

© Коллектив авторов, 2013
УДК 612.821.6

ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ «УСЛОВНО РЕФЛЕКТОРНОЕ ПАССИВНОЕ ИЗБЕГАНИЕ» ПОСЛЕ СТРЕССОРНОЙ НАГРУЗКИ НА ФОНЕ ИММУНИЗАЦИИ КОНЬЮГАТОМ ГЛУТАМАТА С БСА

А.Е. Умрюхин^{1,2}, Н.Ю. Чекмарева¹, С.В. Сотников¹, Л.А. Ветрилэ³, И.А. Захарова³

ГБОУ ВПО Минздравсоцразвития Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва (1)
ФГБУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» РАМН, г. Москва (2)
ФГБУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии» РАМН, г. Москва (3)

Исследовали поведение активных и пассивных крыс в тесте «Условно-рефлекторное пассивное избегание» на фоне иммунизации конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином. Обнаружено, что у поведенчески активных иммунизированных конъюгатом глутамата крыс латентный период перехода в темный отсек укорачивается при проведении повторного тестирования после стрессорного воздействия. Иммунизация конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином у поведенчески активных крыс меняет процессы организации поведения избегания электрокожного воздействия после стрессорной нагрузки.

Ключевые слова: *условно-рефлекторное пассивное избегание, иммунизация, глутамат, поведение, эмоциональный стресс.*

Исследования последних десятилетий показывают, что иммунные факторы вовлекаются в механизмы регуляции физиологических функций и поведения наряду с процессами нервной и гуморальной природы [6, 7]. Новые перспективные пути коррекции функций мозга и поведения открывают методы иммунизации конъюгатами биологически активных соединений с белками [2]. По данным [9] иммунизация мышей конъюгатом серотонина с бычьим сывороточным альбумином (БСА) сопровождается удлинением времени нахождения в светлом отсеке при повторном предъявлении теста «Условно-рефлекторное пассивное избегание» (УРПИ). Направленная модуляция церебральных нейрохимических механизмов поведения возможна при введении конъюгатов нейромедиаторов с белками, вызывающих повышение в крови уровня антител к нейромедиаторам [3, 4]. При действии антител к глутамату обнаружено изменение болевой чувствительности [5, 9].

Учитывая важную роль глутаматергических процессов в мозговых механизмах поведения [12] актуальным является изучение поведенческих реакций при иммунизации конъюгатом глутамата с БСА.

Известно, что уровень двигательной и исследовательской активности крыс в тесте «Открытое поле» (ОП) отражает прогностическую устойчивость животных к нарушениям, вызванным эмоциональным стрессом [8, 10]. При этом особи с высокой поведенческой активностью проявляют в условиях однотипных стрессорных воздействий признаки устойчивых к повреждающему действию стресса, а пассивные – предрасположенных особей. В связи с этим, цель данной работы – в исследовании поведения активных и пассивных крыс в тесте УРПИ на фоне иммунизации конъюгатом глутамата с БСА.

Материалы и методы

Опыты проведены на 48 крысах самцах Вистар. Эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных живот-

ных», утвержденных в ФГБУ «НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина» РАМН, которые соответствуют требованиям Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

После семисуточной адаптации к условиям вивария исследовали поведение крыс в тесте ОП. Время тестирования животных составляло 3 минуты. По значениям параметров поведения крыс в тесте ОП был рассчитан суммарный показатель активности (СПА) животных, представлявший собой сумму центральных и периферических квадратов, центральных и периферических стоек, а также исследованных объектов. По величине СПА каждая крыса была отнесена в группу активных и пассивных животных. Были отобраны 24 крысы с высокой и 24 крысы с низкой поведенческой активностью. В группу пассивных были включены крысы, СПА которых составил $76,44 \pm 2,03$; в группу активных – особи, среднее значение СПА которых равнялось $134,23 \pm 1,93$.

Активные и пассивные по поведению ОП крысы были разделены на две группы по 12 животных в каждой. Активных и пассивных крыс первой группы иммунизировали конъюгатом глутамата с БСА. Конъюгат глутамата с БСА синтезировали с использованием глутарового альдегида по методике [11]. Крыс иммунизировали конъюгатом глутамата трижды возрастающими дозами по схеме: первая иммунизация подкожно в 2-3 точки области спины конъюгатом в дозе 2 мг/кг с полным адьювантом Фрейнда в объеме 0,5 мл (0,25 мл раствора конъюгата + 0,25 мл адьюванта); вторая иммунизация через две недели после первой в дозе 5 мг/кг с неполным адьювантом Фрейнда подкожно; третья иммунизация – через одну неделю после второй иммунизации внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора. Опыты проводили через четыре недели после начала иммунизации.

По двенадцать активных и пассивных по поведению в ОП крыс составили контрольную, неиммунизированную группу. Этим животным вводили бычий сывороточный альбумин и адьювант

Фрейнда по однотипной с иммунизацией схеме и в одинаковых дозах.

Тест УРПИ представлял собой камеру, состоящую из 2-х отсеков: освещенного и затемненного с электропроводящим полом. Крыс помещали в освещенный отсек и измеряли латентный период перехода в темный отсек. После перехода в темный отсек животным предъявляли электрокожное раздражение. Второе тестирование проводили через 72 часа после первого тестирования. При втором тестировании УРПИ оценивали латентный период перехода в темный отсек. Продолжительность второго тестирования составляла 180 секунд.

За два часа до второго предъявления теста УРПИ по 6 поведенчески активных и пассивных крыс в группах иммунизированных и неиммунизированных животных подвергали часовому стрессорному воздействию. Стрессорную нагрузку моделировали фиксацией крыс на платформе за лапы с одновременным стохастическим электрокожным раздражением силой 0,25 мА, частотой 50 Гц, с продолжительностью 1 минута и интервалами от 3 до 8 минут. В группы нестрессированных перед вторым предъявлением теста УРПИ животных вошли также по 6 иммунизированных и неиммунизированных крыс с различной поведенческой активностью.

После окончания опытов крыс умерщвляли путем декапитации, при этом собирали кровь для исследования содержания в ней антител к глутамату. Уровень антител определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием считывающего устройства «Mini-Reader» (Dynateck). В качестве тест антигена использовали конъюгат глутамата на гетерологическом белковом носителе гамма глобулине лошади, синтезированном по описанной ранее методике [11].

Результаты опытов представлены в виде средних величин \pm стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft, Inc). Достоверность различий оценивали с помощью дисперсионного анализа и непараметрических критериев Манна-Уитни в

случае сравнения зависимых совокупностей или критерия Уилкоксона при сравнении независимых групп.

Результаты и их обсуждение

Как показали проведенные опыты, антитела в крови иммунизированных конъюгатом глутамата с БСА крыс были выявлены в титрах 1:512 до 1:1024. Уровень содержания антител к глутамату не различался у поведенчески активных и пассивных животных.

Результаты опытов по исследованию поведения в тесте УРПИ иммунизированных конъюгатом глутамата с БСА активных крыс представлены на рисунке 1.

Как показали проведенные опыты, латентный период перехода в темный отсек при втором предъявлении теста УРПИ достоверно удлинялся по сравнению с его длительностью при первом тестировании УРПИ у неиммунизированных активных крыс. У активных иммунизированных крыс, которых за два часа до повторного предъявления теста УРПИ подвергали часовой стрессорной нагрузке, латентный период перехода в темный отсек при втором предъявлении теста УРПИ был достоверно короче длительности перехода неиммунизированных поведенчески активных крыс при однотипном тестировании УРПИ ($p < 0,05$).

Результаты опытов по исследованию поведения в тесте УРПИ иммунизированных конъюгатом глутамата с БСА пассивных крыс представлены на рисунке 2.

Результаты проведенных опытов показали, что латентный период перехода в темный отсек при втором предъявлении теста УРПИ достоверно удлинялся у поведенчески пассивных неиммунизированных крыс при повторном предъявлении теста. У поведенчески пассивных крыс, иммунизированных конъюгатом глутамата с БСА, было также выявлено удлинение латентного периода перехода в темный отсек при повторном предъявлении теста УРПИ.

Таким образом, повышение в крови уровня антител к глутамату в результате иммунизации крыс конъюгатом глутамата с БСА сопровождается у поведенчески активных крыс укорочением латентного периода перехода в темный отсек при по-

вторном предъявлении теста УРПИ после стрессорной нагрузки.

При переходе в темный отсек из светлого крысы удовлетворяют биологическую мотивацию защиты в темном, замкнутом пространстве от аверсивных раздражителей яркого света и открытого пространства. Можно предположить, что латентный период перехода в темный отсек при первом предъявлении УРПИ отражает выраженность мотивации избегания крысами открытого пространства и яркого света – врожденного норного поведения грызунов. Также на длительность латентного периода перехода в темный отсек может влиять исследовательская мотивация животного. При предъявлении крысе электрокожного раздражения в темном отсеке у животного формируется реакция избегания темного отсека. Мы полагаем, что при проведении через 72 часа второго предъявления теста УРПИ поведение крысы строится на основе взаимодействия двух мотиваций: с одной стороны – избегания открытого пространства и яркого освещения, и с другой стороны – предвидения болевого раздражения в темном отсеке. При анализе предвидения болевого воздействия необходимо учитывать процессы сохранения и воспроизведения памятного следа об электрокожном раздражении, имевшем место в темном отсеке при первом предъявлении теста УРПИ. Также на оценку значимости электрокожного раздражения в аппарате предвидения [1] может оказать влияние величина порога болевой чувствительности у крыс. Таким образом, укорочение длительности латентного периода перехода в темный отсек при повторном предъявлении теста УРПИ может быть вызвано различными причинами: усилением избегания крысами аверсивных раздражителей в светлом отсеке камеры, нарушением формирования и воспроизведения памятного следа об электрокожном раздражении, снижением порога болевой чувствительности, ослаблением мотивации избегания электрокожного раздражения.

В наших опытах показано, что иммунизация активных крыс конъюгатом

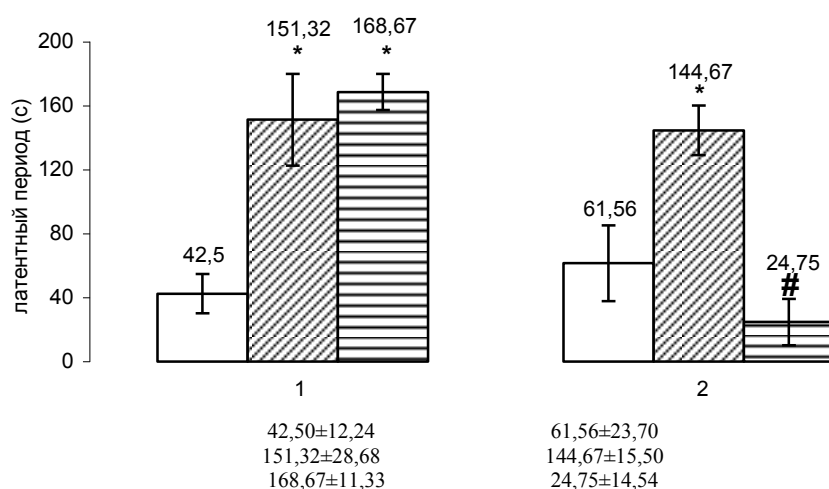


Рис. 1. Латентные периоды переходов в темный отсек в тесте УРПИ у поведенчески активных крыс, неиммунизированных (1) и иммунизированных конъюгатом ГЛУ с БСА (2). Светлые столбики – первое предъявление теста УРПИ; столбики с косой штриховкой – повторное предъявление теста УРПИ без предшествующего стрессорного воздействия; столбики с поперечной штриховкой – повторное предъявление теста УРПИ после стрессорного воздействия.

* – $p < 0,05$ по сравнению с латентным периодом перехода при первом предъявлении теста УРПИ;

– $p < 0,05$ по сравнению с латентным периодом перехода при повторном предъявлении теста УРПИ после стрессорного воздействия у поведенчески активных неиммунизированных животных.

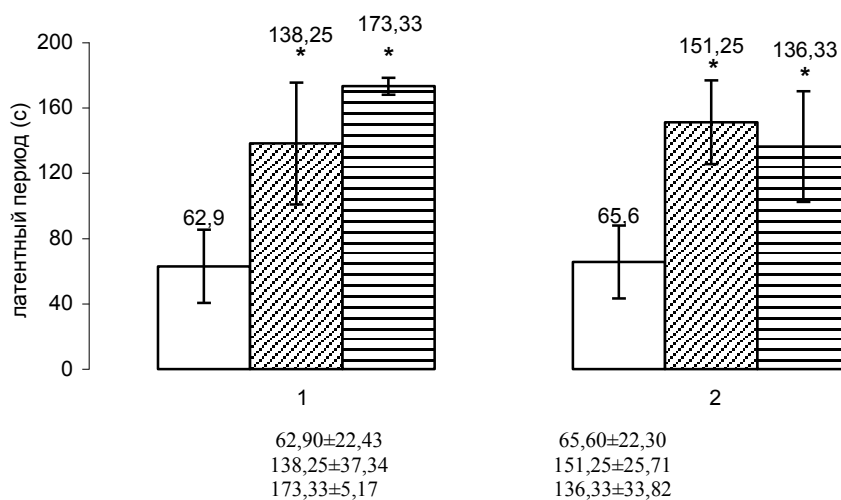


Рис. 2. Латентные периоды переходов в темный отсек в тесте УРПИ у поведенчески пассивных крыс, неиммунизированных (1) и иммунизированных конъюгатом ГЛУ с БСА (2). Светлые столбики – первое предъявление теста УРПИ; столбики с косой штриховкой – повторное предъявление теста УРПИ без предшествующего стрессорного воздействия; столбики с поперечной штриховкой – повторное предъявление теста УРПИ после стрессорного воздействия.

* – $p < 0,05$ по сравнению с латентным периодом перехода при первом предъявлении теста УРПИ.

глутамата с БСА сопровождается укорочением латентного периода перехода в темный отсек при повторном предъявлении теста УРПИ после стрессорной нагрузки. Как уже отмечено, в основе укорочения латентного периода при этом могут лежать различные причины. Их уточнение и изучение представляет предмет дальнейших исследований. Однако на основе полученных данных можно заключить, что иммунизация конъюгатом глутамата с БСА сопровождается у поведенчески активных крыс изменением процессов организации поведения избегания электрокожного воздействия после стрессорной нагрузки.

Выводы

Проведенные исследования показали, что иммунизация конъюгатом глутамата с БСА, приводящая к возрастанию уровня антител к глутамату в крови, сопровождается у поведенчески активных крыс снижением избегания электрокожного воздействия в тесте УРПИ после стрессорной нагрузки. Это может отражать изменение процессов организации поведения избегания электрокожного воздействия после стрессорной нагрузки на фоне иммунизации конъюгатом глутамата с БСА.

Литература

1. Анохин П.К. Опережающее отражение действительности / П.К. Анохин // Вопросы философии. – 1962. – №7. – С. 97-110.
2. Данилова Р.А. Инверсная иммунорегуляция поведения и проблема существования регуляторных аутоантител / Р.А. Данилова, И.П. Ашмарин // Успехи физиол. наук. – 1994. – Т. 25, №1. – С. 3-22.
3. Динамика содержания дофамина и норадреналина в дорзальном гиппокампе у крыс при их иммунизации конъюгатом дофамина / А.Е. Умрюхин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, №4. – С. 374-377.
4. Евсеев В.А. Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии / В.А. Евсеев; Рос. акад. мед. наук. – М.: РАМН, 2007. – 144 с.
5. Игонькина С.И. Влияние антител к тормозным и возбуждающим нейромедиаторам на развитие нейрогенной боли / С.И. Игонькина, М.Л. Кукушкин, Л.А. Верилэ // Патогенез. – 2006. – № 1. – С. 52-53.
6. Иммунные звенья системной организации поведения / К.В. Судаков [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2011. – Т. 42, №3. – С. 81-96.
7. Иммунофизиология / В.А. Черешнев [и др.]; под ред. Ю.С. Оводова. – Екатеринбург: УрО РАН., 2002. – 259 с.
8. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу / Е.В. Коплик // Вестник новых медицинских технологий. – 2002. – №1. – С. 16-18.
9. Сравнительный анализ эффектов системного и внутрижелудочкового введения антител к серотонину на поведенческие реакции и ноцицептивную чувствительность животных / В.А. Евсеев [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности. – 1996. – Т. 46, №1. – С. 129-135.
10. Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу / К.В. Судаков. – М.: Горизонт, 1998. – 267 с.
11. Antibodies against gamma-aminobutyric acid: specificity studies and immunocytochemical results / P. Seguela [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1984. – Vol. 81, №6. – P. 3888-3892.
12. Vizi E.S. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions / E.S. Vizi, J.P. Kiss // Hippocampus. – 1998. – № 8. – P. 566-607.

**PASSIVE AVOIDANCE BEHAVIOR AFTER STRESS EXPOSURE
OF RATS IMMUNIZED BY GLUTAMATE-BSA CONJUGATE**

A.E. Umryukhin, N.Yu. Chekmareva, S.V. Sotnikov, L.A. Vetrile, I.A. Zaharova

Behavior of rats in passive avoidance task was studied after their immunization by glutamate-BSA conjugate. Active rats immunized by conjugate displayed decreased avoidance of aversive stimuli when tested after stress exposure. It may be concluded that immunization by glutamate conjugate is accompanied in active rats by reorganization of avoidance behavior after stress.

Key words: *passive avoidance behavior, immunization, glutamate, emotional stress.*

Умрюхин Алексей Евгеньевич – к.м.н., научный сотрудник ФГБУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина» РАМН.
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

доцент кафедры нормальной физиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.
125009, г. Москва, ул. Моховая, д. 11, строение 4.
Тел.: +7(495)692-20-74.
E-mail: alum1@yandex.ru.

Ветрилэ Лючия Александровна – канд. мед. наук, ст. научный сотрудник ФГБУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии».
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

Захарова Ирина Александровна – канд. биол. наук, ст. научный сотрудник ФГБУ «НИИ общей патологии и патологической физиологии».
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.
E-mail: izaharova_zia@mail.ru.

*Исследования проведены при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований,
грант № 13-04-01908*