**Влияние Альфа-фетопротеина на ориентировочно-исследовательское поведение у экспериментальных животных.**

Юшкова Т.А., Жигалова О.О.

ФГБОУ ВО ПГФА «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь, Россия

( 614000,г.Пермь, ул.Крупская, дом )

**Резюме.**

Работа посвящена изучению влияния гликопротеина альфа-фетопротеина АФП**,** на показатели состояния поведенческой активности**,** лабораторных животных**.** В работепоказано**,** что на фоне введения АФП**,** экспериментальным животным активизировалась ориентировочно**-**исследовательская и двигательная активность**.**Была установлена взаимосвязьизменения показателей поведенческой активности у лабораторных животных при воздействии пептидного биорегулятора альфа-фетопротеина АФП.

Как известно, разные стрессирующие нагрузки (факторы), могут привести к выраженной психоэмоциональной нестабильности, стрессу, и как следствие к депрессивным расстройствам нервной системы. В связи с этим одним из актуальных вопросов становится регуляция и коррекция психоэмоциональных состояний человека.

**Ключевые слова:**поведение, открытое поле, черно-белая камера линейные мыши, альфа-фетопротеин, двигательная активность**,** психоэмоциональный стресс, пролиферация, нейрогенез.

**The influence of alpha - fetoprotein on exploratory behavior in experimental animals.**

Yushkova T. A., Zhigalova O. O.

FSBEI PGFA "Perm state pharmaceutical Academy", Perm, Russia

( 614000,Perm, St.Krupskaya, house )

**Summary.**

The work is devoted to study the influence of the glycoprotein alpha-fetoprotein AFP, on indicators of behavioral activity of laboratory animals. It is shown that due to the introduction of the AFP, experimental animals has intensified exploratory and motor activity. Was the interrelation of changes of indicators of behavioral activity in laboratory animals under the influence of peptide bioregulator of alpha-fetoprotein AFP.

As you know, different stresseraser load (factors) that can lead to severe emotional instability, stress, and as a consequence depressive disorders of the nervous system. In this regard, one of the important issues is the regulation and correction of the psychoemotional state of the person.

**Key words:** behavior, open field, black-and-white camera linear mouse alpha-fetoprotein, physical activity, psycho-emotional stress, proliferation, neurogenesis**.**

**Цель исследования**

Изучить двигательную и исследовательскую активность мышейлинии СВА, выявить различия в поведенческой активности при введении АФП и на фоне лекарственно индуцированного иммунодефицита в тестах «открытое поле и «черно –белая камера».

.

Поиск новых более эффективных и безопасных антидепрессантов в настоящее время привел к возникновению альтернативной или, скорее дополняющей гипотезы патогенеза депрессии ,возникшей примерно 15 лет назад- гипотезы нейрогенеза[10,11].Связующим звеном между депрессией и подавленным нейрогенезом выступает хронический стресс ,который рассматривают как важный этиологический фактор развититя депрессии[12,13].

Термин нейрогенез является собирательным понятием, включающим в себя пролиферацию мультипатентных стволовых клеток их дифференцировку, миграцию а также интеграцию в уже существующие нейрональные сети [14].

Высказано предположение, что уменьшение нейрогенеза под действием стресса, а следовательно и развитие депрессии может быть связано с изменением в экспрессии BDNF в гиппокампе [15].BDNF является одним из основных нейротрофических факторов в мозге, он вовлечен в формирование синапсов ,а также имеет значительное влияние на рост,ремоделирование и стабильность дендритов и аксонов нейронов коры и гиппокампа[15]. Снижение уровня BDNF в ответна стресс может привести к потере нормальной пластичности ,а также к повреждению и гибели нейронов. Это в свою очередь приводит к нарушению индивидуальной способности организма к адаптации в стрессовых ситуациях [15].

Из литературы известно, что имеющиеся на поверхности мембран клеток рецепторы к АФП служат для связывания ядерных факторов или иных кофакторов/ингибиторов Эти данные в значительнрой мере подтверждают тесную связь АФП с клеточной пролиферацией и дифференцировкой.Предполагается также взаимодействие АФП с другими регуляторными белками, такими как факторы роста.В результате такого взаимодействия происходит ориентация клетки на размножение и дифференцировку.[9].

АФП фактически усиливает информационный контроль за правильностью реализации генетической программы пролиферирующих клеток и в значительной мере влияет на их уровень функциональной активности.

**Материал и методы исследования**

Исследования были проведены на половозрелых мышах линии СВА–самцах весом 22–25 г. Мыши в течение недели проходили зоосоциальную адаптацию. Экспериментальныеисследования проведены при соблюдении правил, сформулированных в приказе МЗ СССР№ 1179 (10.10.1983 г.).Все процедуры с животными выполнялись всоответствии с международными правилами инормами обращения с лабораторными животными, не противоречащими Женевской конвенции1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» [8]

Животные были разделены на четыре группыпо5 особей:

– мыши,находившиеся в естественных условиях освещениякоторым вводили эквиобъемное количество изотонического раствора хлорида натрия внутрибрюшинно (0,5мл) –интактная группа (0);

– мыши, находившиеся в естественных условиях освещения, которым однократно внутрибрюшинно ввели раствор АФП в дозе 0,00375 мг/кг в объеме 0,5мл - для оценки показателей состояния поведенческой активности, –опытная группа (1);

-мыши, находившиеся в естественных условиях освещения которым для моделирования иммуносупрессии (экспериментального десинхроза)вводили внутрибрюшинно 0,5мл раствора циклофосфамида (ЦФ) в дозе 50 мкг/кгв объеме 0,5мл,- опытная группа (2);

– мыши, находившиеся в естественных условиях освещения которым внутрибрюшинно однократно ввели раствор АФП в дозе 0,00375 мг/кг в объеме 0,5мл, через сутки после индукции иммунодефицита, раствором (циклофосфамида)ЦФ, оценивали показатели двигательной активности эффекта (АФП–ЦФ), – опытная группа (3).

Моделью изучение индивидуальных особенностей поведения была выбрана методика «Черно-белая камера».Данный тест проводился на всех группах животных параллельно в одно ито же время суток (с 10.00 до 11.00 ч). Черно-белая камера представляет собой закрытый ящик ,состоящий из двух отсеков, разделенных перегородкой :большого светлого (30\*26\*20),пол которого разделен на 25 квадратов,и малого темного (10\*10\*20).Отсеки сообщаются между собой через отверстие в перегородке (3\*3см),которое имеет выдвижную вертикальную дверцу. Сверху темный отсек снабжен плотно подогнанной открывающейся наверх крышкой. Над светлым отсеком располагается электрическая лампа мощностью 40 Вт.Тестирование проводили в дневное время в промежутке между 11 и 13 часами. При эксперименте мышь помещали в темный отсек камеры, после чего камеру закрывали сверху крышкой. Дверца в перегородке также была плотно закрыта.В полной темноте мышь адаптировалась к темному отсеку. Привыкание длилось 3минуты, после чего открывали дверцу в перегородке.Собственно тестирование длилось 3мин, в ходе которых визуально и видеокамерой регистрировали поведение животных: число, выглядываний из темного отсека в светлый через отверстие в перегородке ,число выходов в светлый отсек. Выглядыванием считается частичное или полное пересечение животным условного порога в отверстии центральной перегородки между отсеками. Под выходом понимается любое продвижение в сторону освещенного отсека, которое сопровождается двигательно-исследовательской активностью в этом отсеке. При этом регистрируется число пересеченных квадратов, (локомоции) вертикальные стойки, суммарная длительность выглядываний и выходов в освещенную часть камеры (в с), вертикальная двигательная активность (количество подъемов на задние лапы с опорой и без опоры на стенку).

Сбор результатов производили в течение 3-х мин, подсчитывали среднее значение за 1 мин.

Оценку поведенческих реакций животных осуществляли в изученииориентировочно-исследовательского поведения мышей в тесте «открытого поля» исуммарной двигательной активности животных в течение 3-х мин.

«Открытое поле» представляло собой хорошо освещенную круглую арену диаметром 1,2 м и высотой 45 см, пол которой размечен радиальными и круговыми линиями. Мышь выпускали в центральный сектор поля и в течение 3 мин регистрировали горизонтальную активность(число пересеченных линий по периферии и центру арены суммарно),вертикальную активность(количество подъемов на задние лапы с опорой и без опоры на стенку суммарно), груминг(количество приближений передних лап ко рту и их облизывание), количество заглядываний в отверстия; вегетативную функцию оценивали по уровню дефекации.

Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни, используемого для двух независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при *p* < 0,05 [].Статистическая обработка полученных результатов проводилась на основе пакета программ StatSoftStatistica v8.0. При обработке результатов проверяли группы на нормальностьраспределения исследуемого признака. Исследуемые признаки не подчинялись нормальномураспределению, поэтому для дальнейшего расчета использовали непараметрические критерии: медиана (*Ме*) и квартили (*Q1* – 25%; *Q3* – 75%).

**Результаты и их обсуждение.**

По классическим представлениям [2], двигательная активность (горизонтальная, вертикальная) и норковый рефлекс в совокупности определяют состояние активно-поисковой компоненты поведения, а уровень дефекаций и груминг – пассивно-оборо-нительной. Такой точки зрения придерживаютсяи другие авторы, которые считают, что регистрируемая двигательная активность животного (горизонтальная, вертикальная) и норковый рефлекс отражают ориентировочно-исследовательскую активность. [ 2. 3]. Повышенную эмоциональную реактивность связывают с низкой двигательной активностью иповышенной дефекацией [ 3 ]. Снижение показателя двигательной активно-сти указывает на уменьшение стрессированности животных и, вероятно, уменьшение общего беспокойного состояния – страха[ 4 ]. Из литературных источников известно, что

частое и короткое по времени «умывание» является тревожным грумингом, а высокий уровень дефекации указывает на тревожность животного, его беспокойство и страх [4]. По мнению Маркеля [1 ], уровень дефекаций напрямую отображает соотношение процессов возбуждения и торможения в вегетативной нервнойсистеме.

Известно, что у активных животных ориентировочно-исследовательская мотивацияпревалирует над эмоцией страха перед незнакомой обстановкой.

Было установлено, что животные первой группы (интактные) характеризовались высоким уровнем исследовательского поведения и высокой суммарной двигательной активностью (70,6±11,3). При этом мыши данной группы были относительно не эмоциональны, болюсы наблюдались у 1% животных.

У мышей второй группы после введения раствора циклофосфамида в дозе 50 мг/кг в обьеме 0,5 мл в тесте «открытого поля» выявлено снижение числа посещений периферических квадратов и активности в центральной части установки - на 70% по сравнению с интактной группой- это свидетельствует об усилении тревожности животных: ЦФ (27,4±2,9)по сравнению с контролем (41,0±3,5) (р<0,05)(табл. 1)

Введение животным раствора АФП в дозе 0,00375 мг/кг в объеме 0,5мл способствует коррекции изучаемых показателей исследовательской активности:.АФП повышает суммарную двигательную активность иориентировочно-исследовательское поведение - обэтом свидетельствует наличие достоверных отличий: АФП (62,0±5,1)по сравнению с интактными (p< 0,01) (табл. 1).

ЦФ вызываетснижение критериев поведенческой активности: об этом свидетельствуют достоверные отличия: АФП (62,0±5,1)по сравнению с интактными (41,0±3,5) (p< 0,05),и по сравнению с ЦФ (27,4±2,9) (p< 0,001) (табл. 1)

У мышей четвертой группы (АФП-ЦФ) по сравнению интактной группой и ЦФ возрастал уровень исследовательского поведения как за счет числа посещений центральных, так и за счет увеличения числа периферических квадратов. Суммарная двигательная активность мышей в группе АФП по сравнению с интактными животными группой увеличилась на 70% (р<0,05), а с группой ЦФ увеличилась на 49% (р<0,05). Результаты по определению ориентировочно-исследовательской активности мышей в условиях иммуносупрессии и коррекции внутрибрюшинным введением раствора АФП в дозе 0,00375 мг/кг в объеме 0,5мл представлены в таблице 1.

Таблица1.Влияние АФП на ориентировочно-исследовательское поведение

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Серии опытов | Доза мг/кг | Кол-во живот-  ных | Поле | Стойка | Отверстие | Болюсы | Суммарная двигательная активность |
| Контроль 1  /интактные | – | 10 | 41,0±3,5 | 1,4±0,2 | 28,2±2,1 | 1,0±0,3 | 70,6±11,3 |
| АФП | 0,0375 | 10 | 62,0±5,1  \*\*1  \*\*\*2 | 3,4±0,5  \*\*1  \*\*2 | 34,8±2,3  \*1  \*\*2 | 0,4±0,2  \*1  \*2 | 100,2±11,4  \*1  \*2 |
| Контроль 2  ЦФ | 50 | 10 | 27,4±2,9  \*1 | 0,6±0,4  \*1 | 21,4±2,8  \*1 | 1,0±0,3  \*1 | 49,4±9,1  \*1 |
| ЦФ+АФП |  | 10 | 46,6±4,6  \*1  \*\*2 | 3,0±0,5  \*\*\*1  \*\*2 | 26,2±3,2  \*1  \*2 | 0,4±0,2  \*1  \*2 | 75,8±9,42  \*1  \*2 |

Примечание: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001

1 − по сравнению с контролем;

2 – по сравнению с ЦФ;

Влияние АФП на тревожные реакции животных изучали в тесте «черно-белая камера» Животных разделили 4 экспериментальные группы: 1- группа интактная; 2- группа, животные получавшие ЦФ в дозе 50 мкг/кгв объеме 0,5мл; 3-группа, мыши которым однократно внутрибрюшинно ввели АФП в дозе 0,00375 мг/кг в объеме 0,5мл; 4-группа животных, которым ввели раствор АФП дозе 0,00375 мг/кг в объеме 0,5млчерез сутки после индукции иммунодефицита раствором циклофосфамида (ЦФ)в дозе 50 мкг/кг в объеме 0,5мл.

Исследования показали, что АФП по сравнению с интактными животными увеличил время пребывания в светлом отсеке - это объясняет уменьшение тревожных реакций, о чем свидетельствует наличие достоверных отличий АФП (59,0±2,5) интактные (45,2±2,7) (p< 0,01); по сравнению АФП (59,0±2,5)сЦФ (28,8±2,2) что свидетельствуетоб уменьшении тревожных реакций (p< 0,001), тогда как группа ЦФ продемонстрировала усиление тревожныхреакций, которое проявилось в сокращении пребывания животных на свету;такая активность соответствует хроническому введению кортикостерона [17] и является следствием стрессовой экспозиции.

Группа животных с АФП увеличила не только вертикальную двигательную активность (количество подъемов на задние лапы), но и активно-поисковую составляющую поведения, о чем свидетельствует наличие достоверных отличий АФП (4,2,±0,4) интактные (1,4±0,2) (p< 0,001), по сравнению с ЦФ АФП (4,2,±0,4)ЦФ (0,6±0,2) (p< 0,001) .

У животных с циклофосфан-индуцированным иммунодефицитом АФП устраняет его - об этом свидетельствуют достоверные отличия: ЦФ+АФП(47,6±2,3) интактные (45,6±2,7) (p< 0,05), по сравнению с ЦФ +АФП (47,6±2,3) ЦФ (28,8±2,2) (p< 0,001) (табл.2)

Поведенческие изменения, происходящие под действием АФП, вероятно свидетельствуют о наличии анксиолитической активности у него в условиях непредсказуемого умеренного стресса, что согласуется с данными литературы об этомна моделях тревожных реакций у грызунов .[16].

.

Таблица 2. Влияние АФП на тревожные реакции

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Серии опытов | Доза мг/кг | Кол-во живот-  ных | Выход в светлый отсек | Стойка |
| Контроль 1  /интактные | – | 10 | 45,2±2,7 | 1,4±0,2 |
| АФП | 0,0375 | 10 | 59,0±2,5  \*\*1  \*\*\*2 | 4,2±0,4  \*\*\*1  \*\*\*2 |
| Контроль 2  ЦФ | 50 | 10 | 28,8±2,2  \*\*1 | 0,6±0,2  \*\*\*1 |
| ЦФ+АФП |  | 10 | 47,6±2,3  \*1  \*\*\*2 | 1,4±0,2  \*1  \*\*2 |

Примечание: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001

1 − по сравнению с контролем;

2 – по сравнению с ЦФ;

**Выводы**

.

Полученные данные свидетельствуют о том,что нейрохимические механизмы взаимодействия центральной нервной и иммунной систем зависят от состояния иммунного и нейромедиаторного гомеостаза. Это расширяет наши представления о фармакологических свойствах АФП, и обосновывает целесообразность его использования при психоэмоциональном стрессе ,характеризующимся психо-эмоциональным напряжением, агрессивностью, нейросенсибилизацией и иммунодефицитом.

**Литература**

1. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте открытого поля // *Журн. высш. нервн. деятельности.* 1981. Т. 31, № 2. С. 301–307.8.

2.Симонов П.В. *Мотивированный мозг.* М.: Наука, 1987105 с.

3. Буреш Я. *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения.* М.: Высшая школа, 1991. 399с

4. Медик В.А. Статистика в медицине и биологии. М2000. 69 с.

5. Зарипов А.А., Янович К.В., Потапов Р.В., Корнилова А.А. Современные представления о десинхронозе // *Современные проблемы науки и образования.* 2015. № 3

6. Агаджанян Н.А., Шабатура Н.Н. *Биоритмы, спорт,здоровье.* М.: Физкультура и спорт, 1989. 208 с.

7. Ильин Е.П. *Психофизиология состояний человека.*СПб.: Питер, 2005. 412 с

8. РФ ГОСТ Р-53434-2009. *Принципы надлежащей лабораторной практики.* Москва: Стандартинформ, 2010. 16 с.

9.Черешнев В.А, Родионов С.Ю, Черкасов В.А, Малютина Н.Н, Орлов О.А.

//Альфа-фетопротеин// Екатеринбург 2004.

10 Drew, M.R Adult hippocampal neurogenesis as target for the treatment of depression/ M.R Drew, R.Hen/CNS NeurolDisort Drug Targets-2007.Vol.6№3.P.205-208.

11 Jacobs.B.L.Adult brainneurogenesis and psychyatry:a novel theory of depression/B.L.Jacobs,H.vanPraag, F.H Gage//Mol. Psychyatry.- 2000-.Vol.5№3.P.262-269.

12Colman, I Life course perspectives on the epidemiology of depression/I. Colman, A.Ataullahjan//Can. J. Psychyatry- 2010-.Vol.55№10-.P.622-632.

13Gene-environment interaction: early life stress and risk for depressive and anxiety disordes/ N.R.Neugent, A.R.Tyrka, L.L.Carpener(et al)//Psychofarmacology(Berl.)-2011.Vol.214№1.P.175-196.

14.Echninger,D. in the adult hippocampus/D.Echninger,G.Kempermann//Cell Tissue .-2008 -.Vol.331№1.P.243-250.

15 BDNF function and intracellular signaling in neurons /T.Numakawa,S.Suzuki,EKumamaru (et.al)//Histol.Histopantol.-2010.-.Vol.25№2.P.237-258/

16.Farhan, M. Anxiolytic profile of fluoxetine as monitored following repeated administration in animal rat model of chronic mild stress / M. Farhan and D.J. Haleem // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2015.

17.Ardayfio, P. Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light-dark emergence task in mice [text] / P. Ardayfio and K.S. Kim // Behav. Neurosci. – 2006. –120(2). – P. 249-256

.