Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
"Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского"

На правах рукописи

ЖУРАВЛЕВА ЗОЯ ДМИТРИЕВНА

РОЛЬ ГЛИЦИНЭРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕОПТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ПОВЕДЕНИЯ САМЦОВ КРЫС

Специальность - 1.5.5 – физиология человека и животных
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., проф. И.В. Мухина

Нижний Новгород – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ…… **6**

Введение……..…… **7**

Глава 1. Обзор литературы……..…… 14

1.1 МПО гипоталамуса в регуляции различных видов поведения……... 14

1.1.1 Роль МПО гипоталамуса в регуляции полового поведения ……..…. 16

1.1.2 Роль МПО гипоталамуса в регуляции социального поведения…….. 24

1.1.3 Роль МПО гипоталамуса в регуляции тревожности……. 27

1.2 Нейромедиаторная регуляция поведения…….……. 30

1.2.1 Нейромедиаторы МПО гипоталамуса, участвующие в регуляции полового поведения……..…. 30

1.2.2 Нейромедиаторы МПО гипоталамуса, участвующие в регуляции социального взаимодействия и тревожности…….....……..... 35

1.3 Глициновые рецепторы в центральной нервной системе……..…… 36

1.4 Глициновые рецепторы в МПО……...…….. 41

1.5 Различия в половом поведении, социальном взаимодействии и тревожности между стоками Sprague Dawley и Wistar…….…..…. 42

Глава 2. Материалы и методы……. 46

2.1 Регистрация параметров активности нейронов МПО методом perforated patch-clamp…… 46

2.1.1 Приготовление препаратов диссоциированных клеток……..…… 47

2.1.2 Электрофизиологическая регистрация активности нейронов…….... 48

2.1.3 Используемые растворы для перфузии диссоциированных клеток МПО……...… 48

2.1.4 Схема эксперимента…… 49

2.1.5 Анализ данных и статистическая обработка результатов……..…. 50

2.2 Регистрация полового поведения, социального взаимодействия и тревожности……. 51

2.2.1 Подготовительные процедуры на крысах-самцах …….……. 51

2.2.2 Гистологический контроль……..…… 54
2.2.3 Регистрация полового поведения самцов……. 55
2.2.3.1 Экспериментальные животные…….….. 55
2.2.3.2 Общая схема эксперимента…….. 56
2.2.3.3 Регистрация параметров полового поведения животных…….. 58
2.2.3.4 Подготовительные процедуры на крысах-самках ……..... 61
2.2.3.5 Анализ данных и статистическая обработка результатов……. 62
2.2.4 Регистрация социального взаимодействия самцов……..…. 63
2.2.4.1 Экспериментальные животные……..... 63
2.2.4.2 Схема установки для исследования социального поведения…… 64
2.2.4.3 Дизайн исследования социального взаимодействия в тесте Кроули 65
2.2.4.4 Регистрируемые параметры в тесте Кроули …….. 67
2.2.4.5 Статистический анализ результатов теста Кроули …….….. 67
2.2.5 Регистрация тревожности самцов…….. 68
2.2.5.1 Экспериментальные животные…….. 68
2.2.5.2 Схема установки «Открытое поле» ……..…….. 68
2.2.5.3 Дизайн тестирования животных в установке «открытое поле»…… 69
2.2.5.4 Регистрируемые параметры в тесте «открытое поле»……..…….. 70
2.2.5.5 Статистический анализ результатов теста «открытое поле»…..…… 71
Глава 3. Результаты и обсуждение……..……..…. 72
3.1 Анализ концентрационной зависимости действия стрихнина как антагониста глициновых и (или) ГАМК-рецепторов на изолированных нейронах МПО……..……..... 71
3.1.1 Регистрация ответов нейронов МПО на аппликацию ГАМК и стрихнина……..…… 71
3.1.2 Обсуждение полученных результатов……..……. 77
3.2 Поведение интактных крыс-самцов Sprague Dawley и Wistar…….…….. 78
3.2.1 Половое поведение интактных крыс……..……. 78
3.2.2 Поведение интактных крыс-самцов в тесте Кроули……..... 82

3.2.3 Поведение интактных крыс-самцов в тесте «открытое поле»…….. 84
3.2.1.3 Обсуждение полученных результатов…… 87
3.3 Изучение роли глицинэргической передачи в поведении крыс-самцов различных стоков……..…… 88
3.3.1 Анализ параметров полового поведения крыс самцов……. 89
3.3.1.1 Половое поведение крыс-самцов Sprague Dawley при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО……. 89
3.3.1.2 Половое поведение крыс-самцов Wistar при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО……..... 94
3.3.1.3 Обсуждение полученных результатов…… 99
3.3.2 Анализ параметров поведения крыс-самцов в тесте Кроули……..... 100
3.3.2.1 Поведение крыс-самцов Sprague Dawley в тесте Кроули при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО……. 100
3.3.2.2 Поведение крыс-самцов Wistar в тесте Кроули при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО…… 103
3.3.2.3 Обсуждение полученных результатов……. 105
3.3.3 Анализ параметров поведения крыс-самцов в тесте «открытое поле»…… 106
3.3.3.1 Поведение крыс-самцов Sprague Dawley в тесте «открытое поле» при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО……. 106
3.33.2 Поведение крыс-самцов Wistar в тесте «открытое поле» при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО…… 109
3.3.3.3 Обсуждение полученных результатов…… 112
3.4 Сравнительный анализ влияния фармакологической активации и блокады глициновых рецепторов МПО на параметры поведения самцов крыс стоков Wistar и Sprague Dawley……..…….. 112
3.4.1 Половое поведение…… 112
3.4.2 Тест Кроули ……. 118
3.4.3 Тест «открытое поле»…….. 120

3.4.2.4 Обсуждение результатов……..... 124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……... 128
ВЫВОДЫ……..… 130
Список цитированной литературы…… 132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Egr1 – (early growth response 1), белок раннего ответа роста, также известный как Zif268 zinc finger protein 268

BNST – опорное ядро терминального тяжа

MOR - мю-опиоидные рецепторы

MPOl – латеральная часть медиального преоптического ядра

MPOm – медиальная часть медиального преоптического ядра

MPOc – центральная часть медиального преоптического ядра

NAc – прилежащее ядро

NMDA-рецептор – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

NO – Оксид азота

NOS – синтаза оксида азота

nPGi – парагигантоклеточное ядро продолговатого мозга

PAG – периакведуктальное серое вещество

PGE2 – простагландин E2

PVN – паравентрикулярное ядро гипоталамуса

SD – крысы стока SpragueDawley

SDN-POA – ядра полового диморфизма

VP – вентральный паллидум

VTA – вентральная тегментальная область

W – крысы стока Wistar

α1-GlyRs - α4-GlyRs – гомомерные α1-α4-глициновые рецепторы

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГАМКА-рецептор – рецептор к гамма-аминомасляной кислоте класса А

ГГН - гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось

МПО – медиальная преоптическая область

у.е. – условные единицы

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Исследование медиаторной передачи в нейрональных сетях структур головного мозга, обеспечивающих со стороны ЦНС поведение животных и человека и их приспособление к окружающей среде, остается важной проблемой физиологии 21 века, в частности физиологии нервной системы.

Медиальная преоптическая область (МПО) гипоталамуса является одним из центральных сайтов интеграции информации, поступающей как от лимбической системы и коры больших полушарий, так и от нижележащих отделов мозга, таких как ствол головного мозга. МПО гипоталамуса имеет довольно сложное анатомическое строение и большое количество нейрональных связей с другими отделами головного мозга. В структуре МПО выделяют большое овальное медиальное преоптическое ядро, состоящее из трёх хорошо различимых субпопуляций (Maejima et al., 2018). Вышеуказанные субпопуляции получают анатомически разделённые входы и посылают также анатомически разделённые выходы, благодаря чему разные субпопуляции нейронов контролируют разные виды поведения (Simerly, 2015).

Центральная часть медиального преотического ядра является одним из наиболее значимых нервных центров, регулирующих половое поведение самцов подавляющего большинства видов млекопитающих, включая грызунов (Tsuneoka et al., 2017; Quintana et al., 2019; Hull and Dominguez, 2019; Morishita, Kamada, Tsukahara, 2021). Для ряда видов млекопитающих, таких как овцы, макаки-резусы, перепела, крысы, а также для человека эта область содержит кластер нейронов с более высокой плотностью клеток по сравнению с другими частями и является одним из ядер полового диморфизма (SDN-POA), которое в пять-семь раз больше и содержит больше нейронов у самцов, чем у самок крыс.

Было показано, что повреждение МПО приводит к исчезновению паттернов полового поведения, таких как маунтинги, интромиссии и эякуляции у многих видов, включая приматов (Numan, 2014; Nakashima et al., 2019). Кроме того, в МПО существуют две обособленные группы нейронов. Одна из них отвечает за регуляцию аппетивного, а другая – консуматорного поведения (Numan, 2014). МПО входит в нейрональные круги регуляции процесса эякуляции, принимая участие в снятии тонического ингибирования соответствующих мотонейронов спинного мозга со стороны ядра продолговатого мозга (Hull, Dominguez, 2019).

Существует ряд исследований, в которых МПО изучалась среди структур головного мозга, включённых в регуляцию социального интереса (Dumais et al., 2013), игрового поведения, а также прочих видов аффилированного социального поведения и социального взаимодействия, связанных с социальной мотивацией (Zhao et al., 2020).

Кроме того, МПО участвует в регуляции степени тревожности человека и животных как часть гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Тормозные ГАМКергические проекции нейронов МПО в парвоцеллюлярное паравентрикулярное ядро гипоталамуса, секретирующее кортикотропин-рилизинг-гормон, опосредуют вовлеченность МПО в регуляцию уровня тревожности и связанного с ним защитного поведения (Rodríguez, Dueñas, 2013; Dimen et al., 2021).

Относительно механизмов нейротранссмиттерной передачи в МПО в основном проводились исследования физиологической роли глутаматэргической, ГАМК-эргической, серотонинэргической и дофаминэргической синаптической передачи в нейронных сетях МПО (Huang et al. 2019; Lonstein, Linning-Duffy, Yan, 2019; Guadarrama-Bazante, Rodríguez-Manzo, 2019; Hull, Dominguez, 2019), но не глицинэргической передачи, так как считалось, что она играет важную роль только в тормозных сетях спинного мозга и ствола мозга (Krowicki, Kapusta, 2011; Jonsson et al., 2012; Schaefer et al., 2018; Kumar et al., 2020). В то же время имеются

исследования, подтверждающие наличие и важность глицинэргической передачи в высших отделах головного мозга, в частности, в некоторых ядрах гипоталамуса (van den Pol, Gorcs, 1988; Krowicki, Kapusta, 2011). Карлссон и коллеги в 1997 году обнаружили, что глициновые аппликации на изолированные нейроны переживающих срезов МПО порождают стрихнин-чувствительные токи (Karlsson, Haage, Johansson, 1997). В более поздней литературе существует подтверждение наличия глициновых рецепторов в МПО гипоталамуса (Malinina, Druzin, Johansson, 2005; Karlsson et al., 2011). Однако имеющихся данных недостаточно для понимания роли глицина и глицинэргической передачи МПО в регуляции соматических функций или поведенческих паттернов. Поскольку в высших отделах головного мозга глицин может выступать в качестве ко-агониста ионотропного рецептора глутамата, селективно связывающим N-метил-D-аспартат (NMDA-рецептор; Yu, Lau, 2018), то в нейронных сетях головного мозга он может являться посредником как тормозной, так и возбуждающей передачи импульсов. Вероятно, что роль глицина в обеспечении регуляции поведения будет зависеть от особенностей соотношения ГАМК-эргических и глицинэргических тормозных путей в нейронных сетях мозга, что важно учитывать при выборе потенциальной терапевтической мишени для коррекции различных неврологических расстройств. Например, в ряде экспериментов на наиболее популярных модельных объектах для поведенческих экспериментов - самцах крыс стоков Sprague Dawley и Wistar - была показана существенная разница между стоками в некоторых проявлениях социального поведения (Manduca et al., 2014a; Manduca et al., 2014b) и уровне тревожности (Rybnikova, Vetrovoi, Zenko, 2018), влияющая на результаты экспериментов по фармакологической модуляции поведения, в то время как физиологические и нейробиологические причины данных различий в поведении крыс двух стоков остаются невыясненными.

Вышесказанное, в свою очередь, позволяет предположить, что изучение влияния, оказываемого глицином и глицинэргической передачей

МПО на регулируемые им виды поведения самцов крыс стоков Sprague Dawley и Wistar, представляется важной и актуальной на данный момент задачей.

Цель работы

Целью работы явилось выяснение роли глицинэргической тормозной передачи в медиальной преоптической области гипоталамуса в регуляции поведения самцов крыс стоков Sprague Dawley и Wistar.

Задачи исследования:

1. Выявить эффективную концентрацию стрихнина, избирательно блокирующую глициновые рецепторы, на изолированных нейронах медиальной преоптической области гипоталамуса;
2. Изучить роль глицинэргической передачи в нейрональных сетях медиальной преоптической области гипоталамуса в организации полового поведения самцов крыс стоков Sprague Dawley и Wistar;
3. Изучить роль глицинэргической передачи в нейрональных сетях медиальной преоптической области гипоталамуса в регуляции зоосоциального поведения крыс стоков Sprague Dawley и Wistar в тесте Кроули;
4. Изучить роль глицинэргической передачи в нейрональных сетях медиальной преоптической области гипоталамуса в регуляции двигательной активности и тревожности крыс стоков Sprague Dawley и Wistar в тесте «открытое поле».

Научная новизна работы

Впервые был проведен анализ концентрационной зависимости действия стрихнина как антагониста глициновых и ГАМК-рецепторов МПО на изолированных нейронах методом patch-clamp и доказано, что стрихнин в концентрации 20 μM блокирует глициновые рецепторы и не блокирует ГАМК-рецепторы. Следовательно, стрихнин в концентрации 20 μM может быть использован в качестве ингибитора глицинзависимого торможения в нейронных сетях МПО.

Впервые было выявлено, что интактные крысы самцы стока Wistar демонстрируют менее эффективное половое поведение, чем самцы стока Sprague Dawley. Впервые *in vivo* было показано, что глицин оказывает тормозное влияние на половое поведение самцов крыс стока Wistar, в то время как у крыс стока Sprague Dawley глицин, наоборот, повышает эффективность полового поведения самцов.

Впервые было показано, что глицинэргическая тормозная передача в МПО самцов крыс участвует в регуляции степени тревожности самцов стока Wistar, но не Sprague Dawley.

Впервые было выявлено, что глицинэргическая тормозная передача в МПО самцов крыс не оказывает влияния на социальное взаимодействие, горизонтальную двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение как самцов стоков Wistar, так и Sprague Dawley.

Научно-практическая значимость

Для фундаментальной нейрофизиологии представляются значимыми полученные в работе данные об участии глицинэргической тормозной системы и модуляции глицином возбуждающей системы передачи импульсов в нейронных сетях медиальной преоптической области гипоталамуса в половом поведении самцов крыс.

Полученные в работе данные являются экспериментальным обоснованием значимости глициновых рецепторов медиальной преоптической области гипоталамуса в регуляции полового поведения самцов крыс и тревожности и позволяют рассматривать их как новую мишень для разработки методов терапии нарушения полового поведения. При проведении доклинических исследований новых лекарственных препаратов следует учитывать выявленный механизм различия при выборе модельного стока крыс для исследования полового поведения в эксперименте.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено на самцах крыс стоков Sprague Dawley и Wistar с использованием комплексного методического подхода. Для выбора эффективной концентрации стрихнина для блокады глициновых рецепторов МПО в электрофизиологических экспериментах использовался метод perforated patch-clamp, выполненный на диссоциированных нейронах медиальной преоптической области гипоталамуса самцов крыс. Для изучения роли глицинэргической передачи в поведении крыс использовали (1) оперативные методы вживления инъекционных канюль в глубокие структуры мозга, (2) фармакологический метод с применением стимуляции и блокады глициновых рецепторов растворами глицина и стрихнина соответственно, а также (3) поведенческое тестирование полового поведения самцов, социального взаимодействия в тесте Кроули, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, тревожности в тесте «открытое поле».

Основные положения, выносимые на защиту

1) Глицинэргическое торможение играет важную роль в организации тормозных процессов в нейронных сетях медиальной преоптической области гипоталамуса, обеспечивая особенности полового поведения крыс стока Wistar;

2) Глицинэргическая тормозная нейропередача медиальной преоптической области гипоталамуса играет роль в обеспечении тревожности самцов стока Wistar, но не самцов стока Sprague Dawley;

3) Глицинэргическая тормозная нейропередача медиальной преоптической области гипоталамуса не участвует в формировании поведения при социальном взаимодействии, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности как самцов стока Wistar, так и самцов стока Sprague Dawley.

Аппробация работы

Основные положения диссертации доложены на XIX Нижегородской сессии молодых ученых «Естественные, математические науки» (Нижний Новгород, 2014), международном симпозиуме «International Scientific School «Frontiers in Modern Neuroscience» (Нижний Новгород, 2014), международном симпозиуме «3rd International Seminar on Behavioral Methods» (Shirk, Poland, 2015), международном симпозиуме «Frontiers in Modern Neuroscience» (Нижний Новгород, 2015), XX Нижегородской сессии молодых ученых «Естественные, математические науки» (Нижний Новгород, 2015), международном форуме FEPS (Paris, France, 2016), международном симпозиуме XIII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Edinburgh, United Kingdom, 2017), XXXI Международной научно-практической конференции “Eurasiascience” (онлайн, 2020), конференции "Восьмая научно-практическая конференция специалистов по работе с лабораторными животными" (Пущино, 2020).

Глава 1. Обзор литературы

1.1 МПО гипоталамуса в регуляции различных видов поведения

МПО гипоталамуса является одной из самых анатомически сложно организованных и дифференцированных зон гипоталамуса (Simerly, 2015). В настоящее время выделяют не менее пяти хорошо различимых клеточных групп в недифференцируемом сером веществе, которые включает в себя медиальная преоптическая область гипоталамуса. Большое овальное медиальное преоптическое ядро вытянуто вдоль всей медиальной преоптической области и состоит из трёх хорошо различимых субпопуляций: редкоклеточной латеральной (MPOl), плотноклеточной медиальной (MPOm) и компактной, очень плотноклеточной центральной части (MPOc) (Maejima et al., 2018).

Связи МПО являются весьма сложными по сравнению с другими клеточными группами гипоталамуса. В дополнение к обширным внутригипоталамическим связям, МПО получает мощные входы от задней и медиальной миндалины, опорного ядра терминального тяжа (BNST), каудальной и вентральной частей ядра боковой перегородки и отдельных областей мозга, включая вентральную тегментальную область (VTA), ядро солитарного тракта и парабрахиальное ядро (Simerly, 2015). Каждый из входов в МПО имеет топографическое распределение в пределах трех его субдивизий. Проекции из гипоталамических ядер перивентрикулярной зоны заканчиваются в основном в MPOm, а проекции из вентрального субикулума, каудальной части боковой перегородки и серотонинергических нейронов ствола головного мозга заканчиваются в MPOl (Simerly, 2015).

Как и входы, выходы из МПО также разделены анатомически. В частности, MPOc посылает мощные проекции на другие сексуально диморфные части переднего мозга, такие как вентральное ядро латеральной перегородки, вентролатеральная часть вентромедиального ядра

гипоталамуса, вентральное премаммиллярное ядро, основное ядро BNST и постериодорзальная часть медиального ядра миндалины (Hull, Dominguez, 2019). MPOc является наиболее сексуально диморфной частью МПО, содержит кластер нейронов с более высокой плотностью клеток по сравнению с другими частями и является одним из ядер полового диморфизма (SDN-POA), которое в пять-семь раз больше и содержит больше нейронов у самцов, чем у самок крыс. Объем области, экспрессирующей кальбиндин в MPOc в два-четыре раза больше у самцов, чем у самок крыс, а число кальбиндиновых нейронов у самцов крыс больше, чем у самок крыс. Ряд исследований показал, что MPOc может принимать участие в регуляции сексуальной ориентации и полового поведения у самцов крыс. Более того, гомологи SDN-POA были идентифицированы у других видов, включая хомяков, песчанок, калифорнийских мышей, хорьков, морских свинок и людей (Tsuneoka et al., 2017).

В то же время, количество проекций, посылаемых нейронами MPOm и MPOl относительно невелико (Simerly, 2015). MPOm посылает свои аксоны в те части гипоталамуса, которые контролируют регуляцию гормональной секреции передней доли гипофиза, аркуатное ядро и паравентрикулярное ядро гипоталамуса (PVN). Редкоклеточная MPOl имеет проекции к боковой перегородке и отдельным областям гипоталамуса, а также к ряду ядер ствола мозга (Simerly, 2015). Нейрохимические характеристики MPOc также отличаются от MPOm и MPOl. MPOc содержит большое количество нейронов, экспрессирующих кальбиндин-D28K и DBH-подобную монооксигеназу 1, в то время как MPOm и MPOl содержат мало таких нейронов (Nakashima et al., 2019).

При этом в многочисленных литературных источниках отмечается, что МПО гипоталамуса играет важную роль в регуляции полового поведения грызунов и многих других видов позвоночных (McHenry et al., 2017; Tsuneoka et al., 2017; Pfaff, Baum, 2018; Huang et al., 2019; Nakashima et al., 2019; Hull, Dominguez, 2019).

1.1.1 Роль МПО гипоталамуса в регуляции полового поведения

Половое поведение. Половое поведение самцов - сложный комплекс рефлекторных реакций, включающих генитальные и соматодвигательные рефлексы, вызванные, направленные и поддерживаемые внешними и внутренними сигналами. Половое поведение самцов крыс состоит из прекопуляторного поведения самца, которое позволяет ему оценить потенциал самки для целесообразности спаривания и вызвать у неё рецептивный ответ, и непосредственно совокупления (Hull, Dominguez, 2019). Половое поведение самцов крыс также может быть описано как последовательность поведенческих переходов, ведущих к эякуляции. Данные переходы хорошо описывает «модель воронки», предложенная Венингом и Куленом в 2014 году (Veening, Coolen, 2014).

Данная модель имеет три фазы. Во время первой фазы, также называемой фазой сканирования, или инициации, самец определяет, насколько окружающая среда безопасна, а также степень рецептивности самки. Самцы крыс, обследуя следы мочи самок, определяют наличие в них специфических химических сигналов, определяющих готовность самки к спариванию. При этом присутствие тревожных феромонов, например, выделяемых другими самцами, оказывает ингибирующее действие на половое поведение самцов крыс (Kiyokawa, 2017).

Следующая фаза носит название прекопуляторной. Она соответствует аппетивной фазе, характерной для других видов поведения, например, пищедобывательного. В процессе данной фазы самец продолжает более активно исследовать окружающую среду, а также самку, что выражается в приближении и следовании за ней, а также во взаимном обнюхивании, особенно в аногенитальной области для получения необходимой обонятельной информации и последующей инициации копуляторной фазы. У грызунов самцы и самки на этом этапе также испускают ультразвуковые сигналы частотой 50 кГц (Chu, Snoeren, Ågmo, 2017). В том случае, если

самка находится в состоянии эструса, она также начинает демонстрировать процептивное поведение, включающее в себя такие поведенческие паттерны, как стремительное передвижение, сопровождаемое резким замиранием, подпрыгивание и прядание ушами (Le Moëne, 2020). Данное поведение направлено на фокусирование внимания самца и на совершение им первого маунтинга или интромиссии.

Появление первого маунтинга может рассматриваться как переход от прекопуляторной фазы к копуляторной. Копуляторная фаза соответствует консуматорной фазе, характерной для других видов поведения. У самцов грызунов наблюдается весьма стереотипная картина копуляторного поведения, сформированная тремя различными поведенческими моторными паттернами: маунтингами, интромиссиями и эякуляциями.

Почти все самцы млекопитающих осуществляют маунтинг с дорсальной стороны самки и сзади, располагая передние ноги на спине самки, а стопы задних ног на земле. Самка может принять позу лордоза, рефлекторно выгнув позвоночный столб, сопровождая её отклонением хвоста в сторону. Затем самец начинает совершать тазовые толчки в передне-заднем направлении, которые вызывают или усиливают рецептивную позу самки. Во время маунтинга самец не производит интромиссии полового члена, а после маунтинга медленно слезает с самки (Bialy et al., 2019). Наступающая после этого пауза, как правило, не сопровождается грумингом самца.

Интромиссия, один из поведенческих паттернов копуляции, представляет собой введение самцом полового члена во влагалище самки. Во время интромиссии самец делает толчки тазом со средней продолжительностью 200–400 мс, который совпадает с проникновением полового члена во влагалище самки. После интромиссии самец, как правило, делает резкое движение назад, слезает с самки и осуществляет груминг гениталий (Chan et al., 2010).

В течение копуляторной фазы самец совершает ряд маунтингов и интромиссий, ведущих непосредственно к эякуляции. Эякуляция у крыс начинается с интромиссии полового члена во влагалище самки, но включает более глубокий, долгий толчок (750–2000 миллисекунд) (Hull, Dominguez, 2019), который совпадает с семяизвержением. После эякуляции самец поднимает передние лапы вверх и резко соскакивает с самки. Затем, как правило, он осуществляет весьма продолжительный груминг. Далее наступает длительный временной отрезок сексуального покоя, так называемый постэякуляторный интервал. У крыс невосприимчивость к рецептивной самке длится около пяти минут после первой эякуляции и увеличивается с каждой последующей эякуляцией (Heijkoop, Huijgens, Snoeren, 2018).

Название «модели воронки» описывает то, что на ранние фазы полового поведения оказывают большое влияние факторы окружающей среды, но позже в процессе последовательности поведение становится всё более «целенаправленным». В случае полового поведения переходы на другие поведенческие акты ближе к эякуляции становятся практически невозможными (Veening, Coolen, 2014). Этот факт вызвал предположение, что гипоталамус не контролирует непосредственно рефлексы ствола мозга и спинного мозга, обуславливающие эякуляцию, но влияет на поведенческие последовательности, ведущие самца к «цели».

Так как половое поведение является комплексным рефлексом и, несомненно, важным процессом, его контроль осуществляет целый ряд структур как головного, так и спинного мозга. Однако, как уже было сказано ранее, именно МПО гипоталамуса выделяется большинством исследователей как главный интегративный сайт регуляции полового поведения самцов большинства вида позвоночных (McHenry et al., 2017; Tsuneoka et al., 2017; Pfaff, Baum, 2018; Huang et al., 2019; Nakashima et al., 2019; Hull, Dominguez, 2019).

Нейрональные круги, связанные с обработкой сенсорной информации. МПО получает сенсорную информацию, связанную с половыми стимулами. Известно о существовании, по крайней мере, двух источника сенсорных входов в МПО, которые, по-видимому, стимулируют выходные нейрональные круги регуляции полового поведения самцов. Один из данных источников представляет собой обонятельные входы, идущие через медиальную миндалину, а второй представляет собой генитосенсорные тактильные входы, идущие вверх по проекциям от спинного мозга и переключающиеся в центральном тегментальном поле среднего мозга. Также МПО может стимулировать тестостерон (Numan, 2014).

Наиболее важным стимулом для полового поведения самцов грызунов является, вероятнее всего, хемосенсорных вход от основной и вомероназальной обонятельных систем (Keller et al., 2009). Ранее считалось, что аудиторные стимулы, такие как ультразвуковые сигналы, также повышают вероятность спаривания (Barfield, Thomas, 1986), однако более поздние работы показали, что ультразвуковые сигналы не играют значимой роли в процессе копуляции, по крайней мере, у сексуально неопытных животных (Chu, Snoeren, Ågmo, 2017).

Полученная от основной и вомероназальной обонятельных систем информация обрабатывается в медиальной миндалине, также, как и соматосенсорная информация, идущая от половых органов через парвоцеллюлярную часть субпарафасцикулярного ядра. Ряд структур миндалины, таких как дорсомедиальное ядро, являются структурами полового диморфизма, различаясь по размеру, плотности нейронов и глии, по размеру клеточного ядра нейронов, а также по протяженности в ростро-каудальном направлении. Постеродорсальная субдивизия медиального ядра миндалины экспрессирует высокие уровни андрогенов, прогестерона, а также α- и β-рецепторов к эстрогену. Это связано с возникновением местного полового диморфизма и эффектами половых стероидов, о чем свидетельствуют структурные и функциональные различия у

препубертатных и половозрелых самцов и самок крыс (Zancan et al., 2018). Постеродорсальная субдивизия медиального ядра миндалины модулирует проявление полового поведения у обоих полов, в основном интромиссий и эякуляций у самцов и своевременной секреции гонадотропин-рилизинг-гормона для овуляции и проявления полового поведения у самок (Dalpian, Rasia-Filho, Calcagnotto, 2019). Разрушение кортикомедиальной области у крыс замедляло копуляцию и увеличивало количество интромиссий, необходимых для достижения копуляции (Hull, Dominguez, 2019). Также один из субрегионов постериодорзального сектора медальной миндалине связан с процессами сексуального насыщения. Выходной сигнал от медиальной миндалины, как напрямую, так и через BNST, идет к МПО (Hull, Dominguez, 2019).

В регуляции полового поведения важную роль играет постериомедиальный отдел BNST. Перинатальный уровень тестостерона определяет объем и количество клеток основного ядра BNST, которые у самцов мышей больше, чем у самок. Нейроны основного ядра BNST являются кальбиндин-положительными, и было показано, что количество кальбиндин-иммунореактивных клеток в основном ядре BNST также зависит от пола (Tsuneoka et al., 2017). Наряду с миндалиной, BNST участвует в обработке обонятельной информации, связанной с половым поведением. Например, тревожные феромоны ингибируют половое поведение самцов, влияя на нейрональную активацию в ряде областей BNST и медиальной миндалины (Kobayashi et al., 2013; Kiyokawa, 2017). В целом постериомедиальный отдел BNST и постериодорсальный отдел медиальной миндалины участвуют в обработке обонятельной информации, связанной с инициацией процесса спаривания, а также в обработке информации, связанной с ингибированием эякуляции (Veening, Coolen, 2014; Dalpian, Rasia-Filho, Calcagnotto, 2019).

Результаты описанных выше работ позволяют сделать вывод о важной роли МПО гипоталамуса в нейрональных кругах, участвующих в обработке

обонятельных стимулов, связанных с половым поведением. Однако не менее важным представляются результаты ряда исследований, свидетельствующие о том, что аппетивные и консуматорные фазы полового поведения регулируются разными нейрональными кругами, и МПО гипоталамуса является частью обоих кругов. В регуляции аппетивного полового поведения участвует ростральная часть МПО, а в регуляции консуматорного полового поведения – каудальная часть (Numan, 2014).

Нейрональные круги регуляции, связанные с аппетивным поведением. Эверитт утверждал, что мезолимбическая система (дофаминовая система, берущая начало в VTA и заканчивающаяся в прилежащем ядре (NAc)) регулирует мотивационную компоненту аппетивного полового поведения самцов независимо от МПО (Everitt, 1990). Тем не менее, такая точка зрения противоречит нейроанатомическим исследованиям, доказывающим существование мощных нейрональных входов от МПО в VTA (McHenry et al., 2017). Основываясь на этих анатомических данных, можно заключить, что МПО может влиять на мотивационную компоненту аппетивного полового поведения самцов. Существует мнение, что в исследованиях, отрицающих причастность МПО к регуляции мотивационной компоненты аппетивного полового поведения самцов, разрушалась часть МПО, отвечающая за консуматорное половое поведение, тогда как часть, отвечавшая за аппетивное половое поведение, сохранялась (Numan, 2014).

Как компонент нейрональной сети, участвующей в регуляции мотивационной составляющей полового поведения, МПО посылает свои проекции к VTA. Активация VTA, в свою очередь, приводит к высвобождению дофамина в NAc, что снимает тормозное влияния NAc с вентрального паллидума (VP), позволяя VP реагировать на стимулы, связанные с находящимися в состоянии эструса самками. Базолатеральные и базомедиальные ядра миндалины также участвуют в регуляции снятия тормозного влияния NAc с VP.

Нейрональные круги регуляции, связанные с консуматорным поведением и эякуляцией. Существует ряд реципроктных связей между такими структурами, ответственными за регуляцию полового поведения, как покрышка среднего мозга и МПО, медиальная миндалина и передний гипоталамус (Hull, Dominguez, 2019). Покрышка среднего мозга включает в себя субпарафасцикулярное ядро (часть неопределенной зоны), мелкоклеточный отдел которой переключает соматосенсорный вход от гениталий на МПО и медиальную миндалину, являясь, вероятнее всего, частью эякуляторного круга регуляции. В пользу данной гипотезы свидетельствует тот факт, что данный отдел получает проекции от люмбосакрального отдела позвоночника (Veening, Coolen, 2014). Билатеральное нейротоксическое разрушение центрального тегментального поля снижало процент самцов, способных совершить маунтинги, интромиссии и эякуляции, не влияя при этом на предпочтение партнера или половую мотивацию (Romero-Carbente, Hurtazo, Paredes, 2007). В то же время электрическая стимуляция данного поля усиливала половое поведение у крыс (Veening, Coolen, 2014).

PVN гипоталамуса также участвует в регуляции полового поведение. Оно содержит крупноклеточную группу клеток, секретирующую окситоцин и вазопрессин в гипофиз, и мелкоклеточную группу, посылающую проекции в ряд отделов головного и спинного мозга. PVN является важным интегративным сайтом, контролирующим эякуляторный рефлекс, а также является основным центром регуляции симпатического выхода через его проекции на интермедиолатеральную колонку спинного мозга (Xia et al., 2017). Показано, что поражения PVN у крыс увеличивают время до наступления бесконтактной эрекции, а также снижают их количество. Также было показано, что микроинъекции глутамата в PVN усиливают эрекцию самцов крыс. Предполагается, что данные микроинъекции увеличивают активность поясничного плеврального нерва, а также увеличивают уровень адреналина в плазме крови (Xia et al., 2017). Кроме того, μ-опиоидные

рецепторы в PVN связаны с активностью симпатической нервной системы (Zhang et al., 2019). Трамадол, действующий как агонист μ-опиоидных рецепторов и ингибитор обратного захвата норадреналина/серотонина (5-HT), играет определенную роль в ингибировании эякуляции. Эндогенные опиоиды в PVN модулируют активность спинального генератора эякуляции, оказывая тормозное влияние на него (Zhang et al., 2019).

Важнейшим ингибитором полового поведения самцов крыс является парагигантоклеточное ядро продолговатого мозга (nPGi). Большинство аксонов, идущих от парагигантоклеточного ядра в люмбосакральный отдел спинного мозга, содержат серотонин (Normandin, Murphy, 2011), являющимся главным ингибитором генитальных рефлексов. В люмбосакральном отделе позвоночника находится спинальный генератор эякуляции (Wiggins et al., 2019), включающий в себя группу интернейронов, лежащих в сером веществе. Данная популяция нейронов лежит в 3 и 4 сегментах поясничного отдела и содержит галанин, холицистокинин, гастрин релизинг пептиды, а также энкефалин (Wiggins et al., 2019). Таким образом, nPGi обеспечивает тормозное влияние на нейроны люмбосакрального отдела спинного мозга и, таким образом, на процесс эякуляции.

Для регуляции консуматорного поведения МПО посылает проекции в периакведуктальное серое вещество (PAG), обеспечивая, таким образом, тормозное влияние. Торможение PAG снимает его возбуждающее влияние на nPGi, которое посылает тормозные проекции к спинальным мотонейронам, участвующим в процессе эякуляции. Таким образом, МПО участвует в снятии тонического ингибирования спинального генератора эякуляции со стороны nPGi (Hull, Dominguez, 2019).

Исходя из всего вышесказанного, МПО гипоталамуса является звеном нейрональных кругов регуляции большинства рефлексов, связанных с половым поведением самцов различных видов позвоночных животных. Анатомическое строение данной области также подтверждает её ключевую роль в регуляции полового поведения самцов млекопитающих.

Несмотря на то, что МПО широко изучена в основном в качестве одного из ключевых сайтов регуляции полового поведения самцов, часть исследований рассматривают МПО также как часть нейрональных кругов регуляции социального взаимодействия и тревожности.

1.1.2 Роль МПО гипоталамуса в регуляции социального взаимодействия

Социальное поведение. В широком смысле социальное поведение можно определить как любой вид общения или взаимодействия между двумя особями одного вида. Социальное поведение наблюдается у множества видов от одноклеточных микроорганизмов до людей (Chen, Hong, 2018). В настоящее время в качестве синонима к термину «социальное поведение» используют термин «социальное взаимодействие» - динамический процесс, на который может влиять ряд факторов, в том числе мотивация участвовать в социальном поведении, новизна ситуации, а также ключевые особенности потенциальных социальных партнеров, таких как предварительное знакомство, наличие социальных связей, состояние здоровья (Perkins et al., 2016).

Степень проявления социальности у разных животных варьируется; некоторые из них очень социальны, например, приматы, термиты и медоносные пчелы, тогда как другие ведут преимущественно уединенное существование, например, медведи (Sherwin et al., 2019). В поведенческом репертуаре людей доминируют позитивные социальные взаимодействия, включая аффилированность и социальные связи (Carter, Keverne, 2009). Для людей социальные отношения являются важными компонентами жизненного благополучия, и могут привести как к положительным, так и отрицательным результатам в отношении здоровья. Ранее исследователи в основном фокусировались на экологических предпосылках и приспособительных аспектах социальности, однако в настоящее время развитие эндокринологии,

молекулярной генетики и нейробиологии позволило изучать социальное поведение с физиологической точки зрения на модельных объектах, таких как лабораторные грызуны (Blumstein et al., 2010).

Лабораторные грызуны, в частности, крысы, также проявляют высокую степень социального поведения, благодаря чему они довольно часто выступают в качестве экспериментальных животных в исследованиях, связанных с изучением различных форм социального поведения (Cuevas-Olguin et al., 2017; Donhoffner et al., 2017; Yates et al., 2018; Cezar et al., 2018; Sanna et al., 2020; Rahdar, Khazali, 2020; Hegstad et al., 2020).

В дикой природе крысы образуют социальные иерархии, главенство в которых определяется в череде интенсивных стычек. Иерархия стабилизируется, когда наиболее агрессивное животное займёт главенствующее положение, что сопровождается снижением количества стычек, так как менее доминантные особи подстроят свое поведение под поведение доминанта. Несмотря на то, что стабильность такой иерархической системы может быть очень длительной, её разрушение возможно как следствие целого ряда причин: смерти, старения, болезни доминантной особи, присоединения к группе новой крысы, смены условий обитания (Opendak et al., 2016).

Также крысы проявляют кооперативное социальное поведение, направленное на поддержание дружественных связей внутри группы, заключающееся в аллогруминге, проползании под или переползании через другую особь, сближении или сидении близко друг к другу и последующем поведении, прижимании или сидении в непосредственной близости, а также следование за другой особью (Peters et al., 2016).

Нейрональные круги, связанные с регуляцией социального поведения. В 1999 Сара Ньюман предложила выделить ряд структур, составляющих нейронную сеть социального поведения, как взаимосвязанный набор областей мозга, участвующих в регуляции разнообразного социального поведения, такого как агрессия, половое поведение и родительское поведение

(Newman, 1999). В состав нейронной сети вошли задняя часть медиальной миндалины, BNST, ядра латеральной перегородки, МПО, ядра вентромедиального гипоталамуса и переднего гипоталамуса, а также PAG (Newman, 1999; Smith, DiBenedictis, Veenema, 2019).

Неоднократно сообщалось, что миндалина оказывает модулирующее воздействие на социальное поведение, обрабатывая эмоционально и социально значимую информацию (Newman, 1999); у грызунов эта информация обычно воспринимается посредством обонятельного восприятия. Соответственно, сообщалось, что размер и внутренние связи миндалевидного тела сильно коррелируют со сложностью социальных сетей. Более того, поражение миндалины приводит к изменению социального поведения грызунов (Ko, 2017).

PAG является важной частью лимбического среднего мозга, которая объединяет вегетативные, поведенческие и антиноцицептивные реакции на стресс и страх. Примечательно, что нейрональный круг регуляции, включающий центры лимбической системы, гипоталамуса, среднего мозга и PAG, был предложен в качестве основного нейроанатомического субстрата, который регулирует различные формы агрессивного поведения, особенно у кошачьих, которые использовались в качестве стандартной модели животных для изучения нервных механизмов агрессии и гнева (Ko, 2017). Интересно, что дорсальная часть PAG взаимодействует с миндалиной и МПО, частично регулируя активное защитное поведение в ответ на врожденные стимулы опасности, тогда как вентральная часть PAG связана с пассивным защитным поведением (замиранием) в ответ на условные опасные стимулы у грызунов. Однако ряд исследователей отмечает, что физиологические роли конкретных нейронных цепей, которые соединяют нейроны PAG с другими сетями мозга, в значительной степени не определены. Отмечается необходимость дальнейших исследований для выяснения конкретной роли нейрональных цепей, включающих в себя PAG, в обработке страха как важного триггера

агрессии, иерархии, социального страха и социальной коммуникации (Adolphs, 2013; Ko, 2017).

В BNST находится большое количество волокон, содержащих окситоцин, а также рецепторов к окситоцину (Smith, DiBenedictis, Veenema, 2019). Кроме того, в данном ядре широко распространены нейроны, секретирующие кортикотропин-рилизинг-гормон, что позволяет предположить участие BNST в процессах, связанных с реакцией на стресс, в том числе, вызванный социальными факторами (Matthews, Tye, 2019).

МПО широко известна своей ролью в регуляции полового и материнского поведения, а также в позитивном подкреплении, связанном с данными видами поведения, однако роль МПО в регуляции других видов поведения изучена недостаточно (Zhao et al., 2020). В единичных исследованиях МПО упоминалась среди структур головного мозга, включённых в регуляцию социального интереса (Dumais et al., 2013). Социальный интерес отражает мотивацию экспериментального животного приблизится к животному одного с ним вида для оценки социальных сигналов, и измеряется у крыс количеством времени, затрачиваемым на изучение сородичей. В дальнейшем, группа учёных из Университета Висконсин-Мэдисон выявили, что МПО также может участвовать в регуляции видов социального поведения, не связанного с половым. К примеру, это может быть игровое поведение, а также прочие виды аффилированного социального поведения и социального взаимодействия (Zhao et al., 2020).

1.1.3 Роль МПО гипоталамуса в регуляции тревожности

Тревожность. Страх и тревожность - это близкие состояния, которые развились, чтобы дать организму возможность избежать вреда или уменьшить его и, таким образом, обеспечить свое выживание (Tovote, Fadok, Lüthi, 2015). В отличие от страха, который испытывается по отношению к

ближайшей, непосредственной угрозе, тревожность - состояние, переживаемое в ответ на опасные факторы, которые являются либо отдаленными, либо неопределенными, и включает изменения в субъективном состоянии, поведении и физиологии человека или животного, которые облегчают обнаружение потенциальной угрозы в окружающей среде. Эти поведенческие и физиологические изменения в совокупности называются защитными реакциями (Kenwood, Kalin, Barbas, 2021).

В целом состояние тревоги и сопутствующие ему поведенческие и физиологические изменения выполняют адаптивную функцию. Например, сверхбдительное сканирование окружающей среды увеличивает вероятность раннего обнаружения угрозы и может помочь организму использовать соответствующую защитную стратегию, основанную на близости угрозы. В то же время, когда эти реакции проявляются экстремально, вне контекста и причиняют беспокойство, они могут стать неадекватными. Крайняя и неадекватная тревога является основной чертой тревожных расстройств. Однако стоит отметить, что источник тревожности часто связан с адаптивной функцией (например, социальные взаимодействия имеют решающее значение для поддержания статуса в группе, но являются фокусом тревожности при социальной фобии).

Из-за своей важности для выживания вида тревога и лежащие в ее основе нейрональные круги регуляции являются эволюционно высоко консервативными, следовательно, для изучения нейрональных механизмов регуляции тревожности широко используются животные модели, в частности, лабораторные грызуны (Tovote, Fadok, Lüthi, 2015; Kenwood, Kalin, Barbas, 2021; Wegener, Neigh, 2021).

Нейрональные круги, связанные с регуляцией тревожности. Тревожные реакции опосредуются активацией симпатической нервной системы, ренин-ангиотензиновой системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН; Yaribeygi, Sahraei, 2018; Balthazar et al., 2021). Активность ГГН модулируется лимбическими структурами, такими как

гиппокамп, префронтальная кора, миндалевидное тело и парагипоталамические области. Нейробиологическая активность данной оси начинается с секреции кортикотропин-рилизинг-гормона клетками PVN гипоталамуса (Rodríguez, Dueñas, 2013).

Лимбические структуры, такие как МПО, BNST, дорсомедиальный гипоталамус и ядро солитарного тракта посылают тормозные ГАМКергические проекции в PVN, ингибируя синтез кортикотропин-рилизинг-гормона.

Гиппокамп и медиальная префронтальная кора играют ингибирующую роль в активности ГГН. Прелимбическая и поясная части медиальной префронтальной коры посылают возбуждающие глутаматергические проекции в области пери-PVN и BNST, которые, в свою очередь, посылают прямые тормозные ГАМКергические проекции в PVN. Гиппокамп посылает возбуждающие проекции в задние области BNST, пери-PVN, МПО и дорсальный гипоталамус, которые посылают ГАМКергические проекции в PVN (Rodríguez, Dueñas, 2013).

Напротив, миндалина увеличивает активность ГГН: медиальные и центральные ядра миндалины посылают ингибирующие проекции на ГАМКергические популяции нейронов BNST, МПО и пери-PVN, вызывая транссинаптическое растормаживание PVN (Jankord, Herman, 2008).

Кроме того, всё больше данных также подтверждают роль латеральной перегородки в регуляции тревожности. Латеральная перегородка является основным участком, который соединяет гиппокамп с несколькими подкорковыми областями, включая латеральную гипоталамическую область, латеральную преоптическую область, медиальную гипоталамическую область, МПО, VTA, NAc, PAG и т. д. В литературе существуют данные как об активации, так и подавлении тревожности со стороны латеральной перегородки, что позволяют сделать вывод о неоднородности субпопуляций латеральной перегородки. Имеющиеся литературные данные указывают на противоположные роли дорсальной части и вентральной части латеральной

перегородки в активации и подавлении тревожного поведения соответственно (Rizzi-Wise, Wang, 2021).

1.2 Нейромедиаторная регуляция поведения

1.2.1 Нейромедиаторы МПО гипоталамуса, участвующие в регуляции полового поведения

Дофамин. Дофамин в МПО обуславливает половое поведение самцов. Низкие дозы агониста D_2/D_3 рецепторов куинелорана снижают длительность задержки первых генитальных рефлексов *excopula* без влияния на количество рефлексов, а также на половую мотивацию. Высокие дозы данного агониста угнетают бесконтактные эрекции, но усиливают выброс семенной жидкости. В тоже время эффект агониста D_1 рецепторов дигидрогидроксифенил-тетрагидротиенопиридина противоположен эффекту, наблюдаемому при действии высоких доз куинелорана – он увеличивает длительность эрекций, но снижет выбросы семенной жидкости (Will, Hull, Dominguez, 2014). В 2005 году Домингез и Халл предложили модель, объясняющую данный эффект (Dominguez, Hull, 2005). Данная модель предполагает наличие нескольких порогов для активации системы. Низкопороговый механизм, обусловленный активностью рецепторов семейства D_2, снимает торможение генитальных рефлексов. После активации D_1 рецепторов начинает действовать механизм умеренного порога, который обуславливает эрекцию. Увеличение концентрации дофамина либо длительность его воздействия на систему через активацию рецепторов семейства D_2 приводит к появлению высокопорогового механизма, обуславливающего эякуляцию и угнетающего эрекцию. Концентрация внеклеточного дофамина в МПО начинает расти с момента, когда самец обнаруживает присутствие самки в состоянии эструса, и остаётся высокой на протяжении всего копуляторного акта (Will, Hull, Dominguez, 2014). Предполагается, что источником нервных стимулов,

ведущим к повышению концентрации дофамина в МПО при предъявлении рецептивной самки, является медиальная миндалина, посылающая свои проекции как напрямую, так и через BNST. Существует также гипотеза, что данный механизм является основным способом, благодаря которому миндалина обуславливает процесс копуляции (Hull, Rodrı´guez-Manzo, 2017). В пользу данных предположений говорит то, что химическая стимуляция миндалины самцов крыс вызывает увеличение концентрации дофамина в МПО, сравнимое с происходящим увеличением концентрации дофамина при предъявлении самки (Dominguez, Hull, 2001). До конца не ясен механизм, с помощью которого миндалина вызывает увеличение концентрации дофамина в МПО, так как в миндалине крыс не было обнаружено дофамин-содержащих нейронов, а основными источниками дофамина в МПО являются перивентрикулярное ядро (A14), ростральная zona incerta (A13) и, по крайней мере, у самок крыс, также вентральная сегментарная область (A10; Nutsch et al., 2016).

Известно, что во время внутриутробного развития тестостерон влияет на дифференцировку половой системы, а также областей мозга, связанных с регуляцией репродуктивных функций, включая МПО (Tsuneoka et al., 2017). Однако этими функциями эффект стероидных гормонов не ограничивается. Многочисленные исследования показали, что стероидные гормоны участвуют в регуляции высвобождения дофамина в МПО (Will, Hull, Dominguez, 2014). Эстрадиол способен поддерживать базовый уровень дофамина в МПО у кастрированных самцов, однако его наличие не ведёт к увеличению концентрации дофамина при предъявлении рецептивной самки (Hull, Dominguez, 2019). Базовый уровень дофамина, поддерживаемый эстрадиолом, позволяет самцам совершать интромиссии, но не является достаточным для достижения ими эякуляции. Дигидротестостерон не способен ни поддерживать базовый уровень дофамина, ни приводить к увеличению концентрации данного нейротрансмиттера при предъявлении рецептивной самки. Комбинация эстрадиола и дигидротестостерона

полностью восстанавливает копуляцию так же, как и тестостерон сам по себе. Исходя из вышесказанного, представляется возможным предположить, что базовый уровень дофамина в МПО необходим для как минимум нескольких этапов копуляторного акта, а также что подъем концентрации дофамина при предъявлении самки, требующий наличия андрогенов и эстрогенов, необходим для продуктивного спаривания (Hull, Dominguez, 2019).

Гормональный эффект на внутриклеточный (запасенный) дофамин является противоположным. Наибольший уровень внутриклеточного дофамина наблюдался у кастрированных самцов, которым инъектировалось масло в качестве контрольного вещества. Меньший уровень наблюдался у самцов, которым инъектировался дигидротестостерон, и наименьший уровень внутриклеточного дофамина наблюдался у животных, которым инъектировался эстрадиол. Комбинация эстрадиола и дигидротестостерона, а также тестостерон, поддерживали средний уровень запасенного дофамина. Лучше всего копулировали животные, у которых был высокий уровень внеклеточного дофамина и низкий уровень внутриклеточного. Также кастрированные животные могли синтезировать дофамин, но при предъявлении рецептивной самки не могли произвести выброс дофамина, необходимый для копуляции (Hull, Dominguez, 2019).

Монооксид азота. Оксид азота (NO) является одним из наиболее важных стимулов для высвобождения дофамина в МПО как вторичный мессенджер. NO представляет собой растворимый газ, образующийся при превращении l-аргинина в цитруллин с помощью синтазы оксида азота (NOS; Hull, Rodrı´guez-Manzo, 2017). NOS-содержащие нейроны расположены в МПО, причем у кастрированных крыс в МПО было найдено меньше NOS-содержащих нейронов по сравнению с интактными животными, что указывает на то, что бедное половое поведение кастрированных крыс может быть связано со снижением количества NOS-содержащих нейронов (Huang et al. 2019). Эти результаты предполагают, что половое поведение самцов

связано с центральной активностью NOS в МПО, а повышенная экспрессия нейрональной NOS опосредована андрогенами. Как уже упоминалось выше, как базальный, так и индуцированный предъявлением рецептивной самки, выброс дофамина регулируется NO. Обратный диализ прекурсора NOL-аргинина увеличивает концентрацию внеклеточного дофамина, а L-NMMA, ингибитор NOS, блокирует это увеличение и снижает базовую концентрацию дофамина. Обратный диализ другого ингибитора NOS, L-NAME, блокирует увеличение концентрации дофамина, вызванное процессом копуляции. Микроинъекции L-NAME в МПО полностью блокировали копуляцию у сексуально неопытных самцов и ухудшали её у сексуально опытных самцов (Will, Hull, Dominguez, 2014). Обратный диализ L-аргинина увеличивает количество маунтингов, а обратный диализ L-NMMA снижает количество данных паттернов (Hull, Dominguez, 2019).

Глутамат. Глутамат в МПО вносит свой вклад в регуляцию полового поведение самцов, модулируя, в том числе, высвобождение дофамина, а NO выступает в качестве посредника в данной цепи (Will, Hull, Dominguez, 2014). Микроинъекции антагониста глутаматных рецепторов МК-801 вызывали поведенческие эффекты, сходные с теми, которые вызывали микроинъекции L-NAME (Hull, Dominguez, 2019). Обратный диализ глутамата в МПО также увеличивал концентрацию дофамина, а обратный диализ L-NAME, в отличие от обратного даилиза неактивного изомера D-NAME, снижал базовую концентрацию дофамина и блокировал её увеличение, вызванное инъекцией глутамата (Will, Hull, Dominguez, 2014). Глутаматэргические входы могут стимулировать выброс дофамина. Небольшая часть аксонов, идущих в МПО от миндалины, и большее количество аксонов, идущее в МПО от BNST, содержат переносчик везикулярного глутамата и, таким образом, предположительно являются глутаматэргическими (Hull, Dominguez, 2019). Более того, концентрация внеклеточного глутамата в МПО возрастала в процессе копуляции, а обратный диализ ингибиторов обратного захвата глутамата усиливал как

индуцированное спариванием высвобождение глутамата в МПО, так и половое поведение самцов (Dominguez, Hull, 2010). Концентрация глутамата падала до базовых значений в течение постэякуляторного периода, и значения этого снижения положительно коррелировали с длительностью постэякуляторного периода перед возобновлением копуляции (Hull, Dominguez, 2019).

Серотонин. Микроинъекции же больших доз серотонина в МПО угнетают копуляцию, вероятно, действуя через серотониновые рецепторы 5-HT_{1B}. Также исследование *in vitro* показало, что серотонин в концентрации 500 моль/л подавлял глутаматэргическую передачу и опосредованную глутаматом активацию МПО самцов крыс. Вероятно, это происходило за счет ингибирования как спонтанного, так и вызванного пресинаптического выделения глутамата (Dominguez, Hull, 2010). Обратный диализ 8-OH-DPAT, агониста 5-HT_{1A} рецепторов, в МПО облегчает копуляцию и увеличивает уровень как серотонина, так и дофамина, как и при системном введении. Раклоприд, антагонист D_2 рецепторов, частично блокирует эффект увеличения уровня дофамина при введении 8-OH-DPAT, однако при введении антагонистов 5-HT_{1A} такого не происходит (Hull, Dominguez, 2019).

ГАМК. Наряду с вышеупомянутыми нейротрансмиттерами, в МПО самцов крыс были обнаружены высокие концентрации ГАМК (Andersson, 2001). Как и ожидалось, ГАМК-ергические агонисты мусцимол и этаноламин-О-сульфат, инъецированные в МПО, уменьшали количество самцов крыс, совершавших паттерны полового поведения, тогда как антагонисты $ГАМК_A$ рецепторов бикукулин или 3-меркаптопропионовая кислота резко сокращали длительность задержки эякуляции и длительность послеэякуляторных интервалов, а также уменьшали число интромиссий, предшествующих эякуляции (Hull, Dominguez, 2019).

Эндогенные опиоиды. Опиоиды МПО участвуют в регуляции полового поведения самцов крыс. Предполагается, что β-эндорфин необходим для перехода от взаимных обнюхиваний самца и самки к

непосредственно копуляции, никак не влияя на прочие параметры полового поведения (Veening, Coolen, 2014). Эффекты других опиоидов являются дозозависимыми. Низкие дозы морфина и динорфина, иньектированные в МПО, усиливали копуляторные способности самцов, но большие дозы морфина приводили к неспособности животных возобновить спаривание после достижения второй эякуляции (Hull, Dominguez, 2019).

В литературе встречаются также свидетельства об облегчающем копуляцию влиянии окситоцина, орексина/гипокретина и субстанции Р, а также об ингибирующем влиянии нейропептида Y и нейрокинина K в МПО (Argiolas, Melis, 2013), но эти сведения достаточно скудны.

1.2.2 Нейромедиаторы МПО гипоталамуса, участвующие в регуляции социального взаимодействия и тревожности

Существует крайне мало информации об участии нейромедиаторов МПО в регуляции социального взаимодействия и тревожности, несмотря на то, что МПО входит в регулирующие их нейрональные круги.

Опиодные пептиды. С помощью методов поведенческой генетики было доказано, что мю-опиоидная система МПО крыс стимулирует и поддерживает внутренне вознаграждаемое социальное поведение, не связанное с половым поведением. Используя метод выявления экспрессии генов раннего ответа роста (в частности, экспрессирующийся белок Egr1, early growth response 1, также известный как Zif268 zinc finger protein 268), группа учёных из Университета Висконсин-Мэдисон (Zhao et al., 2020) идентифицировала повышенное количество меченных Egr1 клеток в MPOA после социальной игры у молодых самцов крыс. Также с помощью двойного иммунофлуоресцентного мечения мю-опиоидных рецепторов (MOR) и Egr1 было продемонстрировано, что клетки, экспрессирующие опиоидные рецепторы в МПО, демонстрировали повышенную экспрессию Egr1, когда крысы-подростки были вовлечены в социальную игру. Кроме того, было

показано, что нокдаун гена MOR *Oprm1* в МПО снижает общее количество игровых боев и частоту прыжков (Zhao et al., 2020).

В целом, эти результаты показывают, что МПО участвует в социальном игровом поведении самцов крыс-подростков, и подтверждают гипотезу о том, что МПО является частью консервативной нервной цепи у позвоночных, в которой опиоиды действуют, управляя аффилированными, внутренне вознаграждаемым социальным поведением.

Как уже было сказано ранее, МПО посылает тормозные ГАМКергические проекции в PVN, ингибируя синтез кортикотропин-рилизинг-гормона, и, тем самым, участвует в регуляции тревожности (Rodríguez, Dueñas, 2013). Однако имеющейся информации о нейромедиаторах медиальной преоптической области гипоталамуса, участвующих в регуляции социального взаимодействия и тревожности, недостаточно для всестороннего понимания роли МПО в их регуляции.

Кроме того, в 1997 году в МПО были найдены глициновые рецепторы (Karlsson, Haage, Johansson, 1997), однако, несмотря на важность глицинэргической передачи в ЦНС, их роль в регуляции полового поведения, социального взаимодействия и тревожности практически не изучена.

1.3 Глициновые рецепторы в центральной нервной системе

Глицин – простейшая алифатическая аминокислота, не имеющая оптических изомеров. В 1965 году Априсон и Верман впервые предположили, что глицин действует как нейротрансмиттер в ЦНС (Aprison, Werman, 1965; Hernandes, Troncone, 2009).

У млекопитающих глицин относится к незаменимым аминокислотам (Patri, 2019) и имеет очень важное физиологическое значение, так как он входит в состав ряда белков и биологически активных соединений (Alves et al., 2019). Кроме того, из него синтезируются порфириновые кольца гема и пуриновые основания, а также глицин является нейромедиатором,

регулирующим синаптическую трансмиссию в центральной и периферической нервной системе. Рецепторы к глицину имеются во многих участках головного и спинного мозга и оказывают тормозное воздействие на нейроны, уменьшают выделение из нейронов возбуждающих аминокислот, таких, как глутаминовая кислота, и повышают выделение ГАМК (Kumar et al., 2020). Так как потребление глицина в нервной ткани относительно велико, а поступление его из крови происходит медленно, значительная часть глицина синтезируется в мозге *denovo*. Главными источниками глицина в ЦНС являются глюкоза и серин.

Функциональная глицинергическая передача появляется в начале процесса развития мозга, и активация рецепторов глицина и ГАМК деполяризует нейроны в течение конца пренатального периода и раннем постнатальном развитии (Jonsson et al., 2012). Высокая внутриклеточная концентрация Cl^- в нейронах новорожденных обусловливает деполяризующие ответы, индуцированные ингибирующими нейромедиаторами. Деполяризующая возбуждающая функция глициновых рецепторов на ранних стадиях развития может иметь важное значение для синаптогенеза, поскольку активация глициновых рецепторов в свою очередь вызывает активацию потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов. Вероятно, данный процесс имеет решающее значение для кластеризации глициновых рецепторов на постсинаптических сайтах (Dutertre, Becker, Betz, 2012). Далее в ходе развития возникает переход от деполяризующих к гиперполяризующим ответам, когда начинается экспрессия нейронного K^+/Cl^- котранспортера KCC2 (примерно на 7 день постнатального развития), что приводит к снижению внутриклеточной концентрации Cl^- (Bae et al., 2018). Таким образом, глициновые рецепторы в раннем онтогенезе становятся гиперполяризирующими, то есть тормозными.

Глициновый рецептор представляет собой пентамер, формирующий Cl-канал. Глициновый рецептор может являться гомомерным или гетеромерным, формируясь из только α (α1-α4) или из комбинации α и β

субъединиц соответственно (Lin et al., 2017). Для гетеромерных рецепторов вначале было установлено соотношение 3α:2β (Laube et al., 2002), но затем пересмотрено как 2α:3β (Grudzinska et al., 2005) с конфигурацией β−α−β−α−β (Yang et al., 2012). Альфа- и бета-субъединицы гомологичны друг другу, и, в меньшей степени, субъединицам других ионотропных каналов. Субъединицы соединены друг с другом при помощи дисульфидных мостиков, образуя длинную молекулу, несколько раз проходящую сквозь мембрану клетки. Каждая субъединица глицинового рецептора состоит из достаточно большого глобулярного внеклеточного — находящегося в синаптической щели — домена, являющегося N-концом белка, 4 трансмембранных частей, внутриклеточной петли и короткого внеклеточного С-конца. Между субъединицами находится ионный канал, который обладает избирательной проницаемостью по отношению к ионам Cl^- (Breitinger, Breitinger, 2020).

Молекулярное клонирование позволило выявить четыре гена, называемых *Glra1-4*, кодирующих альфа субъединицы глициновых рецепторов (α1- α4) и один ген (Glrb), кодирующий бета субъединицы. Все альфа субъединицы демонстрируют высокую идентичность последовательности (>80%) и могут образовывать функциональные гомомерные каналы со свойствами, близкими к свойствам глициновых рецепторов in vivo. Бета субъединицы глициновых рецепторов имеют значительные различия в последовательности по сравнению с альфа субъединицами (<50% идентичности) и не формируют функциональные рецепторы, если экспрессируются отдельно, однако удерживаются в эндоплазматическом ретикулуме (Dutertre, Becker, Betz, 2012).

Как уже было отмечено выше, субъединицы глициновых рецепторов обладают временными особенностями экспрессии (Lin et al., 2017). В спинном мозгу незрелых животных глициновые рецепторы представляют собой, в основном, гомомерные структуры, состоящие из α2 субъединиц с молекулярной массой 49 кДа. У взрослых животных в спинном мозгу экспрессируются преимущественно гетеромерные рецепторы, состоящие из

α1 и β субъединиц молекулярной массой 48 и 58 кДа соответственно. Бета субъединица при этом необходима для заякоривания к цитоплазматическому белку гефирину, обеспечивая, таким образом, синаптическую локализацию глицинового рецептора (Schaefer et al., 2018). В свою очередь, гефирин связан с актиновым цитоскелетом и с полимеризованным тубулином. Кроме того, он связан с фактором обмена гуанинового нуклеотида коллибистином, белком постсинаптической адгезии нейролигнином-2 и актин-связывающим белком профилином. Эта белковая сеть обеспечивает интеграцию, перегруппировку и созревание ингибирующих синапсов во время развития организма (Schaefer et al., 2018).

Гетеромерные α1β рецепторы являются самыми распространенными глициновыми рецепторами, синаптически локализованными в ЦНС млекопитающих. Важность альфа субъединицы подчеркивается наличием множества приводящих к заболеваниям мутаций в генах *Glra1* у различных видов млекопитающих, включая мышей, крупный рогатый скот и человека (Schaefer et al., 2018). Например, одной их наиболее частых причин возникновения наследственной гиперплексии, патологии, которая характеризуется чрезмерно выраженными реакциями испуга на неожиданные стимулы, является мутация в *Glra1 (*Yang et al., 2017). Конкурентным антагонистом гетеромерных глициновых рецепторов является сложный алкалоид стрихнин, который замыкает рецептор в закрытом состоянии, исключающем проникновение ионов Cl^-. Стрихнин связывается с рецептором, используя для этого межсубъединичный сайт связывания нейротрансмиттера. Глицин связывается на том же самом участке, но способствует открытию канала, позволяя проникать ионам Cl^- через анион-проводящий путь с расчетным диаметром 5,2-6,0 ангстрем. Молекулы малого размера и ионы, в том числе макроциклические лактоны ивермектин и родственные ему авермектины, модулируют воротную активность глициновых рецепторов путем потенцирования индуцированных глицином токов аллостерическим механизмом (Du et al., 2015).

Гомомерные α2-глициновые рецепторы (α2-GlyRs) широко экспрессируются в эмбриональном и неонатальном периодах развития организма (Lin et al., 2017). В незрелой сетчатке активность α2-GlyRs влияет на развитие фоторецепторов типа «палочки». Нокаут α2 субъединицы в начале развития организма уменьшает количество интернейронов спинного мозга, что влияет на формирование нейронных сетей, генерирующих ритмы (Lin et al., 2017). Кроме того, было обнаружено, что α2-GlyRs контролируют клетки-предшественники (прогениторные клетки) в течение кортикогенеза и способствуют миграции кортикальных интернейронов (Avila et al., 2014). Несмотря на то, что α2-GlyR почти не экспрессируются в мозге взрослого человека, они обнаруживаются в мозжечке, ретине, а также в некоторых областях переднего мозга, включая гиппокамп (Lin et al., 2017). Функциональные α2-GlyRs были обнаружены в культуре нервных стволовых клеток, полученных постнатально из стриатума крыс. Также было показано, что делеция в гене *Glra2* приводит к нарушению нейрогенеза в гиппокампе и пространственной памяти у взрослых мышей. Кроме того, было показано, что у взрослых животных в нервных стволовых клетках гиппокампа экспрессировались глициновые рецепторы, содержащих именно α2, а не α1 или α3, субъединицы (Lin et al., 2017).

Первоначально гомомерные α3 глициновые рецепторы (α3-GlyRs) считались малой изоформой глициновых рецепторов у взрослых животных. В спинном мозге с помощью метода окрашивания α3-GlyRs были обнаружены на синаптических участках в пластинах I и II дорсальных рогов спинного мозга, где они ингибируют распространение ноцицептивных сигналов в более высокие области головного мозга и служит в качестве молекулярного субстрата сенсибилизации боли воспалительным медиатором простагландином E2 (PGE2). PGE2 связывается с рецепторами простагландина EP2 и тем самым активирует протеинкиназу A, которая фосфорилирует α3-GlyRs и, таким образом, снижает глициновые токи в нейронах дорзальных рогов (Zeilhofer et al., 2021). Также α3-GlyRs были

обнаружены в ретине, а также в тормозных синапсах во внутреннем ухе (Dutertre, Becker, Betz, 2012; Breitinger, Breitinger, 2020).

Наименее изученным подтипом являются гомомерные α4 глициновые рецепторы (α4-GlyRs). Транскрипты α4-GlyRs были обнаружены в спинном мозге, периферических ганглиях и мужском генитальном гребне у куриных эмбрионов (Dutertre, Becker, Betz, 2012).

Помимо собственного специфического рецептора (Gly-R), глицин может связываться с сайтом ионотропного NMDA-рецептора глутамата. При связывании глицина и NMDAR1 субъединицы происходит существенное увеличение вероятности активации канала, что может частично объясняться уменьшением скорости десенситизации рецептора. При полном отсутствии глицина рецептор не активируется или слабо активируется L-глутаматом (Yu, Lau, 2018).

1.4 Глициновые рецепторы в МПО

В настоящее время имеется ряд исследований, подтверждающих важность глицинэргической передачи в ядрах гипоталамуса. В хроническом эксперименте на крысах билатеральные микроинъекции глицина в паравентрикулярное ядро гипоталамуса способствовали повышению почечной экскреции воды и натрия и уменьшению влияния центральной симпатической нервной системы на сердце и почки. При билатеральных микроинъекциях стрихнина в паравентрикулярное ядро гипоталамуса происходило значительное увеличение частоты сердечных сокращений без изменения выделительной функции почек (Krowicki, Kapusta, 2011). Микроинъекции глицина в вентромедиальное ядро гипоталамуса оказало стимулирующий эффект на принятие позы лордоза, что является показателем готовности самок крыс к спариванию (Veening et al., 2014).

Рампон и коллеги обнаружили значительное число глицин-иммунореактивных волокон, присутствующих в МПО в 1996 году (Rampon et

al., 1996), а Карлссон и коллеги в 1997 году обнаружили, что глициновые аппликации на изолированные нейроны переживающих срезов МПО порождают стрихнин-чувствительные токи (Karlsson, Haage, Johansson, 1997). В более поздней литературе существует подтверждение наличия глициновых рецепторов в МПО (Malinina, Druzin, Johansson, 2005; Karlsson et al., 2011).

Однако имеющихся данных о глицинэргической передаче недостаточно для понимания роли глициновых рецепторов МПО в регуляции соматических функций или поведенческих паттернов.

1.5 Различия в половом поведении, социальном взаимодействии и тревожности между стоками Sprague Dawley и Wistar

Модельные организмы являются важной частью физиологических и нейробиологических исследований. Одними из наиболее популярных модельных организмов являются лабораторные грызуны, в частности, мыши и крысы (Festing, 2010; Parker et al., 2014; Jensen et al., 2016; Zhao et al., 2019).

Инбредные линии и аутбредные стоки составляют два основных класса доступных лабораторных грызунов (Jensen et al., 2016). Инбредные линии обычно характеризуются генетической однородностью, что, как ожидается, приводит к меньшему фенотипическому разбросу в ответах на токсические или фармакологические манипуляции по сравнению с генетически вариабельными аутбредными стоками. Инбредные линии производят при скрещивании брат-сестра по меньшей мере 20 поколений, причем каждая особь происходит от одной размножающейся пары в 20-м или последующем поколении, что приводит к изогенности (то есть генетической идентичности) и гомозиготности практически всех генетических локусов (Festing, 2010). Аргументы в пользу использования инбредных линий включают увеличение статистической мощности, улучшение воспроизводимости эксперимента и, следовательно, использование меньшего количества животных, необходимых

для проверки конкретной гипотезы. Однако эксперименты на аутбредных животных также необходимы в силу важности генетической гетерогенности при моделировании «беспородной» популяции людей. Кроме того, аутбредные крысы более плодовиты и, соответственно, имеют более низкую стоимость (Jensen et al., 2016).

Несмотря на то, что в настоящее время мыши стали более популярными модельными организмами, ряд поведенческих методов продолжают проводить на крысах в силу того, что их сложно или невозможно адаптировать для мышей (Parker et al., 2014).

Крысы стоков Sprague Dawley и Wistar до сих пор остаются одними из самых популярных модельных организмов при исследовании полового поведения, социальных взаимодействий и тревожности. Однако, несмотря на важность выбора адекватной модели, существует всего несколько работ, в которых рассматривается разница в половом поведении между крысами этих двух стоков.

Существует всего две работы (McLean, Dupeire, Elder, 1972; Emery, Larsson, 1979), в которых рассматривается разница в половом поведении между крысами этих двух стоков. В самом первом исследовании МакЛин с коллегами показали (McLean, Dupeire, Elder, 1972), что самцы крыс стока Wistar демонстрировали значительно больше копулятивных реакций, чем самцах крыс стока Spraque Dawley. В статье Эмерли и Ларссона было показано (Emery, Larsson, 1979), что изменение полового поведения у кастрированных самцов крыс после лечения системным парахлорфенилаланином зависит от стока, к которому принадлежит животное, и времени кастрации. У самцов Wistar и Sprague Dawley наблюдалось снижение поведенческой восприимчивости к лечению парахлорфенилаланином после кастрации, причем самцы Wistar сохраняли свою поведенческую отзывчивость дольше, чем самцы Sprague Dawley. Поведение кастрированных самцов Wistar также было более чувствительно к замещению андрогенов, чем у самцов Sprague Dawley.

Разница в социальном поведении самцов Wistar и Sprague Dawley также изучена довольно слабо. К примеру, Мандука и коллеги показали (Manduca et al., 2014a), что крысы Wistar и Sprague-Dawley различаются по абсолютному уровню социального игрового поведения и количеству ультразвуковой вокализации на частоте 50 кГц. Кроме того, самцы крыс двух стоков показали количественные различия в их реакции на фармакологические манипуляции социальным поведением. Так, и у крыс стока Wistar, и Sprague-Dawley морфин увеличивал, а амфетамин уменьшал количество и длительность паттернов социального игрового поведения. Однако эффекты морфина были более выражены у стока Wistar, чем у Sprague-Dawley. В другом исследовании Мандука и коллеги показали (Manduca et al., 2014b), что ингибитор гидролиза анандамида URB597 усиливал социальное игровое поведение у крыс-подростков Wistar при любых экспериментальных условиях, однако у взрослых крыс Wistar URB597 усиливал социальное взаимодействие только в незнакомых условиях при ярком освещении. В то же время URB597 не влиял на поведение подростков в социальных играх и социальное взаимодействие взрослых у крыс Sprague-Dawley ни в каких экспериментальных условиях. Эти результаты подтверждают, что между крысами Wistar и Sprague-Dawley существуют выраженные поведенческие различия, что может объяснить, к примеру, противоречивые результаты исследований по использованию каннабиноидных препаратов на грызунах.

В то же время, разница в уровне тревожности самцов Wistar и Sprague-Dawley изучена достаточно подробно. В ряде поведенческих тестов было показано, что крысы стока Sprague Dawley характеризуются высокой двигательной и исследовательской активностью, что свидетельствует о низком уровне тревожности, а также низким уровнем стереотипной активности и индекса депрессивноподобного поведения. Напротив, крысы стока Wistar демонстрируют наиболее высокие показатели тревожности и депрессивноподобного поведения среди исследованных стоков (Rybnikova,

Vetrovoi, Zenko, 2018). Однако, в то же время, почти нет данных о физиологических и нейробиологических причинах данного различия.

Стоит отметить, что существующих данных по нейрональному обеспечению различий полового поведения, социального взаимодействия и тревожности со стороны ЦНС для двух довольно популярных в экспериментах по изучению физиологической, биохимической и нейробиологической регуляции различных видов поведения стоков крыс может быть не достаточно для выбора оптимального объекта для исследований.

Исходя из всего вышесказанного, представляется актуальным выявить роль глицинэргической передачи в МПО гипоталамуса в регуляции полового поведения, социального взаимодействия и тревожности у самцов крыс стоков Wistar и Sprague-Dawley.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Для изучения роли глицинэргической системы МПО в нейрональной регуляции полового поведения самцов крыс был использован методический подход, включающий исследование как на клеточном (исследование диссоциированных нейронов МПО методом patch-clamp), так и на поведенческом уровнях (изучение влияния микроинъекций веществ в МПО на параметры полового поведения, социальной, рефлекторной двигательной активности и эмоциональности).

Часть экспериментов, включая работу с диссоциированными нейронами и дальнейшие эксперименты на хронических животных, была выполнена в лаборатории изучения ионных каналов и нейронального сигналинга Университета Умео, Швеция, на базе вивария Университета Умео. Часть экспериментов, включая эксперименты на хронических животных, была выполнена на кафедре нейротехнологий ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Все экспериментальные и хирургические процедуры были одобрены этической комиссией Университета Умео и ННГУ им. Н.И. Лобачевского и соответствовали нормативам, указанным в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)» и межгосударственном стандарте ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», санитарно-эпидемиологических правилах СП 2.2.1.3218-14.

2.1 Регистрация параметров активности диссоциированных нейронов МПО методом patch-clamp

Серия экспериментов по регистрации активности нейронов МПО была выполнена методом patch-clamp на диссоциированных нейронах. Выбранная методика позволила провести анализ особенностей действия различных

концентраций стрихнина на эффективность ГАМК-эргической передачи на изолированных нейронах МПО. Стрихнин является неспецифическим антагонистом глицина, блокирующим как рецепторы к глицину, так и рецепторы к ГАМК. Чтобы исследовать специфическую роль именно глицинэргической передачи в регуляции полового поведения в исследовании, необходимо было подобрать такую концентрацию стрихнина, которая бы блокировала рецепторы к глицину, не блокируя при этом рецепторы к ГАМК. Для выполнения данной задачи была выбрана модификация методики patch-clamp – perforated patch.

2.1.1 Приготовление препаратов диссоциированных клеток

Эксперименты проводились на изолированных нейронах, диссоциированных из срезов, приготовленных из МПО гипоталамуса. Для приготовления диссоциированных нейронов использовались самцы крыс линии Sprague Dawley массой 60-100 гр. Животные декапитировались с помощью гильотины без использования анестезии. Мозг извлекался и помещался в ледяной инкубационный раствор на 5-10 минут. Затем из мозга вырезался блок ткани, содержащий медиальное преоптическое ядро, после чего он нарезался на фронтальные срезы толщиной 300 нм на вибротоме (752 M, Campden Instruments, Leicestershire, UK). Срезы инкубировались в инкубационном растворе при температуре 29-31°C не менее 1 часа до начала диссоциации. Механическая вибродиссоциация проводилась неферментативно, с использованием стеклянного стержня (0,5 мм диаметром), закреплённого на пьезоэлектрическом биморфном кристалле и направленного на МПО. Диссоциированные клетки осаждались на дно чашки Петри в течение 10 минут, после чего чашка Петри помещалась в регистрационную камеру электрофизиологической установки.

2.1.2 Электрофизиологическая регистрация активности нейронов

Для регистрации использовалась конфигурация whole cell patch-clamp в модификации perforated-patch, в которой амфотерицин выступал в качестве агента для перфорации клеточной мембраны. Все токи записывались в режиме voltage clamp. В качестве регистрирующих электродов использовались боросиликатные пипетки (GC150, Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK), заполненные внутриклеточным раствором и погружённые во внеклеточный раствор и имеющие сопротивление 2-7 мОм. Сигнал записывался с использованием усилителя Axopatch 200A, интерфейса Digidata 1200 и программного обеспечения pClamp (Axon Instruments, Foster City, CA), под контролем персонального компьютера. Записанный сигнал фильтровался низкочастотным фильтром на частоте 2-10 кГц (23 дБ).

Все растворы, как для продолжительной перфузии, так и для кратковременной аппликации, поступали с помощью самотечной скоростной перфузионной системы, контролируемой с помощью соленоидных валов, в свою очередь контролирующихся с помощью компьютера.

Все эксперименты проводились при комнатной температуре (23-25°C). Все процедуры и манипуляции по поиску нейронов и регистрации параметров методом perforated-patch осуществляли под оптическим контролем с помощью инвертированного микроскопа (Axio Observer Z1, Zeiss, Oberkochen, Germany) с дифференциальным контрастом по Номарскому (ув. x20).

2.1.3 Используемые растворы для перфузии диссоциированных клеток МПО

В экспериментах по методу perforated-patch для перфузии препарата использовались следующие растворы:

1) инкубационный раствор: на 2 литра дистиллированной воды – 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl(*2H_2O), 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, 4,94 мМ Tris-base.

2) внеклеточный раствор, на 1 литр дистиллированной воды – 137 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl(*2 H_2O), 1,2 мМ $MgCl_2$(*6H_2O), 10 мМ HEPES, 10 мМ глюкозы, 3 μМ глицина. Доводили до pH=7.4 добавлением NaOH.

3) внутриклеточный раствор, на 250 мл дистиллированной воды - 3 мМ NaCl, 1,2 мМ $MgCl_2$(*6H_2O), 10 мМ HEPES, 1 мМ EGTA, 140 мМ.

В экспериментах были использованы следующие диапазоны концентраций: ГАМК – 1 мМ; стрихнин – 50 μМ; стрихнин –20 μМ; сочетание ГАМК и стрихнина –1 мМ и 50 μМ соответственно; сочетание ГАМК и стрихнина –1 мМ и 20 μМ соответственно.

2.1.4 Схема эксперимента

Для проведения электрофизиологических экспериментов с диссоциированными нейронами, осаждёнными на дно чашки Петри, совершались следующие манипуляции: под контролем микроскопа выбирали нейрон, затем к нему подводилась перфузионная пипетка, и с помощью микроманипуляторов совершалось присоединение регистрирующего электрода к нейрону. Далее выдерживали интервал в 10-15 минут, чтобы амфотерицин, содержащийся в кончике регистрирующей пипетки, проделал достаточно перфораций в клеточной мембране. После этого совершалась регистрация параметров по следующей схеме.

В течение одного эксперимента на клетку восемь раз (с интервалом в 1 минуту) аппликировался 1 мМ раствор ГАМК, затем пять раз аппликировался раствор, содержащий одновременно 1 мМ р-р ГАМК и р-р стрихнина в заданной концентрации, затем вновь восемь раз аппликировался раствор, содержащий только 1 мМ ГАМК (рисунок 2.1). Длительность каждой аппликации – 200 мс. В качестве промывающего раствора

использовался внеклеточный раствор, подаваемый между аппликациями ГАМК, и раствор стрихнина в заданной концентрации, подаваемый между аппликациями раствора, содержащего ГАМК и стрихнин одновременно.

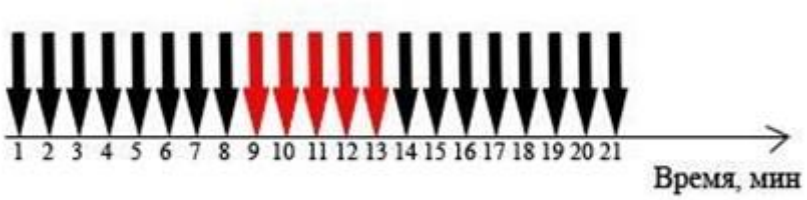


Рисунок 2.1 Схема проведения эксперимента. Черные стрелки – аппликация 1 мМ р-ра ГАМК, красные – аппликация раствора, содержащего 1 мМ ГАМК и стрихнин в заданной концентрации (20 μМ или 50 μМ). Интервал между аппликациями – 1 мин, длительность 200 мс

Регистрация производилась в конфигурации whole cell patch-clamp, модификация perforated-patch. Регистрировали следующие параметры токового ответа нейрона: 1) амплитуду пика непосредственного токового ответа на аппликацию веществ и 2) амплитуду остаточного тока токового ответа на аппликацию веществ.

Данные, полученные на пяти нейронах, обрабатывались с использованием программы Origin software 4.0.

2.1.5 Анализ данных и статистическая обработка результатов

Анализ данных, полученных в электрофизиологических экспериментах на нейронах методом perforated-patch, осуществлялся с помощью программ pClamp и Origin software (версия 4.0–4.1, Microcal Software, Northampton, MA). Регистрируемые параметры токовых ответов нейронов нормировались к значениям токов при восьмой по счету аппликации раствора ГАМК, предшествующей аппликации раствора, содержащего одновременно ГАМК и

стрихнин. Для статистического анализа использовали параметры от пяти нейронов, на которых была отработана вся схема эксперимента, включая анализ действия растворов, содержащих ГАМК в сочетании с различной концентрацией стрихнина.

2.2 Регистрация полового поведения, социального взаимодействия и тревожности

2.2.1 Подготовительные процедуры на крысах-самцах

Для исследования роли глицинэргической передачи в МПО в регуляции полового поведения, социального взаимодействия и тревожности методом фармакологической активации и блокады глициновых рецепторов всем экспериментальным животным оперативным методом транскраниально вживлялись канюли для микроинъекций билатерально в область МПО.

Изготовление канюль для микроинъекций. Канюли изготавливали из стальных инъекционных игл фирмы KDM диаметром 0.6 мм (маркировка 23G). Пробки, предохраняющие канюли от загрязнения и зарастания соединительной тканью, изготавливались из инъекционных игл фирмы KDM диаметром 0.33 мм (маркировка 30G).

Операция по вживлению канюль. Во время проведения операций по вживлению канюль для общей анестезии животных использовался ветеринарный препарат «Золетил 100» в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно, содержащий в качестве действующих веществ тилетамина гидрохлорид и золазепама гидрохлорид, и являющийся приоритетным для иммобилизации и краткосрочной анестезии грызунов. Длительность операционного наркоза составляла от 20 до 60 мин, что позволяло провести все необходимые процедуры. Дополнительно применялся 2% раствор «Рометар» (анальгезирующий и миорелаксирующий препарат) в дозе 0,2 мл/кг внутримышечно и 0,5% новокаин подкожно в область операционного поля.

Все инструменты до начала операции автоклавировались, прочие меры стерильности также были соблюдены.

Операция проводилась в специально оборудованной операционной. Животное закреплялось в стереотаксе при помощи зубного зажима и ушных кернов и находилось на одеяле с подогревом во избежание переохлаждения во время пребывания под наркозом.

Операционное поле на черепе животного выстригалось для удаления шерсти, затем обрабатывалось 70% спиртом и 5% раствором йода. Далее по средней линии черепа делали кожный разрез и удаляли лоскут кожи и подкожные мышцы, на поверхности черепа удаляли надкостницу. Поверхность кости обрабатывали 70% спиртом и просушивали. Площадь черепа, освобожденного от кожи и мышц, составляла около 2 $см^2$. Стоматологическим бором в кости черепа проделывались два трепанационных отверстия для погружения и вживления канюль. Также бором на поверхности черепа наносили неглубокие (не глубже 0,1 мм) насечки для создания неровностей и лучшего закрепления системы крепежа быстротвердеющей стоматологической пластмассой (акрилоксид фирмы «Стома»).

С помощью направляющей иглы, закрепленной в стереотаксе, последовательно билатерально вводили две заранее изготовленные канюли. Координаты вживления канюль: каудально от брегмы AP=-0,36 мм, латерально от сагитального шва L=0,5 мм, глубина погружения на H=5,4 мм (при принятии поверхности мозга за точку отсчёта) в соответствии с атласом мозга крыс (рисунок 2.2; Paxinos, Watson 2007). Кроме того, при погружении канюли учитывалась толщина кости черепа и пространства между костью и мозгом, из-за чего суммарная глубина погружения канюли была равна H=8 мм, что позволяло расположить кончик направляющей канюли на 0,4мм выше МПО во избежание механического разрушения ядра. Канюли фиксировали на поверхности черепа быстротвердеющей стоматологической пластмассой, после полного застывания пластмассы направляющую иглу

извлекали. Вживленные канюли закрывали заранее изготовленными пробками.

Для улучшения крепления канюль на костях черепа использовали дополнительные металлические крепления и пластиковый фиксатор, изготовленный заранее.

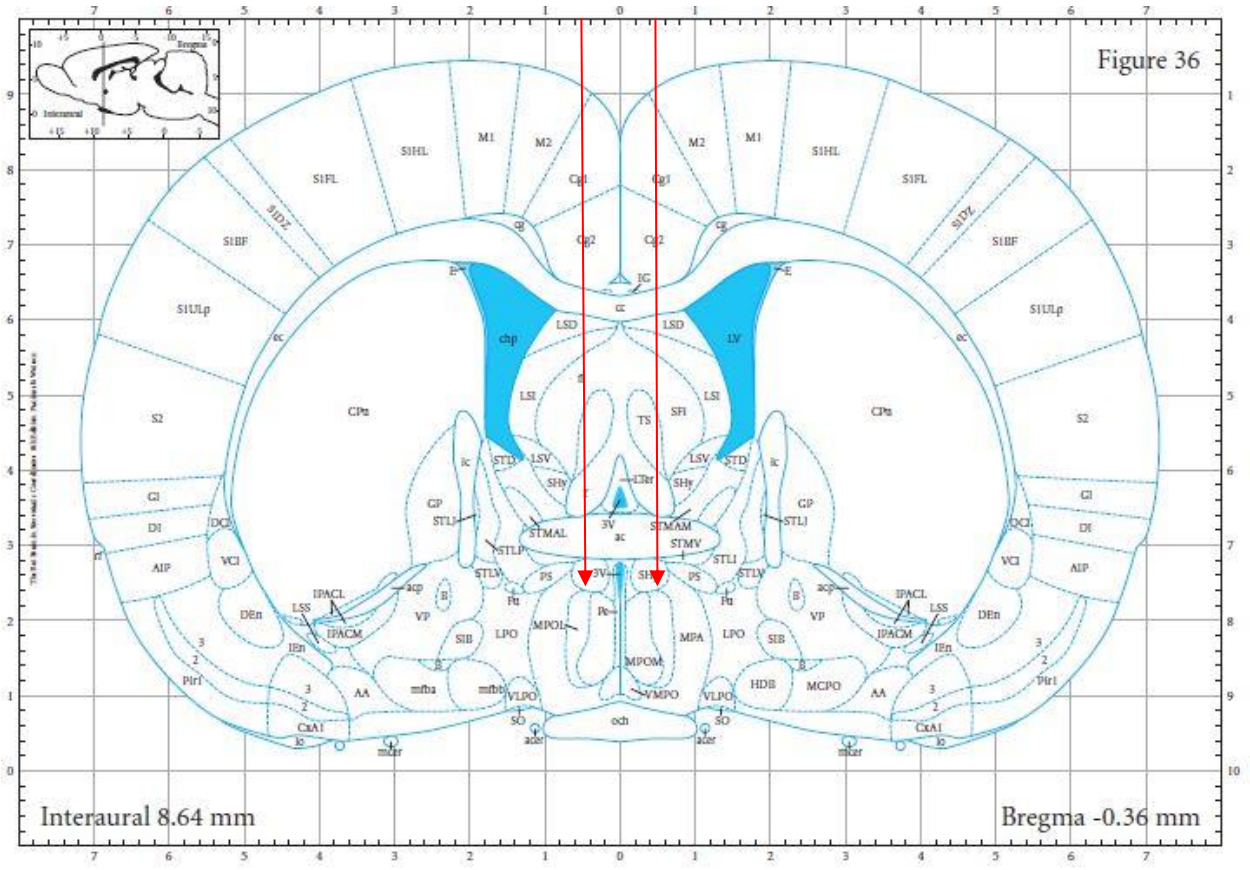


Рисунок 2.2 Местоположение кончиков канюль по атласу мозга крыс (Paxinos, Watson, 2007)

Металлические крепления представляли собой узкие полоски из нержавеющей стали, загнутые в форме скоб, концы которых загибались под кости черепа так, чтобы не повредить кору головного мозга. Металлические крепления автоклавировались вместе с канюлями и хирургическими инструментами. Так же предварительно делался пластиковый фиксатор, предохраняющий канюли и акрилоксидную «шапку» от дальнейших повреждений. Для этого из пластикового шприца вырезалось кольцо 1-1,5 см

в высоту. Края среза шлифовались, на нижней стороне бором просверливались отверстия с расстоянием приблизительно 0,5 см между ними. Далее фиксатор хранился в спирте и извлекался из него непосредственно перед фиксацией на черепе животного. Фиксатор ставился нижней стороной на череп находящегося в стереотаксе животного так, чтобы внутрь его попала и канюля, и вся (или большая часть) акрилоксидная «шапка», после чего заливался акрилоксидом так, чтобы достигалась его максимальная фиксация. После высыхания акрилоксида кожа вокруг операционного поля обрабатывалась 5% раствором йода, животное освобождалось из стереотакса, помещалось в индивидуальную клетку и транспортировалось в общее помещение. Через двенадцать часов после окончания операции самцы уже могли свободно передвигаться по клетке и питаться. Эксперименты с регистрацией полового поведения проводили на самцах не ранее, чем через неделю после операции по введению канюль.

Введение фармакологических веществ. Для введения веществ был изготовлен специальный механический аппликатор. В него вставлялись два Гамильтоновских шприца (на 25 мкл), заполненных необходимым раствором и соединённых гибкими прозрачными полиэтиленовыми трубочками-переходниками с иглами для введения, вставлявшимися в направляющие канюли, вживлённые в мозг животного. После установки и включения, аппликатор начинал подавать жидкость в обе канюли одновременно с одинаковой скоростью 2 мкл в минуту, это значение было откалибровано и выставлено заранее. Время введения – 1 минута, объем вводимой жидкости – 2 мкл.

2.2.2 Гистологический контроль

После проведения всей серии экспериментов по регистрации полового поведения, социального взаимодействия или тревожности проводился гистологический контроль места введения канюли. Для этого животному

внутрибрюшинно вводился «Золетил 100» в дозе 50 мг/кг для анальгезии. Через 10-15 минут в каждую канюлю вводилось 2 мкл зелёного пищевого красителя. Далее животные декапитировались с помощью гильотины. Мозг вынимался, помещался в инкубационный раствор и переносился в помещение с вибротомом (752 M, Campden Instruments, Leicestershire, UK). Далее от мозга отрезались лишние части так, чтобы оставался блок ткани 1 см шириной. Маркёрами нужного участка служили точки на месте вживления канюль на дорзальной стороне и хиазма (перекрёст зрительного нерва) на вентральной. Затем полученный блок клеился на подложку ростральной стороной вверх, ванночка вибротома заполнялась инкубационным раствором, после чего изготавливались срезы толщиной 200 микрон. С помощью микроскопа определялось место попадания канюль. Реконструкция места положения кончика канюль проводилась с помощью атласа (Paxinos, Watson 2007; рисунок 2.2).

2.2.3 Регистрация полового поведения самцов

2.2.3.1 Экспериментальные животные

Всего в экспериментах участвовали 30 самок и 32 самца. Из них было 6 самок и 15 половозрелых самцов стока Sprague Dawley массой от 350 до 450 грамм в возрасте от трёх до шести месяцев, содержавшихся на базе вивария Университета Умео, и 12 самок и 17 половозрелых самцов стока Wistar в возрасте от трёх до шести месяцев массой от 350 до 450 грамм из конвенционального вивария ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Животные в виварии содержались по четыре самки или три самца в клетке с постоянным доступом к кормушкам и поилкам при режиме «12 часов – день, 12 часов – ночь».

До начала всех экспериментальных процедур все самцы ежедневно в течение двух недель приучались к рукам экспериментатора, т.е. проходили процедуру хэндлинга.

2.2.3.2 Общая схема эксперимента

Перед началом экспериментов все самцы крыс были сексуально наивными, т.е. не имели полового опыта. Как известно из литературы, наличие или отсутствие опыта спаривания сильно влияет на регистрируемые нами параметры (Rodríguez-Manzo et al., 2000), поэтому перед началом операции каждый самец участвовал в серии из трёх последовательных экспериментов, приобретая необходимый половой опыт. В этих экспериментах интактные самцы трижды подсаживались к рецептивным самками для регистрации параметров полового поведения, с перерывом между экспериментами не менее 3 дней. Длительность каждого эксперимента составляла два часа, за это время самец, как правило, успевал совершить от двух до трех эякуляций. Такой режим проведения экспериментов выдерживался во избежание проявления эффектов полового насыщения.

На следующем этапе 15 самцов стока Sprague Dawley и 17 самцов стока Wistar подверглись операции по вживлению канюль в область МПО билатерально. Регистрация полового поведения после введения веществ происходила в тех же условиях.

Следовательно, для каждого из 15 самцов стока Sprague Dawley и 17 самцов стока Wistar регистрация полового поведения производилась в серии из шести последовательных этапов (рисунок 2.3):

1) серия из трех последовательных экспериментов (норма 1, норма 2, норма 3) для приобретения полового опыта и анализа его влияния на параметры полового поведения интактных крыс-самцов;

2) вживление канюль в область МПО билатерально и последующий реабилитационный период (не менее 7 дней) (операция);

3) регистрация полового поведения после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл 1мМ раствора глицина (глицин);

4) регистрация полового поведения после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл 20 μМ раствора стрихнина (стрихнин);

5) регистрация полового поведения после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл раствора Рингера для теплокровных в качестве контроля (Рингер).

Рисунок 2.3 Общая схема проведения экспериментов для самцов крыс стока Sprague Dawley и Wistar

Последовательность введения веществ для каждого самца обеих линий выбиралась в случайном порядке. Между введениями выдерживалось три дня во избежание проявления эффектов полового насыщения. В литературе имеются сведения о том, что глицин и стрихнин достаточно быстро вымываются и утилизируются в ткани мозга (Malinina, Druzin, Johansson, 2006), поэтому мы сочли целесообразным проводить запись только первых двух сессий. У самцов крыс первые две сессии, как правило, происходили в течение первых двух часов после предъявления рецептивной самки. Объём вводимых веществ рассчитывался в соответствии с объёмом медиального преоптического ядра (Paxinos, Watson 2007) и составлял 2 мкл.

Данная схема экспериментов была разработана с учётом требований этического комитета, основанных на руководстве «Guide for care and use of laboratory animals» (ILAR publication, 1996, National Academy Press). В

данном руководстве описано так называемое правило «ThreeRs» («Трёх Р»). Данное правило предлагает использовать три критерия при работе с лабораторными животными:

1. замена (Replacement): использовать методы, которые позволяют избежать или заменить использование животных в исследованиях;
2. сокращение (Reduction): использовать методы, которые позволяют исследователям получать сопоставимые уровни информации от меньшего количества животных или получать больше информации от того же числа животных;
3. улучшение (Refinement): использовать методы, которые уменьшают или минимизируют потенциальную боль, страдания или стресс используемых животных.

Использование данного дизайна экспериментов, при котором все исследуемые вещества инъецируются одной и той же группе животных, позволило уменьшить количество экспериментальных животных, следуя критерию «сокращение» правила «Трёх Р».

Кроме того, тестирование проводилось в помещении с комфортной температурой, изолированном от шума и посторонних запахов. Клетки с животными приносились из вивария заранее перед началом каждой серии в целях исключения влияния стрессового фактора новизны в процессе тестирования.

2.2.3.3 Регистрация параметров полового поведения животных

Для регистрации полового поведения экспериментальный самец и заранее подготовленная самка помещались в прозрачный бокс из оргстекла (60x40x50 см), размеры которого позволяли животным свободно передвигаться и взаимодействовать друг с другом. Эксперимент всегда длился в течение 2-х часов, с 18:00 до 20:00, и проводился в изолированной от постороннего присутствия и шума комнате, освещенной рассеянным

красным светом во избежание сбоя у животных режима «день-ночь». Кроме того, известно, что крысы, являясь сумеречными животными, наиболее активны в ночное и вечернее время суток.

Регистрация полового поведения производилась с помощью видеокамеры SonyHandycam. Ракурс регистрации, с которого проводилась съемка, позволял четко видеть и отслеживать параметры полового поведения как самцов, так и самок.

Таким образом, половое поведение самцов крыс может быть проанализировано с точки зрения двух компонентов – либидо (полового влечения самца к самке) и потенции (способности самца к половому акту). Согласно литературе (Heijkoop, Huijgens, Snoeren, 2018), либидо определяется сексуальным возбуждением, и может быть оценено с помощью измерения следующих параметров полового поведения самца:

1. латентный период маунтинга (МЛ) – время от подсадки самца к рецептивной самке до совершения им первого маунтинга. Неполные маунтинги (без фрикционных движений) при обработке результатов наблюдений не учитывались;

2. латентный период интромиссии (ИЛ) – время от подсадки самца к рецептивной самке до совершения им первой интромиссии.

Следующие регистрируемые параметры полового поведения определяли потенцию самца:

1. латентный период эякуляции (ЭЛ) – время от произведенной самцом после подсадки к рецептивной самке первой интромиссии до эякуляции в одной сессии;

2. длительность периода покоя (ДП) – время от эякуляции до первой интромиссии в следующей сессии;

3. число маунтингов за сессию (М);

4. число интромиссий за сессию (И);

Также при анализе видеозаписей анализировались дополнительные вычисляемые параметры (Heijkoop, Huijgens, Snoeren, 2018):

1. средний временной интервал между интромиссиями – длительность задержки эякуляции, поделённая на количество интромиссий в сессию (III);

2. частота паттернов в сессии – суммарное количество интромиссий и маунтингов, поделённое на длительность сессии (время от первого паттерна, маунтинга или интромиссии, в сессии) (CR);

3. частота интромиссий в сессию – количество интромиссий в сессию, поделённое на суммарное количество маунтингов и интромиссий в сессию (IR).

Рисунок 2.4 Схема выделения регистрируемых в экспериментах паттернов полового поведения самцов крыс. Объяснения в тексте

Сессией полового поведения самцов крыс считали период от первого паттерна полового поведения самца до эякуляции (рисунок 2.4). Как правило, за время регистрации (2 часа) самец успевал совершить от одной до трех сессий. Период между двумя последующими сессиями (от эякуляции до первого паттерна следующей сессии) определяли как период покоя. В это время самец производил груминг гениталий и некоторое время оставался вдали от самки.

2.2.3.4 Подготовительные процедуры на крысах-самках

Операция по овариоэктомии самок. Все операционные процедуры, включая предварительную подготовку животного, операционный наркоз и условия соблюдения мер стерильности во время операции проводились аналогично операционным процедурам на крысах-самцах. Операция по стерилизации самок проводилась с дорзальной стороны тела по методике Агмо (Ågmo, 2003). На дорсальной стороне тела, посередине спины, сбривали шерсть животного, обрабатывали операционное поле 70% спиртом и 5% р-ром йода. Далее делался сагиттальный разрез кожи длиной около 1,5 см, начиная от последней пары рёбер и ниже. Затем кожа оттягивалась на 1-2 см влево, и производился второй разрез: через мускульный слой в брюшную полость. В образовавшемся просвете находили яичник, расположенный непосредственно под разрезом, но скрытый в сальнике. Сальник отодвигался, маточная труба перевязывалась кетгутом и вместе с яичником отрезалась выше лигатуры. Разрез зашивался. Яичник на другой стороне тела удалялся аналогичным способом. После оварэктомии кожный разрез зашивали, а операционное поле обрабатывали 5% р-ром йода. После этих процедур животное помещалось в индивидуальную клетку и транспортировалось в общее помещение. Через двенадцать часов после окончания операции самки уже могли свободно передвигаться по клетке и питаться. Полное заживление операционных швов наступало через 2 недели после операции.

Введение самок в эструс. Для того, чтобы самка при контакте с самцом могла показать характерное половое поведения, т.е. была рецептивна для самца, перед проведением экспериментов самок фармакологически вводили в состояние эструса по методике Агмо (Ågmo, 1997). За 52 часа до начала эксперимента самкам подкожно вводили 0,02 мг эстрадиола бензоата (0,1 мл масляного р-ра), затем, за 4 часа до эксперимента, также подкожно вводили 1 мг прогестерона (0,1 мл масляного 1% р-ра). Готовность самки к спариванию проверяли визуально по наличию позы «лордоз», принимаемой самкой при

предъявлении самца. Каждая самка использовалась не чаще одного раза в три дня, самки чередовались таким образом, что самец взаимодействовал с разными самками во все время проведения экспериментов.

2.2.3.5 Анализ данных и статистическая обработка результатов

Анализ данных. Видеофайлы, содержащие запись видео полового поведения крыс и записанные на жесткий диск компьютера, обрабатывались после проведения эксперимента. Для обработки видеофайлов использовалась программа VirtualDub, которая позволяла просматривать видео как в ускоренном, так и замедленном воспроизведении. Анализ видеоизображения в программе VirtualDub позволял определить время выполнения того или иного поведенческого акта с точностью до одного кадра (частота кадров при записи видео составляла 25 кадров в секунду). Таким образом, в ходе обработки видеофайлов определяли время (с точностью до 1/25 доли секунды), когда был совершен определенный поведенческий паттерн (маунтинг, интромиссия, эякуляция), а также подсчитывали количество фрикционных движений, произведенных самцом во время интромиссий и эякуляций.

Статистическая обработка результатов осуществлялась по показателям, полученным на 9 самцах линии Sprague Dawley и 11 самцах линии Wistar, показавших адекватное половое поведение в трех последовательных экспериментах, прооперированных и затем прошедших полную серию экспериментов по введению веществ в МПО, включающую в себя введение растворов глицина, стрихнина и Рингера, и прошедших гистологический контроль подтверждал местоположение кончика канюли.

Данные о времени выполнения элементов полового поведения и количестве фрикций заносились в файл программы Excel. Далее проводилась статистическая обработка полученных результатов в программе GraphPad Prism 5 и Origin Pro v8.5.1. Для каждой выборки определяли нормальность

распределения по критерию Шапиро-Уилка. Так как выборки не прошли проверку на нормальность распределения, для сравнения данных внутри стоков использовали Т-критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони-Холма. Для сравнения данных между стоками использовали U-критерий Манна-Уитни. Достоверность результатов определялась при $p<0,05$.

2.2.4 Регистрация социального взаимодействия самцов

2.2.4.1 Экспериментальные животные

Для выявления роли глицинэргической передачи в МПО в регуляции социального взаимодействия и интереса к социальной новизне нами был выполнен ряд экспериментов по изучению социального взаимодействия в тесте Кроули. Трёхкамерный тест Кроули позволяет оценить когнитивные способности в форме стремления к социальному взаимодействию и интереса к социальной новизне (Crawley, 2007). Грызуны обычно предпочитают проводить больше времени с другим грызуном («общительность» или «социальное взаимодействие»; Панина и др., 2015) и будут исследовать нового грызуна чаще, чем знакомого («социальная новизна»). Основываясь на этих склонностях, трехкамерный тест может помочь выявить грызунов с дефицитом стремления к социальному взаимодействию и/или социальной новизны. Этот тест полезен для количественной оценки дефицита социального поведения, например, у трансгенных животных, проявляющих черты аутизма, а также для оценки новых химических соединений на предмет их влияния на социальное поведение.

В ходе экспериментов по оценке вклада глицинэргической передачи в МПО в регуляцию социального взаимодействия были проанализированы количественные данные, полученные на 20 половозрелых самцах крыс стока Sprague Dawley и 20 самцах стока Wistar. До начала всех экспериментальных

процедур все самцы ежедневно в течение двух недель приучались к рукам экспериментатора, т.е. проходили процедуру хэндлинга.

2.2.4.2 Схема установки для исследования социального поведения

Рабочая установка для исследования «социального узнавания» представляет собой прямоугольный бокс с высокими стенками, разделенный на три отсека прозрачными перегородками 60х30 см (A, B, MID; рисунок 2.5).

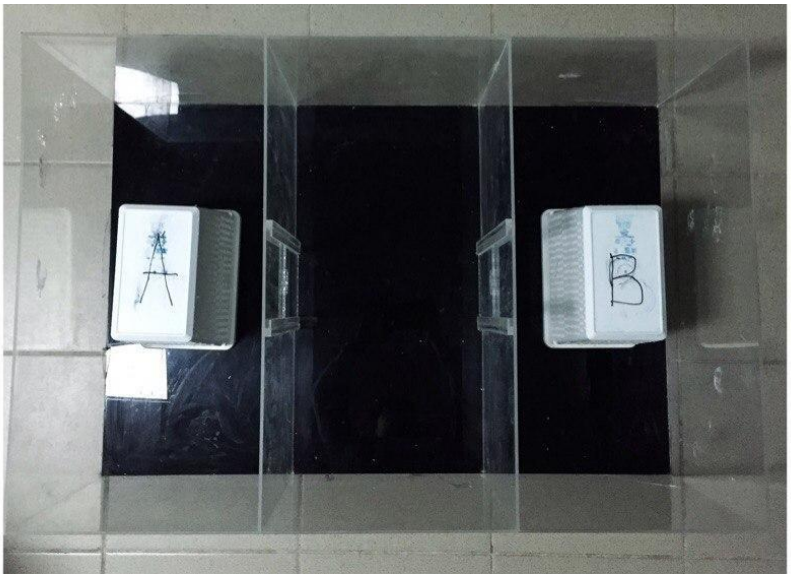


Рисунок 2.5 Фотография установки теста Кроули. Объяснение в тексте

В средней зоне (MID), куда помещалось экспериментальное животное, имелись проходы между отсеками 12 см в высоту и 10 см в ширину. Проходы закрывались специальными дверцами, спускающимися по рейловым направляющим в вертикальной плоскости. В зонах А и В находились полупроницаемые перфорированные контейнеры (20х15х30 см), в которые производилась подсадка резидента (самца своего помёта) и интрудера (самца чужого помёта) соответственно.

Сверху закреплена камера для регистрации перемещений и скорости животного в режиме реального времени.

2.2.4.3 Дизайн исследования социального взаимодействия в тесте Кроули

Тестирование включало три этапа, длящихся 5 минут каждый, во время которых экспериментальный самец мог свободно исследовать установку (рисунок 2.6):

1. на первом этапе в зонах А и В было пусто. Экспериментальное животное помещается в центральный отсек и в течение 5 минут находится в установке. Данный этап направлен на ознакомление животного с установкой;

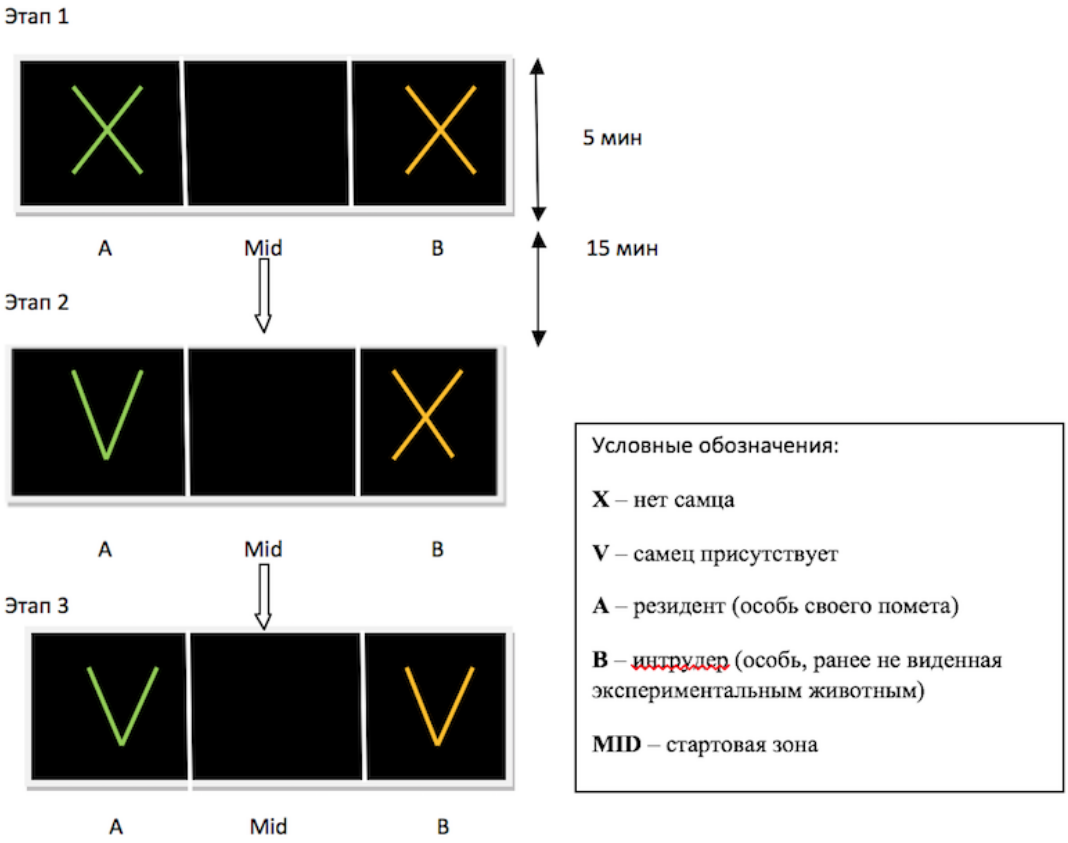


Рисунок 2.6 Дизайн исследования социального взаимодействия в тесте Кроули. Объяснения в тексте

2. на втором этапе в зону А подсаживался резидент - самец одного помета с экспериментальным самцом. Экспериментальное животное помещается в центральный отсек и в течение 5 минут находится в установке. Данный этап направлен на исследование **общительности** животного;

3. на третьем этапе в зоне А оставался резидент, а в зону В подсаживался интрудер - самец чужого помета. Экспериментальное животное помещается в центральный отсек и в течение 5 минут находится в установке. Данный этап направлен на исследование **социальной новизны** и направленности животного на получение нового опыта (Eagle, Fitzpatrick, Perrine, 2013).

Перерыв между этапами составлял 15 минут, во время которого установка обрабатывалась раствором этанола для удаления запаховых меток.

Схема эксперимента была аналогична схеме эксперимента по регистрации полового поведения. Для каждого из 20 самцов крыс стока Sprague Dawley и 26 самцов стока Wistar регистрация социального взаимодействия производилась в серии из пяти последовательных этапов:

1) однократное тестирование в трёхкамерном тесте Кроули интактного животного;

2) вживление канюль в область МПО билатерально и последующий реабилитационный период (не менее 7 дней) (операция);

3) регистрация социального взаимодействия и стремления к социальной новизне после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл 1мМ раствора глицина (глицин);

4) регистрация социального взаимодействия и стремления к социальной новизне после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл 20 μМ раствора стрихнина (стрихнин);

5) регистрация социального взаимодействия и стремления к социальной новизне после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл раствора Рингера для теплокровных в качестве контроля (Рингер).

Между введениями выдерживался интервал в два дня. Тестирование проводилось в помещении с комфортной температурой, изолированном от шума и посторонних запахов. Клетки с животными приносились из вивария

заранее перед началом каждой серии в целях исключения влияния стрессового фактора новизны в процессе тестирования.

2.2.4.4 Регистрируемые параметры в тесте Кроули

Регистрация параметров и событий в каждом эксперименте осуществлялось с использованием комплекса SMART Video Tracking System V3.0. Данное программное обеспечение позволяло автоматически регистрировать процент времени нахождения экспериментального животного в зонах A, B и MID на всех трёх этапах эксперимента. Записанные данные представлялись в цифровом формате, совместимом с Microsoft Word и Microsoft Excel.

2.2.4.5 Статистический анализ результатов теста Кроули

Для статистической обработки результатов теста «открытое поле» из выборки самцов стока Sprague Dawley были исключены 7 самцов, у которых последующий гистологический контроль показал, что положение кончиков канюль в мозговой ткани не соответствовало заданным стереотаксическим координатам. Из выборки самцов стока Wistar были исключены 10 самцов, у которых последующий гистологический контроль показал, что положение кончиков канюль в мозговой ткани не соответствовало заданным стереотаксическим координатам.

Статистическая обработка полученных результатов производилась в программе GraphPad Prism 5. Для каждой выборки определяли нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Так как выборки не прошли проверку на нормальность распределения, для сравнения данных внутри стоков использовали Т-критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони-Холма. Для сравнения данных между стоками использовали U-критерий Манна-Уитни. Достоверность различий определялась при $p<0.05$.

2.2.5 Регистрация тревожности самцов

2.2.5.1 Экспериментальные животные

Для выделения роли глицинэргической передачи в регуляции тревожности самцов крыс, нами были выполнены эксперименты по изучению степени тревожности крыс в тесте «Открытое поле», в ходе которых были проанализированы данные, полученные на 20 половозрелых самцах крыс линии Sprague Dawley и 20 самцах линии Wistar.

2.2.5.2 Схема установки «Открытое поле»

Установка «открытое поле» представляла собой бокс с высокими бортами (100x100x50 см). Пол установки был расчерчен на равные сектора (25 штук), предназначенных для визуальной регистрации моторной активности и эмоционального статуса экспериментальных животных. Поведение животных в 16-ти внешних квадратах и 9-ти внутренних регистрировались отдельно (рисунок 2.7).

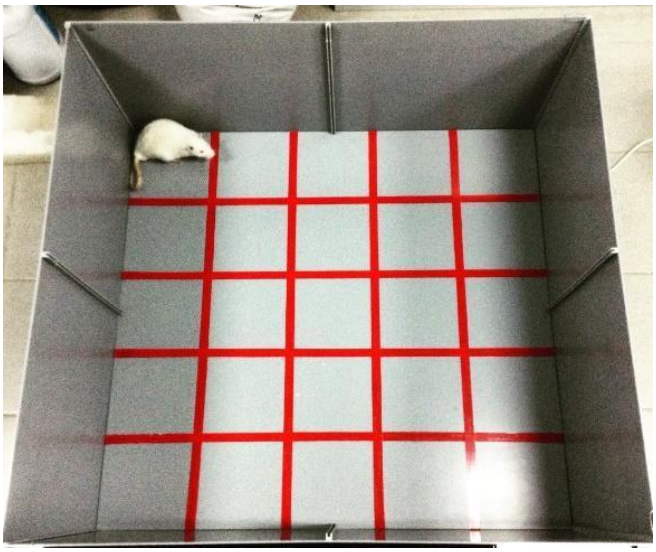


Рисунок 2.7. Фотография установки «открытое поле». Объяснение в тексте

2.2.5.3 Дизайн тестирования животных в установке «открытое поле»

Эксперимент состоял из одного этапа, длящегося 5 минут, во время которого экспериментальный самец помещался в центральный квадрат, после чего мог свободно исследовать установку. После каждого самца установка обрабатывалась этанолом для удаления запаховых меток.

Регистрация событий производилась с использованием комплекса SMART Video Tracking System V3.0. В процессе записи в автоматическом режиме фиксировались траектория и средняя скорость пробежки, а в пользовательском режиме фиксировались количество и длительность груминга, а также вертикальных стоек.

Схема эксперимента была аналогична схеме эксперимента по регистрации полового поведения и поведения в тесте Кроули.

1) однократное тестирование в установке «открытое поле» интактного животного с регистрацией двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, тревожности;

2) вживление канюль в область МПО билатерально и последующий реабилитационный период (не менее 7 дней) (операция);

3) регистрация двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, тревожности после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл 1мМ раствора глицина (глицин);

4) регистрация двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, тревожности после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл 20 μМ раствора стрихнина (стрихнин);

5) регистрация двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, тревожности после билатеральной инъекции в канюли 2 мкл раствора Рингера для теплокровных в качестве контроля (Рингер).

Между введениями выдерживался интервал в два дня. Тестирование проводилось в помещении с комфортной температурой, изолированном от шума и посторонних запахов. Клетки с животными приносились из вивария заранее перед началом каждой серии, в целях исключения влияния стрессового фактора новизны в процессе тестирования.

2.2.5.4 Регистрируемые параметры в тесте «открытое поле»

Регистрация событий производилась с использованием комплекса SMART Video Tracking System V3.0. В процессе записи в автоматическом режиме фиксировались горизонтальная двигательная активность самцов отдельно во внутренних и внешних квадратах установки. В пользовательском режиме фиксировались количество и длительность груминга, а также вертикальных стоек. Фиксировался так называемый «незавершённый» груминг. Груминг половозрелых грызунов состоит из специфических и сильно стереотипных паттернов последовательных движений, известных как "паттерн-синтаксическая цепочка". Данные цепочки груминга, однажды начавшись, продолжаются до завершения, не требуя сенсорной обратной связи. Однако острые стрессовые факторы могут сильно влиять на груминг, который становится заместительной активностью. В таких случаях нарушается цефалокаудальное правило (от головы к хвосту), что приводит к появлению «незавершённого» груминга, при котором нарушается региональное распределение движений (например, животное прерывает паттерн-синтаксическую цепочку и прекращает груминг, не дойдя до туловища и т.д.). «Незавершённый» груминг используется в лабораторных тестах в качестве меры стресса или тревожного поведения у грызунов (Kalueff et al., 2016).

2.2.5.5 Статистический анализ результатов теста «открытое поле»

Для статистической обработки результатов теста «открытое поле» из выборки самцов стока Sprague Dawley были исключены 7 самцов, у которых последующий гистологический контроль показал, что положение кончиков канюль в мозговой ткани не соответствовало заданным стереотаксическим координатам. Из выборки самцов стока Wistar были исключены 10 самцов, у которых последующий гистологический контроль показал, что положение кончиков канюль в мозговой ткани не соответствовало заданным стереотаксическим координатам.

Статистическая обработка полученных результатов производилась в программе GraphPad Prism 5. Для каждой выборки определяли нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Так как выборки не прошли проверку на нормальность распределения, для сравнения данных внутри стоков использовали Т-критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони-Холма. Для сравнения данных между стоками использовали U-критерий Манна-Уитни. Достоверность различий определялась при $p<0.05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Анализ концентрационной зависимости действия стрихнина как антагониста глициновых и (или) ГАМК-рецепторов на изолированных нейронах МПО

3.1.1 Регистрация ответов нейронов МПО на аппликацию ГАМК и стрихнина

В данной серии экспериментов нами была применена методика patch-clamp, которая позволила провести анализ особенностей действия различных концентраций стрихнина как антагониста глициновых и ГАМК-рецепторов в МПО, на эффективность ГАМК-эргической передачи на изолированных нейронах МПО мозга самцов крыс Sprague Dawley.

Как известно (Karlsson, Haage, Johansson, 1997), стрихнин является неспецифическим антагонистом тормозных рецепторов, блокирующим как рецепторы к глицину, так и рецепторы к ГАМК. Однако избирательность стрихнина может определяться концентрацией, так как константа аффинности (связывания) стрихнина к глициновому рецептору - 0,03 мкМ (Young, Snyder, 1973), а константа аффинности стрихнина к ГАМК-рецептору - 1,9 мкМ (Braestrup, Nielsen, 1980). В связи с чем, для блокирования стрихнином именно глицинэргической передачи в МПО, нам необходимо было подобрать такую концентрацию стрихнина, чтобы, полностью блокируя рецепторы к глицину, не блокировать рецепторы к ГАМК. Это исследование было проведено на диссоциированных изолированных клетках МПО с применением методики patch-clamp, модификация perforated patch, как наиболее соответствующей поставленной задаче. В экспериментах регистрировали токовый ответ нейрона на аппликацию ГАМК (8 последовательных аппликаций), затем в 5 аппликациях подавали сочетание растворов ГАМК и стрихнина в исследуемой

концентрации. После этого вновь проводили аппликацию ГАМК на фоне постоянной перфузии нейронов внеклеточным раствором. Данные нормировались к значениям параметров при 8-й аппликации ГАМК.

Как видно из рисунка 3.1, при аппликации раствора, содержащего как 1 мМ ГАМК, так и 50 μМ стрихнина, амплитуда пика токового ответа нейрона на ГАМК падала почти до нуля (0,28±0,02), по сравнению с амплитудой пика токового ответа при аппликации раствора, содержащего только 1 мМ ГАМК (1,07±0,02).

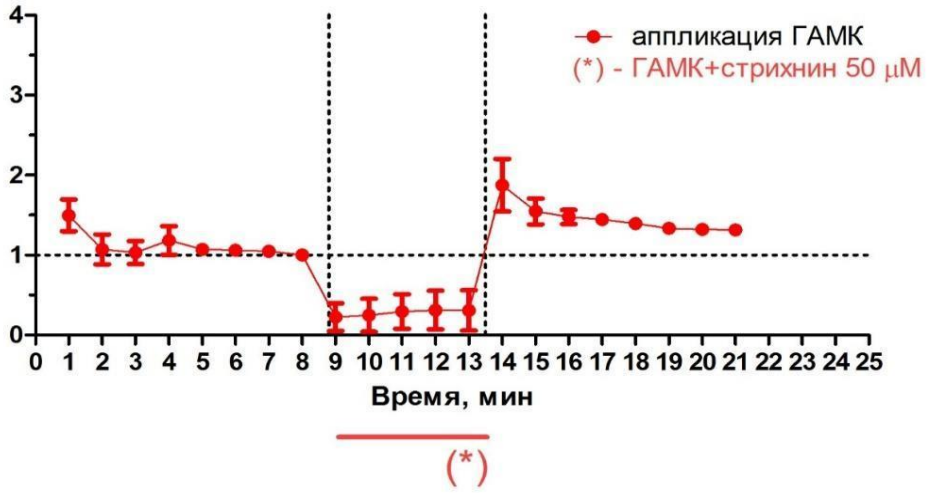


Рисунок 3.1 Средние значения амплитуды пика токового ответа на аппликацию раствора ГАМК концентрацией 1 мМ (первые 8 аппликаций, показаны без использования дополнительных обозначений) и раствора, содержащего ГАМК и стрихнин (1 мМ и 50 μМ соответственно) (9-13 аппликации, показаны красной линией на графике). Все показатели нормированы к восьмой аппликации ГАМК (амплитуда принята за 1), средние значения приведены со стандартной ошибкой среднего

Такие же изменения происходили и с параметром «амплитуда остаточного тока токового ответа» при аппликации раствора, содержащего как 1 мМ ГАМК, так и 50 μМ стрихнина (1,09±0,02 и 0,31±0,02 соответственно; рисунок 3.2).

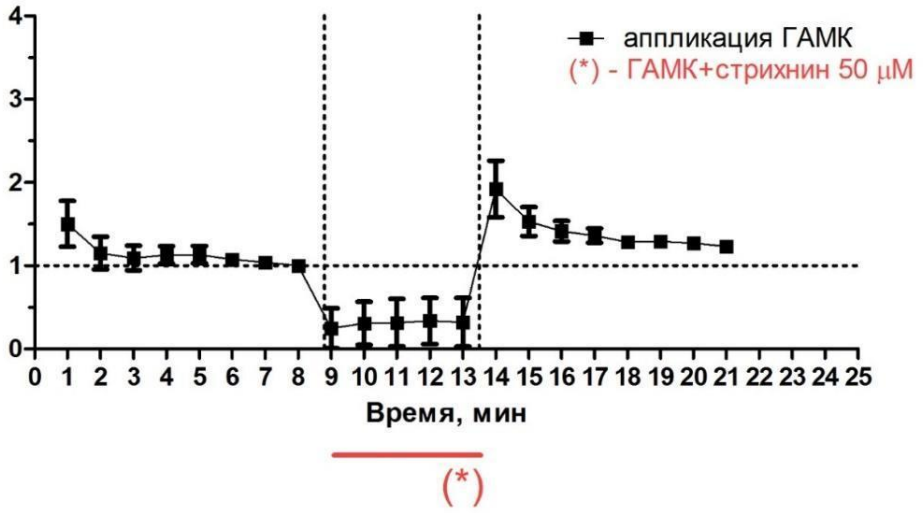


Рисунок 3.2 Средние значения амплитуды остаточного тока токового ответа на аппликацию раствора ГАМК (1 мМ) и раствора, содержащего ГАМК и стрихнин (1 мМ и 50 μМ соответственно). Остальные обозначения как на рисунке 3.1

Статистический анализ полученных данных показал, что эти отличия являлись достоверными (рисунок 3.3).

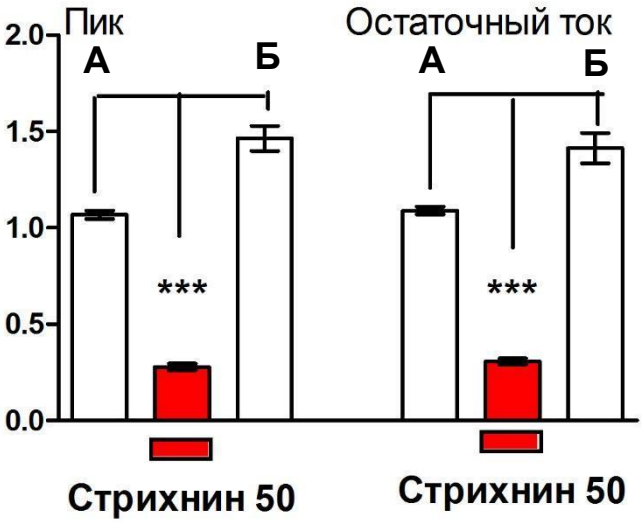


Рисунок 3.3 Средние значения нормированной амплитуды пика токового ответа (слева) и амплитуды остаточного тока токового ответа (справа) на аппликацию растворов. Аппликация 1 мМ раствора ГАМК (белые столбики: А – серия из восьми первых аппликаций раствора ГАМК, Б - серия из восьми последующих аппликаций раствора ГАМК) и раствора,

содержащего ГАМК и стрихнин (1 мМ и 50 μМ соответственно, красный столбик). Средние значения приведены со стандартной ошибкой среднего, показаны достоверные различия средних по t-критерию (***p<0,001)

В то же время, при аппликации раствора, содержащего 1 мМ ГАМК и 20 μМ стрихнина, блокады рецепторов к ГАМК не происходило. Как видно из рисунка 3.4, амплитуда пика токового ответа при аппликации 1 мМ раствора ГАМК не отличалась от таковой при аппликации раствора, содержащего 1 мМ ГАМК и 20 μМ стрихнина (1,07±0,02 и 1,23±0,07 соответственно; рисунок 3.4).

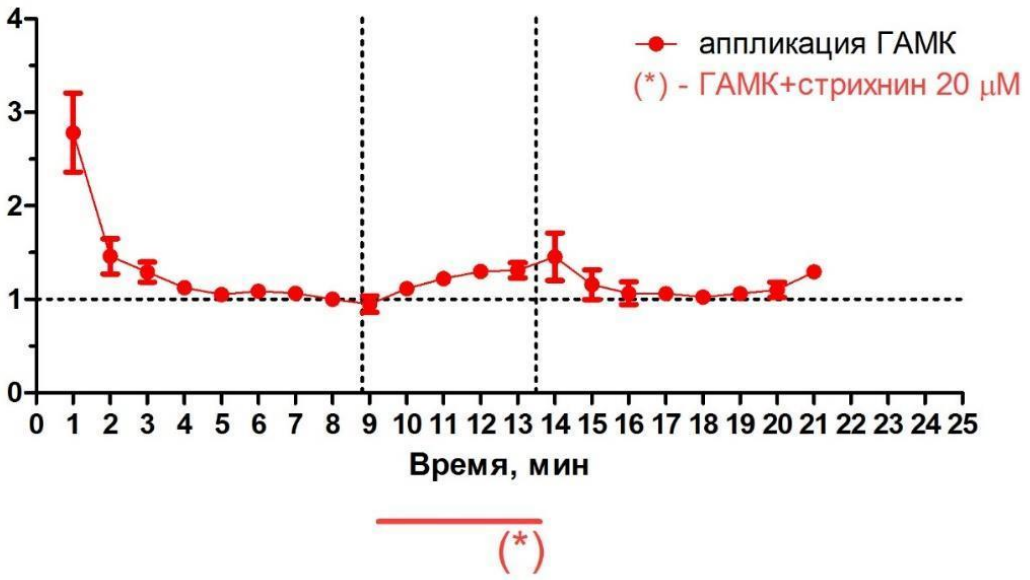


Рисунок 3.4 Средние значения амплитуды пика токового ответа на аппликацию раствора ГАМК концентрацией 1 мМ (показан без использования дополнительных обозначений) и раствора, содержащего ГАМК и стрихнин концентрацией 1 мМ и 20 μМ соответственно (показан красной линией на графике). Остальные обозначения аналогичны рисунку3.1

Амплитуда остаточного тока токового ответа (рисунок 3.5) при аппликации раствора, содержащего 1 мМ ГАМК и 20 μМ стрихнина, также не отличается от амплитуды остаточного тока токового ответа при

аппликации раствора, содержащего только 1 мМ ГАМК (1,08±0,03 и 1,27±0,07 соответственно).

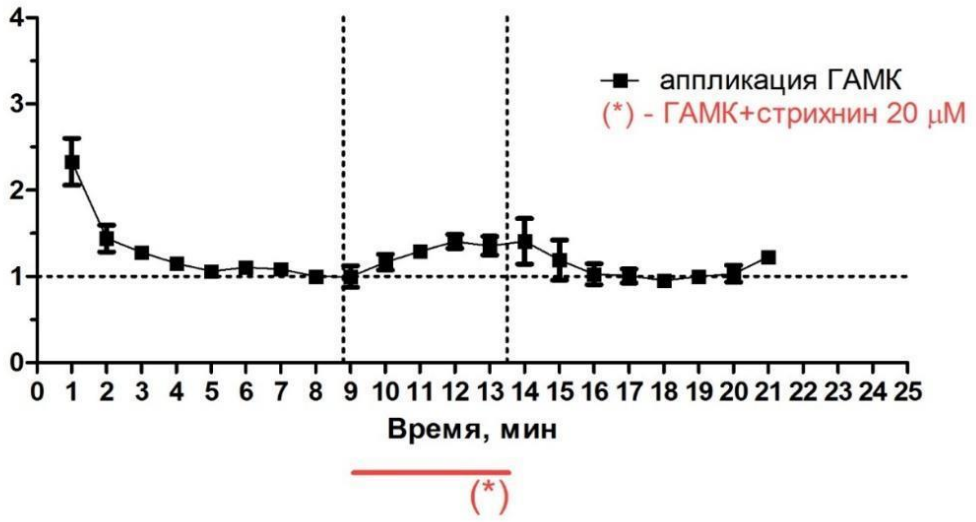


Рисунок 3.5 Средние значения амплитуды остаточного тока токового ответа на аппликацию раствора ГАМК концентрацией 1 мМ (показан без использования дополнительных обозначений) и раствора, содержащего ГАМК и стрихнин концентрацией 1 мМ и 20 μМ соответственно (показан красной линией на графике). Остальные обозначения аналогичны рисунку3.1

Средние значения амплитуд пика и остаточного тока токового ответа на аппликацию растворов ГАМК и стрихнина достоверных различий не имеют, что показано на рисунке 3.6.

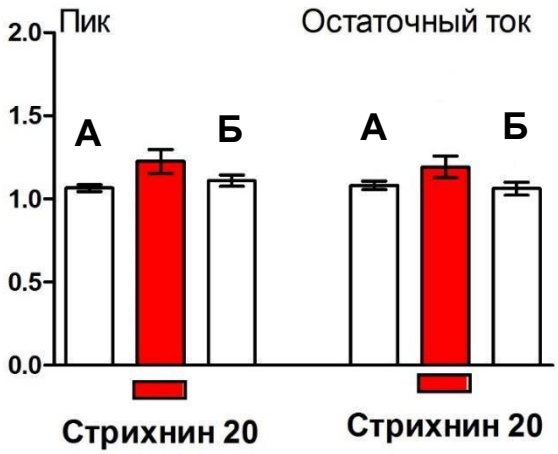


Рисунок 3.6 Средние значения нормированной амплитуды пика токового ответа (слева) и амплитуды остаточного тока токового ответа

(справа) на аппликацию растворов. Аппликация 1 мМ раствора ГАМК (белые столбики: А – серия из восьми первых аппликаций раствора ГАМК, Б - серия из восьми последующих аппликаций раствора ГАМК) и раствора, содержащего ГАМК и стрихнин (1 мМ и 20 μМ соответственно, красный столбик). Средние значения приведены со стандартной ошибкой среднего

Таким образом, аппликация раствора, содержавшего ГАМК 1 мМ и стрихнин 50 μМ, достоверно снижала средние значения нормированной амплитуды пика токового ответа и остаточного тока токового ответа, в то время как аппликация раствора, содержавшего ГАМК 1 мМ и стрихнин 20 μМ, не снижала средние значения нормированной амплитуды пика токового ответа и остаточного тока токового ответа.

3.1.2 Обсуждение полученных результатов

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в концентрации 50 μМ стрихнин блокирует не только рецепторы к глицину, но и большую часть рецепторов к ГАМК. Следовательно, можно утверждать, что стрихнин в концентрации 50 μМ является блокатором как для ГАМК-рецепторов, так и для глициновых рецепторов, участвующих в тормозной нейропередачи в мозге.

Исходя из полученных экспериментальных данных, необходимо использовать стрихнин в концентрации 20 μМ, так как при аппликации раствора стрихнина к диссоциированным клеткам МПО в концентрации 20 μМ большинство рецепторов к ГАМК оставались не заблокированными. Следовательно, в наших исследованиях была найдена концентрация стрихнина 20 μМ, избирательно блокирующая в нейронах МПО рецепторы к глицину (Zhuravleva et al., 2015).

Таким образом, стрихнин в концентрации 20 μМ блокирует глициновые рецепторы и, в то же время, не блокирует рецепотры к ГАМК, и

может быть использован в качестве ингибитора глицинзависимого торможения в нейронных сетях МПО при изучении различных видов поведения.

3.2 Поведение интактных крыс-самцов Sprague Dawley и Wistar

3.2.1 Половое поведение интактных крыс

Половое поведение самцов крыс состоит из *аппетивного* поведения самца, которое позволяет ему оценить потенциал самки для целесообразности спаривания и вызвать у неё рецептивный ответ, и *консуматорного* поведения, или непосредственно копуляторного акта (Hull, Dominguez, 2019). К паттернам, описывающим аппетивное поведение, относятся длительность латентного периода маунтинга и латентного периода интромиссии (Heijkoop, Huijgens, Snoeren, 2018). В данной серии экспериментов было проанализировано половое поведение интактных самцов крыс стока Sprague Dawley и Wistar, ранее получивших половой опыт в двух последовательных экспериментах.

Аппетивная фаза полового поведения

Сравнение аппетивной фазы полового поведения по параметру длительность латентного периода интромиссии не выявило статистически значимых различий ($p = 0,38$) между интактными самцами стока Sprague Dawley и самцами стока Wistar. В то же время было выявлено, что самцы крыс стока Wistar почти не совершали маунтингов в аппетивную фазу (рисунок 3.7 А), следовательно, измерение длительности латентного периода маунтинга не представлялось возможным. В то время медианное значение латентного периода маунтинга у самцов линии Sprague Dawley составило 91 с (25% - 45,5 с; 75% - 120,5 с; рисунок 3.7 А), а латентного периода интромиссии - 119 с (25% - 44,5 с; 75% - 212,5 с; рисунок 3.7 Б). Медианное

значение длительности латентного периода интромиссии у интактных самцов стока Wistar составляло 69 с (25% - 26 с; 75% - 173 с; рисунок 3.7 Б).

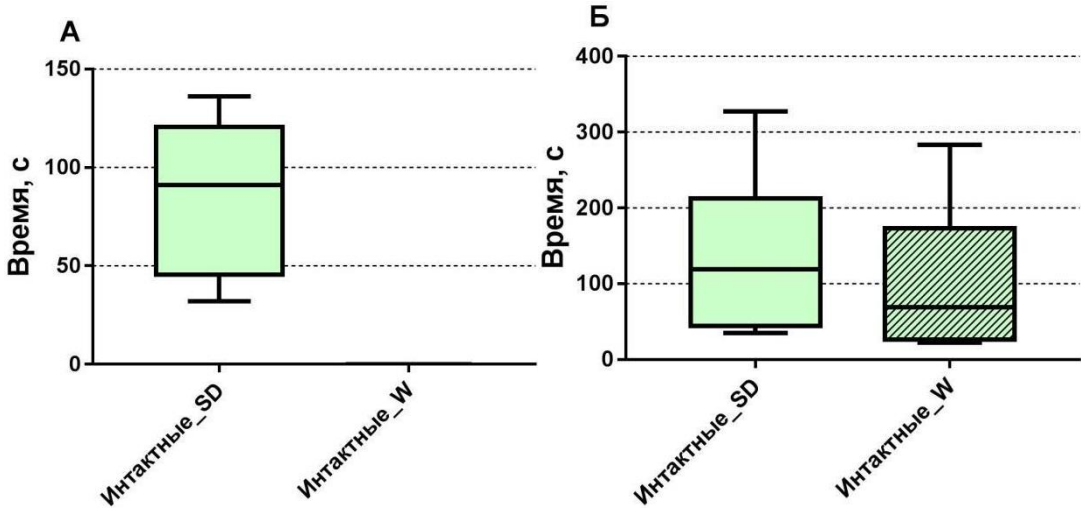


Рисунок 3.7 Параметры, характеризующие аппетивное половое поведение самцов. Длительность латентного периода маунтинга (А) и латентного периода интромиссии (Б) у интактных самцов крыс. На рисунке приведены абсолютные значения

Таким образом, уже на стадии аппетивного полового поведения была выявлена разница между стоками. Самцы крыс Wistar демонстрировали сниженный половой интерес к самкам по сравнению с самцами Sprague Dawley.

Консуматорная фаза полового поведения

Такие параметры, как длительность латентного периода эякуляции, длительность периода покоя, а также число маунтингов за сессию и число интромиссий за сессию, характеризуют консуматорное половое поведение самцов.

Длительность латентного периода эякуляции была в два раза выше у интактных самцов стока Wistar по сравнению со стоком Sprague Dawley ($p = 0,01$; рисунок 3.8 А). Медианное значение длительности латентного периода эякуляции интактных самцов стока Sprague Dawley составляло 1102 с (25% -

624,5 с; 75% - 1589 с). Медианное значение длительности латентного периода эякуляции у интактных самцов стока Wistar составляло 2517 с (25% - 1435 с; 75% - 3282 с).

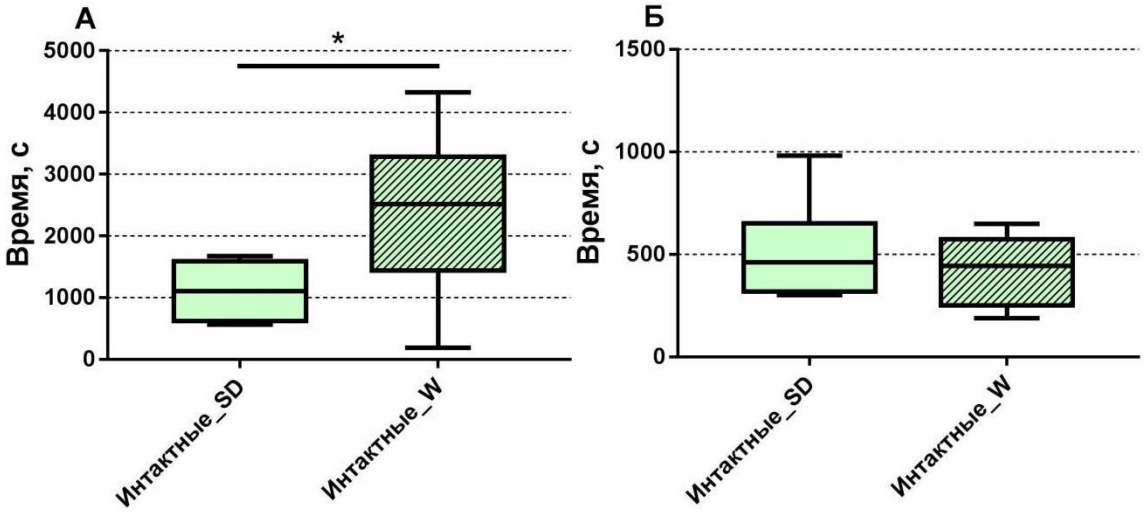


Рисунок 3.8 Длительность латентного периода эякуляции (А) и периода покоя (Б) у интактных самцов для стока Wistar (W) и стока Sprague Dawley (SD). На рисунке приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия медианных значений (* $p<0.05$)

Статистически значимых различий в длительности периода покоя между интактными самцами двух стоков не найдено ($p = 0,6$; рисунок 3.8 Б).

При изучении количества маутингов было показано, что самцы крыс стока Wistar совершали статистически значимо меньшее количество маунтингов по сравнению с самцами крыс стока Sprague Dawley ($p < 0,0001$; рисунок 3.9 А). Из 11 интактных самцов стока Wistar всего два самца совершили по одному маунтингу за один акт копуляции. Медианное значение количества маунтингов в сессию у интактных самцов стока Sprague Dawley составляло 7 (25% - 2; 75% - 10; рисунок 3.9 А).

В то же время самцы крыс стока Wistar совершали статистически значимо большее количество интромиссий по сравнению с самцами крыс

стока Sprague Dawley (p=0,02; рисунок 3.9 Б). Медианное значение количества интромиссий в сессию у интактных самцов стока Sprague Dawley составляло 21 (25% - 12; 75% - 29; рисунок 3.9 Б). Медианное значение количества интромиссий в сессию у интактных самцов стока Wistar в среднем составляло 44 (25% - 30; 75% - 58; рисунок 3.9 Б).

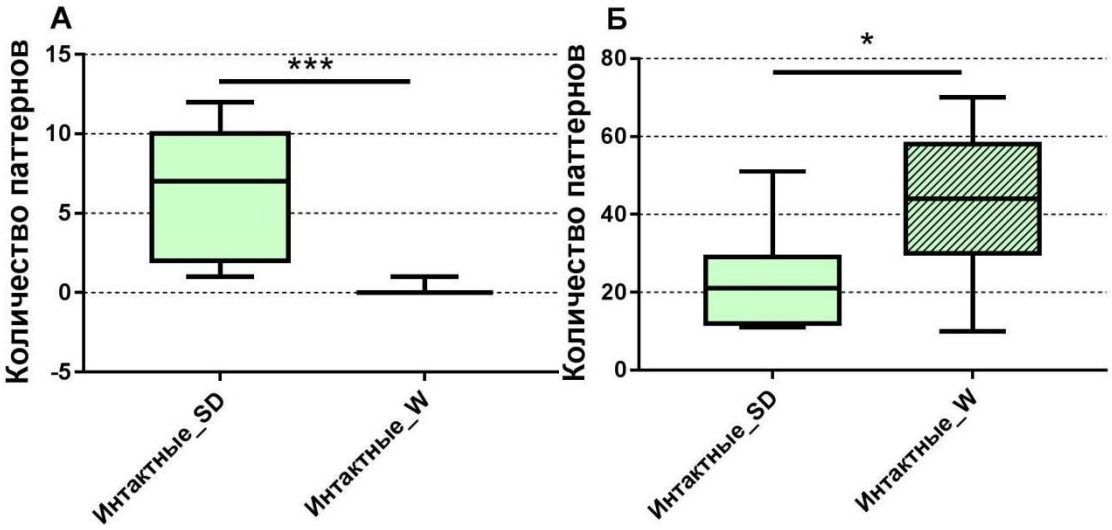


Рисунок 3.9 Количество паттернов маунтинга (А) и интромиссии (Б) у интактных самцов для стока Wistar (W) и стока Sprague Dawley (SD). На рисунке приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия медианных значений (***p< 0,001, * p<0.05)

При анализе дополнительных вычисляемых параметров, характеризующих консуматорное половое поведение самцов, не было найдено различие в среднем временном интервале между интромиссиями (рисунок 3.10 А) и частоте паттернов в сессию у самцов двух стоков (рисунок 3.10 Б). В то же время, частота интромиссий в сессию у крыс стока Wistar была статистически значимо больше по сравнению с частотой интромиссий в сессию у самцов крыс стока Sprague Dawley (p<0,0001; рисунок 3.10 В). Медианное значение частоты интромиссий в сессию для интактных самцов стока Sprague Dawley составляло 0,75 у.е. (25% - 0,61 у.е.; 75% - 0,9 у.е.; рисунок 3.10 В). Медианное значение частоты интромиссий у интактных

самцов линии Wistar составляло 1 у.е. (25% - 1 у.е.; 75% - 1 у.е.; рисунок 3.10 В), так как самцы данного стока почти не совершали маунтингов.

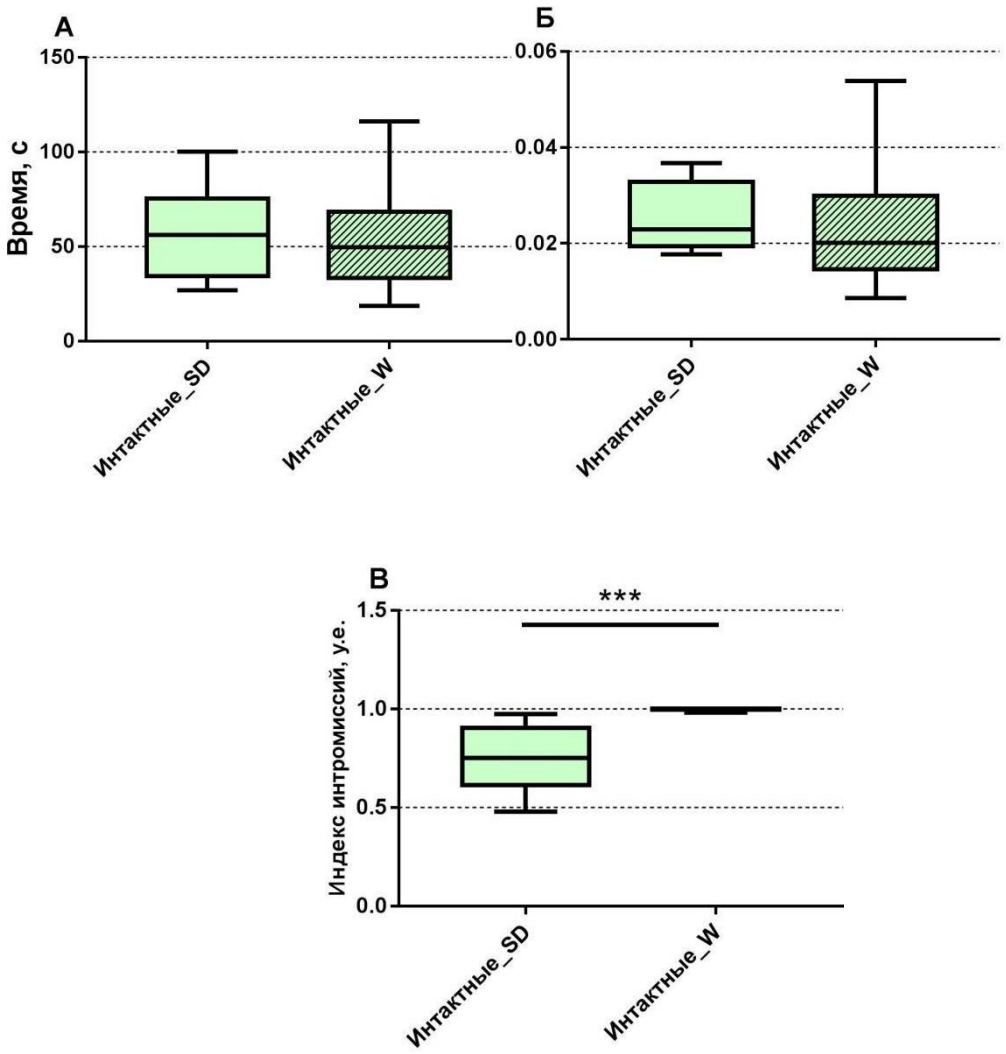


Рисунок 3.10 Средний временной интервал между интромиссиями (А), частота паттернов в сессию (Б) и частота интромиссий в сессию (В) у интактных самцов для стока Wistar (W) и стока Sprague Dawley (SD). На рисунке приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия медианных значений (***p< 0,001)

3.2.2 Поведение интактных крыс-самцов в тесте Кроули

При изучении социального поведения в тесте Кроули самцов крыс двух стоков не было выявлено различий как по параметру общительности, так и по параметру социального интереса.

На втором этапе эксперимента при изучении общительности не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённого интактными самцами двух стоков в отсеке «А» (p = 0,93; рисунок 3.11А), в отсеке «MID» (p = 0,78; рисунок 3.11Б), в отсеке «В» (p = 0,78; рисунок 3.11В).

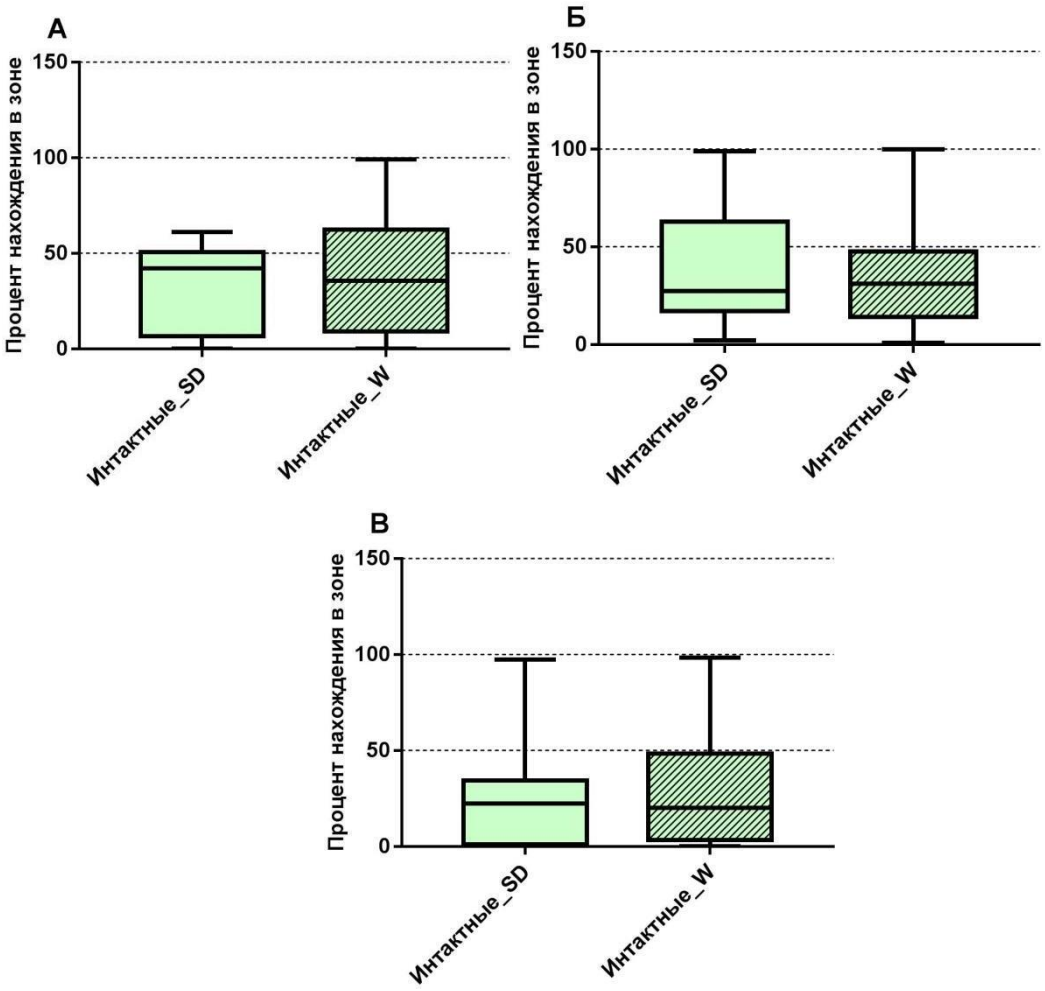


Рисунок 3.11 Процент времени, проведённый интактными самцами стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) на втором этапе теста «Социальная активность» в отсеках «А» (А), «MID» (Б) и «В» (В). На графике приведены абсолютные значения

Также и на третьем этапе эксперимента при изучении социального интереса статистически значимых различий в проценте времени, проведённого интактными самцами двух стоков в отсеке «А» (p = 0,83;

рисунок 3.12 А), в отсеке «MID» (p = 0,83; рисунок 3.12 Б), в отсеке «В» (p = 0,31; рисунок 3.12 В) выявлено не было.

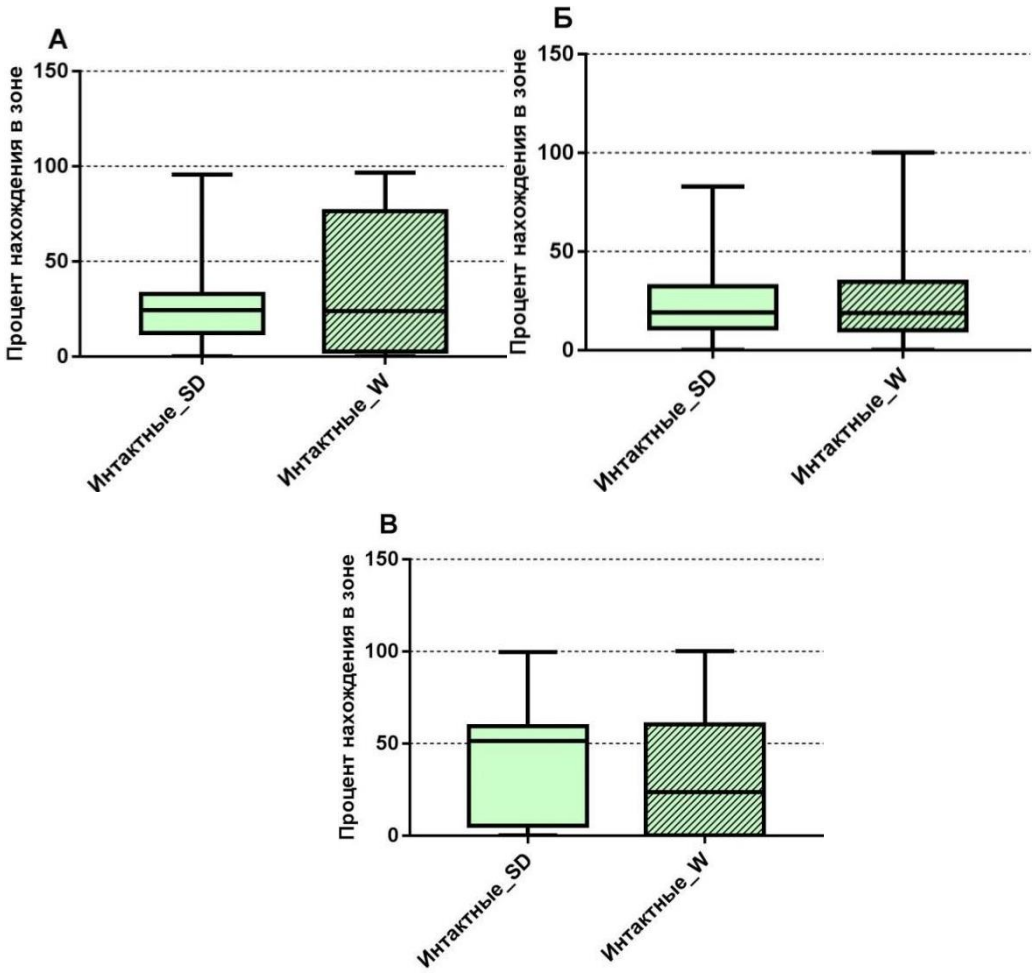


Рисунок 3.12 Процент времени, проведённый интактными самцами стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) на третьем этапе теста «Социальная активность» в отсеках «А» (А), «MID» (Б) и «В» (В). На графике приведены абсолютные значения

3.2.3 Поведение интактных крыс-самцов в тесте «открытое поле»

В ходе анализа параметров теста «открытое поле» была выявлена разница между тревожностью интактных самцов крыс стоков Sprague Dawley и Wistar.

Статистически значимых различий в горизонтальной двигательной активности во внешних (рисунок 3.13 А) и внутренних (рисунок 3.13 Б)

квадратах установки «Открытое поле» для интактных самцов двух стоков выявлено не было (p = 0,77 и p = 0,28 соответственно).

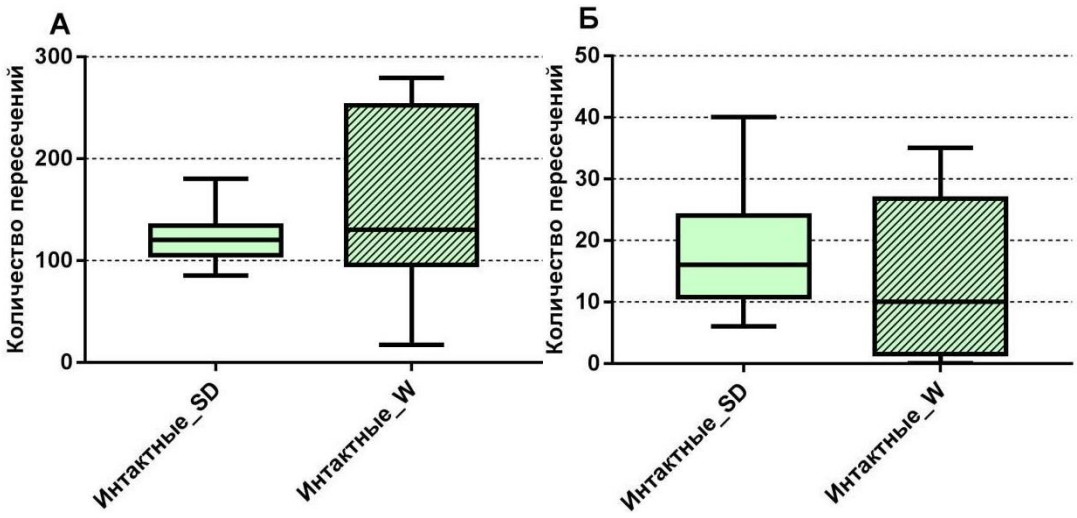


Рисунок 3.13 Горизонтальная двигательная активность интактных самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) во внешних (А) и внутренних (Б) квадратах установки «Открытое поле». На графике приведены абсолютные значения

В то же время было отмечено, что длительность вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «Открытое поле» у интактных самцов стока Wistar была статистически значимо ниже, чем у интактных самцов стока Sprague Dawley ($p<0,0001$; рисунок 3.14 А), при этом статистически значимых различий в количестве паттернов вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «Открытое поле» для интактных самцов двух стоков выявлено не было ($p=0,76$; рисунок 3.14 Б).

Сниженная ориентировочно-исследовательская активность, определенная по длительности вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «Открытое поле» у интактных самцов стока Wistar, могла быть связана с проявлением более высокой тревожности крыс стока Wistar.

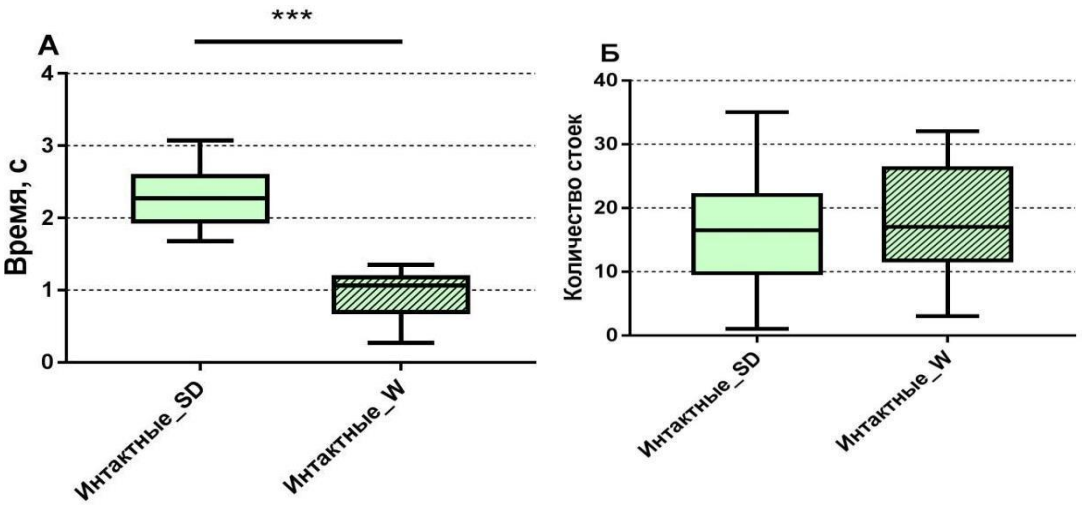


Рисунок 3.14 Длительность (А) и количество паттернов (Б) вертикальной двигательной активности интактных самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) во внешних квадратах установки «Открытое поле». На графике приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия (***p<0,0001)

Действительно было обнаружено, что при отсутствии значимых различий в количестве паттернов груминга во внутренних квадратах установки «Открытое поле» для интактных самцов двух стоков выявлено не было (p = 0,65; рисунок 3.15 А), количество паттернов груминга во внешних квадратах установки «Открытое поле» у самцов стока Wistar было статистически значимо больше, чем у самцов стока Sprague Dawley (p = 0,03; рисунок 3.15 Б). Медианное значение количества паттернов груминга во внешних квадратах установки «Открытое поле» для интактных самцов стока Sprague Dawley составляло 0,5 (25% - 0; 75% - 1,75; рисунок 3.15 Б). Медианное значение количества паттернов груминга во внешних квадратах установки «Открытое поле» для интактных самцов стока Wistar составляло 3 (25% - 0,75; 75% - 6; рисунок 3.15 Б).

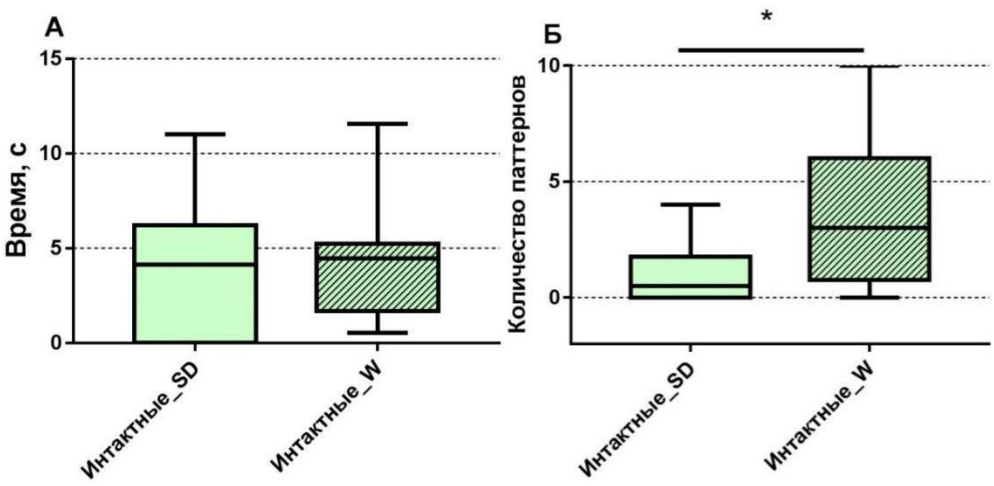


Рисунок 3.15 Длительность (А) и количество паттернов (Б) груминга интактных самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) во внешних квадратах установки «Открытое поле». На графике приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия (*p< 0,05)

3.2.4 Обсуждение результатов

Анализ полученных нами результатов тестирования полового поведения интактных животных выявил статистически значимые различия в половом поведении интактных самцов Sprague Dawley и Wistar. Наиболее заметным различием в поведении самцов двух стоков оказалось почти полное отсутствие паттерна «маунтинг» у самцов стока Wistar. В литературе есть упоминание о том, что самцы крыс стока Wistar совершают меньше маунтингов и больше интромиссий, чем самцы стока Sprague Dawley (McLean, Dupeire, Elder, 1972). Кроме того, самцам стока Wistar требовалось больше времени и интромиссий для достижения эякуляции. Данное различие может свидетельствовать о меньше эффективности копуляции самцов стока Wistar (Zhuravleva et al., 2021).

Анализ степени тревожности самцов стоков Sprague Dawley и Wistar в тесте «открытое поле» показал наличие более высокой степени тревожности у самцов стока Wistar. Количество «незавершённого» груминга,

свидетельствующего о более тревожном состоянии (Kalueff et al., 2016; Umryukhin, Grigorchuk, 2017), у этих животных было выше, чем у самцов стока Sprague Dawley. Также длительность вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» у интактных самцов стока Sprague Dawley была выше, чем у самцов Wistar. Вертикальную двигательную активность связывают с исследовательским поведением (Umryukhin, Grigorchuk, 2017). Уровень исследовательского поведения обратно пропорционален степени тревожности животного, следовательно, самцы Wistar, обладавшие меньшей длительностью вертикальной двигательной активности по сравнению с самцами Sprague Dawley, также являются более тревожными и по данному параметру (Zhuravleva et al., 2021).

Возможно, сниженная эффективность копуляции связана с более высоким уровнем тревожности стока Wistar, так как, согласно модели «воронки» (Veening, Coolen, 2014), тревожные самцы могут тратить больше времени на проверку безопасности окружающей среды, тем самым снижая эффективность копуляции. Однако данное предположение требует дополнительных исследований.

Следует отметить, что, несмотря на существующее предположение в современной научной литературе, что различия в некоторых типах социального поведения между стоками крыс Sprague Dawley и Wistar обусловлены разницей в социальном взаимодействии и аффилиативном поведении (Manduca et al., 2014a; Manduca et al., 2014b), статистически значимых различий при уровне $p<0,05$ в социальном взаимодействии самцов стоков Sprague Dawley и Wistar в трехкамерном тесте Кроули найдено не было.

3.3 Изучение роли глицинэргической передачи в поведении крыс-самцов различных стоков

Различий по параметрам аппетивной и консуматорной фаз полового поведения, социальному взаимодействию в тесте Кроули и тревожностью в тесте «открытое поле» между животными после контрольного введения в МПО раствора Рингера и интактными животными не выявлено. В связи с чем оценка изменений всех исследуемых видов поведения после инъекций глицина и стрихнина была проведена относительно контроля.

3.3.1 Анализ параметров полового поведения крыс-самцов

3.3.1.1 Половое поведение крыс-самцов Sprague Dawley при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО

Аппетивная фаза полового поведения

При микроинъекциях глицина в МПО крыс стока Sprague Dawley наблюдалась тенденция к увеличению длительности латентных периодов как для маунтинга (рисунок 3.16 А), так и для интромиссии (рисунок 3.16 Б), по сравнению с эффектами микроинъекций раствора Рингера. Медианное значение длительности латентного периода маунтинга после микроинъекции раствора Рингера – 47 с (25% - 23 с, 75% - 181 с), после микроинъекции раствора глицина 1 мМ составляло 130 с (25% - 74,5 с, 75% - 331 с). Медианное значение длительности латентного периода интромиссии после микроинъекции раствора Рингера – 182 с (25% - 65 с, 75% - 381 с), после микроинъекции раствора глицина 1 мМ составляло 276 с (25% - 109,5 с, 75% - 404,5 с). При микроинъекциях стрихнина в МПО наблюдалась противоположная тенденция – к уменьшению медианного значения латентных периодов маунтингов (рисунок 3.16 А) и интромиссий (рисунок 3.16 Б) по сравнению с медианными значениями латентных периодов маунтингов и интромиссий соответственно при введении раствора Рингера. Медианное значение длительности латентного периода маунтинга после микроинъекции раствора стрихнина составляло 63 с (25% - 29,5 с, 75% - 76,5

с). Медианное значение длительности латентного периода интромиссии после микроинъекции раствора стрихнина составляло 96 с (25% - 52,5 с, 75% - 164,5 с). Однако достоверных различий для данных параметров, характеризующих либидо самцов млекопитающих, выявлено не было.

А Б

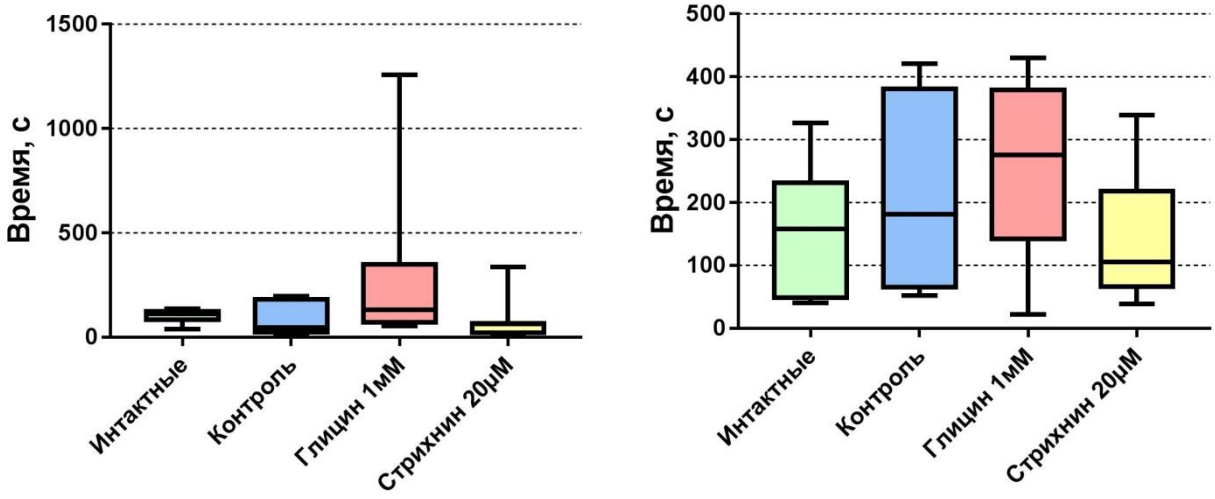


Рисунок 3.16 Параметры, характеризующие аппетивное половое поведение самцов Sprague Dawley. Латентный период маунтинга (А) и латентный период интромиссии (Б) у самцов крыс в течение трех последовательных экспериментов по микроинъекции растворов Рингера, глицина и стрихнина в МПО. По вертикали – длительность в секундах, на графике приведены абсолютные значения

Консуматорная фаза полового поведения

Такие параметры, как латентный период эякуляции, длительность периода покоя, а также число маунтингов и число интромиссий за сессию, характеризуют консуматорное половое поведение самцов.

При введении раствора глицина медианное значение длительности латентного периода эякуляции составляло 887,5 с (25% - 556 с; 75% - 1063 с), что было статистически значимо ниже ($p<0,01$; рисунок 17 А) по сравнению с медианным значением длительности латентного периода эякуляции после введения раствора Рингера, составлявшим 2291 с (25% - 1316 с; 75% - 3051 с). После введения раствора стрихнина медианное значение длительности

латентного периода эякуляции составляло 1044 с (25% - 536,5 с; 75% - 1497 с), статистически значимых различий по сравнению с медианным значением длительности латентного периода эякуляции после введения раствора Рингера выявлено не было (рисунок 3.17 А).

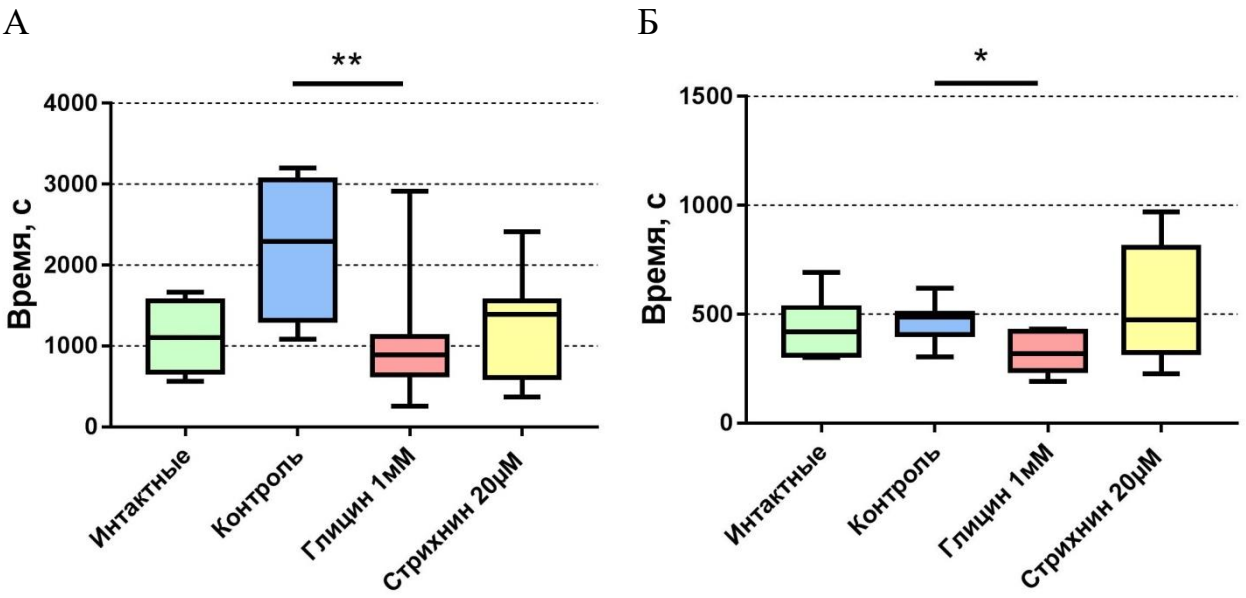


Рисунок 3.17 Параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов Sprague Dawley. Длительность латентного периода эякуляции (А) и длительность периода покоя между сессиями (Б) у самцов крыс в течение трех последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина и стрихнина в МПО. По вертикали – длительность в секундах, на графике приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия медианных значений (**p<0,01; * p<0,05)

Медианное значение длительности периода покоя между сессиями у интактных крыс стока Sprague Dawley в среднем составляло 461 с (25% - 318,8 с; 75% - 651,5 с). Медианное значение длительности периода покоя между сессиями после билатеральных микроинъекций раствора Рингера составляло 487 с (25% - 405 с; 75% - 504 с) и статистически значимо снижалось после микроинъекций глицина (p<0,05; рисунок 3.17 Б), составляя 318 с (25% - 246,5 с; 75% - 409,5с). Наблюдалась также тенденция

к снижению медианного значения длительности периода покоя до 405 с (25% - 274 с; 75% - 645,5 с) при введении стрихнина по сравнению с медианным значением длительности периода покоя при введении раствора Рингера (рисунок 3.17 Б).

Медианное значение количества маунтингов в сессию у интактных самцов стока Sprague Dawley составляло 7 (25% - 2; 75% - 10). Медианное значение количества маунтингов в сессию у самцов стока SpragueDawley после микроинъекций раствора Рингера составляло 8 (25% - 7; 75% - 14) и статистически значимо снижалось после микроинъекций глицина ($p<0,05$; рисунок 3.18 А), составляя 3 (25% - 1,5; 75% - 4). После микроинъекции стрихнина (медианное значение 4; 25% - 3,5; 75% - 9) показатели статистически не отличались от контрольных значений.

А Б

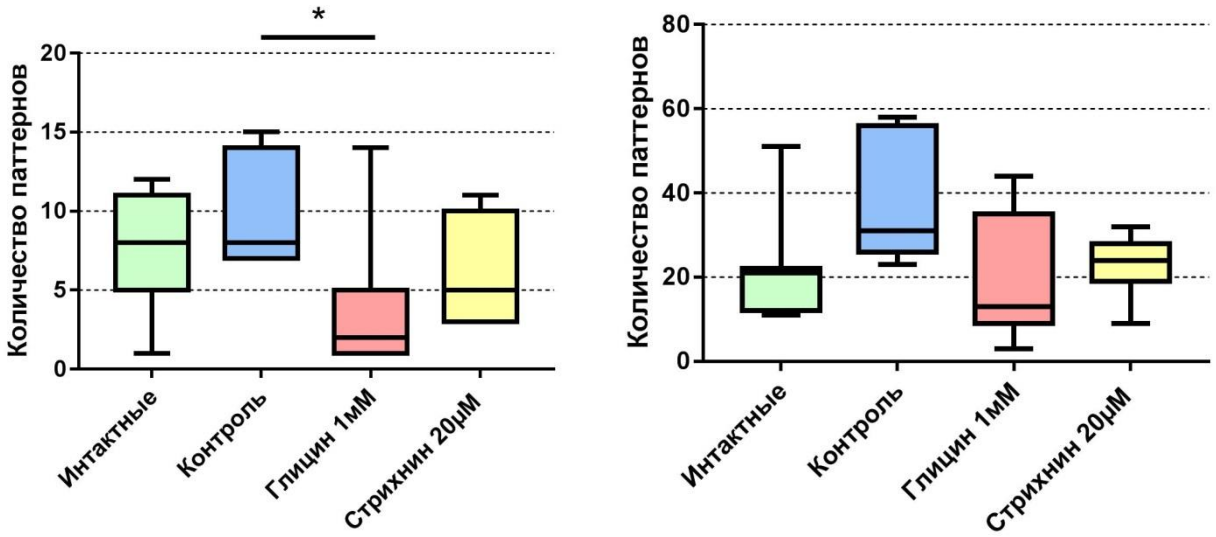


Рисунок 3.18 Параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов Sprague Dawley. Количество маунтингов (А) и количество интромиссий (Б) у самцов крыс в течение трех последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина и стрихнина в МПО. По вертикали – количество паттернов, на графике приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия медианных значений (* $p<0,05$)

Различий в количестве интромиссий в сессию у самцов стока Sprague Dawley после микроинъекций как глицина, так и стрихнина (рисунок 3.18 Б) по сравнению с контролем не выявлено.

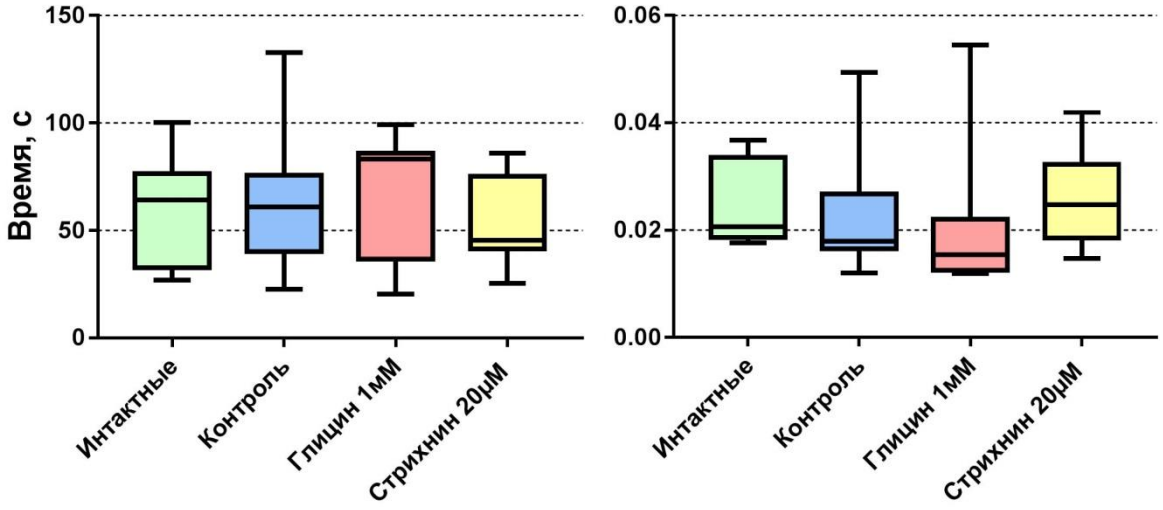
Далее анализировались дополнительные вычисляемые параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов (рисунок 3.19). Различий в среднем временном интервале между интромиссиями, частоте паттернов в сессию и частоте интромиссий в сессию у самцов стока Sprague Dawley после микроинъекций как глицина, так и стрихнина по сравнению с контролем не выявлено.

Таким образом, из описанных выше результатов видно, что для самцов стока Sprague Dawley билатеральные микроинъекции исследуемых веществ не влияли на параметры, характеризующие аппетивное половое поведение, а также на вычисляемые параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов. В то же время микроинъекции глицина статистически значимо снижали следующие параметры, характеризующие консуматорное половое поведение: длительность латентного периода эякуляции, длительность периода покоя между сессиями, количество маунтингов в сессию, что свидетельствовало об активации полового поведения и повышении его эффективности (Heijkoop, Huijgens, Snoeren, 2018).

Микроинъекции стрихнина в МПО, блокирующие глициновые рецепторы в нейронах, не приводили к статистически значимому изменению параметров полового поведения крыс. Следовательно, глицинэргическая система торможения вносит небольшой вклад в общую систему торможения в МПО крыс стока Sprague Dawley, а повышение половой активности при введении глицина, по-видимому, связано с участием глицина в модуляции NMDA-рецепторов возбуждающей системы нейронных сетей МПО.

А

Б



В

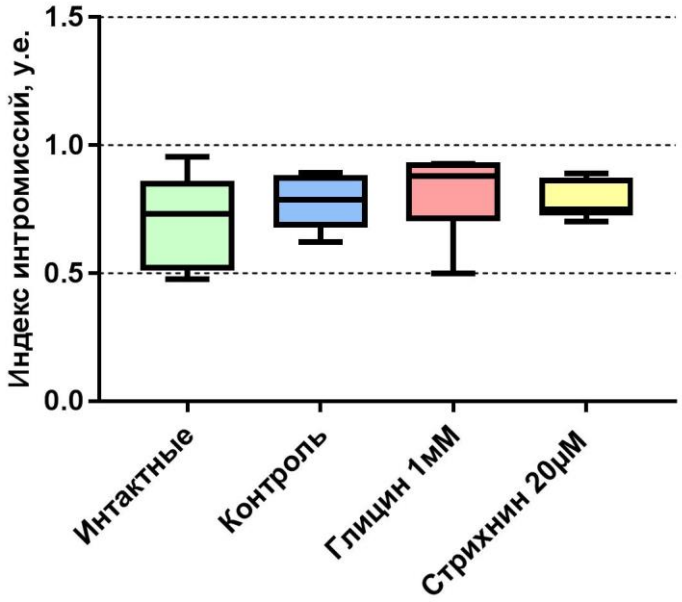


Рисунок 3.19 Вычисляемые параметры. Средний временной интервал между интромиссиями (А), частота паттернов в сессию (Б) и частота интромиссий в сессию (В) у самцов крыс Sprague Dawley в течение трех последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина и стрихнина в МПО. На графике приведены абсолютные значения

3.3.1.2 Половое поведение крыс-самцов Wistar при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО

Аппетивная фаза полового поведения

В отличие от активирующего влияния глицина на половое поведение крыс стока Sprague Dawley, микроинъекции раствора глицина в концентрации 1мМ у 4 самцов из 8 вызывали полное или частичное (невозможность эякуляции) отсутствие полового поведения у самцов крыс стока Wistar. Самцы начинали копуляторный акт с паттерна «маунтинг» по одному разу после микроинъекции глицина 1 мМ (рисунок 3.20 А).

А Б

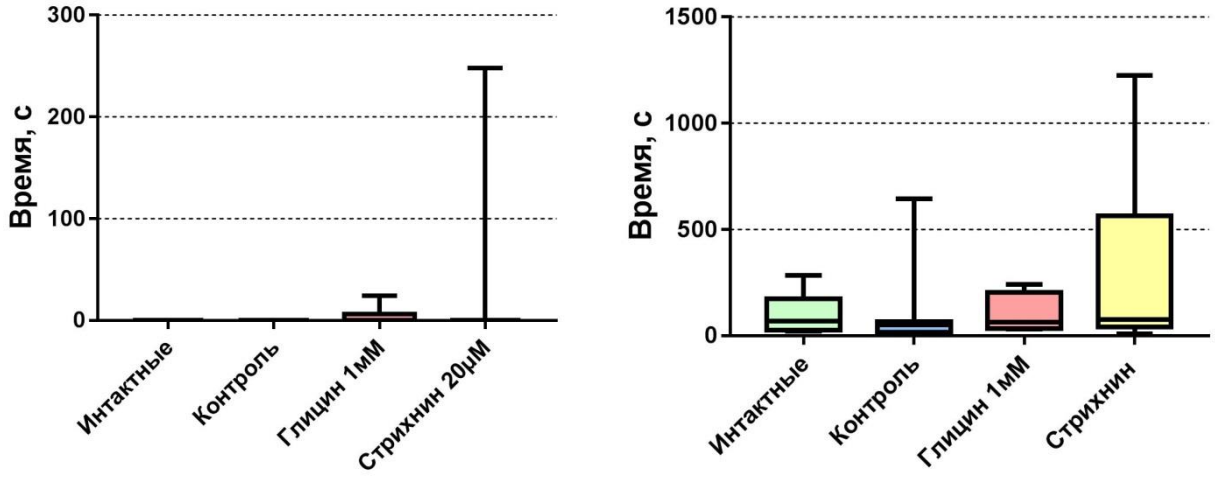


Рисунок 3.20 Параметры, характеризующие аппетивное половое поведение самцов. Латентный период маунтинга (А) и латентный период интромиссии (Б) у самцов крыс в течение четырёх последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина 1мМ, а также стрихнина в МПО. По вертикали – длительность в секундах, на графике приведены абсолютные значения

После микроинъекций стрихнина медианное значение длительности латентного периода интромиссии (76 с; 25% - 41,5 с; 75% - 564 с) было выше по сравнению с медианным значением длительности латентного периода после микроинъекций раствора Рингера (рисунок 3.20 Б), однако статистически значимых различий найдено не было.

Консуматорная фаза полового поведения

После микроинъекций как глицина, так и стрихнина (рисунок 3.21) не выявлено статистически значимых различий по параметрам: латентный период эякуляции и длительность периода покоя между сессиями.

А Б

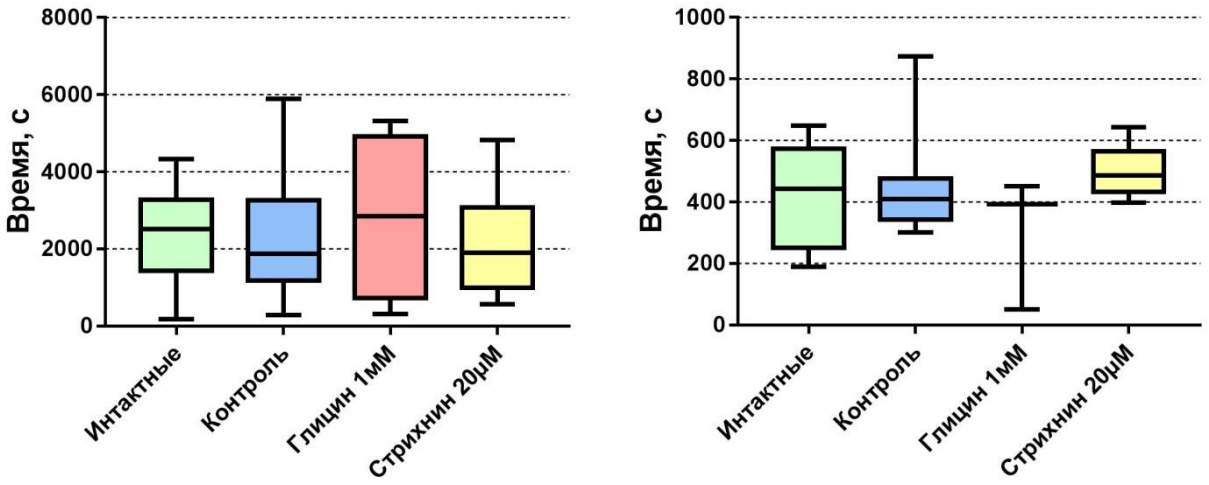


Рисунок 3.21 Параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов. Латентный период эякуляции (А) и длительность периода покоя между сессиями (Б) у самцов крыс в течение четырёх последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина 1мМ, а также стрихнина в МПО. По вертикали – длительность в секундах, на графике приведены абсолютные значения

Самцы крыс стока Wistar почти не совершали маунтингов (рисунок 3.22 А) после билатеральных микроинъекций раствора глицина – два самца из четырёх, совершивших копуляторный акт. После же микроинъекций стрихнина маунтинги совершили пять самцов, при этом число маунтингов доходило до пяти за один копуляторный акт. Микроинъекции глицина приводили к появлению тенденции к увеличению количества интромиссий (62,5; 25% - 20,5; 75% - 91) по сравнению с количеством интромиссий после микроинъекций как раствора Рингера, однако статистически значимых различий найдено не было. Микроинъекции стрихнина также не приводили к

значимым изменениям данного параметра (40; 25% - 19, 75% - 70,5; рисунок 3.22 Б).

А Б

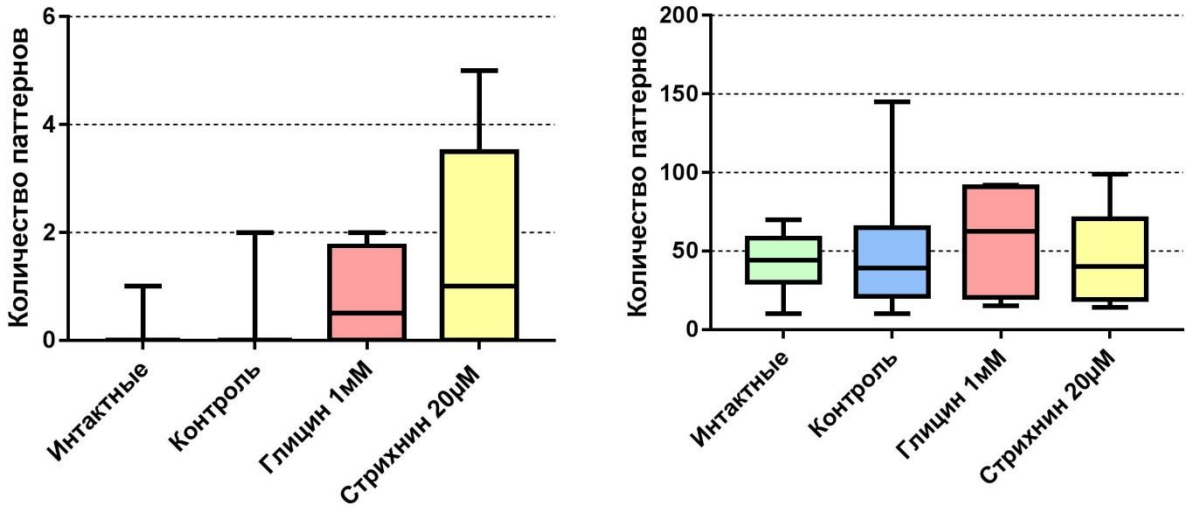


Рисунок 3.22 Параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов Wistar. Количество маунтингов (А) и количество интромиссий (Б) у самцов крыс в течение трех последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина и стрихнина в МПО. По вертикали – количество паттернов, на графике приведены абсолютные значения

Далее анализировались дополнительные вычисляемые параметры, характеризующие консуматорное половое поведение самцов стока Wistar (рисунок 3.23).

Различий в среднем временном интервале между интромиссиями, частоте паттернов в сессию у самцов стока Wistar после микроинъекций как глицина, так и стрихнина по сравнению с контролем не выявлено. В то же время наблюдалось статистически значимое снижение медианного значения частоты интромиссий после микроинъекций стрихнина (0,98; 25% - 0,92; 75% - 1) по сравнению с медианным значением частоты интромиссий после микроинъекций раствора Рингера (рисунок 3.23 В).

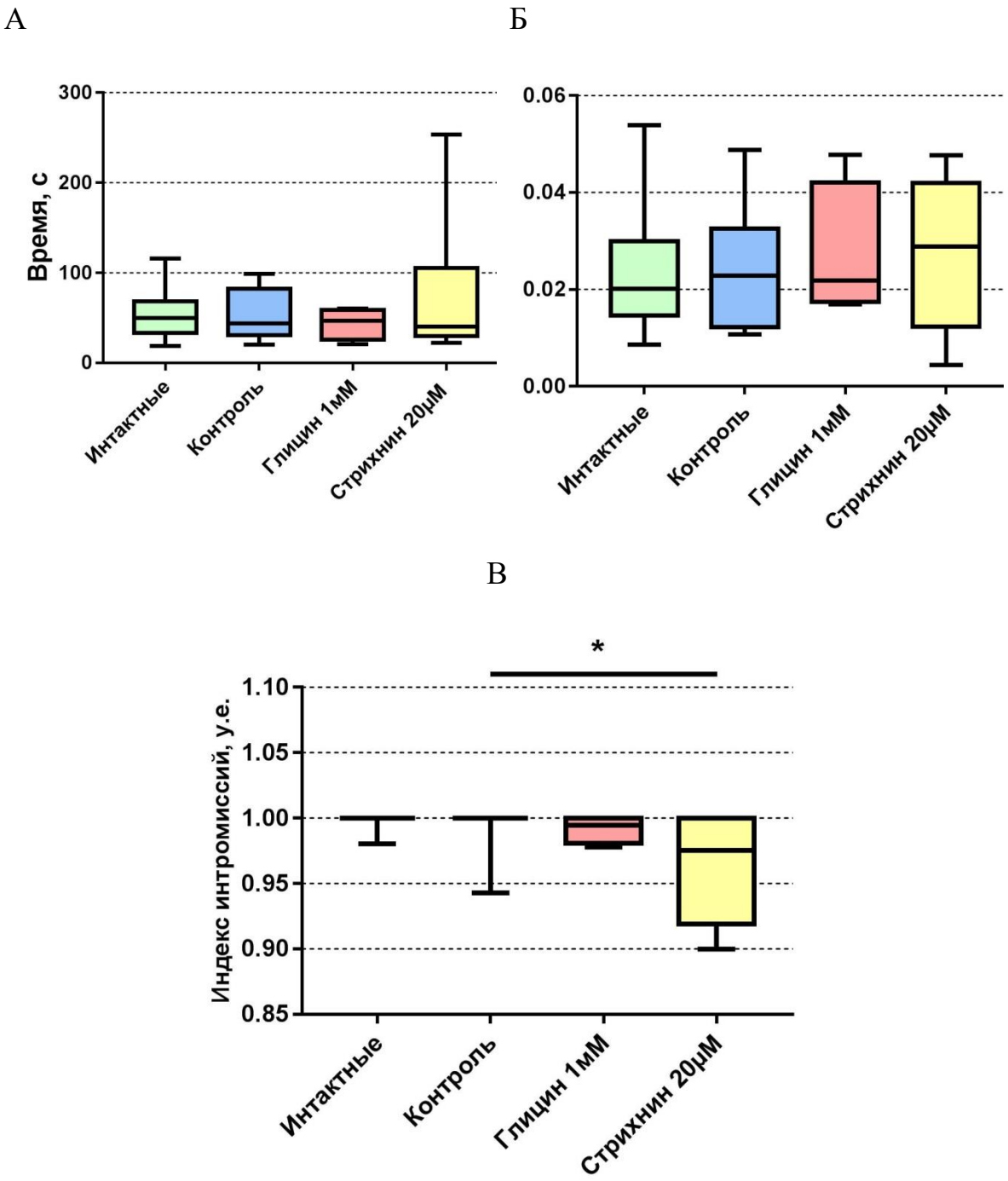


Рисунок 3.23 Средний временной интервал между интромиссиями (А), частота паттернов в сессию (Б) и частота интромиссий в сессию (В) у самцов крыс в течение четырёх последовательных экспериментов по микроинъекции раствора Рингера, глицина и стрихнина в МПО. На графике приведены абсолютные значения, звездочками показаны статистически значимые различия медианных значений (* $p<0,05$)

Таким образом, из описанных выше результатов видно, что для самцов стока Wistar билатеральные микроинъекции глицина в концентрации 1 мМ

приводили к полному или частичному отсутствию эффективного полового поведения как в фазы аппетивного, так и консуматорного поведения. Билатеральные микроинъекции стрихнина приводили к появлению у самцов крыс стока Wistar такого паттерна полового поведения, как маунтинг, а также снижали частоту интромиссий в сессию. Следовательно, глицинэргическое торможение играет важную роль в организации тормозных процессов в нейронных сетях МПО, обеспечивая особенности полового поведения крыс стока Wistar.

3.3.1.3 Обсуждение полученных результатов

Полученные в процессе анализа полового поведения самцов крыс стока Sprague Dawley результаты показали, что билатеральные микроинъекции растворов глицина 1мМ и стрихнина не влияли на такие параметры полового поведения, как латентный период маунтинга и латентный период интромиссии. Это может свидетельствовать о том, что глициновая передача в МПО не влияет на аппетивное половое поведение самцов крыс данного стока. В то же время билатеральные микроинъекции раствора глицина 1 мМ достоверно снижали длительность латентного периода эякуляции, длительность периода покоя и количество маунтингов, что свидетельствует о фасилитации полового поведения (Zhuravleva et al., 2015; Heijkoop, Huijgens, Snoeren, 2018).

Схожий эффект наблюдался после билатеральных микроинъекций ингибиторов обратного захвата глутамата в МПО (Will, Hull, Dominguez, 2014), следовательно, можно предположить, что глицин в МПО действует как ко-агонист NMDA-рецепторов. Схожий механизм наблюдался при изучении роли экзогенного глицина в ядрах гипоталамуса, таких как МПО и супрахиазматическое ядро, в регуляции сна у самцов крыс стока Sprague Dawley (Kawai et al., 2015).

Однако глициновые рецепторы были найдены в нейронах МПО *in vitro* (Karlsson, Druzin, Johansson, 2011) и, возможно, играют роль в регуляции полового поведения самцов других стоков. Данная гипотеза подтверждается нашими данными, полученными в процессе анализа полового поведения самцов крыс стока Wistar (Zhuravleva et al., 2020). Микроинъекции глицина в концентрации 1 мМ приводили к нарушению полового поведения у самцов крыс стока Wistar. Схожий эффект наблюдался у самцов крыс после стимуляции $ГАМК_А$-рецепторов. Введение селективного агониста $ГАМК_А$-рецепторов мусцимола в МПО приводила к потере самцами крыс стока Wistar способности к копуляции (Fernández-Guasti, Larsson, Beyer, 1986).

В противоположность глицину, билатеральные микроинъекции стрихнина как блокатора глициновых рецепторов приводили к появлению у самцов крыс стока Wistar такого паттерна полового поведения, как маунтинг, а также снижали частоту интромиссий в сессию, повышая эффективность полового поведения (Zhuravleva et al., 2020). Фармакологический анализ с использованием агонистов и блокаторов глициновых рецепторов, действительно позволил доказать, что только у крыс стока Wistar глицинэргическое торможение играет важную роль в организации тормозных процессов в нейронных сетях МПО, обеспечивая особенности полового поведения крыс.

3.3.2Анализ параметров поведения крыс-самцов в тесте Кроули

3.3.2.1 Поведение крыс самцов Sprague Dawley в тесте Кроули при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО

Различий по проценту времени нахождения в отсеках «A», «MID» и «B» на всех этапах теста Кроули между крысами самцами Sprague Dawley после контрольного введения в МПО раствора Рингера и интактными животными не выявлено. В связи с чем оценка изменений поведения после

инъекций глицина и стрихнина была проведена относительно контроля (рисунки 3.24 и 3.25).

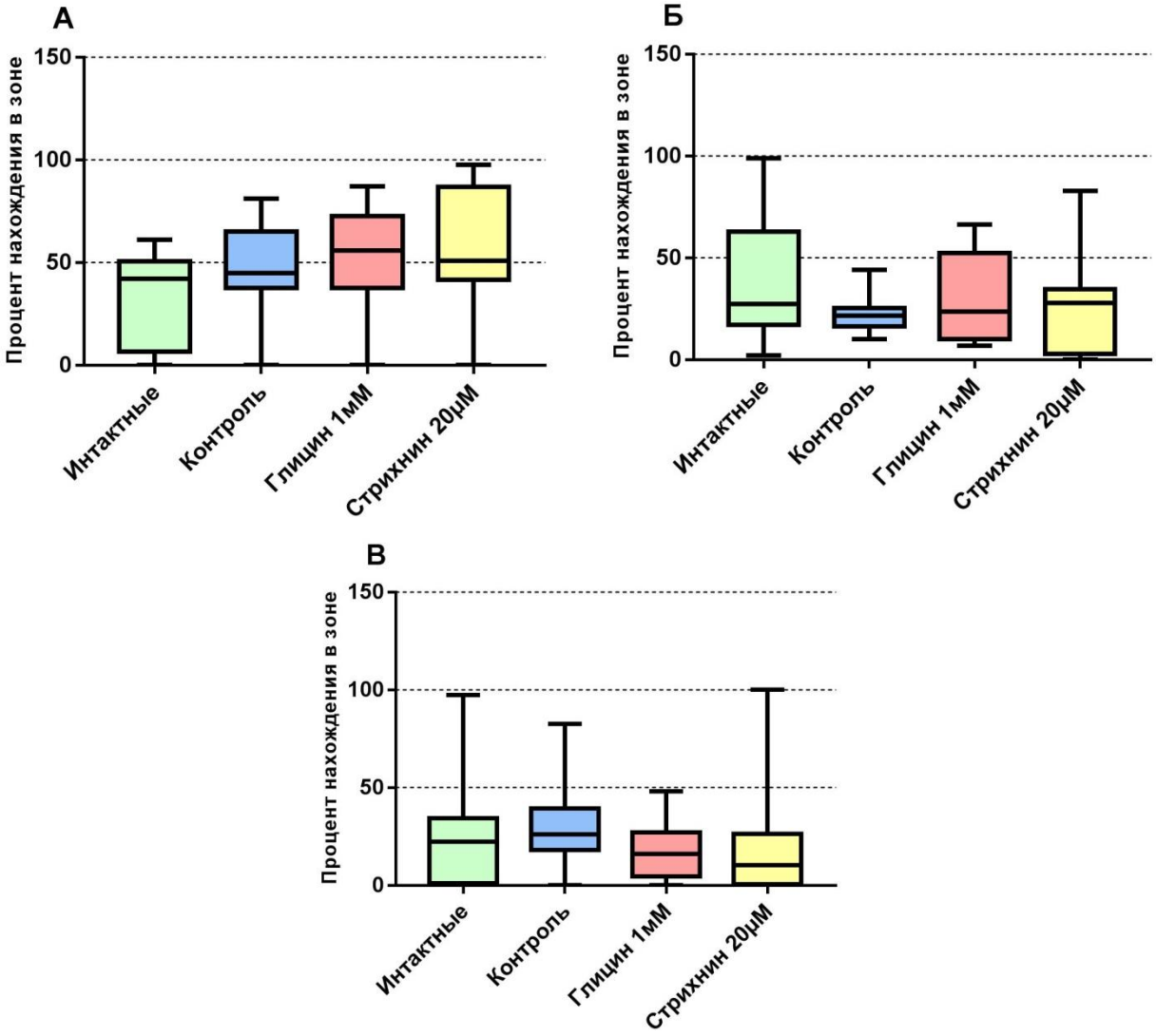


Рисунок 3.24 Процент времени, проведённый самцами стоков Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций контрольного раствора, стрихнина и глицина на втором этапе теста Кроули в отсеках «А» (А), «MID» (Б) и «В» (В). На графике приведены абсолютные значения

На втором этапе эксперимента не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Sprague Dawley в отсеках «А», «MID» и «В» ($p > 0,99$, $p = 0,4$, $p = 0,72$ соответственно; рисунок 3.24) после билатеральных микроинъекций глицина. Также не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Sprague Dawley в отсеках «А», «MID» и «В» ($p > 0,99$, $p = 0,8$ и

p = 0,74 соответственно; рисунок 3.24) после билатеральных микроинъекций стрихнина.

На третьем этапе эксперимента не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Sprague Dawley «A», «MID» и «B» после билатеральных микроинъекций глицина (p = 0,7, p = 0,88, p = 0,33 соответственно; рисунок 3.25) и стрихнина (p = 0,7, p = 0,95 и p = 0,93 соответственно; рисунок 3.25).

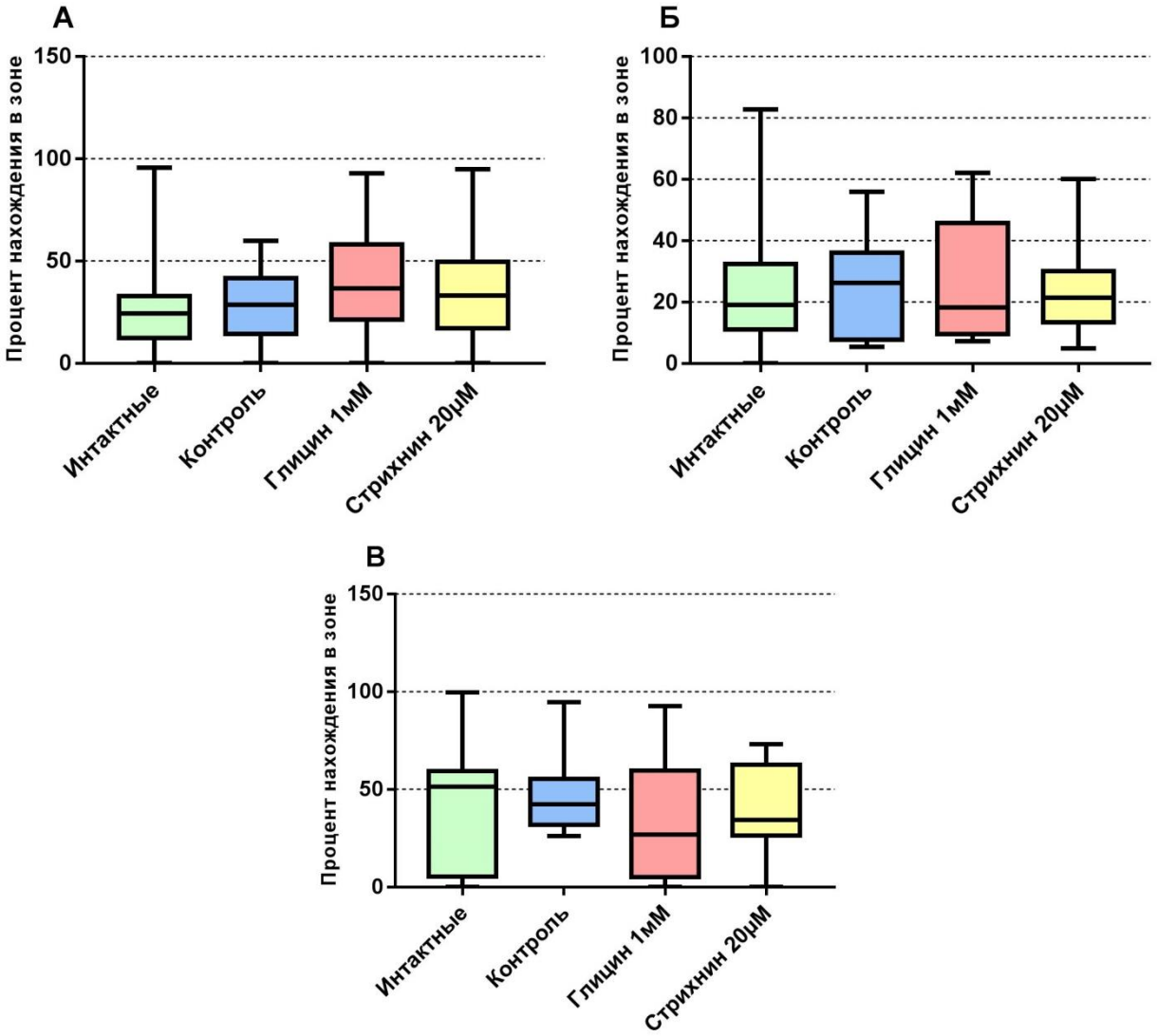


Рисунок 3.25 Процент времени, проведённый самцами стоков Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций контрольного раствора, стрихнина и глицина на третьем этапе теста Кроули в отсеках «A» (A), «MID» (Б) и «B» (B). На графике приведены абсолютные значения

3.3.2.2 Поведение крыс-самцов Wistar в тесте Кроули при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО

Различий по проценту времени нахождения в отсеках «A», «MID» и «B» на всех этапах теста Кроули между животными после контрольного введения в МПО раствора Рингера и интактными животными не выявлено. В связи с чем оценка изменений поведения после инъекций глицина и стрихнина была проведена относительно контроля (рисунки 3.26 и 3.27).

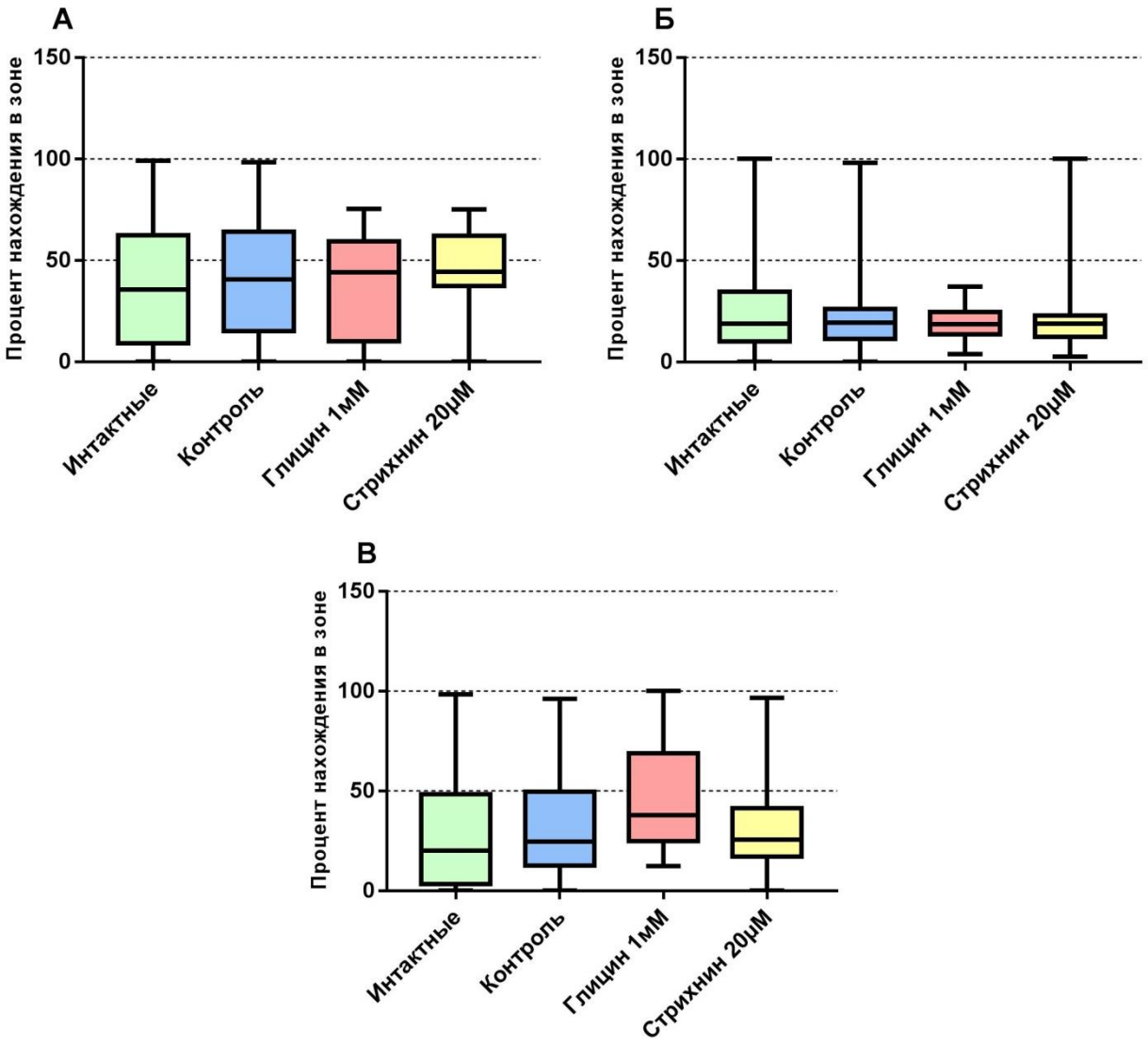
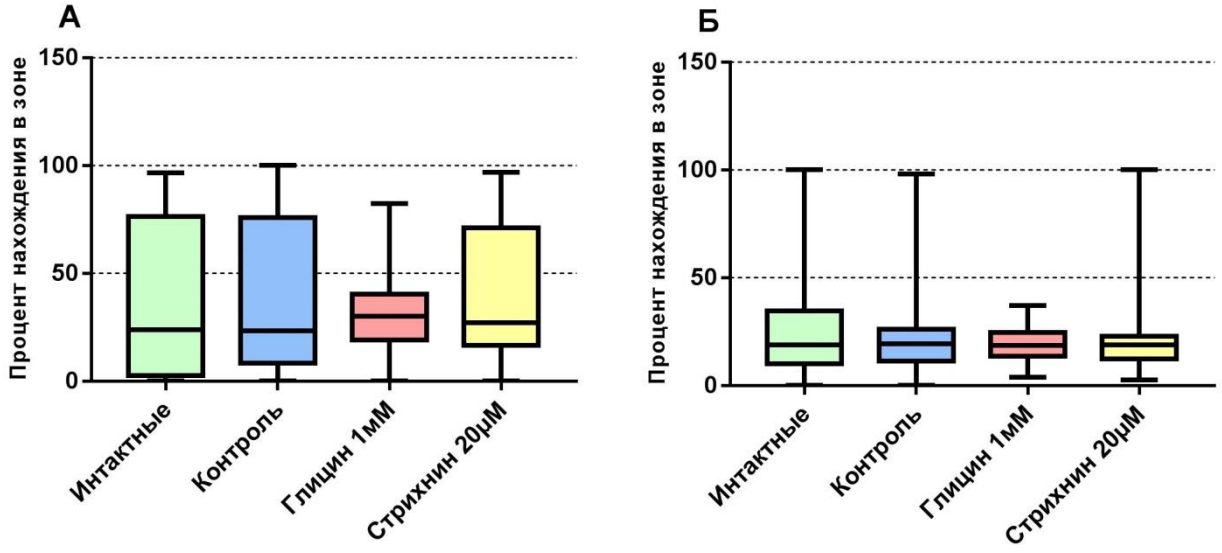


Рисунок 3.26 Процент времени, проведённый самцами стоков Wistar после билатеральных микроинъекций контрольного раствора, стрихнина и глицина на втором этапе теста Кроули в отсеках «A» (А), «MID» (Б) и «B» (В). На графике приведены абсолютные значения

На втором этапе эксперимента не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Wistar в отсеках «А», «MID» и «В» ($p = 0,26$, $p = 0,37$, $p > 0,99$ соответственно; рисунок 3.26) после билатеральных микроинъекций глицина. Также не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Wistar в отсеках «А», «MID» и «В» ($p = 0,31$, $p = 0,37$ и $p = 0,91$ соответственно; рисунок 3.26) после билатеральных микроинъекций стрихнина.

На третьем этапе эксперимента не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Wistar в отсеках «А», «MID» и «В» ($p > 0,99$, $p > 0,99$, $p > 0,99$ соответственно; рисунок 3.27) после билатеральных микроинъекций глицина. Также не наблюдалось статистически значимых различий по времени, проведённому самцами стока Wistar в отсеках «А», «MID» и «В» ($p > 0,99$, $p > 0,99$ и $p > 0,99$ соответственно; рисунок 3.27) после билатеральных микроинъекций стрихнина.



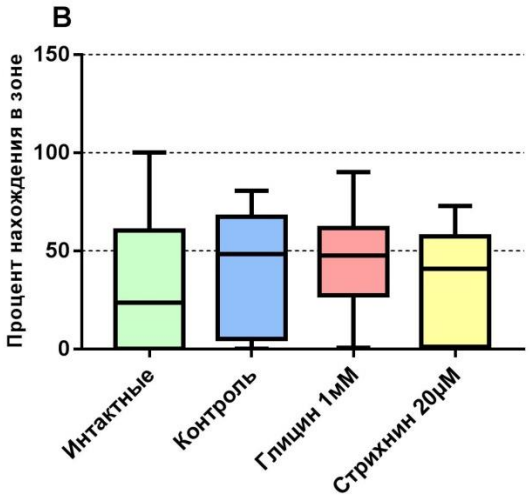


Рисунок 3.27 Процент времени, проведённый самцами стоков Wistar после билатеральных микроинъекций контрольного раствора, стрихнина и глицина на третьем этапе теста Кроули в отсеках «А» (А), «MID» (Б) и «В» (В). На графике приведены абсолютные значения

3.3.2.3 Обсуждение полученных результатов

В современной научной литературе существовало предположение, что различия в различных типах социального поведения между стоками крыс Sprague Dawley и Wistar обусловлены разницей в социальном взаимодействии и аффилированном поведении (Manduca et al., 2014a; Manduca et al., 2014b). Кроме того, нейротензин-позитивные нейроны МПО, взаимодействуя с нейронами вентральной тегментальной области, являются важным элементом в системе вознаграждения при социальных взаимодействиях (Zhao et al., 2020). Следовательно, можно было сделать предположение о возможном влиянии глицинэргической передачи в МПО гипоталамуса на социальное взаимодействие самцов крыс.

Однако анализ полученных в тесте Кроули результатов не выявил влияния активации или блокады глицинэргической передачи в МПО гипоталамуса на социальное взаимодействие как у самцов крыс стоков Sprague Dawley, так и Wistar. Следовательно, глицинэргическая передача в

МПО не влияет на организацию социального взаимодействия крыс обоих стоков.

3.3.3 Анализ параметров поведения крыс-самцов в тесте «открытое поле»

3.3.3.1 Поведение крыс-самцов Sprague Dawley в тесте «открытое поле» при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО

Горизонтальная двигательная активность. Статистически значимых различий в горизонтальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций раствора глицина по сравнению с контрольными ($p>0,99$; рисунок 3.28 А), а также после билатеральных микроинъекций раствора стрихнина по сравнению с контрольными ($p>0,99$; рисунок 3.28 А) выявлено не было.

А Б

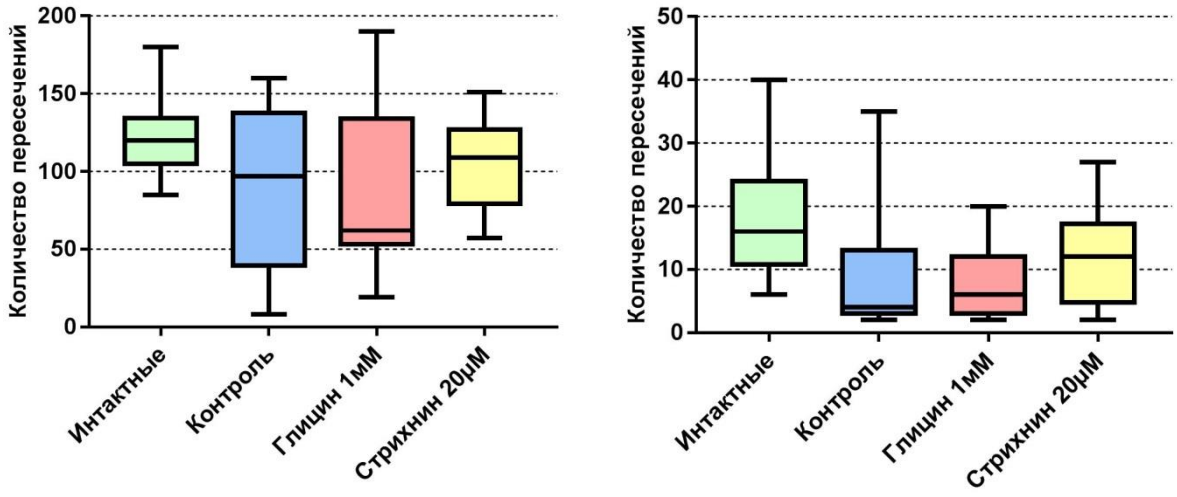


Рисунок 3.28 Горизонтальная двигательная активность во внешних (А) и внутренних (Б) квадратах установки «открытое поле» интактных самцов стоков Sprague Dawley, а также после билатеральных микроинъекций

конрольного растовора, глицина и стрихнина. На графике приведены абсолютные значения

Также не было выявлено статистически значимых различий в горизонтальной двигательной активности во внутренних квадратах установки «открытое поле» по сравнению с контрольными после билатеральных микроинъекций раствора глицина (p=0,68; рисунок 3.28 Б) и раствора стрихнина (p=0,44; рисунок 3.28 Б).

Вертикальная двигательная активность. Статистически значимых различий в длительности вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций раствора глицина по сравнению с контрольными (p=0,33; рисунок 3.29 А), а также после билатеральных микроинъекций раствора стрихнина по сравнению с контрольными (p=0,5; рисунок 3.29 А) выявлено не было.

А Б

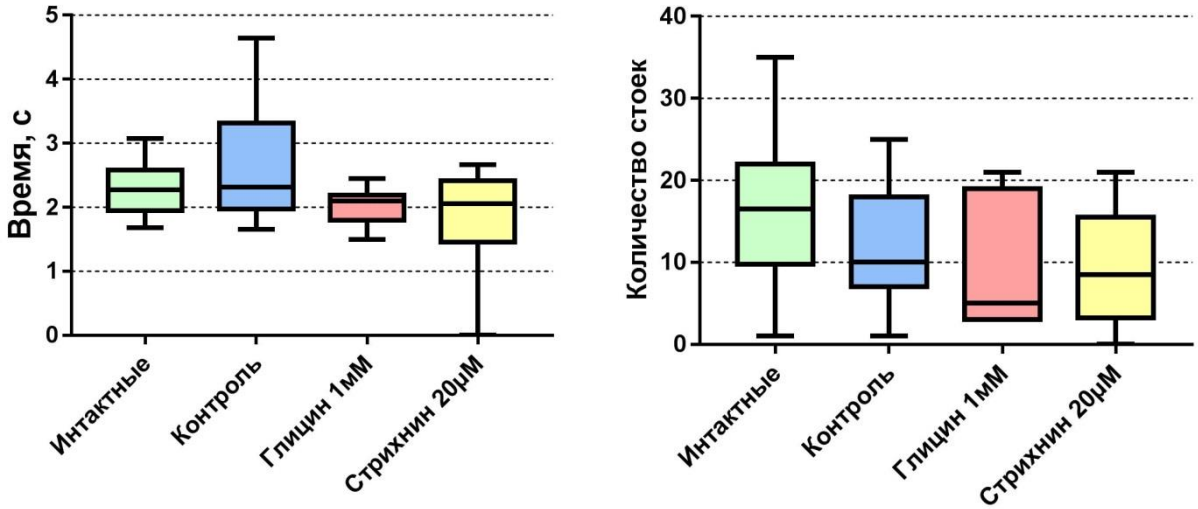


Рисунок 3.29 Длительность (А) и количество (Б) вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» интактных самцов стоков Sprague Dawley, а также после билатеральных микроинъекций конрольного растовора, глицина и стрихнина. На графике приведены абсолютные значения

Статистически значимых различий в количестве вертикальной двигательной активности во внутренних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций раствора глицина (p>0,99; рисунок 3.29 Б) и стрихнина (p>0,99; рисунок 3.29 Б) по сравнению с контрольными выявлено не было.

Длительность груминга. Статистически значимых различий в длительности груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций раствора глицина (p=0,47; рисунок 3.30 А) и раствора стрихнина по сравнению с контрольными (p=0,6; рисунок 3.30 А) выявлено не было. Статистически значимых различий в количестве груминга во внутренних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Sprague Dawley после билатеральных микроинъекций растворов глицина (p=0,79; рисунок 3.30 Б) и стрихнина (p=0,67; рисунок 3.30 Б) по сравнению с контрольными животными выявлено не было.

А Б

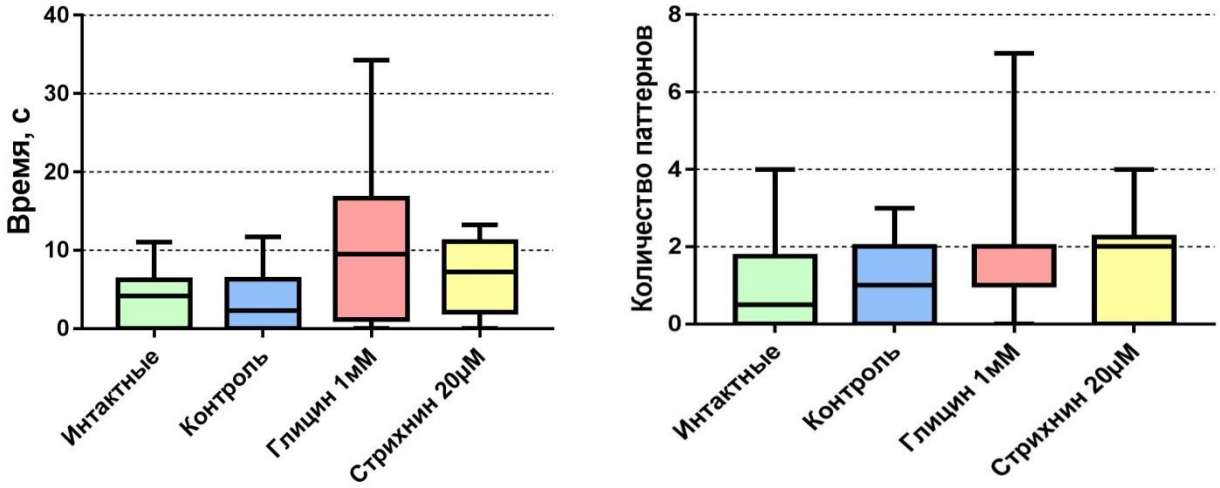


Рисунок 3.30 Длительность (А) и количество (Б) груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» интактных самцов стоков Sprague Dawley, а также после билатеральных микроинъекций конрольного растовора, глицина и стрихнина. На графике приведены абсолютные значения

Таким образом, ни активация, ни блокада тормозного глицинэргического пути в МПО крыс самцов стока Sprague Dawley не влияли на горизонтальную двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и длительность груминга в тесте «открытое поле».

3.3.3.2 Поведение крыс-самцов Wistar в тесте «открытое поле» при билатеральном введении глицина и стрихнина в МПО

Горизонтальная двигательная активность. Статистически значимых различий в горизонтальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Wistar после билатеральных микроинъекций раствора глицина по сравнению с контрольными ($p=0,1$; рисунок 3.31 А), а также после билатеральных микроинъекций раствора стрихнина по сравнению с контрольными ($p=0,43$; рисунок 3.31 А) выявлено не было.

А Б

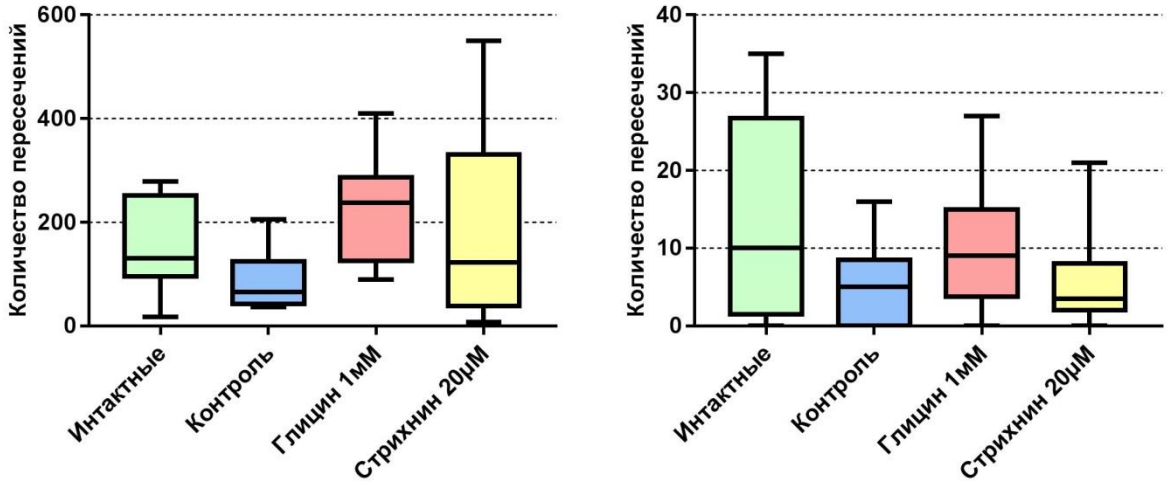


Рисунок 3.31 Горизонтальная двигательная активность во внешних (А) и внутренних (Б) квадратах установки «открытое поле» интактных самцов стоков Wistar, а также после билатеральных микроинъекций конрольного растовора, глицина и стрихнина. На графике приведены абсолютные значения

Статистически значимых различий в горизонтальной двигательной активности во внутренних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Wistar после билатеральных микроинъекций раствора глицина по сравнению с контрольными (p=0,37; рисунок 3.31 Б), а также раствора стрихнина (p=0,89; рисунок 3.31 Б) выявлено не было.

Вертикальная двигательная активность. Статистически значимых различий в длительности вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Wistar после билатеральных микроинъекций растворов глицина (p=0,6; рисунок 3.32 А) и стрихнина по сравнению с контрольными (p=0,45; рисунок 3.32 А) выявлено не было.

А Б

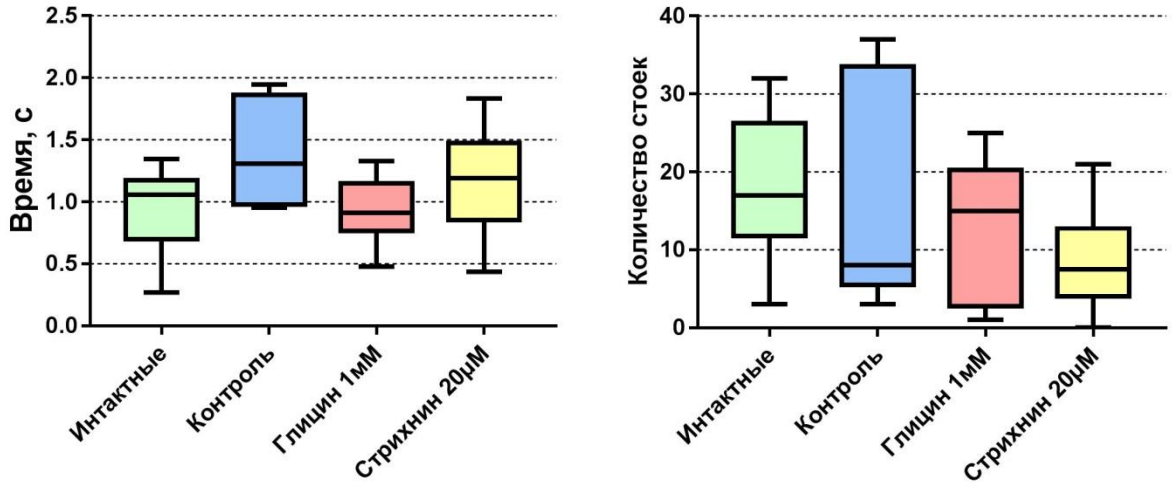


Рисунок 3.32 Длительность (А) и количество (Б) вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» интактных самцов стоков Wistar, а также после билатеральных микроинъекций конрольного растовора, глицина и стрихнина. На графике приведены абсолютные значения

Статистически значимых различий в количестве вертикальной двигательной активности во внутренних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Wistar после билатеральных микроинъекций

растворов глицина (p>0,99; рисунок 3.32 Б) и стрихнина (p=0,33; рисунок 3.32 Б) с контрольными выявлено не было.

Длительность груминга. Статистически значимых различий в длительности груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Wistar после билатеральных микроинъекций раствора глицина по сравнению с контрольными (p=0,45; рисунок 3.33 А), а также после билатеральных микроинъекций раствора стрихнина по сравнению с контрольными (p=0,45; рисунок 3.33 А) выявлено не было. Было выявлено статистически значимое различие в количестве груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» самцов крыс стока Wistar после билатеральных микроинъекций раствора глицина по сравнению с контрольными (p=0,04; рисунок 3.33 Б).

А Б

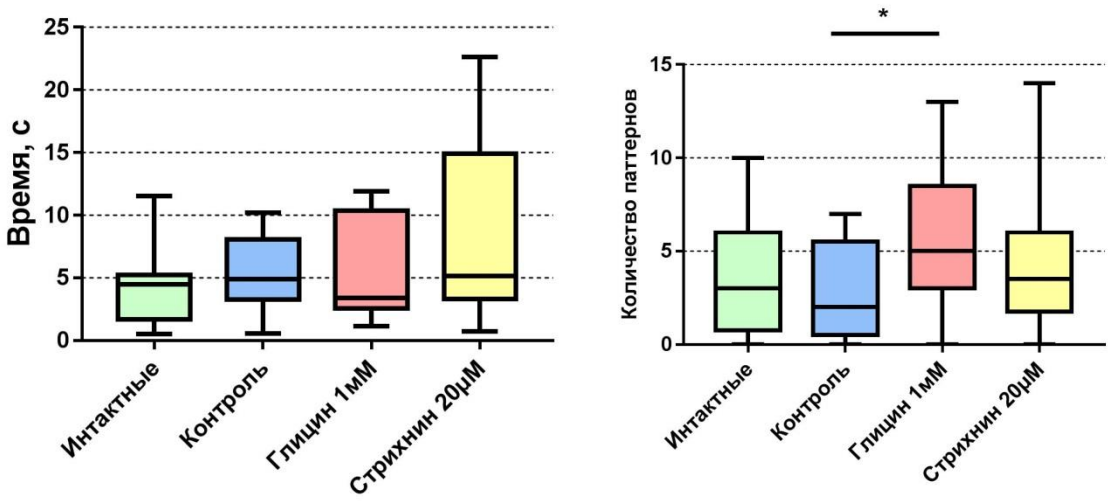


Рисунок 3.33 Длительность (А) и количество (Б) груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» интактных самцов стоков Wistar, а также после билатеральных микроинъекций конрольного растовора, глицина и стрихнина. На графике приведены абсолютные значения, звёздочками показаны статистически значимые отличия медиан (*p<0,05)

При введении стрихнина как блокатора глицинэргической тормозной системы статистически значимых различий в количестве груминга во внешних квадратах установки «Открытое поле» между самцами крыс стока

Wistar после билатеральных микроинъекций раствора стрихнина (p=0,88; рисунок 3.33Б) и после билатеральных микроинъекций контрольного раствора выявлено не было.

3.3.3.3 Обсуждение полученных результатов

Самцы крыс стока Sprague Dawley не показали статистически значимых различий в параметрах, характеризующих тревожность и локомоторную активность в тесте «открытое поле» после активации и блокады глициновых рецепторов. В то же время активация глицинэргичекой передачи в МПО самцов стока Wistar увеличивала количество прерванных («незавершённых») грумингов, что свидетельствовало об усилении тревожности у животных (Kalueff et al., 2016). Вероятно, что глицинэргическая передача МПО гипоталамуса не оказывает значимого влияния на тревожность самцов крыс стока Sprague Dawley, но играет значимую роль в регуляции уровня тревожности самцов стока Wistar.

3.4 Сравнительный анализ влияния фармакологической активации и блокады глициновых рецепторов МПО на параметры поведения самцов крыс стоков Wistar и Sprague Dawley

При сравнительном анализе поведения самцов крыс стока Sprague Dawley и Wistar после билатеральных введений растворов глицина 1 мМ и стрихнина 20 μM все значения нормировались к значениям, полученным при введении контрольного раствора.

3.4.1 Половое поведение

Анализ полученных нами результатов тестирования полового поведения при фармакологической манипуляции глицинергической

нейропередачи в нейронных сетях МПО выявил различие между самцами стоков Sprague Dawley и Wistar.

Аппетивная фаза полового поведения

Так как самцы крыс стока Wistar почти не совершали маунтингов, статистически сравнить половое поведение самцов крыс двух стоков по параметру «длительность латентного периода маунтинга» не представлялось возможным. По параметру длительность латентного периода интромиссий статистически значимых различий между ответными реакциями самцов разных стоков на билатеральные микроинъекции раствора глицина (p = 0,34) и стрихнина (p=0,12) не обнаружено (рисунок 3.34).

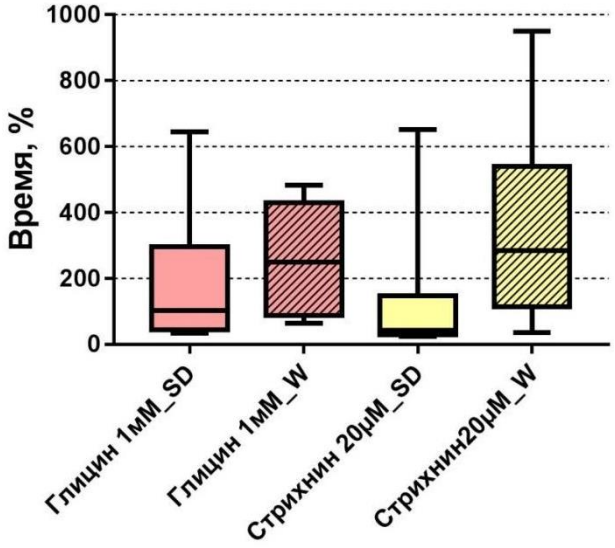


Рисунок 3.34 Длительность латентного периода интромиссий самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μM (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

Консуматорная фаза полового поведения

После стимуляции процессов торможения в нейронных сетях путем билатеральных микроинъекций 1мМ глицина у 4 из 8 самцов стока Wistar полностью (отсутствие эякуляции) либо частично исчезало половое поведение, в то время как самцы Sprague Dawley сохраняли способность к копуляции в 100% случаев.

Длительности латентного периода эякуляции (рисунок 3.35) у самцов стока Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина была статистически значимо выше, чем у самцов стока Sprague Dawley (p=0,009). Статистически значимых различий между нормированными значениями длительности латентного периода эякуляции у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора стрихнина обнаружено не было (p = 0,35).

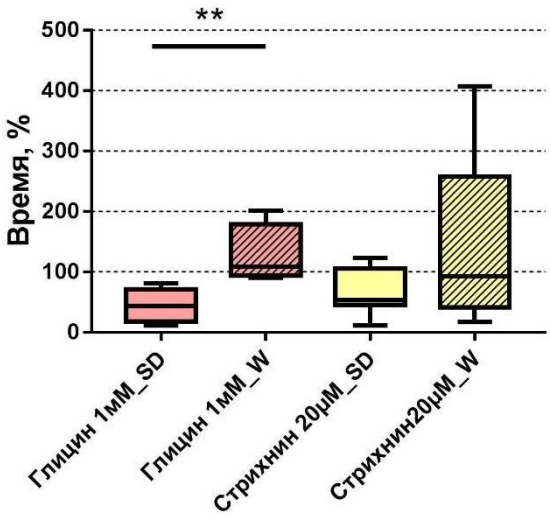


Рисунок 3.35 Длительность латентного периода эякуляции самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора, звездочками показаны статистически значимые различия (**p< 0,01)

Провести анализ статистически значимых различий между нормированными значениями длительности периода покоя между сессиями у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина не представлялось возможным, так как после билатеральных микроинъекций глицина только 3 самца Wistar из 8 смогли совершить больше 2 сессий за время регистрации полового поведения (рисунок 3.36).

Статистически значимых различий между нормированными значениями длительности периода покоя между сессиями (рисунок 3.38) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора стрихнина обнаружено не было (p=0,99).

Так как самцы крыс стока Wistar почти не совершали маунтингов, статистически сравнить половое поведение самцов крыс двух стоков по параметру «количество маунтингов» не представлялось возможным.

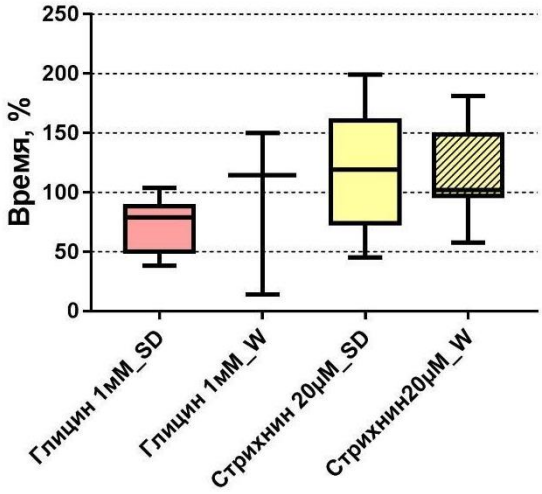


Рисунок 3.36 Длительность периода покоя между сессиями самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

Статистически значимых различий между нормированными значениями количества интромиссий (рисунок 3.37) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина (p=0,16) и стрихнина (p=0,21) обнаружено не было.

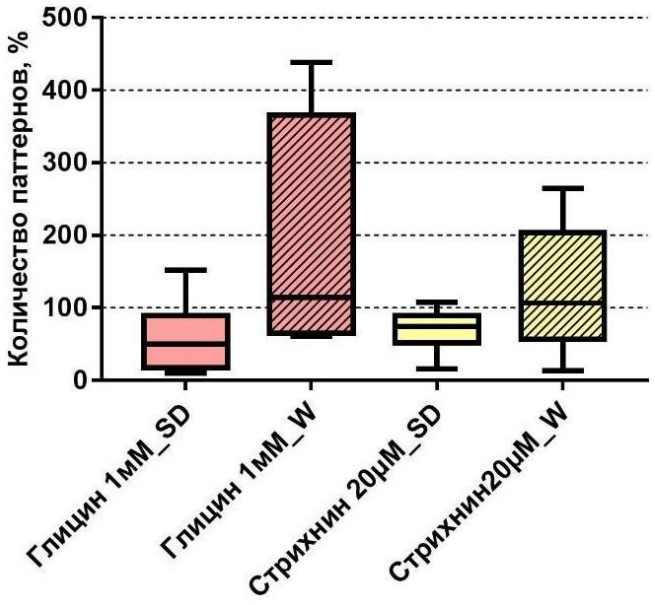


Рисунок 3.37 Количество интромиссий самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μM (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

Статистически значимых различий между нормированными значениями среднего временного интервала между интромиссиями (рисунок 3.38) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина ($p=0,76$) и стрихнина ($p=0,47$) обнаружено не было.

Статистически значимых различий между нормированными значениями частоты паттернов в сессию (рисунок 3.39) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина обнаружено не было ($p=0,76$), также, как и при введении раствора стрихнина ($p=0,84$).

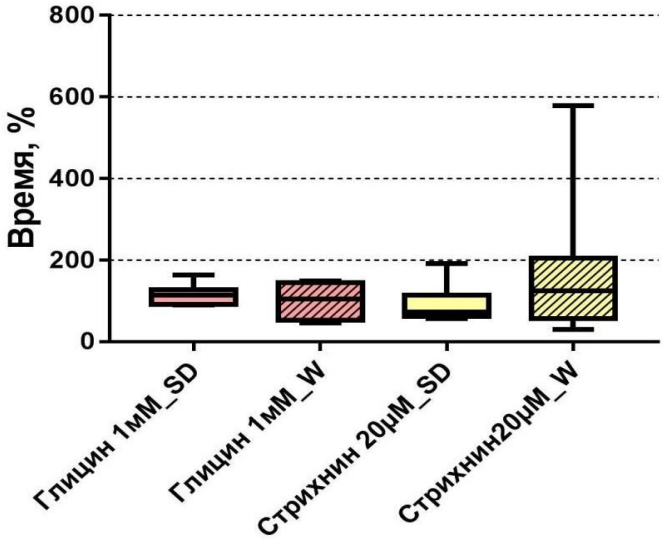


Рисунок 3.38 Средний временной интервал между интромиссиями самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μM (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

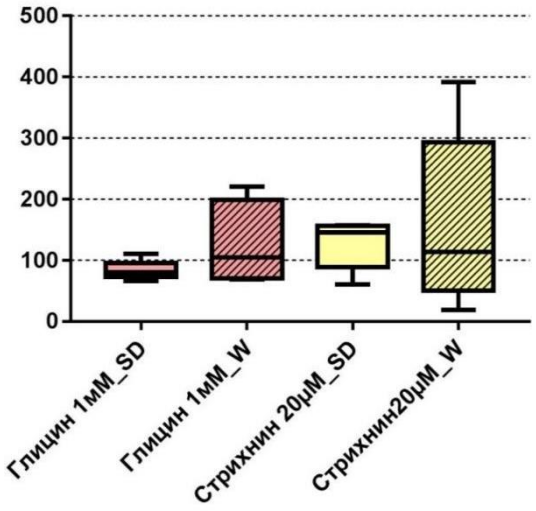


Рисунок 3.39 Частота паттернов в сессию самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μM (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

Статистически значимых различий между нормированными значениями частоты интромиссий (рисунок 3.40) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина (p=0,61) и стрихнина (p=0,76) обнаружено не было.

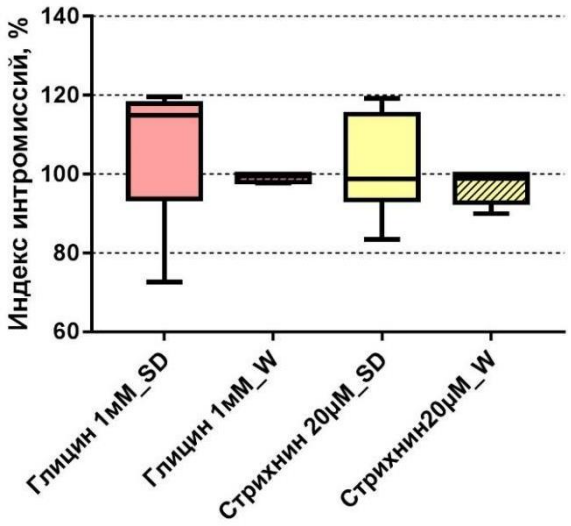


Рисунок 3.40 Частота паттернов в сессию самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

3.4.2 Тест Кроули

В данной серии экспериментов сравнивали социальное взаимодействие самцов крыс стоков SpragueDawley и Wistar при введении раствора Рингера, после билатеральных микроинъекций раствора глицина 1мМ и раствора стрихнина 20 μМ для выявления возможной разницы в социальной активности животных данных стоков. Статистический анализ проводился на значениях, нормированных к введению контрольного раствора.

Статистически значимых различий между нормированными значениями процента времени, проведённого в отсеке «A», «MID» и «B» (рисунок 3.41) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина (p=0,67, p=0,44, p=0,19 соответственно) и

стрихнина (p=0,43, p=0,81, p=0,26 соответственно) на втором этапе тестирования обнаружено не было.

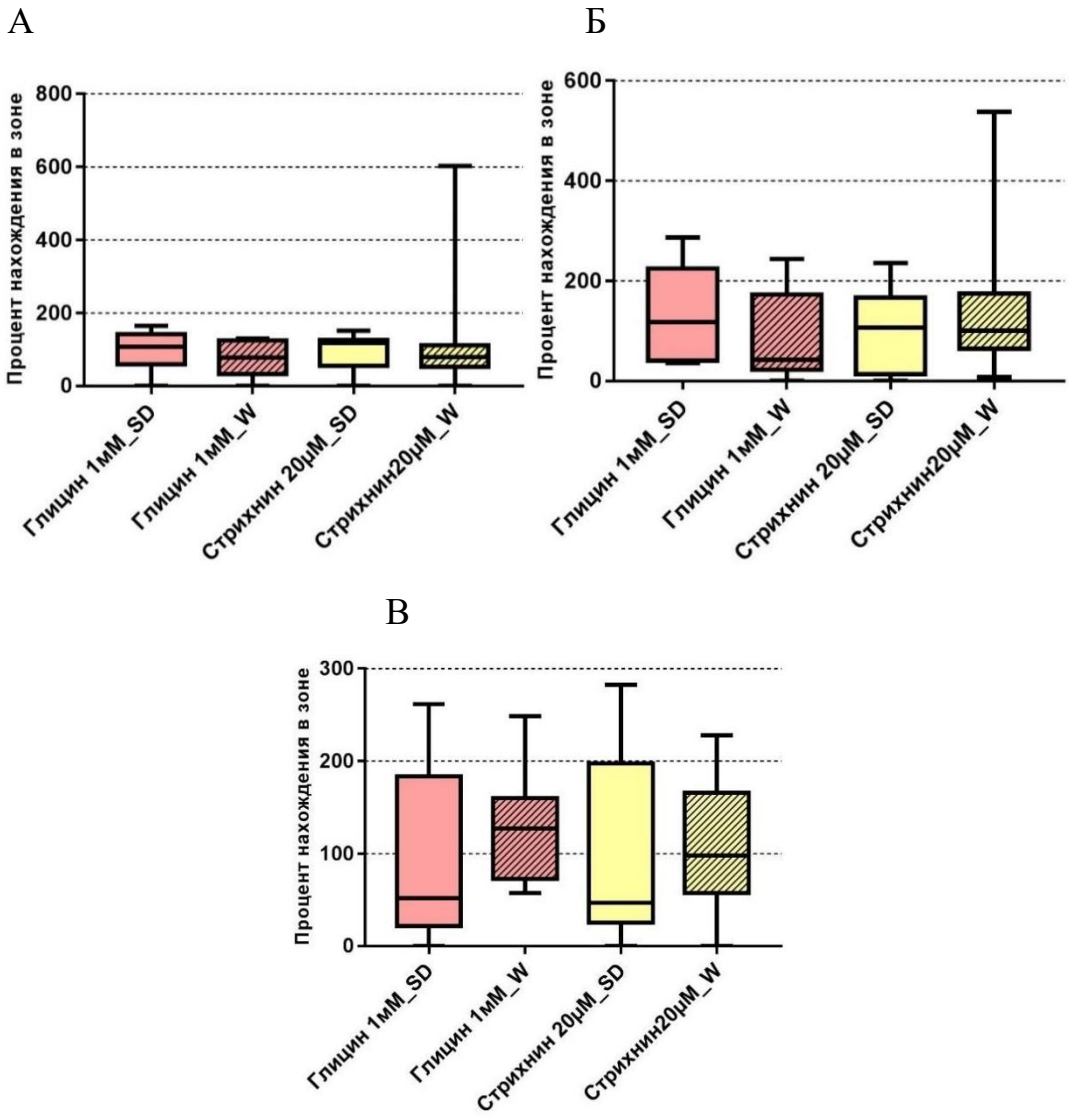


Рисунок 3.41 Процент времени, проведённого в отсеке «А» (А), «MID» (Б), «В» (В), для самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) на втором этапе тестирования после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

Статистически значимых различий между нормированными значениями процента времени, проведённого в отсеке «А», «MID» и «В» (рисунок 3.42) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной

микроинъекции раствора глицина (p = 0,62, p=0,72, p=0,31) и стрихнина (p = 0,99, p=0,9, p=0,76) на третьем этапе обнаружено не было.

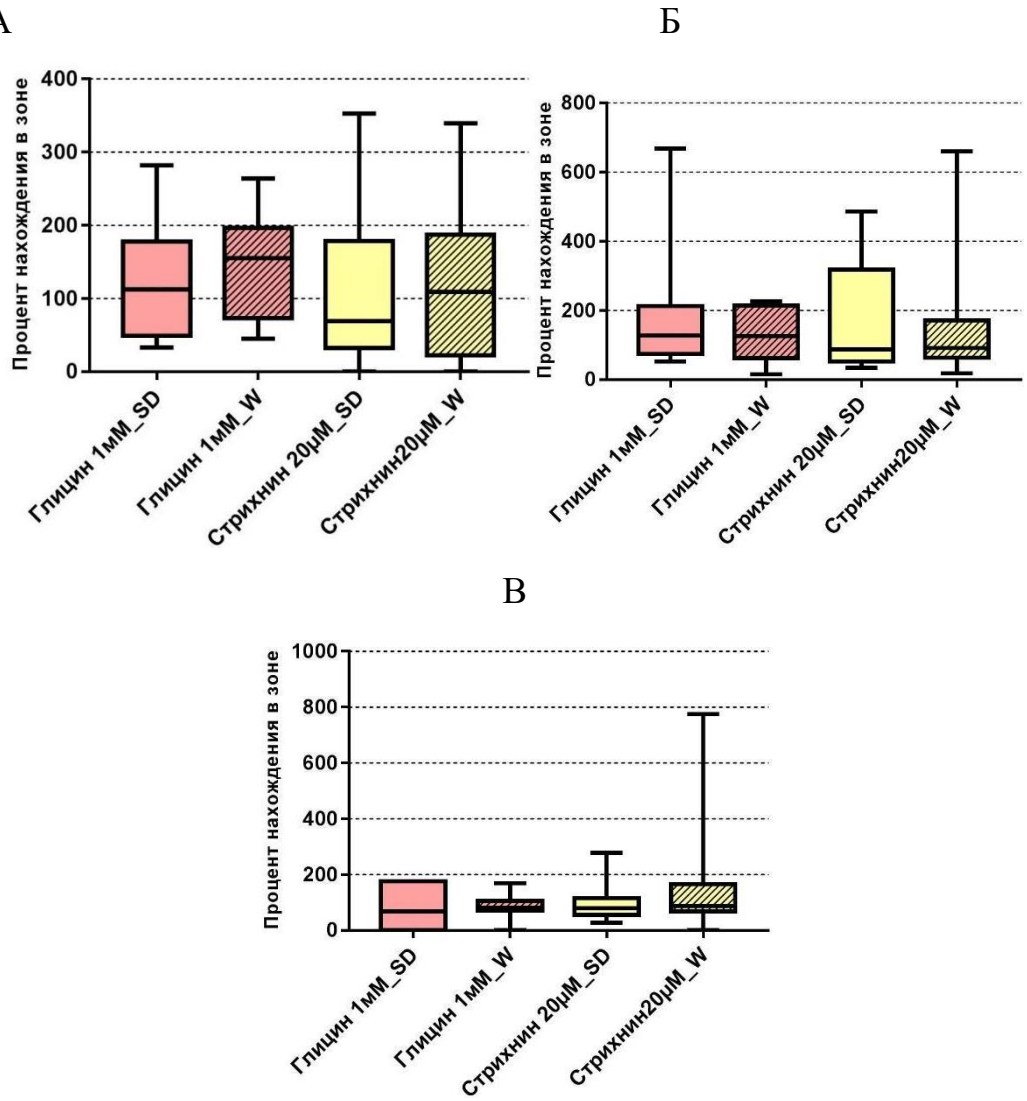


Рисунок 3.42 Процент времени, проведённого в отсеке «А» (А), «MID» (Б) и «В» (В) для самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) на третьем этапе тестирования после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

3.4.3 Тест «открытое поле»

В ходе анализа параметров теста «открытое поле» была выявлена разница между поведением самцов крыс линий SpragueDawley и Wistar при

блокаде глицинэргического торможения по параметру «горизонтальная двигательная активность во внутренних квадратах «открытого поля» и активации глицинэргического торможения в МПО гипоталамуса по парметру «количество паттернов груминга во внешних квадратах открытого поля».

Статистически значимых различий между нормированными значениями горизонтальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» (рисунок 3.43 А) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина (p=0,07) и стрихнина (p=0,86) обнаружено не было. Горизонтальная двигательная активность во внутренних квадратах установки «открытое поле» (рисунок 3.43 Б) после билатеральной микроинъекции раствора глицина не различалась (p=0,48), а после стрихнина у самцов стока Wistar была статистически значимо ниже, чем у самцов стоков Sprague Dawley (p = 0,04).

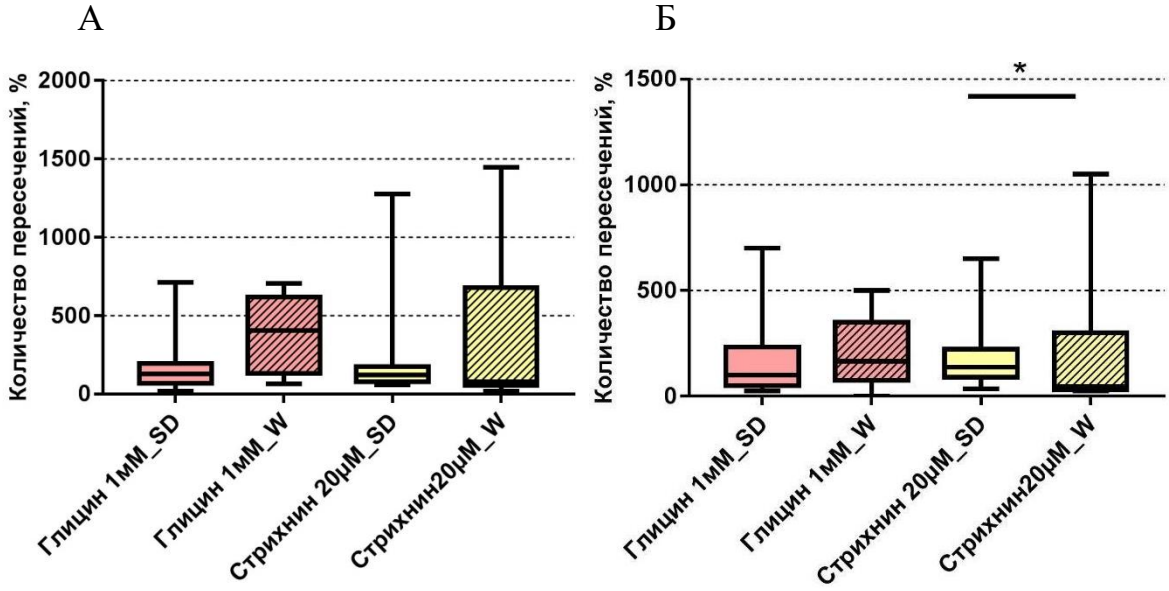


Рисунок 3.43 Горизонтальная двигательная активность во внешних (А) и внутренних (Б) квадратах установки «открытое поле» для самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора, звёздочками показаны статистически значимые отличия медиан (*p<0,05)

Статистически значимых различий между нормированными значениями длительности вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина (p=0,3) и стрихнина (p=0,81) обнаружено не было (рисунок 3.44).

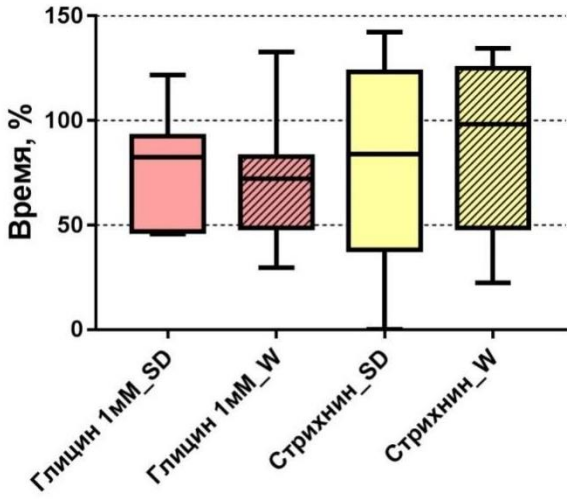


Рисунок 3.44 Длительность вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» для самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μM (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

Статистически значимых различий между нормированными значениями количества паттернов вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» (рисунок 3.45) у самцов стоков Sprague Dawley и Wistar после билатеральной микроинъекции раствора глицина (p=0,78) и стрихнина (p=0,62) обнаружено не было.

Количество паттернов груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» (рисунок 3.46) после билатеральной микроинъекции раствора глицина было статистически значимо выше у самцов стока Wistar по сравнению с самцами стока Sprague Dawley (p=0,02), в то время как после билатеральной микроинъекции раствора стрихнина статистически значимых различий найдено не было (p=0,53).

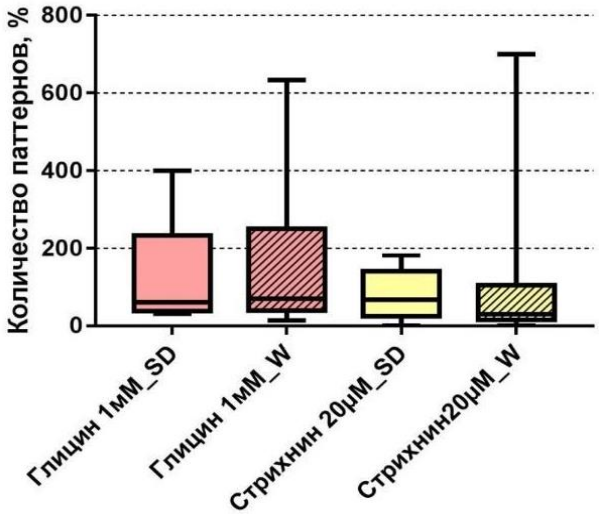


Рисунок 3.45 Количество паттернов вертикальной двигательной активности во внешних квадратах установки «открытое поле» для самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения, нормированные к введению контрольного раствора

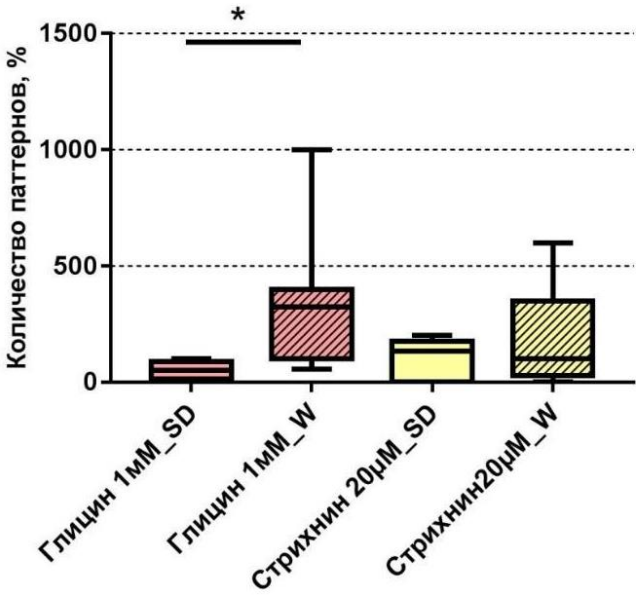


Рисунок 3.46 Количество паттернов груминга во внешних квадратах установки «открытое поле» для самцов стоков Sprague Dawley (SD) и Wistar (W) после билатерального введения раствора глицина 1 мМ (красные боксы) и стрихнина 20 μМ (жёлтые боксы). На рисунке приведены значения,

нормированные к введению контрольного раствора, звёздочками показаны статистически значимые отличия медиан (*p<0,05)

3.4.2.4 Обсуждение результатов

Крысы стоков Sprague Dawley и Wistar до сих пор остаются одними из самых популярных модельных организмов при исследовании полового поведения. Однако, несмотря на важность выбора адекватной модели, существует всего несколько работ (McLean, Dupeire, Elder, 1972; Emery, Larsson, 1979), в которых рассматривается разница в половом поведении между крысами этих двух стоков. В статье Эмери и Ларссона (1979) было показано, что изменение полового поведения у кастрированных самцов крыс после лечения системным парахлорфенилаланином зависит от стока, к которому принадлежит животное, и времени кастрации. У самцов Wistar и Sprague Dawley наблюдалось снижение поведенческой восприимчивости к лечению парахлорфенилаланином после кастрации, причем самцы Wistar сохраняли свою поведенческую отзывчивость дольше, чем самцы Sprague Dawley. Поведение кастрированных самцов Wistar также было более чувствительно к замещению андрогенов, чем у самцов Sprague Dawley. Однако существующие данные по различию полового поведения двух довольно популярных стоков крыс на настоящий момент отрывочны и не поно описывают половое поведение животных.

Как видно из полученных нами результатов (Zhuravleva et al., 2021), между самцами крыс стоков Sprague Dawley и Wistar прежде всего наблюдается разница в аппетивном и консуматорном половом поведении. Наиболее характерным отличием является почти полное отсутствие паттерна «маунтинг» у самцов стока Wistar у интактных животных. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными о том, что самцы крыс стока Wistar совершают меньше маунтингов и больше интромиссий, чем

самцы стока Sprague Dawley, а также самцы стока Лонг-Эванс (McLean, Dupeire, Elder, 1972).

Кроме того, для достижения эякуляции интактным самцам крыс стока Wistar в наших экспериментах требовалось больше времени и совершённых интромиссий, чем самцам стока Sprague Dawley. Мы предположили, что одним из возможных объяснений сниженной половой активности может быть более высокая степень тревожности у животных стока Wistar. Действительно, проведенные исследования поведения животных в тесте «открытое поле» выявили более высокую степень тревожности самцов стока Wistar по сравнению с самцами стока Sprague Dawley. Таким образом, было показано, что низкий уровень половой активности самцов крыс стоков Wistar может быть связан с высоким уровнем тревожности животных данного стока, однако данная гипотеза требует дальнейшей проверки.

Известно, что МПО может влиять на мотивационную компоненту полового поведения самцов (Numan, 2014). Как компонент иерархической нейрональной сети, участвующей в регуляции мотивационной компоненты полового поведения, МПО посылает свои проекции к вентральной тегментальной области. Активация вентральной тегментальной области, в свою очередь, приводит к высвобождению дофамина в прилежащем ядре, что снимает тормозное влияние прилежащего ядра на нейроны вентрального паллидума, позволяя ему реагировать на стимулы, связанные с находящимися в состоянии эструса самками. Морфологические особенности структуры связей позволили Винигу и Кулену в 2014 году разработать модель полового поведения, названной ими «моделью воронки». Данная модель предполагает, что на ранние фазы полового поведения оказывают большое влияние факторы окружающей среды, но позже в процессе разворачивания фаз полового поведения оно становится всё более «целенаправленным»: переходы на другие поведенческие акты ближе к эякуляции становятся практически невозможными. Этот факт позволил сформулировать предположение, что гипоталамус не контролирует

непосредственно рефлексы ствола мозга и спинного мозга, обуславливающие эякуляцию, но влияет на поведенческие последовательности, ведущие самца к «цели» (Veening, Coolen, 2014). В таком случае высокая степень тревожности будет мешать животному совершать поведенческие последовательности, возвращая его к фазе «инициации», в ходе которой самец проверяет безопасность окружающей среды (Veening, Coolen, 2014) и, таким образом, влиять на эффективность полового поведения. Данная гипотеза согласуется с полученными нами экспериментальными данными в ходе анализа полового поведения самцов двух стоков. Интактным самцам крыс стока Wistar для достижения эякуляции требовалось достоверно больше времени и совершённых интромиссий, чем самцам стока Sprague Dawley, что может свидетельствовать о большем отвлечении самцов стока Wistar на проверку безопасности окружающей среды как более тревожных животных.

В литературе существовали предположения о том, что разница в социальном поведении между стоками Sprague Dawley и Wistar обусловлена разницей в поведении животных при социальном взаимодействии. Однако наши эксперименты в тесте Кроули показали, что между стоками Sprague Dawley и Wistar практически нет разницы в социальном взаимодействии как у интактных животных, так и у животных, подвергшихся операции по билатеральному вживлению канюль и дальнейшим фармакологическим манипуляциям.

При анализе различий в половом поведении и тревожности животных мы предположили, что молекулярной мишенью может быть глицинэргическая передача в МПО, точнее ее различный вклад в процессы торможения по сравнению с известной ролью ГАМК-эргической передачи. Для проверки данной гипотезы был использован фармакологический подход с применением агонистов и блокаторов глициновых рецепторов глицинэргической системы.

Ранее был выявлен факт снижения эффективности полового поведения самцов вплоть до полного его исчезновения (Hull, Dominguez, 2019) при

применении агонистов ГАМК-рецепторов. Мы же показали методом фармакологической стимуляции и ингибирования глициновых рецепторов, что у самцов стока Вистар, кроме ГАМК-эргической системы, важную роль играет и глицинэргическая система торможения, стимуляция которой снижала половое поведение, а блокада – повышала эффективность полового поведения.

Кроме того, снижению эффективности полового поведения при введении глицина в наших экспериментах способствовало усиление тревожности при активации глицинэргической тормозной передачи в МПО у самцов стока Wistar.

Из литературных источников известно, что глицин в ЦНС может являться посредником, как тормозной (через собственный глициновый рецептор; Kumar et al., 2020), так и возбуждающей передачи импульсов (в качестве ко-агониста NMDA рецепторов, так как эти рецепторы имеют сайт связывания для глицина, при взаимодействии глицина с которым происходит облегчение эффекта связывания глутамата с NMDA рецепторами и усиление возбуждающей передачи (Yu, Lau, 2018)). Следовательно, увеличение эффективности полового поведения самцов стока Sprague Dawley при введении глицина говорило о повышении эффективности возбуждающей передачи импульсов, опосредованной NMDA рецепторами.

Исходя из полученных нами данных, стоит предположить, что при выборе модели для исследования полового поведения самцов крыс необходимо учитывать сток, так как имеется различие в организации на нейромедиаторном уровне тормозных процессов в одном из центральных ядер гипоталамуса - МПО.

Также представляется интересным дальнейшее изучение феномена глицинэргической передачи в гипоталамусе крыс стока Wistar, выявление роли глицинэргической передачи в нейронных сетях гипоталамуса других экспериментальных животных, а также человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При решении задачи по выявлению физиологической роли глицина и глицинэргической передачи в центральных отделах головного мозга была изучена роль МПО в модуляции регулируемых им видах поведения самцов крыс стоков Sprague Dawley и Wistar.

Анализ данных, полученных на изолированных нейронах МПО методом patch-clamp выявил, что стрихнин в концентрации 20 μM блокирует только глициновые рецепторы, и может быть использован в качестве ингибитора глицинзависимого торможения в нейронных сетях МПО при изучении поведения.

В исследовании поведения интактных животных было показано, что интактные крысы самцы стока Wistar демонстрируют менее эффективное половое поведение, чем самцы стока Sprague Dawley. Выявленные различия в половом поведении самцов стоков Sprague Dawley и Wistar обусловлены особенностями структуры тормозных процессов в нейронных сетях МПО гипоталамуса крыс разных стоков. Активация глицинэргического торможения в МПО у крыс стока Wistar вызывала снижение полового поведения как на аппетивной, так и на консуматорной стадии полового поведения, а, блокада глицинэргического торможения в нейронных сетях МПО, наоборот, активировала паттерны полового поведения.

В отличии от крыс стока Wistar у самцов Sprague Dawley роль глицинэргической системы торможения в нейронных сетях МПО значительно снижена. Микроинъекции глицина в МПО у самцов Sprague Dawley повышали эффективность копуляции, о чем свидетельствовало снижение длительности латентного периода эякуляции во время консуматорной фазы полового поведения. Следовательно, можно предположить, что у самцов стоков Wistar и Sprague Dawley имеется разное соотношение глициновых и ГАМК-рецепторов, что может являться причиной данных различий. В пользу этой гипотезы говорит то, что в наших

исследованиях микроинъекции стрихнина в МПО не приводили к изменениям в поведении самцов стока Sprague Dawley.

Анализ полученных в тесте Кроули результатов не выявил различий в социальном взаимодействии как у интактных самцов крыс стоков Sprague Dawley и Wistar, так и после билатеральных микроинъекций раствора глицина 1 мМ и стрихнина 20 μM, следовательно, глицинэргическая нейропередача МПО не участвует в регуляции социального взаимодействия самцов обоих стоков.

Интересным является анализ результатов теста «открытое поле» по уровню тревожности, который показал, что глицинэргическая нейропередача МПО участвует в регуляции тревожности самцов стока Wistar. Микроинъекции глицина в МПО увеличивали количество паттернов «незавершённого» груминга у самцов стока Wistar, что свидетельствовало об увеличении уровня тревожности. Микроинъекции стрихнина приводили к снижению выраженности данной реакции в тесте «открытое поле». В то же время, глицинэргическая передача МПО гипоталамуса не оказывала влияния на тревожность самцов крыс стока Sprague Dawley.

Таким образом, проведенные исследования поведения крыс самцов разных стоков выявили различный вклад тормозной глицинэргической нейропередачи МПО в регуляцию полового поведения и тревожности у самцов крыс стока Wistar и Sprague Dawley. Помимо фундаментального значения выявления физиологической роли глицинэргической нейропередачи МПО в регуляцию поведения самцов крыс, важным является прикладной аспект, который следует учитывать при проведении доклинических исследований новых лекарственных препаратов при выборе модельного стока крыс для исследования полового поведения и тревожности в эксперименте.

ВЫВОДЫ

1. Стрихнин в концентрации 20 μM является блокатором глициновых рецепторов нейронов медиальной преоптической области гипоталамуса и может использоваться в качестве ингибитора глицинзависимого торможения в нейронных сетях МПО;

2. Интактные крысы самцы стока Wistar демонстрировали менее эффективное половое поведение по параметрам аппетивной и консуматорной стадий полового поведения, более высокий уровень тревожности в тесте «открытое поле», чем самцы стока Sprague Dawley. Различий в социальном взаимодействии, а также двигательной активности в тесте «открытое поле» между интактными крысами двух стоков не выявлено;

3. Активация глицинэргической тормозной нейропередачи МПО у самцов стока Wistar тормозила половое поведение, приводя к полному или частичному отсутствию копуляции, в то время как блокада глицинэргической тормозной нейропередачи приводила к появлению паттернов «маунтинг», что свидетельствовало об обогащении поведенческого репертуара и активации полового поведения.

4. Глицин у крыс стока Sprague Dawley повышал эффективность копуляции, о чем свидетельствовало снижение длительности латентного периода эякуляции во время консуматорной фазы полового поведения. Активация/блокада глицинэргических тормозных путей не влияла на параметры полового поведения;

5. Активация глицинэргической тормозной нейропередачи МПО у самцов стока Wistar приводила к увеличению количества «незавершённых» грумингов, что свидетельствовало об усилении тревожности. У крыс стока Sprague Dawley активация/блокада глицинэргических тормозных процессов не влияла на степень тревожности;

6. Активация/блокада глицинэргической тормозной нейропередачи МПО как у самцов стока Wistar, так и Sprague Dawley не оказывала влияние на социальное взаимодействие животных в трехкамерном тесте Кроули.

Список цитированной литературы

1. Панина, Ю.А. Оценка социального взаимодействия и эмоционального поведения крыс с моделью аутизма / Ю.А. Панина, Н.А. Малиновская, А.Б. Салмина, О.Л. Лопатина, Р.В. Рябоконь, Г.Е. Герцог, С.К. Антонова // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – № 3. – С. 102-105.
2. Adolphs, R. The biology of fear [Электронный ресурс] / R. Adolphs // Curr. Biol. – 2013. – Vol. 23, №2. – Режим доступа: https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(12)01435-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982212014352%3Fshowall%3Dtrue
3. Ågmo, A. Male rat sexual behavior / A. Ågmo // Brain Res Brain Res Protoc. – 1997. – Vol. 1, № 2. – P. 203-209.
4. Ågmo, A. Lack of opioid or dopaminergic effects on unconditioned sexual incentive motivation in male rats / A. Ågmo // Behavioral Neuroscience. – 2003. – Vol. 117, № 1. – P. 55–68.
5. Alves, A. Glycine Metabolism and Its Alterations in Obesity and Metabolic Diseases [Электронный ресурс] / A. Alves, A. Bassot, A.L. Bulteau, L. Pirola, B. Morio // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, № 6. – Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627940/
6. Aprison, M.H. The distribution of glycine in cat spinal cord and roots / M.H. Aprison, R. Werman // Life Sci. – 1965. – Vol. 4, № 21. – P. 2075–2083.
7. Argiolas, A. Neuropeptides and central control of sexual behaviour from the past to the present: a review / A. Argiolas, M.R. Melis // Prog Neurobiol. – 2013. – Vol. 108. – P. 80-107.
8. Avila, A. Glycine receptors control the generation of projection neurons in the developing cerebral cortex / A. Avila, P.M. Vidal, S. Tielens, G. Morelli, S. Laguesse, R.J. Harvey, J.M. Rigo, L. Nguyen // Cell Death Differ. – 2014. – Vol. 21, № 11. – P. 1696-1708.

9. Bae, J. Y. Extrasynaptic homomeric glycine receptors in neurons of the rat trigeminal mesencephalic nucleus / J.Y. Bae, J.S. Lee, S.J. Ko, Y.S. Cho, J.C. Rah, H.J. Cho, M.J. Park, Y.C. Bae // Brain Struct Funct. – 2018. – Vol. 223, № 5. – P. 2259-2268.
10. Balthazar, L. The association between the renin-angiotensin system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety disorders: A systematic review of animal studies [Электронный ресурс] / L. Balthazar, Y.V.M. Lages, V.C. Romano, J. Landeira-Fernandez, T.E. Krahe // Psychoneuroendocrinology. – 2021. – Vol. 132. – Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306453021002286?via%3Dihub
11. Barfield, R. J. The role of ultrasonic vocalizations in the regulation of reproduction in rats / R.J. Barfield, DA. Thomas // Ann N Y Acad Sci. – 1986. – Vol. 474. – P. 33-43.
12. Bialy, M. The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal Models of Human Health Disorders [Электронный ресурс] / M. Bialy, W. Bogacki-Rychlik, J. Przybylski, T. Zera // Front Behav Neurosci. – 2019. – Vol. 13. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2019.00257/full.
13. Blumstein, D. T. Toward an integrative understanding of social behavior: new models and new opportunities [Электронный ресурс] / D.T. Blumstein, L.A. Ebensperger, L.D. Hayes, R.A. Vásquez, T.H. Ahern, J.R. Burger, A.G. Dolezal, A. Dosmann, G. González-Mariscal, B.N. Harris, E.A. Herrera, E.A. Lacey, J. Mateo, L.A. McGraw, D. Olazábal, M. Ramenofsky, D.R.Rubenstein, S.A. Sakhai, W. Saltzman, C. Sainz-Borgo, M. Soto-Gamboa, M.L. Stewart, T.W. Wey, J.C. Wingfield, L.J. Young // Front Behav Neurosci. – 2010. – Vol. 4, № 34. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2010.00034/full.
14. Braestrup C. Urinary and brain beta-carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors / Braestrup C., Nielsen

M., Olsen C. E. // Proc Natl Acad Sci USA . – 1980. – Vol. 77, № 4. – P. 2288-2292

15. Breitinger, U. Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor / U. Breitinger, H.G. Breitinger // ACS Chem Neurosci. – 2020. – Vol. 11, № 12. – P. 1706-1725.
16. Carter C.S. Hormones, Brain and Behavior (Chapter 4: The Neurobiology of Social Affiliation and Pair Bonding / C.S. Carter, E.B. Keverne, co-edited by D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Etgen, S.E. Fahrbach, R.T. Rubin. – Hormones, Brain and Behavior, *Second Edition*. – Elsevier Academic Press, 2009. – 3364 p.
17. Cezar, L. C. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid / L.C. Cezar, T.B. Kirsten, C.C.N. da Fonseca, A.P.N. de Lima, M.M. Bernardi, L.F. Felicio // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. – 2018. – Vol. 84(Pt A). – P. 173-180.
18. Chan, J. S. Drug-induced sexual dysfunction in rats [Электронный ресурс] / J. S. Chan, M. D. Waldinger, B. Olivier, R. S. Oosting // Current protocols in neuroscience. – 2010. – Режим доступа: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142301.ns0934s53.
19. Chen, P. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior / P. Chen, W. Hong // Neuron. – 2018. – Vol. 98, №1. – P. 16-30.
20. Chu, X. Functions of vocalization in sociosexual behaviors in rats (Rattus norvegicus) in a seminatural environment / X. Chu, E. Snoeren, A. Ågmo // J Comp Psychol. – 2017. – Vol. 131, № 1. – P. 10-18.
21. Crawley, J.N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors / Crawley J.N. // Ment Retard Dev Disabil Res Rev. – 2004. – Vol.10, № 4. – P. 248-258.
22. Cuevas-Olguin, R. Cerebrolysin prevents deficits in social behavior, repetitive conduct, and synaptic inhibition in a rat model of autism / R. Cuevas-Olguin, S. Roychowdhury, A. Banerjee, F. Garcia-Oscos, E.

Esquivel-Rendon, M.E. Bringas, M.P. Kilgard, G. Flores, M. Atzori // J Neurosci Res. – 2017. – Vol. 95, № 12. – P. 2456-2468.

23. Dalpian, F. Sexual dimorphism, estrous cycle and laterality determine the intrinsic and synaptic properties of medial amygdala neurons in rat [Электронный ресурс] / F. Dalpian, A.A. Rasia-Filho, M.E. Calcagnotto // J Cell Sci. – 2019. – Vol. 132, № 9. – Режим доступа: https://jcs.biologists.org/content/132/9/jcs227793.long.
24. Dimen, D. Sex-specific parenting and depression evoked by preoptic inhibitory neurons / D. Dimen, G. Puska, V. Szendi, E. Sipos, D. Zelena, Á. Dobolyi // iScience. – 2021. – Vol. 24, № 10. – Режим доступа: https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(21)01058-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2589004221010580%3Fshowall%3Dtrue
25. Dominguez, J. M. Stimulation of the medial amygdala enhances medial preoptic dopamine release: implications for male rat sexual behavior / J.M. Dominguez, E.M. Hull // Brain Res. – 2001. – Vol. 917, № 2. – P. 225-229.
26. Dominguez, J. M. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior / J.M. Dominguez, E.M. Hull // Physiol Behav. – 2005. – Vol. 86, № 3. – P. 356-368.
27. Dominguez, J. M. Serotonin impairs copulation and attenuates ejaculation-induced glutamate activity in the medial preoptic area / J.M. Dominguez, E.M. Hull // Behavioral neuroscience. – 2010. – Vol. 124, № 4. – P. 554–557.
28. Donhoffner, M. E. Prosocial effects of prolactin in male rats: Social recognition, social approach and social learning / M.E. Donhoffner, S. Al Saleh, O. Schink, R.I. Wood // Horm Behav. – 2017. – Vol. 96. – P. 122-129.
29. Du, J. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy / J. Du, W. Lü, S. Wu, Y. Cheng, E. Gouaux // Nature. – 2015. – Vol. 526, № 7572. – P. 224-229.

30. Dumais, K.M. Sex differences in oxytocin receptor binding in forebrain regions: Correlations with social interest in brain region- and sex- specific ways / K.M. Dumais, R. Bredewold, Th.E. Mayer, A.H. Veenema // Hormones and Behavior. – 2013. – Vol. 64, №4. – P. 693–701.
31. Dutertre, S. Inhibitory glycine receptors: an update / S. Dutertre, C.M. Becker, H. Betz // J Biol Chem. – 2012. – Vol. 287, № 48. – P. 40216-40223.
32. Eagle, A.L. Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats / A.L. Eagle, C.J. Fitzpatrick, S.A. Perrine // Behav Brain Res. – 2013. – Vol. 256. – P. 591-597.
33. Emery, D. E. Rat strain differences in copulatory behavior after para-chlorophenylalanine and hormone treatment / D.E. Emery, K. Larsson // J Comp Physiol Psychol. – 1979. – Vol. 93, №6. – P. 1067-1084.
34. Everitt BJ. Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats / B.J. Everitt // Neurosci Biobehav Rev. – 1990. – Vol. 14, № 2. – P. 217-232.
35. Fernández-Guasti, A. GABAergic control of masculine sexual behavior / A. Fernández-Guasti, K. Larsson, C. Beyer // Pharmacol Biochem Behav. – 1986. – Vol. 24, № 4. – P. 1065-1070.
36. Festing, M.F. Improving toxicity screening and drug development by using genetically defined strains / M.F. Festing // Methods Mol Biol. – 2010. – Vol. 602. – P. 1-21.
37. Grudzinska, J. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors / J. Grudzinska, R. Schemm, S. Haeger, A. Nicke, G. Schmalzing, H. Betz, B. Laube // Neuron. – 2005. – Vol. 45, № 5. – P. 727-739.
38. Guadarrama-Bazante, I. L. Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats / I.L. Guadarrama-Bazante, G.

Rodríguez-Manzo // Psychopharmacology (Berl). – 2019. – Vol. 236, № 4. – P. 1303-1312.

39. Hegstad, J. Female rat sexual behavior is unaffected by perinatal fluoxetine exposure [Электронный ресурс] / J. Hegstad, P.T. Huijgens, D.J. Houwing, J.D.A. Olivier, R. Heijkoop, E.M.S. Snoeren // Psychoneuroendocrinology. – 2020. – Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453020302183?via%3Dihub.
40. Heijkoop, R. Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls / R. Heijkoop, P.T. Huijgens, E.M.S. Snoeren // Behav Brain Res. – 2018. – Vol. 352. – P. 70-80.
41. Hernandes, M.S. Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review / M.S. Hernandes, L.R. Troncone // J Neural Transm (Vienna). - 2009. – Vol. 116, № 12. – P. 1551-1560.
42. Huang, A. C. Neuronal nitric oxide synthase activity mediates Lycium barbarum polysaccharides-enhanced sexual performance without stimulating noncontact erection in rats / A.C. Huang, J.M. Wu, Y.H. Chang, N.K. Dubey, A.W. Chiu, C.Y. Yeh, T.H. Tsai, K.Y. Yeh // Psychopharmacology (Berl). – 2019. – Vol. 236, № 4. – P. 1293-1301.
43. Hull, E.M. Male Sexual Behavior / E.M. Hull, G. Rodríguez-Manzo // Hormones, Brain and Behavior. – 2017. – Vol. 1. – P. 1-57.
44. Hull, E.M. Neuroendocrine Regulation of Male Sexual Behavior / E.M. Hull, J.M. Dominguez // Compr Physiol. – 2019. – Vol. 9, № 4. – P. 1383-1410.
45. Jankord R. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress / R. Jankord, J.P. Herman // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 1148. – P. 64–73.
46. Jensen, V.S. Rodent model choice has major impact on variability of standard preclinical readouts associated with diabetes and obesity research /

V.S. Jensen, T. Porsgaard, J. Lykkesfeldt, H. Hvid // Am J Transl Res. – 2016. – Vol. 8, № 8. – P. 3574-3584.

47. Jonsson, S. Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development / S. Jonsson, J. Morud, C. Pickering, L. Adermark, M. Ericson, B. Söderpalm // Brain Res. – 2012. – Vol. 1446. – P. 12-21.
48. Kalueff, A.V. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience / A.V. Kalueff, A.M. Stewart, C. Song, K.C. Berridge, A.M. Graybiel, J.C. Fentress // Nat Rev Neurosci. – 2016. – Vol. 17, №1. – P. 45-59.
49. Karlsson, U. Currents evoked by GABA and glycine in acutely dissociated neurons from the rat medial preoptic nucleus / U. Karlsson, D. Haage, S. Johansson // Brain Res. – 1997. – Vol. 770, № 1-2. – P. 256-260.
50. Karlsson, U. Cl(-) concentration changes and desensitization of GABA(A) and glycine receptors / U. Karlsson, M. Druzin, S. Johansson // J Gen Physiol. – 2011. – Vol. 138, № 6. – P. 609-626.
51. Kawai, N. The sleep-promoting and hypothermic effects of glycine are mediated by NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus / N. Kawai, N. Sakai, M. Okuro, S. Karakawa, Y. Tsuneyoshi, N. Kawasaki, T. Takeda, M. Bannai, S. Nishino // Neuropsychopharmacology. – 2015. – Vol. 40, № 6. – P. 1405-1416.
52. Keller, M. The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior / M. Keller, M.J. Baum, O. Brock, P.A. Brennan, J. Bakker // Behav Brain Res. – 2009. – Vol. 200, № 2. – P. 268-276.
53. Kenwood, M.M. The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders/ M.M. Kenwood, N.H. Kalin, H. Barbas // Neuropsychopharmacology. – 2022. – Vol. 47, №1. – P. 260-275.
54. Kiyokawa, Ya. Social Odors: Alarm Pheromones and Social Buffering / Ya. Kiyokawa // Curr Topics Behav Neurosci. – 2017. – Vol. 30. – P. 47–65.

55. Ko, J. Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns [Электронный ресурс] J. Ko // Front Neural Circuits. – 2017. – Vol. 11. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2017.00041/full
56. Kobayashi, T. c-Fos expression during the modulation of sexual behavior by an alarm pheromone / T. Kobayashi, Y. Kiyokawa, S. Arata, Y. Takeuchi, Y. Mori / Behav Brain Res. – 2013. – Vol. 237. – P. 230-237.
57. Krowicki, Z. K. Microinjection of glycine into the hypothalamic paraventricular nucleus produces diuresis, natriuresis, and inhibition of central sympathetic outflow / Z. K. Krowicki, D. R. Kapusta // J Pharmacol Exp Ther. – 2011. – Vol. 337, № 1. – P. 247-255.
58. Kumar, A. Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs [Электронный ресурс] A. Kumar, S. Basak, S. Rao, Y. Gicheru, M.L. Mayer, M.S.P. Sansom, S. Chakrapani // Nat Commun. – 2020. – Vol. 11, № 1. – Режим доступа: https://www.nature.com/articles/s41467-020-17364-5.
59. Laube, B. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? / B. Laube, G. Maksay, R. Schemm, H. Betz // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – Vol. 23, № 11. – P. 519-527.
60. Le Moëne, O. Rapid changes in sociosexual behaviors around transition to and from behavioral estrus, in female rats housed in a seminatural environment [Электронный ресурс] / O. Le Moëne, E. Hernández-Arteaga, X. Chu, A. Ågmo // Behav Processes. – 2020. – Vol. 174. – Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635719304917?via%3Dihub.
61. León Rodríguez, D.A. Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats [Электронный ресурс] / D.A. León

Rodríguez, Z. Dueñas // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, №6. – Режим доступа: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068010

62. Lin, M. S. α2-glycine receptors modulate adult hippocampal neurogenesis and spatial memory / M.S. Lin, W.C. Xiong, S.J. Li, Z. Gong, X. Cao, X.J. Kuang, Y. Zhang, T.M. Gao, N. Mechawar, C. Liu, X.H.Zhu // Dev Neurobiol. – 2017. – Vol. 77, № 12. – P. 1430-1441.
63. Lonstein, J. S. Low Daytime Light Intensity Disrupts Male Copulatory Behavior and Upregulates Medial Preoptic Area Steroid Hormone and Dopamine Receptor Expression, in a Diurnal Rodent Model of Seasonal Affective Disorder [Электронный ресурс] / J.S. Lonstein, K. Linning-Duffy, L. Yan // Front Behav Neurosci. – 2019. – Vol. 13, № 72. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2019.00072/full.
64. Maejima, S. VGF in the Medial Preoptic Nucleus Increases Sexual Activity Following Sexual Arousal Induction in Male Rats / S. Maejima, Y. Abe, S. Yamaguchi, S. Musatov, S. Ogawa, Y. Kondo, S. Tsukahara // Endocrinology. – 2018. – Vol. 159, № 12. – P. 3993-4005.
65. Malinina, E. Fast neurotransmission in the rat medial preoptic nucleus / E. Malinina, M. Druzin, S. Johansson // Brain Res. – 2005. – Vol. 1040, № 1-2. – P. 157-168.
66. Malinina, E. Short-term plasticity in excitatory synapses of the rat medial preoptic nucleus / E. Malinina, M. Druzin, S. Johansson // Brain Res. – 2006. – Vol. 1110, № 1. – P. 128-135.
67. Manduca, A. Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats / A. Manduca, P. Campolongo, M. Palmery, L.J. Vanderschuren, V. Cuomo, V. Trezza // Psychopharmacology (Berl). – 2014a. – Vol. 231, № 8. – P. 1661-1673.

68. Manduca, A. Strain- and context-dependent effects of the anandamide hydrolysis inhibitor URB597 on social behavior in rats / A. Manduca, M. Servadio, P. Campolongo, M. Palmery, L. Trabace, L.J. Vanderschuren, V. Cuomo, V. Trezza // Eur Neuropsychopharmacol. – 2014b. – Vol. 24, №8. – P. 1337-1348.
69. Matthews, G.A. Neural mechanisms of social homeostasis / G.A. Matthews, K.M. Tye // Ann N Y Acad Sci. – 2019. – Vol. 1457, № 1. – P. 5-25.
70. McHenry, J. A. Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit / J.A. McHenry, J.M. Otis, M.A. Rossi, J.E. Robinson, O. Kosyk, N.W. Miller, Z.A. McElligott, E.A. Budygin, D.R. Rubinow, G.D. Stuber // Nat Neurosci. – 2017. – Vol. 20, № 3. – P. 449-458.
71. McLean, J.H. Strain differences in the mating behavior of Sprague-Dawley, Long-Evans, and Wistar male rats / J.H. McLean, W.A. Dupeire, S.T. Elder // Psychon Sci. – 1972. – Vol. 29. – P. 175–176.
72. Morishita, M. Neuronal activation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female and male rats during copulation and its sex differences / M. Morishita, A. Kamada, S. Tsukahara [Электронный ресурс] // Neurosci Lett. – 2021. – Vol. 755. – Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394021002937?via%3Dihub.
73. Nakashima, S. Region-specific effects of copulation on dendritic spine morphology and gene expression related to spinogenesis in the medial preoptic nucleus of male rats / S. Nakashima, M. Morishita, K. Ueno, S. Tsukahara // Psychoneuroendocrinology. – 2019. – Vol. 108. – P. 1-13.
74. Newman, S.W. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network / S.W. Newman // Ann N Y Acad Sci. – 1999. – Vol. 877. – P. 242-257.
75. Normandin, J. J. Serotonergic lesions of the periaqueductal gray, a primary source of serotonin to the nucleus paragigantocellularis, facilitate sexual

behavior in male rats / J.J. Normandin, A.Z. Murphy // Pharmacol Biochem Behav. – 2011. – Vol. 98, № 3. – P. 369-375.

76. Numan, M. Neurobiology of Social Behavior (Chapter 4: Sexual Behaviors and Sexual Differentiation) / M. Numan. – Elsevier Academic Press, 2014. – 358 p.
77. Nutsch, V. L. Colocalization of Mating-Induced Fos and D2-Like Dopamine Receptors in the Medial Preoptic Area: Influence of Sexual Experience [Электронный ресурс] / V.L. Nutsch, R.G. Will, C.L. Robison, J.R. Martz, D.J. Tobiansky, J.M. Dominguez // Front Behav Neurosci. – 2016. – Vol. 10, № 75. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2016.00075/full.
78. Opendak, M. Lasting Adaptations in Social Behavior Produced by Social Disruption and Inhibition of Adult Neurogenesis / M. Opendak, L. Offit, P. Monari, T.J. Schoenfeld, A.N. Sonti, H.A. Cameron, E. Gould / J Neurosci. – 2016. – Vol. 36, № 26. – P. 7027-7038.
79. Parker, C.C. Rats are the smart choice: Rationale for a renewed focus on rats in behavioral genetics / C.C. Parker, H. Chen, S.B. Flagel, A.M. Geurts, J.B. Richards, T.E. Robinson, L.C. Solberg Woods, A.A. Palmer // Neuropharmacology. – 2014. – Vol. 76 Pt B (0 0). – P. 250-258.
80. Patri, M. Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction (Chapter 2: Synaptic Transmission and Amino Acid Neurotransmitters / Patri, M., co-edited by Th. Heinbockel, A.B. Csoka. – London: IntechOpen Limited, 2019. – 96 p.
81. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – San Diego, 2007. – 456 p.
82. Perkins, A.E. A working model for the assessment of disruptions in social behavior among aged rats: The role of sex differences, social recognition, and sensorimotor processes / A.E. Perkins, T.L. Doremus-Fitzwater, R.L. Spencer, E.I. Varlinskaya, M.M. Conti, C. Bishop, T. Deak // Exp Gerontol. – 2016. – Vol. 76. – P. 46-57.

83. Peters, S. M. Novel approach to automatically classify rat social behavior using a video tracking system / S.M. Peters, I.J. Pinter, H.H. Pothuizen, R.C. de Heer, J.E. van der Harst, B.M. Spruijt // J Neurosci Methods. – 2016. – Vol. 268. – P. 163-170.
84. Pfaff, D.W. Hormone-dependent medial preoptic/lumbar spinal cord/autonomic coordination supporting male sexual behaviors / D.W. Pfaff, M.J. Baum // Mol Cell Endocrinol. – 2018. – Vol. 467. – P.21-30.
85. Quintana, G.R. Differential disruption of conditioned ejaculatory preference in the male rat based on different sensory modalities by micro-infusions of naloxone to the medial preoptic area or ventral tegmental area / G.R. Quintana, M. Birrel, S. Marceau, N. Kalantari, J. Bowden, Y. Bachoura, E. Borduas, V. Lemay, J.W. Payne, C.M. Cionnaith, J.G. Pfaus // Psychopharmacology (Berl). – 2019. – Vol. 236, № 12. – P. 3613-3623.
86. Rahdar, P. Rfamide-related peptide-3 suppresses the substance P-induced promotion of the reproductive performance in female rats modulating hypothalamic Kisspeptin expression / P. Rahdar, H. Khazali // Exp Brain Res. – 2020. – Vol. 38, № 11. – P. 2457-2467.
87. Rampon, C. Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain/ C. Rampon, P.H. Luppi, P. Fort, C. Peyron, M. Jouvet // Neuroscience. – 1996. – Vol. 75, № 3. – P. 737-755.
88. Rizzi-Wise, C.A. Putting Together Pieces of the Lateral Septum: Multifaceted Functions and Its Neural Pathways [Электронный ресурс] / C.A. Rizzi-Wise, D.V. Wang // eNeuro. – 2021. – Vol. 8, №6. – Режим доступа: https://www.eneuro.org/content/8/6/ENEURO.0315-21.2021.long
89. Rodríguez, L.D.A. Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats [Электронный ресурс] / L.D.A. Rodríguez, Z. Dueñas // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, №6. – Режим доступа: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068010

90. Rodríguez-Manzo, G. Stimulation of the medical preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation / G. Rodríguez-Manzo, F. Pellicer, K. Larsson, A. Fernández-Guasti // Behav Neurosci. – 2000. – Vol. 114, №3. – P. 553-560.

91. Romero-Carbente, J. C. Central tegmental field and sexual behavior in the male rat: effects of neurotoxic lesions / J.C. Romero-Carbente, E.A. Hurtazo, R.G. Paredes // Neuroscience. – 2007. – Vol. 148, № 4. – P. 867-875.

92. Rybnikova, E. A. Comparative Characterization of Rat Strains (Wistar, Wistar–Kyoto, Sprague Dawley, Long Evans, LT, SHR, BD-IX) by Their Behavior, Hormonal Level and Antioxidant Status / E.A. Rybnikova, O.V. Vetrovoi, M.Yu. Zenko // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2018. – Vol. 54, № 5. – P. 374-382.

93. Sanna, F. Altered Sexual Behavior in Dopamine Transporter (DAT) Knockout Male Rats: A Behavioral, Neurochemical and Intracerebral Microdialysis Study [Электронный ресурс] / F. Sanna, J. Bratzu, M.P. Serra, D. Leo, M. Quartu, M. Boi, S. Espinoza, R.R. Gainetdinov, M.R. Melis, A. Argiolas //Front Behav Neurosci. – 2020. – Vol. 14, № 58. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2020.00058/full.

94. Schaefer, N. Impaired Glycine Receptor Trafficking in Neurological Diseases [Электронный ресурс] / N. Schaefer, V. Roemer, D. Janzen, C. Villmann // Front Mol Neurosci. – 2018. – Vol. 11, № 291. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00291/full.

95. Sherwin, E. Microbiota and the social brain [Электронный ресурс] / E. Sherwin, S.R. Bordenstein, J.L. Quinn, T.G. Dinan, J.F. Cryan // Science – 2019. – Vol. 366, № 6465. – Режим доступа: https://science.sciencemag.org/content/366/6465/eaar2016.long.

96. Simerly, R. B. The Rat Nervous System (Chapter 13: Organization of the Hypothalamus / R. B. Simerly, edited by G. Paxinos. – Elsevier Academic Press, 2015. – 1035 p.

97. Smith, C.J.W. Comparing vasopressin and oxytocin fiber and receptor density patterns in the social behavior neural network: Implications for cross-system signaling [Электронный ресурс] / C.J.W. Smith, B.T. DiBenedictis, A.H. Veenema // Front Neuroendocrinol. – 2019. – Vol. 53. – Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S009130221930007X?via%3Dihub

98. Tovote, P. Neuronal circuits for fear and anxiety / P. Tovote, J.P. Fadok, A. Lüthi // Nat Rev Neurosci. – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 317-331.

99. Tsuneoka, Y. Moxd1 Is a Marker for Sexual Dimorphism in the Medial Preoptic Area, Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Medial Amygdala [Электронный ресурс] / Y. Tsuneoka, S. Tsukahara, S. Yoshida, K. Takase, S. Oda, M. Kuroda, H. Funato // Front Neuroanat. – 2017. – Vol. 11, № 26. – Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2017.00026/full.

100. Umryukhin, P.E. Behavior of Rats in an Open Field Test as a Prognostic Indicator of Corticosterone Levels Before and After Stress / P.E. Umryukhin, O.S. Grigorchuk // Neurosci Behav Physi. – 2017. – Vol. 47. – P. 456–458.

101. van den Pol, A.N. Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord / A.N. van den Pol, T. Gorcs // J Neurosci. – 1988. – Vol. 8, № 2. – P. 472-492.

102. Veening, J. G. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits / J.G. Veening, L.M. Coolen // Pharmacol Biochem Behav. – 2014. – Vol. 121. – P. 170-183.

103. Viau, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes / V. Viau // J Neuroendocrinol – 2002. – Vol. 14, №6. – P. 506-513.

104. Wegener, A.J. Animal Models of Anxiety and Depression: Incorporating the Underlying Mechanisms of Sex Differences in Macroglia Biology [Электронный ресурс] / A.J. Wegener, G.N. Neigh // Front Behav Neurosci. – 2021. – Vol. 15. - Режим доступа: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2021.780190/full

105. Wiggins, J. W. Chronic Spinal Cord Injury Reduces Gastrin-Releasing Peptide in the Spinal Ejaculation Generator in Male Rats / J.W. Wiggins, N. Kozyrev, J.E. Sledd, G.G. Wilson, L.M. Coolen // J Neurotrauma. – 2019. – Vol. 36, № 24. – P. 3378-3393.

106. Will, R. G. Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior / R.G. Will, E.M. Hull, J.M. Dominguez // Pharmacol Biochem Behav. – 2014. – Vol. 121. – P. 115-123.

107. Winokur, S.B. Depression-related disturbances in rat maternal behaviour are associated with altered monoamine levels within mesocorticolimbic structures [Электронный ресурс] / S.B. Winokur, K.L. Lopes, Y. Moparthi, M. Pereira // J Neuroendocrinol. – 2019. – Vol. 31, № 9. – Режим доступа: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jne.12766.

108. Xia, J. D. Centrally mediated ejaculatory response via sympathetic outflow in rats: role of N-methyl-D-aspartic acid receptors in paraventricular nucleus / J.D. Xia, J. Chen, H.J. Sun, L.H. Zhou, G.Q. Zhu, Y. Chen, Y.T. Dai // Andrology. – 2017. – Vol. 5, № 1. – P. 153-159.

109. Yang, Z. Stochiometry and subunit arrangement of α1β glycine receptors as determined by atomic force microscopy / Z. Yang, E. Taran, T.I. Webb, J.W. Lynch // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51, № 26. – P. 5229-5231.

110. Yang, Z. A novel compound mutation in GLRA1 cause hyperekplexia in a Chinese boy- a case report and review of the literature [Электронный ресурс] / Z. Yang, G. Sun, F. Yao, D. Tao, B. Zhu // BMC Med Genet. – 2017. – Vol. 18, № 1. – Режим доступа: https://bmcmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12881-017-0476-6.

111. Yaribeygi, H. Physiological/neurophysiological mechanisms involved in the formation of stress responses / H. Yaribeygi, H. Sahraei // Neurophysiology. – 2018. – Vol. 50. – P. 131–139.

112. Yates, N. J. Vitamin D is crucial for maternal care and offspring social behaviour in rats / N.J. Yates, D. Tesic, K.W. Feindel, J.T. Smith, M.W. Clarke, C. Wale, R.C. Crew, M.D. Wharfe, A.J.O. Whitehouse, C.S. Wyrwoll // J Endocrinol. – 2018. – Vol. 237, № 2. – P. 73-85.

113. Young A.B. Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system / Young A.B., Snyder S.H. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1973. - Vol.70, №10. – P. 2832-2838.

114. Yu, A. Glutamate and Glycine Binding to the NMDA Receptor / A. Yu, A.Y. Lau //Structure. – 2018. – Vol. 26, № 7. – P. 1035-1043.

115. Zancan, M. Remodeling of the number and structure of dendritic spines in the medial amygdala: From prepubertal sexual dimorphism to puberty and effect of sexual experience in male rats / M. Zancan, R.S.R. da Cunha, F. Schroeder, L.L. Xavier, AA. Rasia-Filho // Eur J Neurosci. – 2018. – Vol. 48, № 2. – P. 1851-1865.

116. Zeilhofer, H.U. Glycine Receptors in Spinal Nociceptive Control-An Update [Электронный ресурс] / H.U. Zeilhofer, K. Werynska, J. Gingras, G.E. Yévenes // Biomolecules. - 2021. – Vol. 11, № 6. – Режим доступа: https://www.mdpi.com/2218-273X/11/6/846

117. Zhang, Q. J. Effects of mu opioid receptors in paraventricular nucleus on ejaculation through mediating sympathetic nerve system activity [Электронный ресурс] / Q.J. Zhang, J. Yang, Y.M. Wang, R. Cong, G.Q.

Zhu, Z.J. Wang, N.H. Song, J.D. Xia // Neuropharmacology. – 2019. – Vol. 158. – Режим доступа: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0028390819302679?via%3Dihub.

118. Zhao C. Mu opioid receptors in the medial preoptic area govern social play behavior in adolescent male rats [Электронный ресурс] / C. Zhao, L. Chang, A.P. Auger, S.C. Gammie, L.V. Riters // Genes Brain Behav. – 2020. – Vol. 19, № 7. – Режим доступа: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gbb.12662

119. Zhao, Y. Quantitative phenotype analysis to identify, validate and compare rat disease models [Электронный ресурс] / Y. Zhao, J.R. Smith, S.J. Wang, M.R. Dwinell, M. // Database (Oxford). 2019. – Vol. baz037. – Режим доступа: https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/baz037/5424140?login=false

120. Zhuravleva, Z.D. The Effect of Glycine Microinjections in the Medial Preoptic Area of the Hypothalamus on the Sexual Behavior of Male Rats / Z.D. Zhuravleva, A.V. Lebedeva, A.B. Volnova, I.V. Mukhina, M. Ya. Druzin // Neurochemical Journal. – 2015. – Vol. 9, № 2. – P. 141–145.

121. Zhuravleva, Z.D. Effects of Glycine Receptors of the Medial Preoptic Nucleus on Sexual Behavior of Male Wistar Rats / Z.D. Zhuravleva, M.A. Mogutina, I.V. Mukhina, M. Ya. Druzin // Bull Exp Biol Med. – 2020. – Vol. 169. – P. 299–301.

122. Zhuravleva, Z.D. Glycine receptors of the medial preoptic area of the hypothalamus as a potential therapeutic target for the correction of sexual behavior (experimental study on model rats) / Z.D. Zhuravleva, N.A. Titova, I.V. Mukhina, M. Druzin // Modern Technologies in Medicine. - 2021. – Vol. 6. – P. 36–41.