

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПЕПТИДОВ ТИМУСА НА ПОВЕДЕНИЕ И ОБУЧЕНИЕ КРЫС

А.Ю. Ольховик, А.В. Новоселецкая

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» МО РФ, г. Санкт-Петербург, ул. Боткинская, д. 17 (drypak@bk.ru)

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12 (тел. (495) – 939-50-01, anna.novoseletskaya@gmail.com)

Резюме

В опытах на самцах крыс Wistar изучали влияние интраназального введения пептидов тимуса на функциональную активность центральной нервной системы. Показано снижение уровня тревожности крыс и увеличение исследовательской активности в тестах «Открытое поле» и «Экстраполяционное избавление», а также выявлен оптимизирующий эффект тактивина и тимозина фракции 5 на память.

Ключевые слова: интраназальное введение, пептиды тимуса, открытое поле, память, обучение, экстраполяционное избавление.

INFLUENCE OF INTRANASAL INTRODUCTION THYMUS PEPTIDES FOR BEHAVIOR AND TRAINING IN RATS

A.Y. Olkhovik, A.V. Novoseletskaya

Military-Medical Academy. Kirov

Moscow State University named after MV Lomonosov

Abstract

In experiments on male Wistar rats was researched the effect of intranasal injection of thymus peptides on the functional activity central nervous system. Reduce the level of anxiety in rats and an increase in research activity in the tests "Open field" and "Extrapolation escape task" are explored, and a positive dynamics on the formation with using tactivin and thymosin fraction 5 on the memory.

Key words: intranasal introduction, thymus peptides, open field, memory, training, extrapolation escape task.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск фармакологических веществ, оказывающих нейропротективное действие на память и когнитивные функции человека при различных патологиях центральной нервной системы, и анализ механизмов их действия составляет важное направление современной нейробиологии [1-3].

Клинические и экспериментальные данные доказывают участие регуляторных пептидов в управлении процессами обучения и памяти [4-6].

Вопрос о взаимодействии нервной и иммунной систем в последнее время вызывает большой интерес у специалистов различных научных профилей [7-9].

Показано, что у пациентов с болезнью Альцгеймера расстройства когнитивных функций сопровождаются нарушениями в работе иммунной системы. Исходя из этого, можно предположить, что расстройства иммунной системы могут вызвать дисбаланс в нейроэндокринной иммуномодуляционной сети, что, в свою очередь, повлияет на работу когнитивной системы [10].

Ряд природных пептидов, их фрагментов и синтетических аналогов послужили основой для создания принципиально новых нейротропных фармакологических веществ. Однако в настоящее время нельзя утверждать, что пептидные препараты находят широкое применение в клинической практике [11].

Интерес представляет изучение эффектов цитокинов и связанных с ними иммуноактивных веществ с нейроиммуномодулирующими свойствами [12]. Такими веществами являются иммуноактивные пептиды тимуса. Нейромодуляторные свойства иммуноактивных пептидов и их влияние на поведение животных и человека изучены недостаточно [13-14].

Цель исследования изучить влияние интраназального введения иммуноактивных пептидов тимуса на свободное поведение и процессы обучения и памяти у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на 120 крысах Wistar весом 180-220 г. Животных содержали в виварии при температуре +22-24°C и свободном доступе к воде и пище. Для снижения возможного полимодального эффекта со стороны других «пептидных систем» использовали малые дозы иммуноактивных пептидов тимуса путем их доставки через слизистую носа. В течение пяти дней один раз в сутки животным интраназально вводили

препараты объемом 100 мкл: тактивин в дозе 5 мкг/кг, тимозин фракция 5 (Hoffmann-La Inc., Швеция) в дозе 5 мкг/кг и физиологический раствор.

Поведение крыс изучали в тесте «Открытое поле» и в тесте «Экстраполяционное избегание». Далее у всех животных вырабатывали условный рефлекс активного избегания (УРАИ).

Установка для теста «Открытое поле» (ОП) представляет собой круглую (диаметром 97 см) камеру, пол которой разделен на сектора с отверстиями. У животных в течение 5 минут регистрировали количество пересеченных секторов, вертикальных стоек и норковых реакций, продолжительность одной остановки и длительность актов груминга [15].

Установка для теста «Экстраполяционное избегание» представляет собой емкость цилиндрической формы диаметром 31 см с закрепленным внутри на геометрическом центре по контуру на держателях прозрачным полым цилиндром (диаметр 7,3 см, высота 23 см), [16]. Установку заполняли водой (27°C), чтобы края внутреннего цилиндра были погружены в воду на 2,5 см. Животное аккуратно помещали в воду, опустив его внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Решение задачи заключалось в подныривании под края внутреннего цилиндра и выныривании вне его границ. В течение 5 минут регистрировали общее время двигательной активности, время и число актов иммобильности, число прыжков во внутреннем цилиндре, общее время карабкания и латентный период подныривания.

УРАИ вырабатывали у крыс в челночной камере. К условному раздражителю (звук 700 Гц) через 10 секунд изолированного действия подключался безусловный раздражитель – электрический ток силой 0,4-0,9 мА. При переходе животного через отверстие в другую половину камеры во время действия безусловного раздражителя звук и ток выключались. Если животное переходило во время следования только звукового сигнала, тока не следовало, а звук прекращался. Если животное не совершало перехода при действии раздражителей, то через 10 с после включения тока они вместе выключались автоматически. Каждый опыт состоял из 25 предъявлений с межсигнальным периодом 30 с. Опыты проводили ежедневно в течение 7 дней до формирования устойчивого рефлекса (более 80% реакций избегания от числа предъявлений).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона в программе «Statistica 8.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тестирования в ОП проводили дважды. Первому тестированию подвергались животные за день до начала введения веществ. Результаты этого тестирования использовались для распределения высокоактивных и низкоактивных животных равномерно по группам. Распределение проводили по следующим критериям: горизонтальная активность (количество пересеченных секторов периферических, медиальных и центрального) и вертикальная активность (количество вертикальных стоек и норковых реакций) животных. Статистических различий между средними показателями (среднее $\pm$ стандартное отклонение) сформированных групп не было выявлено. В первом тестировании в ОП показатель количество пересеченных периферических секторов в группе 1 (стала контрольной группой) составил $40,4 \pm 5$, в группе 2 (стала группой тимозин фракция 5) – $38,5 \pm 3$, в группе 3 (стала группой тактивин) – $39,2 \pm 3$; показатель количество пересеченных медиальных секторов в группе 1 составил $12,6 \pm 3,1$, в группе 2 – $14,3 \pm 2,6$, в группе 3 – $13,9 \pm 3,3$; показатель количества пересечений центрального сектора в группе 1 составил $2,0 \pm 0,3$, в группе 2 – $2,4 \pm 0,2$, в группе 3 – $2,2 \pm 0,3$. Различий в показателях вертикальной двигательной активности у трех групп животных до введения фармакологических веществ выявлено не было. В первом тестировании в ОП количество стоек в группе 1 составило $21,4 \pm 3,3$, в группе 2 – $20,6 \pm 2,4$, в группе 3 – $22,8 \pm 2,7$; а количество норковых реакций в группе 1 составило $10,8 \pm 2,7$, в группе 2 – $12,1 \pm 2,2$, в группе 3 – $12,4 \pm 1,9$. Повторные тестирования проводили через 5 дней после начала введения веществ. Все регистрируемые показатели в данном тесте выражали в процентах по отношению к результатам первого тестирования, показатели которого принимали за 100%.

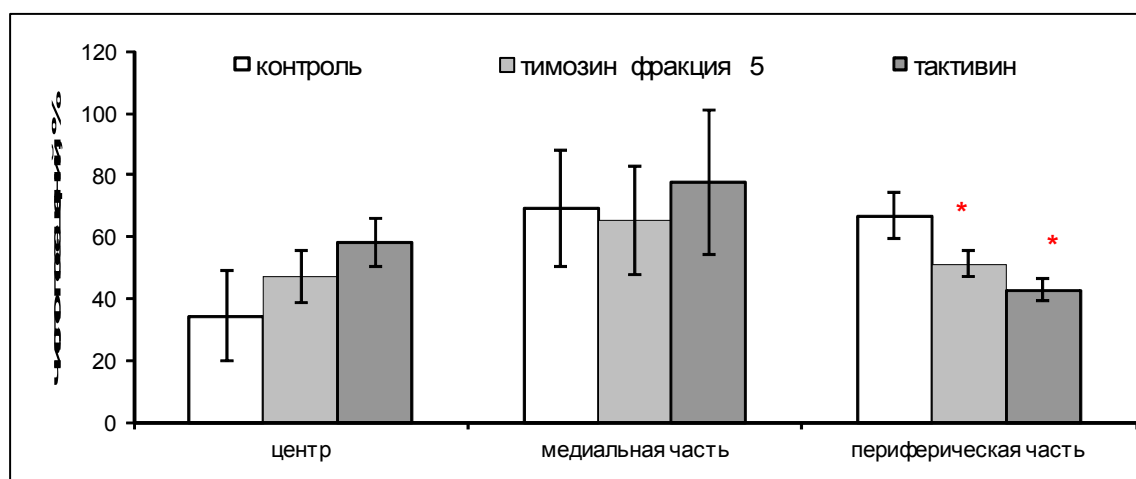
При втором тестировании в ОП, наблюдали достоверное снижение числа посещений периферических секторов арены на фоне тимозина фракции 5 и тактивина (рис. 1А). Различий в посещении медиальных и центрального секторов арены между опытными и контрольной группами не наблюдалось. Стоит отметить, что наблюдалось достоверное уменьшение числа норковых реакций для опытных групп тимических пептидов (рис. 1Б).

Под действием всех иммуноактивных пептидов достоверно ($p < 0,05$) уменьшалась средняя длительность одной остановки животного. Анализ груминга и число стоек во всех опытных группах было сопоставимо и не отличалось от показателей контрольной группы.

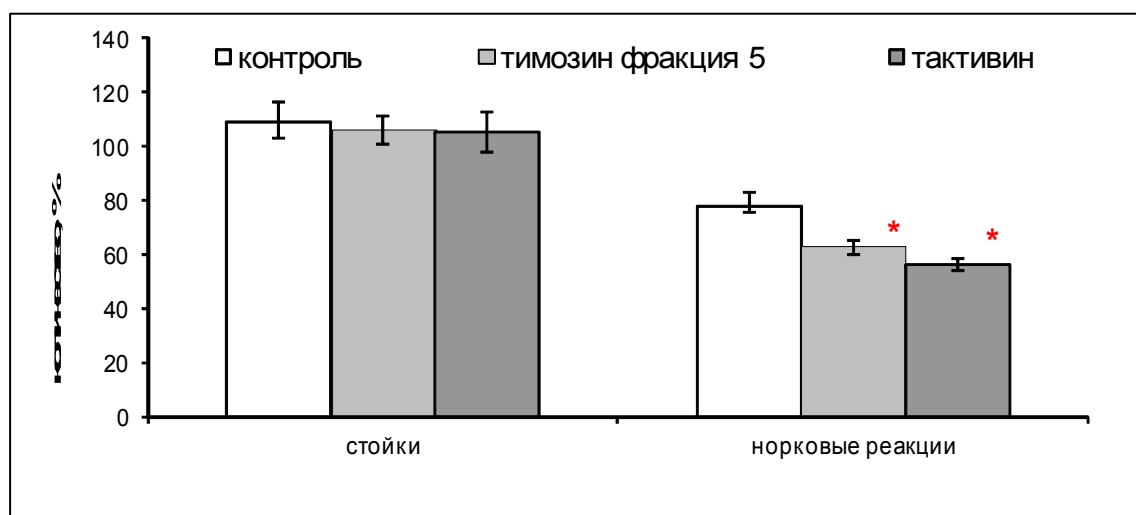
В тесте «Экстраполяционное избавление», после ознакомления с обстановкой (в виде поворотов головы и туловища), животные делали попытки выбраться из узкого цилиндра, карабкаясь по его стенкам, или совершая прыжки вверх, опираясь передними

лапками на стенки цилиндра. Далее, безуспешные попытки избегания сменялись подныриванием под край цилиндра. Полученные экспериментальные данные демонстрируют статистически значимое отличие в показателе латентного периода подныривания (время решения задачи) у крыс на фоне исследуемых иммуноактивных пептидов (рис. 2А).

Поскольку животные контрольной группы дольше находились в экспериментальных условиях, результаты по продолжительности иммобильности и двигательной активности представлены в процентах от общего времени, проведенного в тесте (суммарное время периодов иммобильности и двигательной активности принято за 100%). На фоне иммуноактивных пептидов продолжительность иммобильности в процентах от общего времени нахождения в тесте снижена по сравнению с контролем, а продолжительность двигательной активности в процентах от общего времени нахождения в экспериментальной установке достоверно ($p < 0,001$) увеличена (рис. 2Б).



А.



Б.

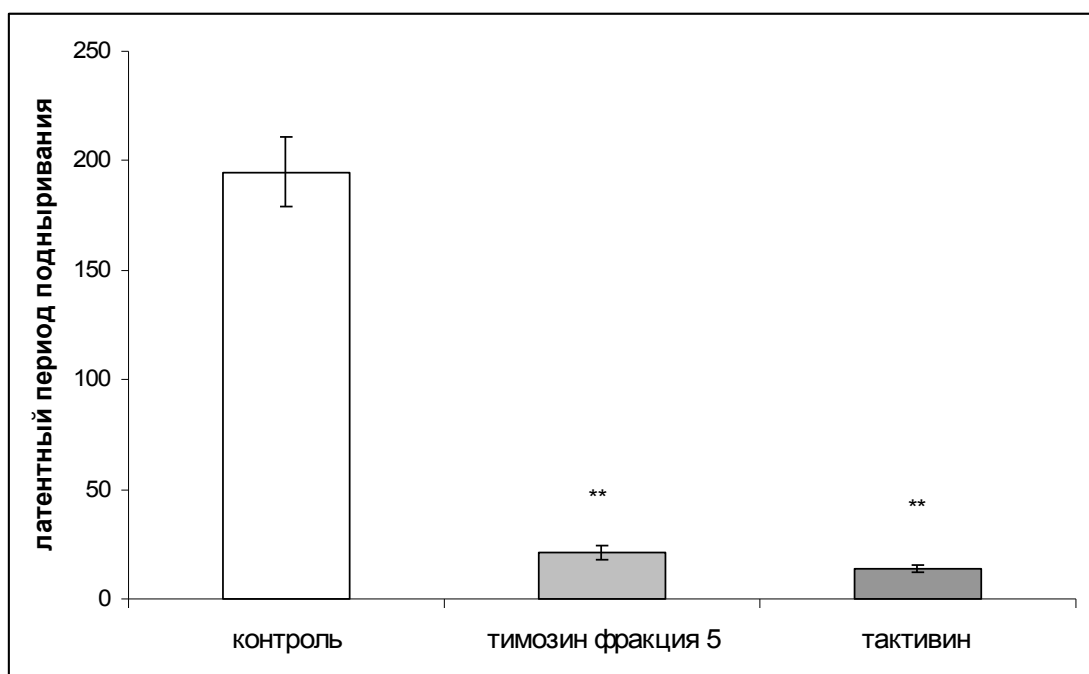
Рис. 1. Поведение животных в тесте «Открытое поле» в процентах по отношению к результатам 1-го тестирования.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

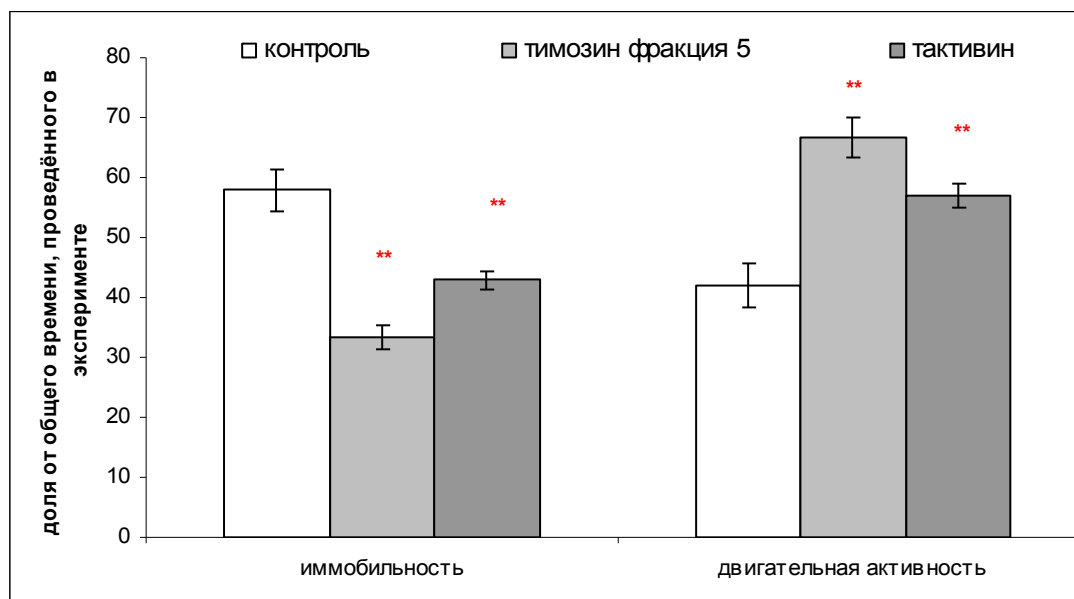
А. Число посещений животными различных секторов в тесте;

Б. Количество стоек и норковых реакций.

Процесс обучения в опытных группах животных, получавших пептиды тимуса, происходил значительно быстрее, чем в контрольной группе, на протяжении 7 дней выработки УРАИ (рис. 3).



А.



Б.

Рис. 2. Поведение животных в тесте «Экстраполяционное избавление».

** - $p < 0,001$ относительно контроля.

А. Латентный период подныривания в тесте «Экстраполяционное избавление»;

Б. Суммарная продолжительность иммобильности и двигательной активности в процентах от общего времени нахождения в тесте.

В процессе формирования реакции избегания в каждой группе животных (за исключением контрольной группы) до 3 дня выработки рефлекса наблюдалось сначала увеличение числа межсигнальных реакций, а затем снижение. Группы тимических пептидов тимозина фракции 5 и тактивина в дозах 5 мкг/кг демонстрировали достоверно меньшее ($p < 0,05$) число межсигнальных реакций по сравнению с контрольной группой во время выработки УРАИ.

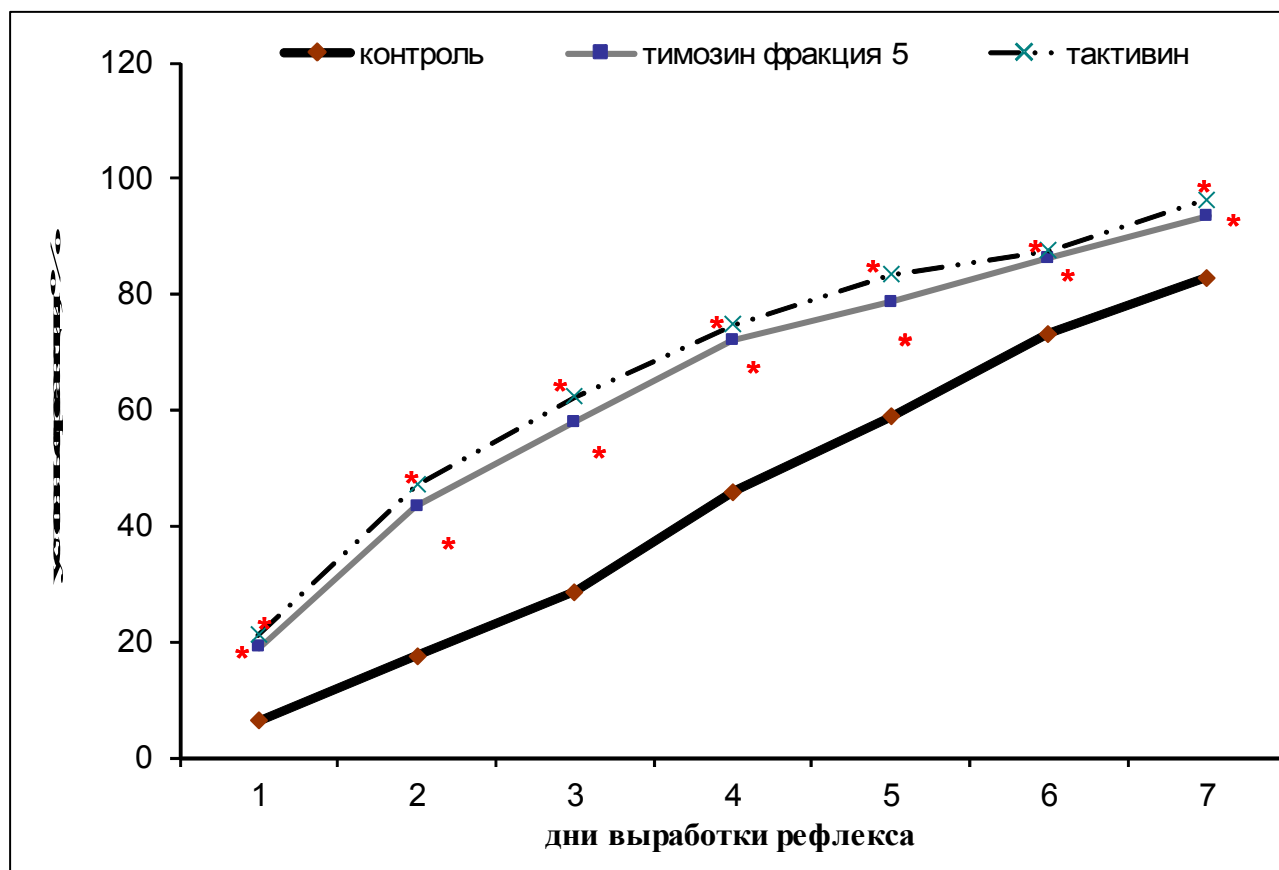


Рис. 3. Динамика формирования условного рефлекса активного избегания.

* - $p < 0,05$ относительно контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование воздействия иммуноактивных пептидов на поведение крыс. Использованы стандартные поведенческие модели: «Открытое поле», «Экстраполяционное избавление» и выработка УРАИ.

Методика ОП широко используется в психофармакологии для изучения влияния веществ на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность [17]. Во всех группах наблюдалось снижение двигательной активности при втором тестировании в ОП. Поведение в данном тесте можно рассматривать с позиции привыкания или негативного обучения, так как происходит угасание реакции на новую среду по мере ее оценки как «биологически незначимое».

Под действием пептидов тимуса (тактивина и тимозина фракции 5) наблюдали снижение числа посещений животными периферических секторов ОП и норковых реакций. Полученные данные указывают на снижение пептидами тимуса уровня тревожности крыс и улучшение исследовательской активности животных, о чем также

косвенно свидетельствуют множественные акты приноживания и облизывания стенок и пола арены.

Эффекты, полученные на фоне интраназального введения пептидов тимуса, аналогичны данным, полученным при внутрибрюшинном введении препарата пептидов тимуса – тактивина в дозах 0,5 мг/кг [14, 18].

Как видно из представленных данных, группы животных, получавшие иммуноактивные пептиды тимуса, отличались более активным ориентировочно-исследовательским поведением, по сравнению с контрольными животными.

В исследованиях Марковой Е.В. с соавторами установлено, что экспериментальные животные с различным уровнем ориентировочно-исследовательского поведением характеризуются также определенными особенностями функционирования иммунной системы, а стимуляция клеточного звена иммунного ответа активизирует ориентировочно-исследовательское поведение [19, 20].

В тесте «Экстраполяционное избавление» крысы, помещенные в воду внутри узкого прозрачного цилиндра, преимущественно совершают либо прыжки вверх, либо пытаются поднырнуть под нижним краем цилиндра (решение задачи). В работе Бондаренко Н.А. было доказано, что поведение подныривания в тесте «Экстраполяционное избавление» является целенаправленным (поиск места, позволяющего спастись из воды) и при подкреплении быстро выучивается животным [21]. В нашем эксперименте показано достоверное ($p < 0,001$) уменьшение латентного периода подныривания на фоне пептидов тимуса.

Полученные данные свидетельствуют о достоверном ($p < 0,05$) уменьшении периода иммобильности на фоне иммуноактивных пептидов.

Животные контрольной группы, в отличие от опытных, при помещении в экспериментальную среду совершают прыжки практически сразу же, в то время как на фоне пептидов тимуса в качестве первой реакции наблюдается двигательная активность и только после – прыжки, как этап решения задачи, после чего животное подныривает. Полученные данные указывают на уменьшение тревожности крыс на фоне пептидов тимуса.

Далее исследовали действие иммуноактивных пептидов на выработку УРАИ. Получены данные, свидетельствующие о том, что пептиды тимуса (тактивин и тимозин фракции 5) ускоряют процесс формирования реакции избегания по сравнению с

контрольной группой в каждый из дней обучения. Эти данные подобны полученным ранее на ноотропных препаратах при внутрибрюшинном введении [17, 22].

Из наблюдений за поведением крыс в тесте УРАИ удалось выявить, что животные, которым вводили тактивин и тимозин фракции 5, предпочитали находиться либо возле отверстия, разделяющего отсеки, либо в центре камеры, когда не действовали раздражители.

Полученные результаты исследования выработки УРАИ у крыс на фоне иммуноактивных пептидов выявили оптимизирующий эффект этих веществ на память.

Более высокая двигательная активность на фоне пептидов тимуса во всех перечисленных тестах сочеталась с более быстрой выработкой УРАИ, т.е. такое поведение способствовало обучению. Особенно выраженное действие пептидов тимуса на обучение проявлялось на начальном этапе, что, видимо, связано с уменьшением чрезмерно высокого эмоционального напряжения животных, вызываемого новой обстановкой и электроболевым воздействием. Важно отметить, что эффекты пептидов тимуса при их интраназальном введении подобны эффектам при внутрибрюшинном введении [14, 18].

ВЫВОДЫ

1. Интраназальное введение пептидов тимуса тактивина и тимозина фракции 5 в дозе 5 мкг/кг снижает уровень тревожности крыс и увеличивает исследовательскую активность в поведенческих тестах.

2. Показано активирующее влияние пептидов тимуса на процесс формирования условного рефлекса активного избегания у крыс, которое более выражено проявляется на начальных этапах формирования памятного следа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakajima A., Tang Y.P. Genetic approaches to the molecular/neuronal mechanisms underlying learning and memory in the mouse // J. Pharmacol. Sci. – 2005. – V. 99, № 1. – P. 1-5.
2. Izquierdo I., Bevilaqua L.R., Rossato J.I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation // Trends Neurosci. – 2006. – V. 29, № 9. – P. 496-505.
3. Marshuetz C., Smith E.E. Working memory for order information: multiple cognitive and neural mechanisms // Neuroscience. – 2006. – V. 139, № 1. – P. 195-200.

4. Gard P.R., Naylor C., Ali S., Partington C. Blockade of pro-cognitive effects of angiotensin IV and physostigmine in mice by oxytocin antagonism. // Eur. J. Pharmacol. – 2012. – V. 15, № 683(1-3). – P. 155-160.
5. Ковалев Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г. Действие пирацетама на поведение и рецепторы мозга мышей C57BL/6 и BALB/c-ноотропный и анксиолитический эффекты // Эксп. и клин. фарм. – 2013. – Т. 76, №. 9. – С. 3-10.
6. Белозерцев Ф. Ю., Козловский И.И., Семенова Т.П., Козловская М.М. Влияние нейропептида селанка на выработку адаптивного навыка пространственной зрительной ориентировки у крыс с нарушением мнестических функций // Психофармакол. и биол. нарколог. – 2009. – Т. 9, № 3-4. – С. 2591-2597.
7. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии 2-е изд. М.: Изд-во Медицина, 2008. – 512 с.
8. Киселева Н.М., Новоселецкая А.В., Зимина И.В. и др. [Влияние тактивина на функциональное нарушение реакции избегания у крыс](#) // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2009. – Т. 147, № 1. – С. 75-77.
9. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М.: Изд-во Медицина – Здоровье, 2015. – 328 с.
10. Коляскина Г.И., Секирина Т.П., Андросова Л.В. и др. Особенности иммунной системы при нормальном старении и при болезни Альцгеймера // Вестник Росс. Акад. Мед. Наук. – 1996. – № 4. – С. 19-23.
11. Шабанов П.Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры // Психофармакол. биол. наркол. – 2008. – Т. 8, № 3-4. – С. 2399-2425.
12. Лосева Е.В., Логикова Н.А., Акмаев И.Т. Роль интерферона-α в регуляции функций нервной системы // Успехи физиологич. наук. – 2008. – Т. 39, № 2. – С. 31-45.
13. [Morris D.C.](#), [Chopp M.](#), [Zhang L.](#), [Zhang Z.G.](#) Thymosin β4: a candidate for treatment of stroke? // [Ann. N.Y. Acad. Sci.](#) – 2008. – № 1194. – P. 112-117.
14. Киселева Н.М., Новоселецкая А.В., Зимина И.В. и др. Влияние тактивина на поведение и обучение крыс // Вестн. Росс. Акад. Мед. Наук. – 2010. – № 1. – С. 23-26.
15. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Изд-во Высшая школа, 1991. – С. 175-189.
16. Самотруева М.А., Теплый Д.Л., Тюренков И.Н. Экспериментальные модели поведения // Журн. естеств. науки. – 2009. – Т. 27, № 2. – С. 140-152.

17. Воронина Т.А., Островская Р.У. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Редмедиум, 2000. – С. 153-158.
18. Новоселецкая А.В., Киселева М.В., Иноземцев А.Н. и др. Мнемотропные свойства иммунокорректирующего препарата тимуса тактивина // Аллергол. и иммунол. – 2011. – Т. 12, № 3. – С. 255-257.
19. Маркова Е.В., Громыхина Н.Ю., Абрамов В.В., Козлов В.А. Иммунологические параметры у мышей с разным поведением в тесте «Открытое поле» // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 15-17.
20. Маркова Е.В., Обухова Л.А. Колосова Н.Г. Клеточный иммунный ответ крыс Wistar и OXYS и особенности их поведения в тесте «Открытое поля» // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2003. – Т. 136, № 12. – С. 667-669.
21. Бондаренко Н.А. Избирательное влияние нейролептиков на дофаминзависимое нарушение поведения крыс в тесте «Экстраполяционное избавление» // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1990. – № 11. – С. 506-509.
22. Иноземцев А.Н., Капица И.Г., Гарибова Т.Л. и др. Сопоставление влияния ноотропов и анксиолитиков на функциональные нарушения реакции избегания у крыс // Вест. Моск. ун-та. – Сер. 16: Биол. – 2004. – № 3. – С. 24-30.