

**ЛОГИНОВА Надежда Александровна**

**ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
ИНТЕРФЕРОНА-АЛЬФА И ПИЯВИТА  
НА УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНУЮ ПАМЯТЬ  
И НЕЙРОНО-ГЛИАЛЬНЫЕ СООТНОШЕНИЯ  
В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС**

**03.03.01. – физиология**

**03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2010

Работа выполнена на кафедре высшей нервной деятельности Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (заведующий кафедрой – доктор биологических наук, профессор В.В. Шульговский) и в Учреждении Российской академии наук Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (директор института – доктор биологических наук, профессор П.М. Балабан).

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор  
**Нина Александровна Тушмалова**

кандидат биологических наук  
**Наталья Викторовна Пасикова**

**Официальные оппоненты:** кандидат биологических наук  
**Андрей Александрович Мартьянов**

доктор биологических наук  
**Мария Анатольевна Александрова**

**Ведущее учреждение:** Учреждение Российской академии наук  
Институт теоретической и  
экспериментальной биофизики РАН

Защита состоится 15 марта 2010 года в 15 часов 30 минут на заседании Диссертационного совета Д 501.001.93 при Биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские Горы, дом 1, строение 12, Биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан \_\_\_ февраля 2010 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

доктор биологических наук

Б.А. Умарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Известно, что многие психические заболевания часто сопровождаются когнитивными расстройствами, для коррекции которых используются ноотропы (Воронина, Островская, 2005; Харкевич, 2006; Nicholson, 1990; Ruther et al., 1994; Dormehl et al., 1999). В течение ряда лет на кафедре высшей нервной деятельности в лаборатории эволюции механизмов памяти МГУ им. М.В.Ломоносова проводятся исследования по выявлению мнемотропных свойств биологически активных соединений природного происхождения (Прагина и др., 1990; Тушмалова и др., 1999; 2002). Особенность этих исследований состоит в интеграции двух фундаментальных принципов: эволюционно-физиологического и молекулярно-биологического. Эти подходы позволили продемонстрировать однонаправленность внутриклеточных изменений, отражающих формирование памяти у животных независимо от уровня организации нервной системы (Тушмалова, Маракуева, 1986) и сформулировать концепцию эволюционно-молекулярных основ памяти. Использование эволюционно-молекулярной индикации мнемотропных свойств биологически активных соединений выявило новые спектры действия дерината, полидана, пиявита (Тушмалова, Прагина, 2002). Феномен метилирования как один из важных механизмов экспрессии генов участвует в процессах памяти (Гуськова и др., 1977; Ашапкин и др., 1983; Ванюшин, 2005; Miller, Sweatt, 2007). Ранее было показано, что Пиявит<sup>®</sup> улучшает выработку и воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания (Тушмалова и др., 2001), а также вызывает метилирование ДНК (Никонов и др., 1990). Интерферон-альфа также влияет на метилирование ДНК (Abramovich et al., 1997; Sun et al., 2000; Hafner et al., 2001) и известен как препарат, в высоких дозах обладающий противоопухолевыми и антивирусными свойствами (Balmer, 1985; Dafny, Jang, 2005), а в низких дозах способный ускорять обучение у животных (Журавлев и др., 1997; Mayr et al., 1999). Если биологические эффекты интерферона-альфа детально изучены (Thomas et al., 2003; Uddin, Plataniias, 2004), то влияние интерферона-альфа на когнитивные функции только изучается (Журавлев и др., 1997; Licinio et al., 1997; Schaefer, 2002; Dafny, Yang, 2005), так же как и влияние Пиявита<sup>®</sup> (Тушмалова и др., 2001; Баскова, Исаханян, 2004).

Чтобы оценить действие препаратов на функции нервной системы наиболее оптимальным является комплексный подход к исследованию структурных и функциональных перестроек в организме.

В процессах формирования памяти ведущая роль принадлежит гиппокампу и коре больших полушарий головного мозга (Тушмалова, 1962; Гамбарян, Коваль, 1974; Виноградова, 1975; Бериташвили, 1976; Cavallaro et al.,

2001; Hatsopoulos et al., 2007). Изменение нейроно-глиальных соотношений, состояние триады «нейрон-глия-сосуд» рассматриваются как отражение функциональной активности различных структур в головном мозгу (Гейнисман, 1974; Ройтбак, 1993; Мац, 1994; Hirase, Takata, 2007; Banachlocha, 2007; Gibbs et al., 2008; Salmina, 2009), плотность капилляров свидетельствует об энергетическом обеспечении нервной ткани (Бродский, 1966; Vanzetta, Grinvald, 2008). Ранее были исследованы структурно-функциональные изменения в коре и гиппокампе крыс под влиянием ДНК-содержащего препарата «Полидан» (Каптарь, 2007; Курская, 2007). Однако нейроно-глиальный комплекс детально исследован не был. Наша работа служит логическим продолжением этих исследований. Таким образом, все вышеизложенное определило цель и задачи настоящей работы.

### **Цель и основные задачи исследования.**

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния биологически активных соединений интерферона-альфа и Пиявита<sup>®</sup> на формирование памятного следа на моделях пищевого и оборонительного условных рефлексов и анализе изменения нейроно-глиальных соотношений в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа крыс. При этом ставились следующие задачи:

1. Исследовать динамику выработки условного рефлекса активного избегания у крыс при хроническом введении крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг и препарата Пиявит<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг.
2. Исследовать динамику выработки пищевого условного рефлекса на тон и следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени при введении крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг и препарата Пиявит<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг.
3. Исследовать динамику восстановления реакции избегания у крыс на фоне введения препарата Пиявит<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг после проведения обратимых функциональных нарушений памяти.
4. Провести морфометрический анализ нервных и глиальных клеток в V слое моторной коры и поле СА3 гиппокампа крыс на фоне введения крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг и препарата Пиявит<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг.
5. Провести количественный анализ кровеносных сосудов в моторной коре и гиппокампе на фоне введения крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг и препарата Пиявит<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг.

### **Научная новизна и практическая значимость.**

Работа посвящена исследованию изменения нейроно-глиальных соотношений в мозге при выработке оборонительных и пищевых рефлексов на фоне хронического введения крысиного интерферона-альфа и препарата Пиявит<sup>®</sup>.

Впервые на модели экспериментального нарушения памяти показано, что препарат Пиявит<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг улучшает воспроизведение реакции у животных в измененных условиях опыта.

Впервые показано, что хроническое введение Пиявита<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг приводят к активации синтетических процессов в нейронах, о чем свидетельствует увеличение плотности капилляров и числа глиальных клеток.

Впервые показано, что хроническое введение интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг ускоряет выработку пищевого и оборонительного условных рефлексов и сопровождается увеличением числа сателлитной и свободной глии.

Таким образом, вещества, механизм действия которых различен, вызывает сходное действие на процессы обучения, и приводят к изменениям в комплексе «нейрон-глия-капилляр» в нервной ткани головного мозга.

Методические подходы, использованные в данной работе, могут найти применение на этапах доклинических исследований потенциальных лекарственных препаратов с целью уточнения спектра действия и анализа механизмов их активности. Результаты данной работы могут быть использованы в медицинской практике для коррекции нарушений памяти. Материалы диссертации могут быть использованы в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофармакологии.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Интерферон-альфа оптимизирует формирование памяти на моделях оборонительного и пищевого условных рефлексов.
2. Препарат Пиявит<sup>®</sup> оказывает разнонаправленное действие на выработку пищевых и оборонительных условных рефлексов, вызывая наибольший эффект при функциональном нарушении выработанной реакции.
3. Интерферон-альфа и препарат Пиявит<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг вызывают активацию синтетических процессов в нейронах V слоя моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа, о чем можно судить по увеличению количества сателлитной и свободной глии.
4. Препарат Пиявит<sup>®</sup> обладает антигипоксическими свойствами, что проявляется в увеличении плотности капилляров в моторной коре и гиппокампе при его хроническом введении.

### **Апробация работы**

Материалы диссертационной работы были доложены на XV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008» (Москва, Россия, 2008); XVI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009» (Москва, Россия, 2009); XII всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, Россия, 2009).

Диссертация апробирована на заседании Кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова 24 декабря 2009 г.

### **Публикации**

По теме диссертации было опубликовано 7 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав собственных результатов, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на \_\_\_ страницах машинописного текста и содержит \_\_\_ рисунка и \_\_\_ таблицы. Список литературы включает \_\_\_ литературные ссылки, из них \_\_\_ на английском языке.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Объект исследования** Работа выполнена на 95 крысах самцах линии Вистар массой 200-220г. (питомник «Столбовая»). Крыс содержали в виварии в стандартных условиях. Все эксперименты проводили согласно «Правилам работы с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.84 г. №724).

### **Схема эксперимента**

**Серия I. Исследование влияния крысиного интерферона-альфа на обучение крыс условному рефлексу активного избегания.** В этой серии использовались следующие группы животных:

1. контроль 1 – интраназальное хроническое введение дистиллированной воды (n=8);
2. контроль 2 – интраназальное хроническое введение 0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина – растворителя крысиного интерферона-альфа (n=8);

3. крысиный интерферон-альфа – интраназальное хроническое введение крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг (n=9).

20-е сутки введения препаратов – 1-й опыт по выработке условного рефлекса активного избегания.

24-е сутки введения препаратов – 2-й опыт по выработке условного рефлекса активного избегания.

35-е сутки введения препаратов – забор материала для гистологических исследований.

**Серия II. Исследование влияния Пиявита<sup>®</sup> на обучение крыс условному рефлексу активного избегания.** Серия проводилась в 2 этапа, на каждом из которых использовались следующие группы животных:

**А)** 1. физраствор – внутрибрюшинное (i.p.) хроническое введение 0,5мл физиологического раствора (0,9% NaCl) (n=10);

2. мексидол, 30мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл мексидола в дозе 30мг/кг (n=10). Мексидол – препарат, обладающий антигипоксическими и ноотропными свойствами (Воронина и др., 1994), служил препаратом сравнения для Пиявита<sup>®</sup>;

3. Пиявит, 100мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг (n=10).

**Б)** 1. физраствор – i.p. хроническое введение 0,5мл 0,9% NaCl (n=5);

2. Пиявит, 10мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг (n=5).

В течение пяти дней до начала экспериментов крысам вводили препараты.

5-е сутки введения препаратов – начало выработки условного рефлекса активного избегания.

5-е – 10-е сутки введения препаратов – выработка условного рефлекса активного избегания до критерия обученности 80%.

**Серия III. Исследование влияния крысиного интерферона-альфа на обучение крыс пищевому условному рефлексу на тон и следовому пищевому условному рефлексу на отсчет интервалов времени.** В этой серии использовались следующие группы животных:

1. контроль 1 – интраназальное хроническое введение дистиллированной воды (n=8);

2. контроль 2 – интраназальное хроническое введение 0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина – растворителя крысиного интерферона-альфа – (n=8);

3. крысиный интерферон-альфа – интраназальное хроническое введение крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг (n=9).

10-е – 14-е сутки введения препаратов – выработка пищевого условного рефлекса на тон.

15-е сутки введения препаратов – выработка следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени.

35-е сутки введения препаратов – забор материала для гистологических исследований.

**Серия IV. Исследование влияния Пиявита<sup>®</sup> на обучение крыс пищевому условному рефлексу на тон и следовому пищевому условному рефлексу на отсчет интервалов времени.** В серии использовались следующие группы животных:

1. физраствор – i.p. хроническое введение 0,5мл 0,9% NaCl (n=10);

2. Пиявит, 10мг/кг - i.p. хроническое введение 0,5мл Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг (n=10);

3. Пиявит, 100мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг (n=10).

10-е – 14-е сутки введения препаратов – выработка пищевого условного рефлекса на тон.

15-е сутки введения препаратов – выработка следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени.

17-е сутки введения препаратов – забор материала для гистологических исследований.

**Серия V. Исследование корректирующего влияния Пиявита<sup>®</sup> при функциональном нарушении памяти.** В этой серии использовались следующие группы животных:

1. физраствор – i.p. хроническое введение 0,5мл 0,9% NaCl (n=10);

2. мексидол, 30мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл мексидола в дозе 30мг/кг (n=10);

3. Пиявит, 10мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг (n=5);

4. Пиявит, 100мг/кг – i.p. хроническое введение 0,5мл Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг (n=10).

В течение 5-ти дней до начала выработки условного рефлекса активного избегания крысам вводили препараты. После достижения животными критерия обученности 80% проводили функциональное нарушение условного рефлекса активного избегания – пространственную переделку.

**Серия VI. Исследование влияния крысиного интерферона-альфа и Пиявита<sup>®</sup> на морфометрические изменения в V слое моторного неокортекса и поле СА3 дорзального гиппокампа у обученных животных.**

В этой серии использовались следующие группы животных:

1. контроль 1 – животные, которым ежедневно интраназально вводили дистиллированную воду (n=4);
2. контроль 2 – животные, которым ежедневно интраназально вводили 0,1% бычий сывороточный альбумин, обучившиеся на различных моделях памяти (n=4);
3. крысиный интерферон-альфа - животные, которым ежедневно интраназально вводили крысиный интерферон-альфа в дозе 1800МЕ/кг, обучившиеся на различных моделях памяти (n=4);
4. физраствор – i.p. хроническое введение 0,9% NaCl (n=22);
5. Пиявит, 10мг/кг – i.p. хроническое введение Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг (n=6);
6. Пиявит, 100мг/кг – i.p. хроническое введение Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг (n=19).

В эксперименте использованы следующие формы препаратов: Пиявит<sup>®</sup> (ООО Научно-внедренческая фирма «Гируд И.Н.» г. Балаково, Саратовская область, регистрационный №000363/022001); мексидол (Р №002161/01); физиологический раствор (ОАО «Биохимик», регистрационный №002134/01-2003); бычий сывороточный альбумин (Sigma, USA); крысиный интерферон-альфа (PBL Biomedical Laboratories, USA).

**Условный рефлекс активного избегания.** Для анализа влияния крысиного интерферона-альфа на выработку у крыс условного рефлекса активного избегания использовали следующую схему эксперимента: выработку рефлекса проводили в течение двух сеансов по 60 предъявлений в каждом с интервалом между опытами 3 суток. Для выработки рефлекса использовалась челночная камера (ДхШхВ=37х20х22см) с электрифицированным полом и дверцей между отсеками 7х8 см. Использовали источник тока с фиксированным сопротивлением. Частота действия тока (безусловный раздражитель) составляла 1 Гц, длительность 10 секунд, продолжительность единичного удара током 0,5 секунд. В качестве условного стимула использовали тон (400 Гц). Обучение продолжалось, пока животное не достигало критерия 10 подряд реакций избегания (тогда рефлекс считался выработанным) или 10 следующих подряд невыполненных реакций (тогда рефлекс считался невыработанным). Способность и скорость выработки рефлекса оценивали по 10-ти балльной шкале (Лосева, Алексеева, 2006), разработанной в лаборатории функциональной нейробиологии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН:

1 балл – животное не избавлялось и не избегало удара током с первых предъявлений; 2 балла – к 30-му предъявлению животное переставало избавляться и избегать удара током; 3 балла – в течение всего эксперимента (60 предъявлений) животное избавлялось от удара током к концу действия безусловного раздражителя; 4 балла – в течение всего эксперимента (60 предъявлений) животное избавлялось от удара током в начале действия безусловного раздражителя; 5 баллов – в течение 60 предъявлений животное 3-4 раза подряд избегало удара током; 6 баллов – в течение 60 предъявлений животное 5-9 раз подряд избегало удара током; 7 баллов – медленная выработка: серия из 10 избеганий удара током подряд появлялась к 55-му предъявлению; 8 баллов – средняя выработка: серия из 10 избеганий удара током подряд появлялась к 40-55-му предъявлению; 9 баллов – быстрая выработка: серия из 10 избеганий удара током подряд появлялась к 25-40-му предъявлению; 10 баллов – сверхбыстрая выработка: серия из 10 избеганий удара током подряд появлялась до 25-го предъявления.

Для анализа влияния препарата Пиявит® на выработку у крыс условного рефлекса активного избегания использовали следующую схему: у животных в течение 5-7 дней (по 20-25 предъявлений в опыте) вырабатывали УРАИ (Буреш и др., 1991) в челночной камере, оборудованной перегородкой с двумя дверцами. Условным раздражителем служил звук (длительность до действия безусловного раздражителя 10с), безусловным – электрический ток (сила тока 0,4 – 1мА. Продолжительность действия тока в комплексе с условным раздражителем 10с). Переход животных через отверстие, расположенное в дистальной части перегородки в другую половину камеры выключал оба раздражителя. Межсигнальный период составлял 25-30 с. В процессе выработки реакции регистрировали количество реакций избегания и количество межсигнальных реакций. Подача стимулов осуществлялась автоматически с использованием программы LabVIEW™ 5.0. Для отражения глубины консолидации памятного следа был введен коэффициент, который позволяет продемонстрировать, сколько секунд осталось до действия безусловного стимула (Новоселецкая, Тушмалова, Воеводина, 2008):

$$\eta_{ni} = (1/m) \sum_{j=1}^{j=m} (10 - tn_{ij})$$

,где

$n_i$  – эксперимент в  $n$ -й день;  $tn_{ij}$  – время (в секундах) от начала подачи условного стимула (звукового сигнала) до перехода крысы в другую часть камеры или до конца действия безусловного стимула (тока),  $j$  – номер предъявления условного стимула (звука),  $m$  – количество предъявлений в опыте.

После достижения животным критерия обученности (более 80% реакций избегания от числа предъявлений) осуществляли функциональное нарушение выработанной реакции.

**Функциональное нарушение памяти, вызванное пространственной переделкой.** По окончании опыта по выработке условного рефлекса активного избегания отверстие, через которое животное переходило в другую половину камеры при обучении, закрывали и открывали в противоположной стороне перегородки (Иноземцев, Прагина, 1992). В течение 20 предъявлений тестировали воспроизведение реакции в новых условиях. Регистрировали количество реакций избегания, количество межсигнальных реакций и количество подходов к закрытому отверстию. Анализировали динамику восстановления реакций избегания. Данная модификация условного рефлекса активного избегания рекомендована авторами для тестирования ноотропной активности препаратов (Иноземцев и др., 2004).

**Пищевой условный рефлекс на тон.** У животных вырабатывали пищевой условный рефлекс на тон (400 Гц) и временной интервал по методике, разработанной Т.А.Меринг (1988). За 8 часов до каждого опытного сеанса у крыс отставляли пищу. В течение 5 дней вырабатывали пищевой условный рефлекс на тон (по 15 сочетаний в опыте). Для выработки рефлекса использовали камеру (33x45x34 см.) с отверстием (6x3 см.) в стенке (33x34 см.) на высоте 2 см от пола. У этой стенки с внутренней стороны помещали платформу (12x8x5 см.), становясь на которую, крыса могла получать пищу через отверстие. Тон предъявляли в строгом временном стереотипе с интервалом в 60 с. Во время действия тона (не более 15с) крыса должна была подняться на платформу и взять подкрепление через отверстие в стенке камеры. В этом случае решение задачи считали верным. Для анализа были выбраны следующие параметры: число верных решений (в процентах от числа сочетаний за один опытный сеанс) и число межсигнальных реакций.

**Следовой пищевой условный рефлекс на отсчет интервалов времени.** После применения тона 75 раз (по 15 предъявлений в течение 5 дней) его отменяли и в течение одного опытного сеанса на 6-й день проверяли возможность выработки следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени. Ответ считался правильным, если крыса поднималась на платформу через  $60 \pm 10$  с после предыдущего взятия пищи, и при этом совершало не более двух межсигнальных побежек. Всего за сеанс крысе предъявляли 10 раз указанный временной интервал. Оценивали число правильных ответов (в процентах от числа предъявлений) и число межсигнальных побежек.

### **Морфометрические исследования нейроно-глиальных соотношений и капилляров в V слое моторной коры и поля СА3 дорзального гиппокампа.**

Мозг фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН=7.2-7.4) и замораживали в парах жидкого азота. Серийные фронтальные срезы толщиной 18мкм изготавливали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  при помощи криостата Zeiss (Германия). Каждый пятый срез на уровне первичной моторной коры и дорзального гиппокампа монтировали на предметные стекла, покрытые 0,1% раствором желатина. Срезы окрашивали тионином и крезил-виолетом по методу Ниссля, обезвоживали в спиртах в возрастающей концентрации, осветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам под покровное стекло. Срезы исследовали в световом микроскопе Zeiss (Германия). Для получения микрофотографий срезов использовали цифровую камеру Sony и программу KS-300. Подсчет количества числа нейронов и глиальных клеток (сателлитной и свободной глии) производили при увеличении 640 раз на площади среза  $0,0144\text{мм}^2$ , а количества профилей капилляров – при увеличении 320 раз на площади среза  $0,016\text{мм}^2$ .

**Статистический анализ.** Статистическое сравнение исследуемых групп животных в поведенческих экспериментах проводили по однофакторному дисперсионному анализу ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса, а данные морфологических исследований сравнивали по двухфакторному дисперсионному анализу ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса. Корреляцию данных поведенческих и морфометрических исследований проводили с помощью корреляционного анализа Спирмена.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

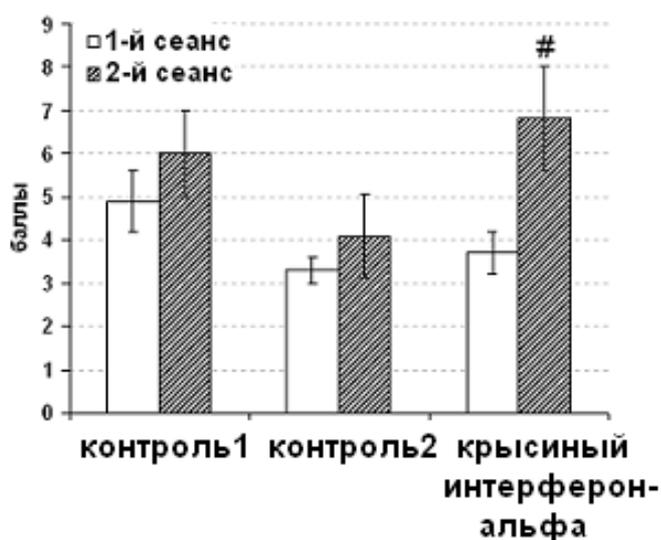
Изучали действие крысиного интерферона-альфа и Пиявита<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг на формирование памяти у крыс на моделях условного рефлекса активного избегания и пищевого условного рефлекса на тон и следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени.

**Влияние крысиного интерферона-альфа на выработку условного рефлекса активного избегания избегания.** Выработку рефлекса проводили в течение 2-х сеансов с интервалом 3 суток. Способность к выработке условного рефлекса активного избегания оценивали в баллах.

В 1-м сеансе у животных из подопытной группы на фоне введения крысиного интерферона-альфа способность к выработке условного рефлекса активного избегания была ниже, чем в контрольной группе на фоне введения

дистиллированной воды и такой же, как в контрольной группе на фоне введения бычьего сывороточного альбумина (рис. 1). Во 2-м сеансе у животных на фоне введения крысиного интерферона-альфа способность к обучению была выше, чем в контрольных группах. Во 2-м сеансе у животных из всех исследуемых групп способность к обучению выше, чем в 1-м сеансе. Так, на фоне введения интерферона-альфа скорость обучения во 2-м сеансе ( $6,8 \pm 1,2$  баллов) выше, чем в 1-м сеансе ( $3,7 \pm 0,5$  баллов) ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, крысиный интерферон-альфа оптимизирует формирование памяти при выработке условного рефлекса активного избегания.

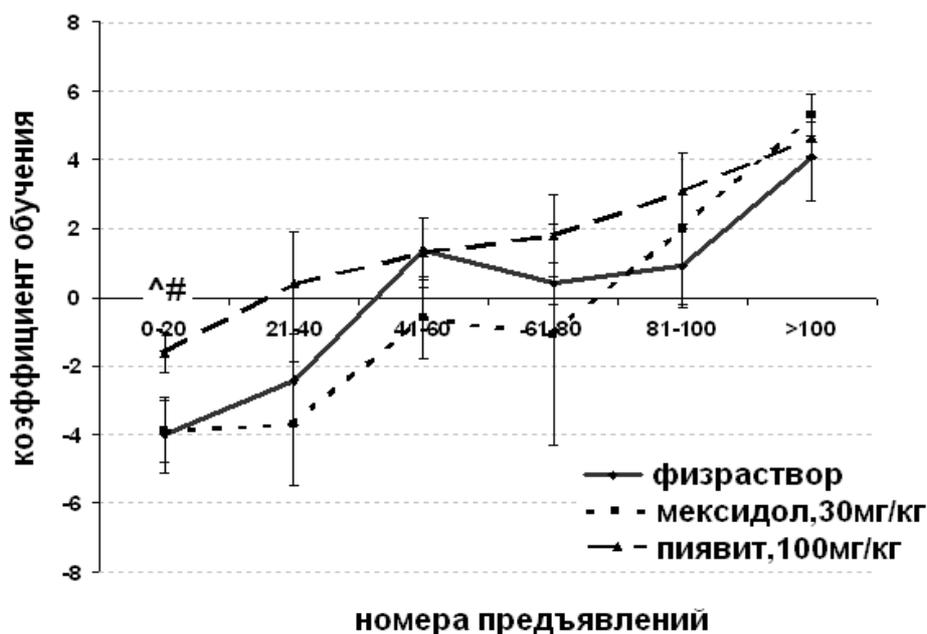


**Рис. 1. Выработка условного рефлекса активного избегания в двух сеансах (интервал 3 дня) у крыс в контроле и на фоне введения крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг.**

По оси абсцисс – группы крыс, по оси ординат – величина баллов;  
# -  $p < 0,05$  – по сравнению с 1-м сеансом, критерий Вилкоксона для зависимых признаков.

**Влияние Пиявита® на выработку условного рефлекса активного избегания.** При выработке условного рефлекса активного избегания крысы, которым вводили Пиявит® в дозе 100мг/кг, обучались лучше, чем контрольные животные. Коэффициент обучения в начале выработки рефлекса в группе животных на фоне введения Пиявита® в дозе 100мг/кг выше ( $-1,6 \pm 0,6$ ), чем в контрольной группе ( $-4,0 \pm 1,1$ ) ( $p < 0,1$  – тенденция) и группе на фоне введения препарата сравнения мексидола в дозе 30мг/кг ( $-3,9 \pm 0,9$ ) ( $p < 0,1$  – тенденция) (рис. 2). Показателем консолидации памятного следа является положительное значение коэффициента обучения. Животные на фоне введения Пиявита® в дозе 100мг/кг быстрее, чем контрольные животные, обучались условному рефлексу активного избегания. Введение Пиявита® в дозе 10мг/кг не влияло на формирование памяти на модели условного рефлекса активного избегания.

Таким образом, хроническое введение Пиявита® в дозе 100мг/кг оптимизирует выработку условного рефлекса активного избегания.



**Рис. 2. Коэффициент обучения при выработке условного рефлекса активного избегания в контроле и на фоне введения Пиявита®.**

По оси абсцисс – количество предъявлений, по оси ординат – величина коэффициента обучения. ^ -  $p < 0.1$  – по сравнению с контрольной группой; # -  $p < 0.1$  – по сравнению с группой «мексидол, 30 мг/кг», однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса.

**Влияние крысиного интерферона-альфа и Пиявита® на выработку пищевого условного рефлекса на тон.** Хроническое введение крысиного интерферона-альфа улучшает формирование памяти: процент положительных реакций к 75-му предъявлению в этой группе выше ( $100,0 \pm 0,0\%$ ), чем в контроле ( $67,5 \pm 11,8\%$ ) ( $p < 0.01$ ).

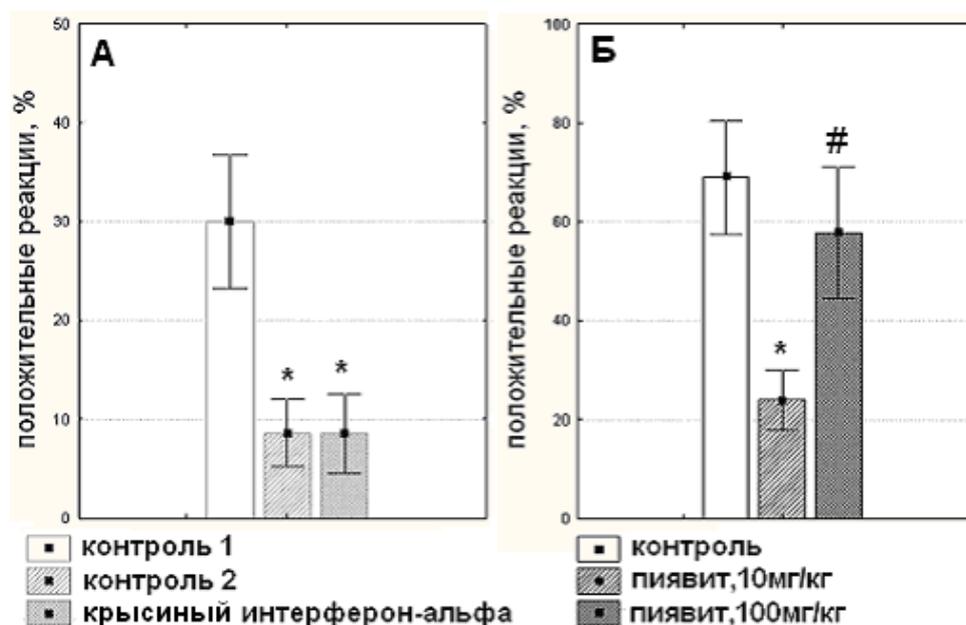
Введение Пиявита® в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг не влияет на процесс выработки пищевого условного рефлекса на тон. Так, процент положительных реакций в контрольной группе животных в конце выработки рефлекса составил  $81,3 \pm 9,3\%$ , в то время как в подопытных группах животных на фоне введения Пиявита® в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг –  $86,7 \pm 5,4\%$  и  $77,8 \pm 12,5\%$  соответственно.

Таким образом, крысиный интерферон-альфа ускоряет формирование памяти при выработке пищевого условного рефлекса на тон, а Пиявит® не влияет на процесс выработки пищевого условного рефлекса на тон.

**Влияние крысиного интерферона-альфа и Пиявита® на выработку следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени.**

Исследовали влияние крысиного интерферона-альфа (рис. 3А) и Пиявита® (рис. 3Б) на выработку следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени. У животных на фоне введения крысиного интерферона-альфа процент положительных реакций ниже, чем в контроле ( $p < 0.01$ ). У животных на фоне введения Пиявита® в дозе 10 мг/кг ухудшается способность к выработке рефлекса на время. Процент положительных реакций в этой группе

ниже, чем в контроле ( $p < 0.01$ ) и на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 3.** Количество положительных реакций при выработке следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени в контроле и на фоне введения крысиного интерферона-альфа (А) и Пиявита<sup>®</sup> (Б).

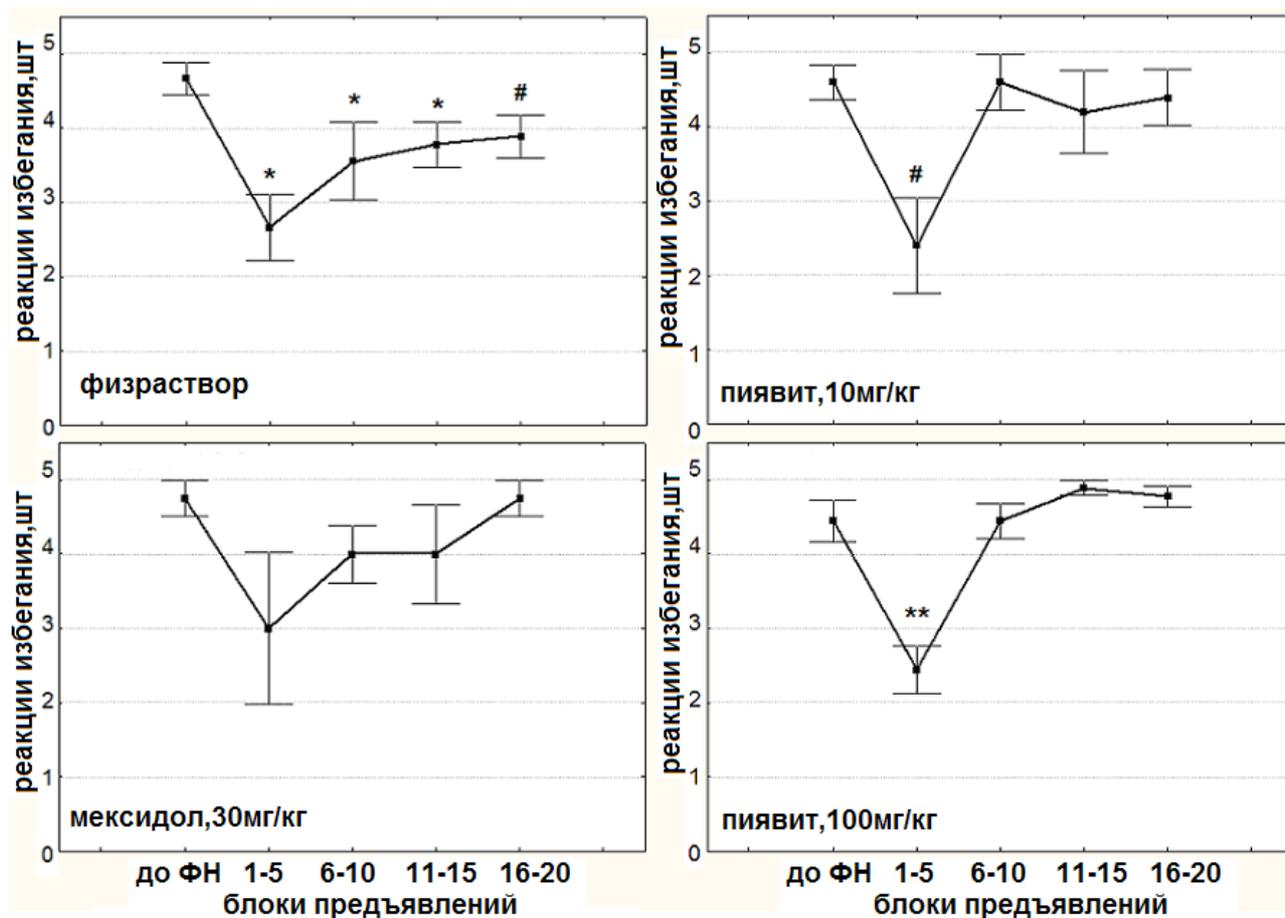
По оси абсцисс – группы; по оси ординат – процент положительных реакций

\* -  $p < 0.05$  – по сравнению с контрольной группой; # -  $p < 0.05$  – по сравнению с группой «пиявит, 10мг/кг», однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса.

Таким образом, введение крысиного интерферона-альфа и Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг снижает уровень положительных реакций при выработке следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени.

### **Влияние Пиявита<sup>®</sup> на восстановление реакции после проведения функционального нарушения памяти.**

С целью изучения влияния Пиявита<sup>®</sup> на процесс восстановления функционально нарушенной памяти у крыс после выработки условного рефлекса активного избегания проводили обратимое функциональное нарушение – пространственную переделку. После проведения пространственной переделки количество реакций избегания в контрольной группе снижается до  $2,7 \pm 0,5$  шт. после функционального нарушения ( $p < 0.05$ ) (рис. 4). Восстановления реакций избегания в контроле не произошло. В группе на фоне введения препарата сравнения мексидола восстановление реакции избегания до исходного уровня произошло к 20-му предъявлению (рис. 4). В подопытной группе животных на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг количество реакций избегания в результате пространственной переделки снизилось до  $2,4 \pm 0,7$  шт. ( $p < 0.1$  – тенденция). Но уже к 6-10-му предъявлениям достигло исходного значения: произошло полное восстановление. На фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг нарушенный навык восстановился после пространственной переделки к 6-10-му предъявлениям (рис. 4).



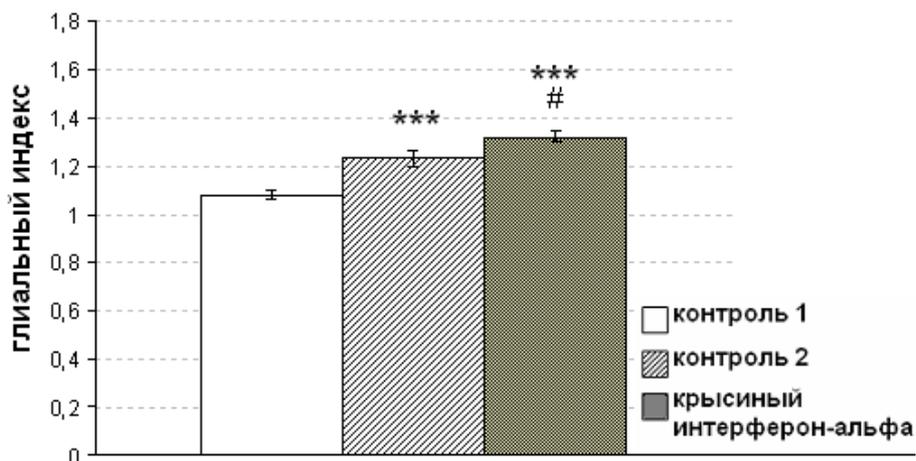
**Рис. 4.** Динамика количества реакций избегания после проведения функционального нарушения – пространственной переделки в контроле и на фоне введения Пиявита®. По оси абсцисс – номера предъявлений после проведения пространственной переделки, по оси ординат – количество реакций избегания. # -  $p < 0.1$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с количеством реакций избегания до пространственной переделки, непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых признаков.

Таким образом, Пиявит® в дозах 10мг/кг и 100мг/кг ускоряет восстановление памятного следа после пространственной переделки, так же как и мексидол, обладающий ноотропными и антигипоксическими свойствами.

**Влияние крысиного интерферона-альфа и препарата Пиявит® на нейроно-глиальные соотношения в V слое моторной коры.** На фоне хронического введения крысиного интерферона-альфа глиальный индекс увеличивался по сравнению с контрольными группами ( $p < 0.0001$ ) (рис. 5).

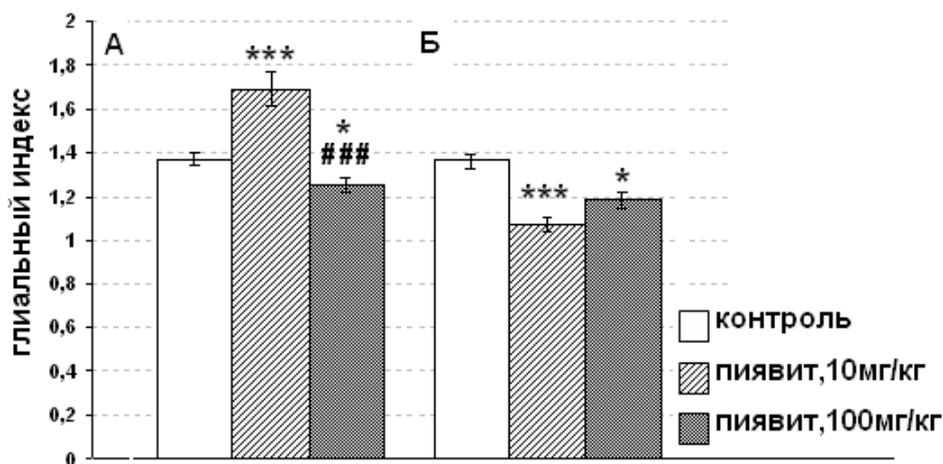
После выработки условного рефлекса активного избегания на фоне введения Пиявита® в дозе 10мг/кг величина глиального индекса выше, чем в контрольной группе ( $p < 0.0001$ ). На фоне введения Пиявита® в дозе 100мг/кг глиальный индекс ниже, чем в контроле ( $p < 0.05$ ) и на фоне введения Пиявита® в дозе 10мг/кг ( $p < 0.0001$ ) (рис. 6А).

После выработки пищевого условного рефлекса на фоне введения Пиявита® в дозах 10мг/кг и 100мг/кг величина глиального индекса у животных ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0.0001$  и  $p < 0.05$  соответственно) (рис. 6Б).



**Рис. 5.** Величина глиального индекса в V слое моторной коры в контроле и на фоне введения крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг при обучении.

\*\*\* -  $p < 0.0001$  – по сравнению с группой «контроль 1», # -  $p < 0.05$  – по сравнению с группой «контроль 2», двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса.



**Рис. 6.** Величина глиального индекса в V слое моторной коры в контроле и на фоне введения Пиявита® в дозах 10мг/кг и 100мг/кг при выработке условного рефлекса активного избегания (А) и пищевого условного рефлекса (Б).

\* -  $p < 0.05$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$  – по сравнению с контрольной группой, ### -  $p < 0.0001$  – по сравнению с группой на фоне введения Пиявита® в дозе 10мг/кг, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса.

Таким образом, в V слое моторной коры на фоне введения крысиного интерферона-альфа при обучении увеличивается глиальный индекс, а на фоне введения Пиявита® в дозе 10мг/кг после выработки условного рефлекса активного избегания глиальный индекс увеличивается, а после выработки пищевого условного рефлекса на фоне введения Пиявита® - снижается.

**Влияние крысиного интерферона-альфа и препарата Пиявит® на нейроно-глиальные соотношения в поле СА3 дорзального гиппокампа при обучении.** В поле СА3 дорзального гиппокампа хроническое введение

крысиного интерферона-альфа не влияет на нейроно-глиальные соотношения. Глиальный индекс составил в группах  $0,60 \pm 0,02$ .

После выработки условного рефлекса активного избегания на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг величина глиального индекса выше по сравнению с контролем ( $p < 0.0001$ ), а на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг – ниже, чем в контроле ( $p < 0.001$ ) и на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг ( $p < 0.0001$ ) (рис. 7А). После выработки пищевого условного рефлекса введение Пиявита<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг не влияло на величину глиального индекса (рис. 7Б).

Таким образом, введение крысиного интерферона-альфа не влияет на нейроно-глиальные соотношения в поле СА3 дорзального гиппокампа, а введение Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг вызывает увеличение глиального индекса после выработки рефлекса активного избегания (рис. 3А), но не влияет на нейроно-глиальные соотношения после выработки пищевого условного рефлекса (рис. 3Б).

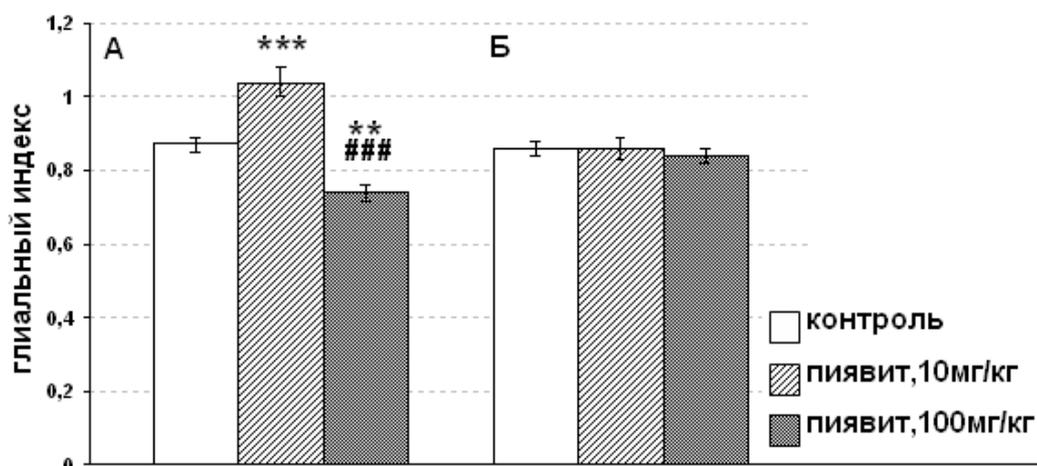


Рис. 7. Величина глиального индекса в поле СА3 дорзального гиппокампа в контроле и на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг при выработке условного рефлекса активного избегания (А) и пищевого условного рефлекса (Б).

\*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$  – по сравнению с контрольной группой, ### -  $p < 0.0001$  – по сравнению с группой животных на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса.

**Влияние крысиного интерферона-альфа и препарата Пиявит на состояние капилляров в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа при обучении.** Хроническое введение крысиного интерферона-альфа вызывает снижение плотности капилляров в V слое моторной коры ( $p < 0.0001$ ) и поле СА3 дорзального гиппокампа ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (табл. 1).

После выработки условного рефлекса активного избегания на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> плотность капилляров увеличивается в V слое моторной коры и поле СА3 гиппокампа по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ) (табл. 1).

После выработки пищевого условного рефлекса хроническое введение Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг вызывает увеличение плотности капилляров в V слое моторной коры по сравнению с контрольной группой и группой на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг ( $p < 0.001$ ) и в поле СА3 дорзального гиппокампа по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ). На фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг плотность капилляров увеличивается в поле СА3 дорзального гиппокампа ( $p < 0.05$ ) (табл. 1).

Таким образом, введение интерферона-альфа вызывает снижение плотности капилляров, а введение Пиявита<sup>®</sup> при обучении увеличивает плотность капилляров в моторной коре и гиппокампе.

**Табл. 1. Плотность капилляров ( $m \pm SEM$ ) в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа в контроле и на фоне введения крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг, и Пиявита<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг при обучении**

группы	V слой моторной коры	поле СА3 дорзального гиппокампа
контроль 1	1,8 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1
контроль 2	1,0 $\pm$ 0,1***	1,6 $\pm$ 0,1*
крысиный интерферон-альфа	1,1 $\pm$ 0,1***	1,8 $\pm$ 0,1*
условный рефлекс активного избегания		
контроль	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
пиявит, 10мг/кг	2,4 $\pm$ 0,1*	2,6 $\pm$ 0,1*
пиявит, 100мг/кг	2,5 $\pm$ 0,1*	2,4 $\pm$ 0,1*
пищевой условный рефлекс		
контроль	2,7 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1
пиявит, 10мг/кг	3,5 $\pm$ 0,1**	2,5 $\pm$ 0,1*
пиявит, 100мг/кг	2,7 $\pm$ 0,1##	2,3 $\pm$ 0,1*

\* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.001$ , \*\*\* -  $p < 0.0001$  – по сравнению с контролем, ## -  $p < 0.001$  – по сравнению с группой крыс на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением по критерию Ньюмана-Кеулса.

Таким образом, при обучении на фоне введения крысиного интерферона-альфа увеличивается глиальный индекс в V слое моторной коры на фоне общего снижения плотности капилляров в моторной коре и гиппокампе. При выработке условного рефлекса активного избегания введение Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг вызывает увеличение глиального индекса в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа, и плотность капилляров в этих структурах. Введение Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг вызывает снижение глиального индекса в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа, но плотность капилляров в этих структурах увеличивается. После выработки пищевого условного рефлекса на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в V слое моторной коры глиальный индекс снижается, а в поле СА3 дорзального гиппокампа не изменяется. Плотность капилляров при введении Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг

увеличивается в моторной коре и гиппокампе, а при введении Пиявита<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг – только в гиппокампе.

Отсутствие изменения в соотношении глиальных клеток и нейронов в гиппокампе может быть связано с тем, что гиппокамп – это структура, участвующая в процессах кратковременной памяти (Гамбарян, Коваль, 1974; Виноградова, 1975; Bliss, Lomo, 1973; Lynch, 2004; Berger, Thompson, 2006), а неокортекс обеспечивает долговременную память (Лурия, 1969; Хомская, 2005; Brons, Woody, 1980; Thompson, Kim, 1996), поэтому изменения в структуре неокортекса более выражены. Также известно, что неокортекс более чувствителен к различным воздействиям, чем гиппокамп (Шмидт и др., 1976; Гусев, Скворцова, 2001). Было показано, что секрет слюнных желез, входящий в состав Пиявита<sup>®</sup>, стимулирует синтез оксида азота в эндотелиальных клетках капилляров, и поэтому предположительно может влиять на ангиогенез (Баскова и др., 2009), а интерферон-альфа, обладая противоопухолевым действием, его ингибирует (Dinney et al., 1998).

### **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Данная работа выполнена в рамках концепции Н.А.Тушмаловой об эволюционно-молекулярных основах памяти и посвящена исследованию влияния биологически активных соединений природного происхождения на регуляцию формирования памяти (Тушмалова, Прагина, 2002; Прагина и др., 2003). Препарат Пиявит<sup>®</sup> и крысиный интерферон-альфа, которые исследовали в данной работе, являются одними из таких веществ. Секрет слюнной железы, входящий в состав Пиявита<sup>®</sup> (Никонов и др., 1990), и интерферон-альфа (Abramovich et al., 1997; Sun et al., 2000; Hafner et al., 2001) вызывают изменение степени метилирования ДНК, которое является одним из механизмов регуляции экспрессии генов (Ванюшин, 1968; 1974; 2005; Bird, 2002). Ранее в лаборатории эволюции механизмов памяти было показано, что Пиявит<sup>®</sup> оптимизировал сохранность памятного следа на модели условного рефлекса пассивного избегания (Тушмалова и др., 2001). В настоящей работе исследовали влияние Пиявита<sup>®</sup> в дозах 10мг/кг и 100мг/кг, а также крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг на формирование у крыс условного рефлекса активного избегания и пищевого условного рефлекса на тон и на отсчет временных интервалов как моделей ассоциативной памяти с отрицательным и положительным подкреплением. Было показано, что Пиявит<sup>®</sup> в зависимости от дозы оказывает различное действие на формирование пищевых и оборонительных рефлексов. Использование мексидола в качестве препарата сравнения к Пиявиту<sup>®</sup>, а также вызываемое им действие на пищевое и оборонительное поведение, позволяет предположить принципиальное

сходство в механизме действия этих препаратов. В то время как для интерферона-альфа известны рецепторы, соединяясь с которыми он вызывает различные биологические эффекты (Степаничев, 2005; Hertzog et al., 1994; Thomas et al., 2003; Dafny, Jang, 2005), то Пиявит<sup>®</sup> является соединением метаболического типа действия, наряду с мексидолом (Воронина, 2003), которого относят к антигипоксантам – классу фармакологических препаратов, устраняющим последствия гипоксии (Зарубина, 2002; Galenko-Yaroshevskii et al., 2005) за счет расширения сосудов, обусловленного увеличением синтеза оксида азота в эндотелиальных клетках капилляров (Баскова и др., 2009).

По результатам наших исследований Пиявит<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг ускорял выработку рефлекса активного избегания уже на начальной стадии, а в дозе 10мг/кг улучшал воспроизведение реакции в измененных условиях опыта (пространственная переделка), которая предъявлялась животным в конце эксперимента через 8 дней. Отставленный эффект Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг может свидетельствовать о проявлении кумулятивного эффекта препарата. Накопительное действие препаратов (ноотропов, низкомолекулярных пептидов и др.) подтверждается данными литературы (Гречко, 1994; Wenger, 1980).

У подопытных животных на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> проводили функциональное нарушение условного рефлекса активного избегания. Согласно литературным данным сокращение времени восстановления нарушенной реакции после проведения пространственной переделки может свидетельствовать о ноотропных свойствах исследуемого препарата (Иноземцев и др. 2004), в данном случае Пиявита<sup>®</sup>. У крыс на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> прежний навык затормаживается очень быстро по сравнению с контрольными животными, что выражается в быстром переучивании подопытных животных и увеличении межсигнальных реакций. Можно предположить, что Пиявит<sup>®</sup> увеличивает лабильность возбуждательных и тормозных процессов. А повышение локомоторной активности, которое наблюдается при проведении пространственной переделки по сравнению с процессом выработки рефлекса, может свидетельствовать об активации возбуждательных процессов (Babbini, Davis, 1972; Donzanti, Uretsky, 1983; McCrea, 2001).

При выработке условного рефлекса активного избегания на фоне хронического введения крысиного интерферона-альфа в дозе 1800МЕ/кг было получено, что этот препарат ускоряет выработку рефлекса по сравнению с контрольными группами, что согласуется с литературными данными, согласно которым интерферон-альфа улучшает формирование оборонительных рефлексов (Журавлев и др., 1997).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что Пиявит<sup>®</sup> в дозе 100мг/кг и крысиный интерферон-альфа в дозе 1800МЕ/кг оказывают однонаправленное действие на формирование оборонительного рефлекса, ускоряя образование памятного следа.

В то же время Пиявит<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг, так же как и интерферон-альфа, угнетает формирование следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени. Ухудшение формирования памяти при выработке рефлекса на время, согласно протоколу выработки, сопряжено с увеличением числа межсигнальных реакций, что может свидетельствовать об изменении возбуждательных и тормозных процессов в ЦНС. Действительно, как было показано в исследованиях Т.А.Меринг, следовые рефлексы требуют точного временного распределения процессов торможения и возбуждения (Меринг, Мухин, 1971). Подобная ситуация возникала при разрушении гиппокампа в условиях выработанного рефлекса на время: такие животные отличались гиперактивностью с резко выраженной ориентировочной и поисково-исследовательской активностью (Меринг и др., 1972; Меринг, 1990). Это подтверждается результатами теста «открытое поле», который мы проводили в ходе нашей работы, где на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> локомоторная и исследовательская активность не изменялась при повторных тестированиях по сравнению с контролем.

При изучении действия крысиного интерферона-альфа было получено, что этот препарат улучшает формирование условного рефлекса активного избегания, но ухудшает способность животных к отсчету временных интервалов. Эти данные можно объяснить тем, что интерферон-альфа модулирует опиоидную, серотониновую, дофаминовую и глутаматную нейротрансмиссию (Клодт и др., 2008; Wichers, Maes, 2004; Scheafer et al., 2003), баланс которых играет важную роль в формировании рефлексов с положительным и отрицательным подкреплением (Ашмарин и др., 1996; Rada et al., 1998; Schwaerzel et al., 2003). Так, повышение активности серотонинергической системы стимулирует выработку рефлексов с положительным подкреплением, а повышение активности норадренергической системы – с отрицательным подкреплением. Вероятно, Пиявит<sup>®</sup> также может вовлекаться в процесс метаболизма медиаторов, поскольку препарат в своем составе содержит серотонин (Баскова и др., 2008), что представляет несомненный интерес для дальнейших исследований.

После проведения поведенческих экспериментов мозг животных брали для проведения морфометрических исследований в моторном неокортексе – структуре, являющейся ключевой для формирования двигательного стереотипа (Беритов, 1969; Прибрам, 1975; Sanes, Donoghue, 2000; Hatsopoulos et al., 2007)

и гиппокампе, который участвует в формировании памяти (Тушмалова, 1962; Гамбарян, Коваль, 1973; Бериташвили, 1974; Виноградова, 1975; Lynch, 2004; Huff et al., 2006). Исследовали плотность нервных, глиальных клеток, глиальный индекс, свидетельствующий о состоянии функциональной активности нейронов (Ройтбак, 1993, Gibbs et al., 2008). Состояние капилляров было целесообразно исследовать наряду с нейроно-глиальным комплексом. В частности, об антигипоксических свойствах препаратов можно судить по изменению плотности капилляров (Вовенко, Чуйкин, 2007).

Можно предположить, что одним из механизмов мнемотропного эффекта в действии Пиявита<sup>®</sup>, который был получен в результате проведения данного исследования, является изменение микроциркуляции в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа, что выразилось в увеличении сосудистой сети. Улучшение памяти сопровождается усилением метаболизма в нервной ткани (Воронина, Островская, 2005; Харкевич, 2006; Nicholson, 1990; Ruther et al., 1994; Dormehl et al., 1999), и в данном случае за счет увеличения плотности капилляров в структурах мозга. Увеличение глиального индекса в исследованных структурах мозга свидетельствует о повышении функциональной активности нейронов (Гейнисман, 1974; Ройтбак, 1993; Мац, 1994; Vanaclocha, 2007; Gibbs et al., 2008). Изменение нейроно-глиальных соотношений при обучении на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> носит разнонаправленный характер. Глиальный индекс увеличивается после выработки условного рефлекса активного избегания в V слое моторной коры и поле СА3 дорзального гиппокампа на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг. При выработке пищевого условного рефлекса глиальный индекс снижается на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> в V слое моторной коры, но не изменяется в поле СА3 гиппокампа. Вероятно, характер изменений в нейро-глиальном комплексе свидетельствует о различной степени участия исследованных структур мозга в выработке рефлексов (Ройтбак, 1993; Мац, 1994), а также модификации таких изменений на фоне введения Пиявита<sup>®</sup>. По всей видимости, различное действие доз Пиявита<sup>®</sup> на структурные перестройки в моторной коре и гиппокампе могут быть связаны с кумулятивным эффектом препарата. Согласно литературным данным умеренное активирующее действие, которое выражается в усилении метаболизма, может наступить в течение 2-3 недель (Гречко, 1994), то есть столько, сколько длился эксперимент в данном исследовании.

У крыс на фоне введения крысиного интерферона-альфа по сравнению с контрольной группой снижается количество профилей капилляров в моторной коре и гиппокампе. Из данных литературы известно, что противоопухолевый эффект, которым обладает интерферон-альфа, осуществляется, в том числе, за счет снижения ангиогенеза (Dinney et al., 1998). Увеличение плотности

капилляров может свидетельствовать о повышении уровня метаболизма в нейронах (Sakata et al., 2005; Bruchey, Gonzalez-Lima, 2008).

В моторной коре происходит увеличение глиального индекса на фоне введения крысиного интерферона-альфа, что отражает повышение функциональной активности нейронов (Ройтбак, 1993; Мац, 1994), где сформированы корковые центры этих рефлексов, в то время как в гиппокампе не происходило изменения нейроно-глиальных соотношений. На нейронах моторной коры и поля СА3 гиппокампа экспрессируются  $\mu$ -опиоидные рецепторы (Tempel, Zukin, 1987), через которые интерферон-альфа действует на клетки. Различная реакция со стороны нейро-глиального комплекса может объясняться распределением  $\mu$ -опиоидных рецепторов и рецепторов к интерферону в V слое моторной коры и поле СА3 гиппокампа (Tempel, Zukin, 1987). Различная плотность этих рецепторов в неокортексе и гиппокампе, может выражаться разными порогами чувствительности к интерферону. Кроме того, рецепторы к интерферону-альфа локализуются, прежде всего, на астроглии и микроглии (Chelbi-Alix et al., 1994).

В рефлексе на отсчет интервалов времени было отмечено, что интерферон не оказал заметного влияния на выработку данного рефлекса. Эти данные подтверждаются результатами гистологических исследований, согласно которым в гиппокампе – структуре, ответственной за формирование условных рефлексов, связанных со временем (Меринг, 1990; Rawlins, 1985; Beylin et al., 2001), – не было выявлено никаких существенных структурных изменений (ни со стороны нейронов, ни со стороны глии).

Следовательно, крысиный интерферон-альфа оказывает свое действие прежде всего на глиальные клетки, на которых в большом количестве располагаются  $\mu$ -опиоидные рецепторы и рецепторы к интерферону-альфа (Tempel, Zukin, 1987; Chelbi-Alix et al., 1994), а Пиявит<sup>®</sup> – на сосудистое русло, вызывая увеличение плотности капилляров, и лишь опосредованно влияет на количество периваскулярной глии (один из элементов свободной глии).

Таким образом, было получено, что исследуемые в данной работе препараты Пиявит<sup>®</sup> и крысиный интерферон-альфа ускоряют процессы формирования памяти. Пиявит<sup>®</sup> оказывал различное действие на формирование памяти в зависимости от дозы. Так, Пиявит<sup>®</sup> в дозе 10мг/кг ухудшал выработку следового пищевого условного рефлекса на отсчет интервалов времени, вероятно, за счет увеличения двигательной активности у подопытных животных, но не влиял на выработку условного рефлекса активного избегания, а в дозе 100мг/кг Пиявит<sup>®</sup> улучшал формирование условного рефлекса активного избегания. Но наибольший эффект был получен при изучении действия Пиявита<sup>®</sup> на восстановление реакций избегания после проведения

функциональных нарушений условного рефлекса активного избегания. Было получено, что скорость восстановления реакции избегания на фоне введения Пиявита<sup>®</sup> была выше, чем в контрольной группе. Метаболическое действие препарата служит отражением активности генома, в частности активации метилирования ДНК мозга, которое является одним из ведущих молекулярных механизмов экспрессии генов (Ванюшин, 2005; Bird, 2002). Результаты опытов с анализом функционального состояния сосудов продемонстрировали увеличение количества сосудов в коре и гиппокампе под влиянием Пиявита<sup>®</sup>, что служит косвенным показателем усиления метаболических процессов. Таким образом, можно предположить, что положительный эффект Пиявита<sup>®</sup> достигается, за счет действия на кровеносное русло нервной ткани и модуляции серотонинэргической системы головного мозга.

Таким образом, в работе показана способность Пиявита<sup>®</sup> и интерферона-альфа влиять на обучение, как на этапе выработки условных рефлексов, так и при функциональном нарушении условного рефлекса активного избегания. Препарат сравнения мексидол практически не влиял на динамику формирования памятного следа. Тем не менее, изучаемые в работе препараты Пиявит<sup>®</sup> и интерферон-альфа по ряду параметров продемонстрировали положительное влияние на процесс формирования памяти животных. Это свидетельствует с одной стороны об их положительном влиянии на метаболические процессы в мозговой ткани, а с другой – указывает на необходимость дальнейшего изучения такого влияния с целью его оптимизации.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена зависимость влияния крысиного интерферона-альфа от типа условного рефлекса: интерферон-альфа улучшает выработку условного рефлекса активного избегания и пищевого условного рефлекса на тон, но угнетает формирование пищевого условного рефлекса на время.
2. Установлена зависимость влияния препарата Пиявит<sup>®</sup> на формирование памяти от дозы: в дозе 10мг/кг он угнетает выработку рефлекса на время, а в дозе 100мг/кг ускоряет выработку условного рефлекса активного избегания.
3. Пиявит<sup>®</sup> проявляет корректирующие свойства при восстановлении памяти после функциональных нарушений условного рефлекса активного избегания.
4. Хроническое введение крысиного интерферона-альфа приводит к увеличению глиального индекса в моторной коре, что коррелирует с оптимизацией процессов обучения в рефлексах – моделях ассоциативной памяти.

5. Хроническое введение препарата Пиявит® приводит к увеличению количества капилляров в моторной коре и дорзальном гиппокампе, что коррелирует с ускорением восстановления памятного следа после функционального нарушения условного рефлекса активного избегания.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов Российского гуманитарного научного фонда № 04-06-00217а, № 07-06-00282а

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ

1. Лосева Е.В., **Логинова Н.А.**, Бирюкова Л.М., Мац В.Н., Пасикова Н.В. Выработка пищевых условных рефлексов у молодых и стареющих крыс в контроле и на фоне введения малых доз интерферона-альфа // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2007. Т. 93. № 4. С. 386-393.
2. Лосева Е.В., **Логинова Н.А.**, Акмаев И.Г. Роль интерферона-альфа в регуляции функции нервной системы // Успехи физиологических наук. 2008. Т. 39. № 2. С. 31-45.
3. Лосева Е.В., **Логинова Н.А.**, Неклюдов В.В., Мац В.Н., Курская О.В., Пасикова Н.В. Влияние интерферонов альфа человека и крысы на поведение разновозрастных крыс, а также сравнение гомологии их аминокислотных последовательностей // Журн. высш. нервн. деят. 2009. Т. 59, № 4. С. 461-472.
4. **Логинова Н.А.**, Пасикова Н.В., Баскова И.П., Тушмалова Н.А. Влияние пиявита на формирование пищевого условного рефлекса у крыс // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2008». Секция «Биология». М. Макс-пресс, 2008. С. 169-170.
5. **Логинова Н.А.**, Пасикова Н.В., Иноземцев А.Н., Баскова И.П., Тушмалова Н.А. Влияние пиявита на формирование у крыс рефлексов с положительным и отрицательным подкреплением // Тезисы докладов VI Сибирского физиологического съезда. Барнаул 2008, В 2-х томах. Т.1. С. 205.
6. **Логинова Н.А.** Влияние пиявита на выработку условного рефлекса активного и пассивного избегания // Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009». Секция «Биология». Тез. докл. М.: Макс-Пресс. С. 211.
7. Новоселецкая А.В., **Логинова Н.А.** Влияние дерината и пиявита на функционально нарушенную память крыс // XII всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина». С-Петербург, 2009. С. 273-274.