после неонатальных воздействий выявило различия как в знаке, так и в степени выраженности изменений, ими вызываемых. Это может означать, что непосредственной причиной изменений функций ЦНС во взрослом возрасте после неонатальных воздействий могут быть сложные по своим механизмам и зависящие от генетических особенностей особи изменения в созревании ЦНС. Подобные эффекты, как упоминалось выше, могут объясняться особенностями режима работы мембранных рецепторов ЦНС в ранние периоды развития (Slotkin, 1998).

Предрасположенность к аудиогенной эпилепсии, как у мышей, так и у крыс, определяется морфо-физиологической организацией нейронных сетей нижнего и верхнего двухолмия, черной субстанции и других структур ствола мозга. В реализации аудиогенного судорожного припадка важная роль принадлежит глутаматергической, ГАМК-ергической, также катехоламинергической систем (Faingold, 1999).

Разное участие пуринаргической системы в цепи процессов, определяющих генез АП (влияние неонатально введенного кофеина) у мышей двух генотипов указывает на возможное участие в них именно пуринаргического звена. Введение кофеина было испытанным методическим приемом усугубления тяжести АП у крыс линии КМ, причем, по предположению Л.В. Крушинского, это усиление связывали не с ослаблением тормозных “резервов” ЦНС, а с усилением процесса возбуждения (Семиохина и др., 2006). Однако это предположение, по-видимому, не может быть справедливым для аудиогенных припадков у мышей. В наших экспериментах неонатальное введение кофе-

ина вызвало отчетливое усиление тяжести припадка только у мышей линии 101/НУ, но мало изменило этот признак у линии DBA, хотя, животные этого генотипа находились на “пике” предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. Пуринаргическая система мозга влияет на функционирование глутаматергических структур (Dall’Igna et al., 2003), участвующих в формировании аномальной реакции на звук у грызунов (Sakamoto et al., 2002), и дофаминергических структур, модулирующих аудиогенную эпилепсию (Dassesse et al., 1999). Эффекты агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов на аудиогенные судороги у мышей DBA при непосредственном введении были описаны подробно (Maxson et al., 1977). Так, например, введение ингибитора синтеза глюкокортикоидов – метопирона – предотвращает формирование предрасположенности к аудиогенным судорогам у мышей линии C57BL/, тогда как на мышей DBA данный препарат не влияет. Это свидетельствует о различии в механизмах аудиогенной эпилепсии у мышей разного генотипа.

Аудиогенная эпилепсия, как дискретный патологический признак, наиболее характерна для ЦНС грызунов, возможно, в силу особенностей организации периферического и центрального отделов их слуховой системы (Семиохина и др., 2006). Характерная для этих судорог фаза двигательного возбуждения, является, по всей видимости, проявлением и гипертрофированной реакции бегства в ответ на сильный стимул, так и начавшимся распространением судорожного разряда на нейронные сети, отвечающие за движения бега. Подтверждением такого предположения является отдаленный эффект неонатального введения противосудорожного агента леветирацитама, при котором у крыс в возрасте 1–1.5 мес. аудиогенных судорог в ответ на звук не формируется, однако

стартл-реакция (вздрагивание на акустический стимул) оказывается гипертрофированной.

Было показано (Chen et al., 1976), что аудиогенные судороги, вызванные у взрослых мышей процедурой “прайминга” (воздействию звука в раннем возрасте) оказались чувствительными к действию морфина и налоксона. Это позволило сопоставить особенности АП после неонатальных воздействий с развитием и модуляцией в онтогенезе болевой чувствительности.

Влияние антидепрессантов на поведение мышей, в том числе и на их агрессивность связано с функцией серотонинергической системы (Sanchez et al., 1993; Liang et al., 2003). Зависимые от генотипа эффекты неонатального введения антидепрессанта буспирона на уровень межсамцово́й агрессии у взрослых самцов, показанные в наших экспериментах, могут свидетельствовать о различиях в функции серотонинергической системы у использованных линий, или же о различиях в сроках их формирования.

Объяснение изменений в уровне болевой чувствительности взрослых животных после неонатальной болевой стимуляции и “компенсаторное” ее снижение, если в этом возрасте вводили семакс, следует искать на пути анализа формирования мозгового субстрата болевой чувствительности. Оно происходит с участием ряда нейротрансмиттерных систем, в частности опиоидной и ГАМК-ергической (Koch et al., 2008). Наши эксперименты показали, что проявление таких эффектов может зависеть как от генотипических особенностей, так и от пола, причем половые различия выявлены и у человека (Rasakham, Chen, 2011).

Существуют данные об участии дофаминергических структур таламуса и ствола мозга в модуляции болевой чувствительности (Gao et al., 2011). Они важны для интерпретации результатов, полученных в наших экспериментах, в которых показано, что после неонатального введения АКТГ4-10 уменьшается количество катехоламинергических нейронов в *zona incerta* (Шилова и др. 2000; Бояршинова и др., 2004б), являющемся частью ноцицептивной системы мозга (Murray et al., 2009). Недавно стало известно, что интенсивность постнатального нейрогенеза в области таламуса может модулироваться нейротрофинами (Mooney, Miller, 2011), что в свою очередь может, быть причиной показанного нами изменения числа нейронов в *zona incerta*.

Усиление пролиферативной активности после неонатальных инъекций семакса, показанное в наших исследованиях, может иметь общие причины с модуляцией некоторых реакций в тестах на исследовательское поведение и поведение, связанное со страхом и тревогой, чему имеются подтверждения в литературе (Vozdagi et al., 2008). Одной из таких причин может быть, например, изменения в продукции BDNF, как результата введения семакса (Shadrina et al., 2010).

Можно также полагать, что непосредственной мишенью влияний, вызванных вмешательством в ход развития ЦНС, является активность сигнальных путей в нейронах разной “эргичности” в период активной дифференцировки нейронов (см., напр., Wang et al., 2008). Это утверждение выглядит достаточно общим, однако сам факт модуляции поведения взрослых мышей и крыс как результат неонатальных инъекций биологически активных веществ разных категорий, заставляет предполагать, что ранний постнатальный онтогенез — это стадия развития ЦНС, в течение которой становление связей и эргичности нейронов может быть легко изменено (Crews, 2008).

Поскольку считается, что первая декада постнатального онтогенеза грызунов соответствует уровню развития плода человека на последнем триместре беременности, наши данные могут свидетельствовать о важности проблемы отдаленных последствий неонатальных воздействий для здоровья человека. Опасность воздействий на развивающийся плод человека, связанных, например, с приемом матерью фармакологических препаратов из групп наркотических средств и/или антидепрессантов, обсуждается клиницистами (Slotkin, 1998; Vorhees, 1994). При этом речь идет не о непосредственных токсических эффектах или тератогенности таких агентов. Данный феномен заслуживает особого внимания нейробиологов. Изменения функции ЦНС в период времени, достаточно отдаленный от неонатального, проявляются как отклонения в поведении, в изменениях болевой чувствительности и др. (Porter, 1999; Puchalski, Hummel, 2002).

Таким образом, мы можем утверждать, что неонатальное введение большого ряда биологически активных веществ, а также болевая стимуляция в неонатальный период, могут иметь отдаленные последствия, которые выражаются у взрослых животных в виде изменений физиологических реакций и поведения, а также морфологических характеристик мозга. И если в литературе имеется огромное количество свидетельств наличия подобных отдаленных эффектов, существование генетических особенностей их реализации достаточно подробно проиллюстрировано в нашей работе, начало которой было положено предположением, которое около 20 лет назад сделал Л.И. Корочкин. Механизмы этого феномена и его зависимость от генотипа следует искать на пути молекулярно-генетического анализа онтогенеза мозга.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 01-04-48289а, № 07-04-01287, № 09-04-00481а, 09-04-13868-офи_ц), грантом РГНФ № 06-06-00351а, а также Государственным контрактом П720 Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 год”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев В.В., Кошелев В.Б., Ковалев Г.И., Полетаева И.И.* Влияние неонатальных воздействий на болевую и аудиогенную чувствительность и на содержание моноаминов в мозге взрослых крыс // *Онтогенез*. 2003а. Т. 34. № 6. С. 464–471.
- Алексеев В.В., Салонин Д.В., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* Пороги болевой чувствительности у взрослых крыс трех генотипов после болевой стимуляции в неонатальный период жизни // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2003б. Т. 135. № 4. С. 388–389.
- Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М. и др.* Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: Наука, 1983. С. 172.
- Бояришинова О.С., Шилова О.Б., Маркина Н.В. и др.* Генотип-зависимые изменения порогов болевой чувствительности у взрослых мышей после неонатальных воздействий // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2004а. Т. 137. № 6. С. 532–535.
- Бояришинова О.С., Ревизиц А.В., Полетаева И.И., Корочкин Л.И.* Неонатальное введение АКТГ4-10 и его аналога Семакса детенышам лабораторной мыши модулирует число катехоламинергических нейронов в промежуточном мозге // *ДАН*. 2004б. Т. 396. С. 181–183.
- Бояришинова О.С., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Аудиогенная эпилепсия у молодых мышей разных линий после неонатального введения семакса // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2008. Т. 145. № 7. С. 94–97.
- Дубынин В.А., Малиновская И.В., Ивлева Ю.А. и др.* Зависимость отставленных поведенческих эффектов бета-казоморфина-7 от возраста и пола детенышей белых крыс // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2001. Т. 130. № 11. С. 488–492.
- Корогодина Ю.В., Сьяксте Т.Г.* Мыши линии 101/НУ – возможная модель болезней человека, связанных с хромосомной нестабильностью // *Генетика*. 1981. Т. 17. № 5. С. 915–919.
- Маркина Н.В., Шилова О.Б., Перепелкина О.В. и др.* Неонатальное введение буспилона изменяет межсамцовую агрессивность у взрослых мышей // *ДАН*. 2004. Т. 396. № 2. С. 1–3.
- Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Бизикоева Ф.З. и др.* Неонатальное введение буспилона изменяет межсамцовую агрессивность у взрослых мышей // *Журн. высш. нервн. деят.* 2006. Т. 56. № 4. С. 491–498.
- Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Полетаева И.И.* Отдаленные последствия неонатального введения кофеина и пирacetama на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии у мышей трех генотипов // *Журн. высш. нервн. деят.* 2006. Т. 58. № 3. С. 424–431.
- Полетаева И.И., Лильп И.Г., Ирисова О.А. и др.* Необычный тип локомоции у мышей линии 101/НУ // *Генетика*. 1992. Т. 28. № 12. С. 147–149.
- Полетаева И.И., Шилова О.Б., Корочкин Л.И.* Действие АКТГ₄₋₁₀ на поведение мышей различных инбредных линий // *Онтогенез*. 1996а. Т. 27. № 4. С. 294–299.
- Полетаева И.И., Лильп И.Г., Бизикоева Ф.З. и др.* Аудиогенная эпилепсия у мышей линии 101/НУ в разные периоды онтогенетического развития // *Онтогенез*. 1996б. Т. 27. № 3. С. 222–231.
- Савина Т.А., Федотова И.Б., Семиохина А.Ф. и др.* Отставленные эффекты раннего постнатального введения эпифизарного гормона мелатонина на аудиогенные судороги крыс линии Крушинского-Молодкиной // *Журн. высш. нервн. деят.* 2005. Т. 55. № 1. С. 117–125.
- Салонин Д.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Влияние неонатального введения кетамина на болевую чувствительность и аудиогенные судорожные припадки взрослых крыс // *Журн. высш. нервн. деят.* 2004. Т. 54. № 2. С. 277–282.
- Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И.* Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения // *Журн. высш. нервн. деят.* 2006. Т. 56. № 2. С. 249–267.
- Тимошенко Т.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Аудиогенная эпилепсия у крыс разных генотипов после неонатальных воздействий, усиливающих нейрогенез в зубчатой фасции // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2009а. Т. 147. № 4. С. 458–461.
- Тимошенко Т.В., Ревизиц А.В., Павлова Г.В. и др.* Влияние неонатального введения нейропептида семакса на пролиферативную активность клеток в зубчатой фасции гиппокампа крыс двух генотипов // *ДАН*. 2009б. Т. 424. С. 78–80.
- Тимошенко Т.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др.* Аудиогенная эпилепсия у крыс разных генотипов после неонатальных воздействий, усиливающих нейрогенез в зубчатой фасции // *Бюлл. exper. биол. мед.* 2009а. Т. 147. № 4. С. 458–461.
- Шилова О.Б., Орлова Е.О., Ковалев Г.И. и др.* Неонатальное введение АКТГ4-10 вызывает зависимые от генотипа изменения уровней мозговых моноаминов, количества катехоламинергических нейронов в зона incerta гипоталамуса и аудиогенной чувствительности у взрослых мышей линий СВА И 101/НУ // *Генетика*. 2000. Т. 36. № 11. С. 1507–1514.
- Шилова О.Б., Маркина Н.В., Перепелкина О.В. и др.* Неонатальные инъекции препарата семакс и физиологического раствора вызывают изменения поведения взрослых мышей разных генотипов в тесте “открытое поле” // *Журн. высш. нервн. деят.* 2004. Т. 54. № 6. С. 785–794.
- Agrawal A.K., Shapiro B.H.* Neonatal phenobarbital imprints overexpression of cytochromes P450 with associated increase in tumorigenesis and reduced life span // *FASEB J*. 2005. V. 19. № 3. P. 470–472.
- Ammassari-Teule M., Fagioli S., Maritati M. et al.* Chronic administration of phosphatidylserine during ontogeny enhances subject-environment interactions and radial maze performance in C57BL/6 mice // *Physiol. Behav.* 1990. V. 47. № 4. P. 755–760.
- Anand K.J., Bhutta A.T.* Vulnerability of the developing brain. Neuronal mechanisms // *Clin. Perinatol.* 2002. V. 29. № 3. P. 357–372.
- Bozdagi O., Rich E., Tronel S., Sadahiro M. et al.* The neurotrophin-inducible gene Vgf regulates hippocampal function and behavior through a BDNF-dependent mechanism // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 39. P. 9857–9869.
- Brown R.W., Perna M.K., Schaefer T.L. et al.* The effects of adulthood nicotine treatment on D2-mediated behavior and neurotrophins of rats neonatally treated with quinpirole // *Synapse*. 2006. V. 59. № 5. P. 253–259.

- Chen C.S., Gates G.R., Reynoldson J.A. Effect of morphine and naloxone on priming-induced audiogenic seizures in BALB/c mice // *Br. J. Pharmacol.* 1976. V. 58. P. 517–520.
- Cohen M.A., Skelton M.R., Schaefer T.L. et al. Learning and memory after neonatal exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rats: interaction with exposure in adulthood // *Synapse.* 2005. V. 57. P. 148–159.
- Costei A.M., Kozer E., Ho T. et al. Perinatal outcome following third trimester exposure to paroxetine // *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2002. V. 156. P. 1129–1132.
- Counotte D.S., Spijker S., Van de Burgwal L.H. et al. Long-lasting cognitive deficits resulting from adolescent nicotine exposure in rats // *Neuropsychopharm.* 2009. V. 34. P. 299–306.
- Crews D. Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology // *Front Neuroendocrinol.* 2008. V. 29. № 3. P. 344–357.
- Dall'Igna O.P., Da Silva A.L., Dietrich M.O. et al. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice // *Psychopharmacology.* 2003. V. 166. № 3. P. 258–263.
- D'Amato F.R., Mazzacane E., Capone F. et al. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice // *Physiol. Behav.* 2001. V. 66. № 4. P. 627–637.
- Dassesse D., Vanderwinden J.M., Goldberg I. et al. Caffeine-mediated induction of c-fos, zif-268 and arc expression through A1 receptors in the striatum: different interactions with the dopaminergic system // *Eur. J. Neurosci.* 1999. V. 11. № 9. P. 3101–3114.
- Faingold C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat // *Adv. Neurol.* 1999. V. 79. P. 311–321.
- File S.E., Tucker J.C. Prenatal treatment with clomipramine has an anxiolytic profile in the adolescent rat // *Physiol. Behav.* 1983. V. 31. № 1. P. 57–61.
- Fitzgerald M., Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects // *Neurosci.* 2001. V. 7. № 3. P. 246–257.
- Gao H.-R., Shi T.-F., Yang C.-X. et al. The effect of dopamine on pain-related neurons in the parafascicular nucleus of rats // *J. Neur. Transmis.* 2010. V. 117. № 5. P. 585–591.
- Guillet R. Neonatal caffeine exposure alters seizure susceptibility in rats in an age-related manner // *Brain Res., Dev. Brain Res.* 1995. V. 89. № 1. P. 124–128.
- Grunau R. Early pain in preterm infants. A model of long-term effects // *Clin. Perinatol.* 2002. V. 29. № 3. P. 373–394.
- Henry K.R. Audiogenic seizure susceptibility induced in C57B1/6J mice by prior auditory exposure // *Science* 1967. V. 158. P. 938–940.
- Kaindl A.M., Ikonomidou C. Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain // *Neurotox. Res.* 2007. V. 11. № 3–4. P. 203–218.
- Koch S.C., Fitzgerald M., Hathway G.J. Midazolam potentiates nociceptive behavior, sensitizes cutaneous reflexes, and is devoid of sedative action in neonatal rats // *Anesthes.* 2008. V. 108. № 1. P. 122–129.
- Kuznetsova G.D., Petrova E.V., Coenen A.M. et al. Generalized absence epilepsy and catalepsy in rats // *Physiol. Behav.* 1996. V. 60. № 4. P. 1165–1169.
- Liang J., Wang X., Lu Y. et al. Effects of antidepressants on the exploration, spontaneous motor activity and isolation-induced aggressiveness in mice // *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2003. V. 35. № 1. P. 54–60.
- Loepke A.W., Istaphanous G.K., McAuliffe J.J. et al. The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory // *Intern. Anesth. Res. Soc.* 2009. V. 108. № 1. P. 90–104.
- Maxson S.C., Sze P.Y. Glucocorticoids and development of audiogenic seizure susceptibility in DBA/1B mice // *Behav. Genet.* 1977. V. 7. P. 323–326.
- McGivern R.F., Rose G., Berka C. et al. Neonatal exposure to a high level of ACTH4-10 impairs adult learning performance // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1987. V. 27. № 1. P. 133–142.
- Maguire J., Mody I. GABAAR plasticity during pregnancy: relevance to postpartum depression // *Neuron.* 2008. V. 59. P. 207–213.
- Maple A.M., Perna M.K., Joshua P. et al. Ontogenetic quinpirole treatment produces long-lasting decreases in the expression of Rgs9, but increases Rgs17 in the striatum, nucleus accumbens and frontal cortex // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 26. № 9. P. 2532–2538.
- Maxson S.C., Sze P.Y. Glucocorticoids and development of audiogenic seizure susceptibility in DBA/1B mice // *Behav. Genet.* 1977. V. 7. № 4. P. 323–326.
- Mehta M., Ahmed Z., Fernando S.S. et al. Plasticity of 5-HT_{1A} receptor-mediated signaling during early postnatal brain development // *J. Neurochem.* 2007. V. 101. № 4. P. 918–928.
- Middaugh L.D., Boggan W.O., Shepherd C.L. Prenatal ethanol effects and dopamine systems of adult C57 male mice // *Neurotoxicol. Teratol.* 1994. V. 16. № 2. P. 207–212.
- Midzyanovskaya I.S., Kuznetsova G.D., Vinogradova L.V. et al. Mixed forms of epilepsy in a subpopulation of WAG/Rij rats // *Epilepsy Behav.* 2004. V. 5. № 5. P. 655–661.
- Mooney S.M., Miller M.W. Role of neurotrophins on postnatal neurogenesis in the thalamus: prenatal exposure to ethanol // *Neurosci.* 2011. Jan 25 [Epub ahead of print].
- Morford L.L., Inman-Wood S.L., Gudelsky G.A. et al. Impaired spatial and sequential learning in rats treated neonatally with D-fenfuramine // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 16. P. 491–500.
- Mothes H.K., Opitz B., Werner R. et al. Effects of prenatal ethanol exposure and early experience on home-cage and open-field activity in mice // *Neurotoxicol. Teratol.* 1996. V. 18. № 1. P. 59–65.
- Murray P.D., Masri R., Keller A. Abnormal anterior pretectal nucleus activity contributes to central pain syndrome // *J. Neurophysiol.* 2009. V. 102. P. 181–191.
- Noorlander C.W., Ververs F.F.T., Nikkels P.G.J. et al. Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities // *PLoS ONE.* 2008. V. 3. № 7. P. e2782.
- Peters J.W., Schouw R., Anand K.J. et al. Does neonatal surgery lead to increased pain sensitivity in later childhood? // *Pain.* 2005. V. 114. № 3. P. 444–454.
- Peunova N., Scheinker V., Cline H. et al. Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 22. P. 8809–8818.
- Pick C.G., Cooperman M., Trombka D. et al. Hippocampal cholinergic alterations and related behavioral deficits after early exposure to ethanol // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1993. V. 11. № 3. P. 379–385.

- Porter F.L., Grunau R.E., Anand K.J. Long-term effects of pain in infants // *J. Dev. Behav. Pediatr.* 1999. V. 20. № 4. P. 253–261.
- Puchalski M., Hummel P. The reality of neonatal pain // *Adv. Neon. Care.* 2002. V. 5. P. 233–244.
- Rasakham K., Liu-Chen L.Y. Sex differences in kappa opioid pharmacology // *Life Sci.* 2011. V. 88. № 1–2. P. 2–16.
- Sakamoto T., Mishina M., Niki H. Mutation of NMDA receptor subunit epsilon 1: effects on audiogenic-like seizures induced by electrical stimulation of the inferior colliculus in mice // *Mol. Brain Res.* 2002. V. 102. № 1–2. P. 113–117.
- Sánchez C., Arnt J., Hyttel J. et al. The role of serotonergic mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice // *Psychopharm. (Berl.)* 1993. V. 110. № 1–2. P. 53–59.
- Shadrina M., Kolomin T., Agapova T. et al. Comparison of the temporary dynamics of NGF and BDNF gene expression in rat hippocampus, frontal cortex, and retina under Semax action // *J. Mol. Neurosci.* 2010. V. 41. № 1. P. 30–35.
- Shibuya T., Watanabe Y., Hill H.F. et al. Developmental alterations in maturing rats caused by chronic prenatal and postnatal diazepam treatments // *Jpn. J. Pharmacol.* 1986. V. 40. № 1. P. 21–29.
- Schroeder H., Humbert A.-C., Desor D. et al. Long-term consequences of neonatal exposure to diazepam on cerebral glucose utilization, learning, memory and anxiety // *Brain Res.* 1997. V. 766. № 1–2. P. 142–152.
- Slotkin T.A. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? // *JPET.* 1998. V. 285. № 3. P. 931–945.
- Táira T., Porkka-Heiskanen T., Korpi E.R. Neonatal administration of a GABA-T inhibitor alters central GABAA receptor mechanisms and alcohol drinking in adult rats // *Psychopharm. (Berl.)* 1992. V. 109. № 1–2. P. 191–197.
- Táira T., Uusi-Oukari M., Korpi E.R. Early postnatal treatment with muscimol transiently alters brain GABA-A receptors and open-field behavior in rat // *Eur. J. Pharmacol.* 1993. V. 230. № 3. P. 307–312.
- Tchekalarova J., Kubová H., Mares P. Effects of postnatal caffeine exposure on seizure susceptibility in developing rats // *Brain Res.* 2007. V. 1150. P. 32–39.
- Wang C.Z., Yang S.F., Xia Y. et al. Postnatal phencyclidine administration selectively reduces adult cortical parvalbumin-containing interneurons // *Neuropsychopharm.* 2008. V. 33. P. 2442–2455.
- Williamsa M.T., Blankenmeyer T.L., Schaefer T.L. et al. Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure in rats on spatial learning in the Barnes maze and on cliff avoidance, corticosterone release, and neurotoxicity in adulthood // *Dev. Brain Res.* 2003. V. 147. P. 163–175.
- Williamsa M.T., Moran M.S., Vorhees C.V. Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2004. V. 22. № 5–6. P. 273–283.
- Venerosi A., Calamandrei G., Alleva E. Animal models of anti-HIV drugs exposure during pregnancy: effects on neurobehavioral development // *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psych.* 2002. V. 26. № 4. P. 747–761.
- Venerosi A., Cutuli D., Colonnello V. et al. Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood // *Neurotoxicol. Teratol.* 2008. V. 30. № 6. P. 468–474.
- Viggedal G., Hagberg B.S., Laegreid L. et al. Mental development in late infancy after prenatal exposure to benzodiazepines—a prospective study // *J. Child Psychol. Psych.* 1993. V. 34. № 3. P. 295–305.
- Vorhees C.V. Developmental neurotoxicity induced by therapeutic and illicit drugs // *Env. Health Persp.* 1994. V. 102. Suppl. 2. P. 145–153.
- Vorhees C.V., Schaefer T.L., Skelton M.R. et al. (+/–) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) dose-dependently impairs spatial learning in the Morris water maze after exposure of rats to different five-day intervals from birth to postnatal day twenty // *Dev. Neurosci.* 2009. V. 31. № 1–2. P. 107–120.

Neonatal Injections of Pharmacological Agents and Their Remote Genotype-Dependent Effects in Mice and Rats

I. I. Poletaeva^a, O. V. Perepelkina^a, O. S. Boyarshinova^a, I. G. Lil'p^a, N. V. Markina^a,
T. V. Timoshenko^a, and A. V. Revishchin^b

^a Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^b Institute for Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova street 34/5, Moscow, 119334 Russia

e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Abstract—Experimental data were reviewed which demonstrated that the neonatal injection effects of certain biologically active drugs (ACTH_{4–10} fragment and its analogue Semax, piracetam, caffeine, levetiracetam, busperone, etc.) could be detected in adult animals as changes in physiological and behavioral reactions and in several morphological traits as well. Audiogenic seizures proneness, anxiety-fear and exploration behavior as well as pain sensitivity were analyzed. The remote effects discovered were either similar in direction to those applied to an adult organism, or opposite to it. Pharmacological treatments of such type presumably interfere the CNS development during early postnatal ontogeny and change the normal pattern of brain development. These modulatory influences could be due to changes in neurotransmitter system development and are presumably capable to induce CNS morphological deviations (numbers of neurons, adult neurogenesis).

Keywords: ontogeny, neonatal treatment, genotype, audiogenic epilepsy, pain sensitivity, anxiety, exploration behavior, mice, rats.