

# БИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

---

УДК 615.373:578.245]03.015.4.076.9

DOI 10.17816/pmj35575-81

## ОПТИМИЗАЦИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВОСЬМИРУКАВНОГО ЛАБИРИНТА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА «ЦИКЛОФЕРОН®» НА КОГНИТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

*С.В. Кузнецов<sup>1\*</sup>, В.Ф. Кузнецов<sup>1</sup>, Е.В. Макунина<sup>1</sup>, Р.М. Касимова<sup>1</sup>,  
В.Д. Тютюнщикова<sup>1</sup>, Т.П. Обернебесова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера,

<sup>2</sup>Пермский базовый медицинский колледж, Россия

## OPTIMIZED USE OF EIGHT-ARM MAZE WHEN STUDYING EFFECT OF PREPARATION “CYCLOFERON®” ON COGNITIVE POTENTIAL OF EXPERIMENTAL ANIMALS

*S.V. Kuznetsov<sup>1\*</sup>, V.F. Kuznetsov<sup>1</sup>, E.V. Makunina<sup>1</sup>, R.M. Kasimova<sup>1</sup>,  
V.D. Tyutyunshikova<sup>1</sup>, T.P. Obernebesova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University,

<sup>2</sup>Perm Basic Medical College, Russian Federation

---

**Цель.** Разработка алгоритма тестирования в условиях радиального восьмирукавного лабиринта, а также исследование влияния препарата «Циклоферон®» на когнитивные процессы у экспериментальных животных в условиях повторного обучения.

**Материалы и методы.** Исследование проводили по оригинальной методике на лабораторных животных – белых беспородных крысах-самцах ( $n = 21$ ) в возрасте 8–9 месяцев. В качестве экспериментальной лабораторной установки использован радиальный восьмирукавный лабиринт. Во время эксперимента с целью активации поискового поведения суточный рацион питания был снижен на 15–20 %. В качестве подкрепления использовали молочный продукт «Сгущенка с сахаром». На первой стадии эксперимента животные получали типовой рацион вивария. Во второй части исследования крысы проходи-

---

© Кузнецов С.В., Кузнецов В.Ф., Макунина Е.В., Касимова Р.М., Тютюнщикова В.Д., Обернебесова Т.П., 2018

тел.: +7 904 846 06 39

e-mail: st1987@mail.ru

[Кузнецов С.В. (\*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, преподаватель кафедры нормальной физиологии; Кузнецов В.Ф. – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии; Макунина Е.В. – студентка лечебного факультета; Касимова Р.М. – студентка лечебного факультета; Тютюнщикова В.Д. – кандидат биологических наук, доцент кафедры нормальной физиологии; Обернебесова Т.П. – преподаватель отделения «Стоматология ортопедическая»].

ли повторное обучение после получения препарата «Циклоферон®», рассчитанного для каждой из крыс по массе в количестве 0,77 мг препарата на 100 г массы тела животного, после чего повторно оценивалась их пространственная память.

**Результаты.** По итогам второй части эксперимента выявлена статистически значимая тенденция к увеличению животных с положительным результатом тестирования по одностороннему критерию Фишера ( $p = 0,037$ ). Корреляционных взаимосвязей между применением препарата «Циклоферон®» и количеством повторных заходов в рукава, а также общим количеством заходов при тестировании выявлено не было ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует о формировании целенаправленного движения.

**Выводы.** Достоверная тенденция к увеличению количества животных, прошедших обучение при повторном тестировании на фоне применения препарата «Циклоферон®», обладающего иммуномодулирующим действием, а также антиоксидантным действием, свидетельствует об актуальности использования предложенной методики при изучении когнитивных эффектов веществ, требующих длительного введения.

**Ключевые слова.** Пространственная память, радиальный восьмирукавный лабиринт, «Циклоферон®».

**Aim.** To develop the testing algorithm in conditions of radial eight-arm maze and to study the effect of preparation “Cycloferon<sup>®</sup>” on cognitive processes in experimental animals in conditions of repeated training.

**Materials and methods.** The study was conducted on experimental animals – white outbred male rats ( $n = 21$ ) aged 8–9 months using the original method. “Radial eight-arm maze” was used as experimental laboratory device. During the experiment, to activate searching behavior, daily nutrition regime was reduced by 15–20 %. To fortify, milk product “Thickened milk” was used. At the first experimental stage, the animals received a typical vivarium ration. During the second part of this study, the rats underwent repeated training after taking “Cycloferon<sup>®</sup>”, calculated for each rat by the mass – 0.77 mg per 100 g of the animal body mass; after that the rats’ spatial memory was assessed.

**Results.** Taking into account the results of the second part of experiment, statistically significant tendency to increase was revealed among animals with positive result of testing with one-sided Fisher criterion ( $p = 0.037$ ). No correlation between taking “Cycloferon<sup>®</sup>” and the number of repeated entering of the arms and the total number of entering of the arms was detected ( $p > 0.05$ ) that proves the formation of purposive movement.

**Conclusions.** A reliable tendency to increase in the number of animals, trained during the repeated testing against the background of using “Cycloferon<sup>®</sup>”, which possesses immunomodulating effect as well as antioxidant action, confirms the actuality of applying the offered method while studying cognitive effect of substances, requiring long-term introduction.

**Key words.** Spatial memory, radial eight-arm maze, “Cycloferon<sup>®</sup>”.

## ВВЕДЕНИЕ

Известны взаимосвязи нарушения функций иммунной системы, приводящие к изменениям функций нервной системы, проявляющимся в различных сочетаниях одновременного нарушения их деятельности. Это сочетание дефектности иммунной и нервной систем наблюдают в старости, при избыточных физических нагрузках, различных вариантах дистресса, при развитии нейродегенеративных заболеваний [4, 9]. Параллельно возможно увеличение концен-

трации провоспалительных цитокинов и продуктов перекисного окисления липидов [4, 14]. В этой связи актуально использование препаратов, обладающих комплексным действием в соответствии с формирующейся патологией. Данные исследования стали основой для развития отдельной области медицины – нейроиммунологии.

Установлено модулирующее влияние иммунной системы, прежде всего Т-клеточного звена, на различные физиологические функции [6, 9]. Однако недостаточно изучено влияние лекарственных препаратов, об-

ладающих иммуномодулирующей активностью в отношении феномена пространственной памяти и когнитивных процессов. Следует отметить, что исследование подобных «сопутствующих» эффектов различных лекарственных препаратов является значимой проблемой при разработке здоровьесберегающих технологий [3].

Изучение процессов удержания и воспроизведения информации в условиях эксперимента также является актуальной проблемой. Последнее обусловлено тем, что многие варианты патологии центральной нервной системы сопровождаются когнитивным дефицитом, что обусловлено нарушением процессов воспроизведения ранее запомненной информации.

Изучение незнакомой окружающей среды сочетается с процессами обучения формированию и оценке пространственной памяти. Общеизвестно, что пространственная память и исследовательская активность связаны с активностью нейрональных образований в структурах гиппокампа [7, 10].

Процессы формирования и воспроизведения пространственной информации обусловлены сложными взаимодействиями между корой больших полушарий, структурами гиппокампа, а также с другими различными структурами головного мозга, в частности с базальными ганглиями, осуществляющими когнитивный контроль над структурами соматической нервной системы [7].

Наряду с представленной выше экспериментальной моделью изучения пространственной памяти существуют экспериментальные модели в восьмирукавном лабиринте, однако недостаточно оптимизирован алгоритм осуществления этой модели. Так, недостатком водного лабиринта Морриса является создание нетипичных для живот-

ных условий, а именно пребывание животного в воде может являться дополнительным стрессорным фактором, искажающим точность полученных результатов. Другим важным недостатком лабиринта Морриса, по мнению ряда авторов, является невозможность определить связь полученных результатов с пространственной памятью [8]. Следовательно, преимуществом теста «восьмирукавный радиальный лабиринт» является возможность контроля большего количества параметров (число рукавов, повторные заходы животного в рукава) и меньшее количество факторов, которое может сказаться на полученных результатах [2].

Общеизвестны методики тестирования экспериментальных животных в течение 5, 6 и/или 30 дней, в финальной части которого проводится подсчет балла памяти (Memory Score, MS) по формуле [1, 11, 13].

$$MS = \frac{(\text{верный вход} - \text{неверный вход})}{(\text{верный вход} + \text{неверный вход})}.$$

При использовании различных протоколов тестирования следует отметить, что пищевое подкрепление может находиться одновременно в нескольких рукавах, кроме того, факт съедания найденного подкрепления не является обязательным, что может приводить к развитию ложноположительных результатов. Представленные факты определяют целесообразность использования восьмирукавного радиального лабиринта.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на лабораторных животных – белых беспородных крысах-самцах ( $n = 21$ ), возраст которых составлял 8–9 месяцев, масса – 438 (410–

460) г. Животные содержались в условиях однополой стаи по 5–6 голов в одной клетке. Все исследования выполнены в соответствии с общепринятыми этическими нормами. При проведении работ учитывали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755) и «Европейскую конвенцию о защите животных, используемых для экспериментов или в иных целях» от 18 марта 1986 г.

В качестве экспериментальной лабораторной установки использовали радиальный восьмирукавный лабиринт, построенный в соответствии с нормами (НПК «Открытая наука», Москва, Россия). Материалами для установки служили ПВХ-панели, оклеенные изнутри полипропиленовой пленкой. Установка располагалась на высоте 70 см от уровня пола. Эксперимент проводился при искусственном освещении. Время проведения эксперимента – 11–13 часов дня.

Радиальный восьмирукавный лабиринт используется в качестве установки, позволяющей оценить формирование пространственной рабочей и долговременной памяти, находящейся под контролем гиппокампа [12]. Данный метод тестирования базируется на использовании инстинкта грызунов по исследованию новых мест в сочетании с пищевым подкреплением. Восьмирукавный лабиринт входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013.

В течение всего времени эксперимента с целью активации поискового поведения суточный рацион питания был снижен на 15–20 %. В качестве подкрепления использовался продукт молочносодержащий сгущенный с сахаром «Сгущенка с сахаром».

Перед началом эксперимента проводили приручение крыс с целью снижения уровня стресса у животных (помещение руки исследователя в перчатке в клетку с животными на 3 минуты перед началом эксперимента в течение трех первых дней). Далее животное помещалось на центральную площадку лабиринта, всегда в одном направлении, затем засекалось время, в течение которого экспериментальное животное находило нужный рукав лабиринта, в котором лежало пищевое подкрепление, и съедало его. Исследование проводилось в течение 3 минут, за это время фиксировали траекторию движения, количество заходов в рукава, количество повторных заходов.

Обучение крыс проводилось в течение 12 дней с целью привыкания к обстановке и запоминания рукава, в котором находилось подкрепление. Тестирование проходило в несколько фаз. Первая фаза – привыкание, в течение которой пищевое подкрепление находилось во всех рукавах. Данная фаза проходила в течение первых 3 дней. Далее проходила фаза тренировки. В 4–6-й дни подкрепление находилось в четырех рукавах (в каждом втором), в 7–9-й дни в двух рукавах (под углом 90°), в последние три дня – только в одном рукаве. Далее проводилось непосредственное тестирование с целью определения количества животных с выработанным рефлексом. Предложенный протокол тестирования основан на ранее предложенном протоколе с модификацией во временном аспекте [1].

Нами предложен новый алгоритм тестирования, в ходе которого фазы тренировки проходили ежедневно, в одно и то же время. Подкрепление располагалось в одном рукаве, а не в нескольких, как это делается обычно, что позволяет исключить случайные

заходы экспериментального животного в рукава с подкреплением и, соответственно, ложноположительные результаты. Более длительная фаза привыкания позволяет также снизить уровень эмоционального стресса в ответ на предъявление новой окружающей среды, что способствует повышению эффективности процесса обучения. Обязательным условием позитивного тестирования является не только заход экспериментального животного в рукав с подкреплением, но и съедание подкрепления, что свидетельствует о целенаправленном движении и поведении.

В первой части эксперимента крысы проходили обучение, после чего оценивалась их пространственная память в лабиринте. Во второй части исследования крысы проходили повторное обучение после получения препарата «Циклоферон®», рассчитанного для каждой из крыс по массе в количестве 0,77 мг препарата на 100 г массы тела животного, после чего также оценивалась их пространственная память.

«Циклоферон®» (меглумина акридон-ацетат) – производное акридонуксусной кислоты, низкомолекулярный индуктор синтеза интерферона, обладает иммуномодулирующим действием, направленным на активацию Т-лимфоцитов и НК-клеток.

Препарат «Циклоферон» вводился перорально [5]. Между первой и второй частями эксперимента был перерыв, который составлял 14 дней, из которых в течение 12 последних дней крысы получали препарат «Циклоферон». После перерыва осуществлялось тестирование, целью которого являлось выявление количества животных с сохраненным поисковым поведением. Статистический анализ проводили с использованием точного теста Фишера, корреляционный анализ – с применением критерия Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По итогам первой части эксперимента положительный результат тестирования был отмечен у 8 крыс. Через 14 дней перерыва при тестировании в условиях 8-рукавного лабиринта достоверно отмечено снижение количества животных с положительным результатом тестирования ( $p < 0,05$ ).

По итогам второй части эксперимента выявлена статистически значимая тенденция к увеличению количества животных с положительным результатом тестирования по одностороннему критерию Фишера ( $p = 0,037$ ). Корреляционных взаимосвязей между применением препарата «Циклоферон» и количеством повторных заходов в рукава, а также общим количеством заходов при тестировании выявлено не было ( $p > 0,05$ ), что вкупе с увеличением количества животных с положительным результатом тестирования свидетельствует о формировании целенаправленного движения.

Следовательно, использование предложенного метода тестирования является актуальным в рамках изучения выработки пространственной памяти в условиях использования лекарственных препаратов, требующих длительного введения.

## Выводы

В ходе данного исследования разработан новый алгоритм оценки когнитивного потенциала экспериментальных животных в условиях восьмирукавного радиального лабиринта, позволяющий изучить формирование долговременной пространственной памяти у грызунов в эксперименте при использовании препаратов, требующих длительного введения. В ходе исследования применялся иммуномодулятор «Циклоферон» с целью

изучения его влияния на когнитивный потенциал животных при повторном обучении. В ходе повторного исследования установлено, что применение препарата «Циклоферон» статистически значимо влияло на сохранение и воспроизведение информации. Достоверная тенденция к увеличению количества животных, прошедших обучение при повторном тестировании на фоне применения препарата «Циклоферон», обусловлена непосредственным иммуномодулирующим действием, а также антиоксидантным действием [5].

Представленные данные свидетельствуют об актуальности исследования эффектов препаратов, обладающих специфической и неспецифической иммуномодулирующей активностью, при изучении когнитивных процессов в эксперименте, а также целесообразности разработки новых алгоритмов тестирования в экспериментальных установках.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Интышева А.М., Польшников А.М., Салмина А.Б. Восьмирукавный радиальный лабиринт как инструмент оценки пространственного обучения и памяти у мышей. Сибирское медицинское обозрение 2016; 5: 46–52.
2. Интышев А.М., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Комлева Ю.К., Черных А.И., Белова О.А., Саламатина А.Б. Сравнение тестов «восьмирукавный радиальный лабиринт» и «водный лабиринт Морриса» при оценке пространственной памяти у экспериментальных животных в ходе нейроповеденческого тестирования. Фундаментальная и клиническая медицина 2017; 2(2): 62–69.
3. Кузнецов В.Ф., Кулёмин Л.М., Кузнецов С.В. Ферментированные пищевые волокна («Рекицен-РД», «Ультрасорб») в патологии человека. Вятский медицинский вестник 2006; 2: 144–145.
4. Кузнецов С.В., Кузнецов В.Ф., Негодяева Н.Л., Обернебесова Т.П. Натуральный комплекс ферментированных пищевых волокон и короткоцепочечных жирных кислот при коррекции провоспалительного статуса. Пермский медицинский журнал 2017; 1(34): 84–89.
5. Хужахметова Л.К., Теплый Д.Л. Фармакологическая коррекция перекисного окисления липидов и перекисного гемолиза эритроцитов у половозрелых крыс при имобилизационном стрессе. Естественные науки 2016; 2 (55): 66–71.
6. Cohen H., Ziv Y., Cardon M., Kaplan Z., Matar M.A., Gidron Y., Schwartz M., Kipnis J. Maladaptation to mental stress mitigated by the adaptive immune system via depletion of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ cells. J Neurobiol 2006; 66(6): 552–563.
7. Delli Pizzi S., Franciotti R., Bubbico G., Thomas A., Onofrij M., Bonanni L. Atrophy of hippocampal subfields and adjacent extrahippocampal structures in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 2016; 40: 103–109.
8. Hodges H. Maze procedures: The radial-arm and water maze compared. Cognitive Brain Research 1996; 3 (3–4): 167–181.
9. Kipnis J., Gadani S., Derecki N.C. Pro-cognitive properties of T cells. Nat Rev Immunol 2012; 12(9): 663–669.
10. Mauldin K.N., Griffin A.L., Oliver C.G., Berry S.D. Hippocampal response patterns during discriminative eyeblink/jaw movement conditioning in the rabbit. Behavioral Neuroscience 2008; 122(5): 1087–1099.
11. Olton D.S., Samuelson R.J. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats.

J. Experim. Psychol.: Animal Behavior Processes 1976; 2 (2): 97–116.

12. *Penley S.C., Gaudet C.M., Threlkeld S.W.* Use of an eight-arm radial water maze to assess working and reference memory following neonatal brain injury. J Vis Exp 2013; 82. DOI: 10.3791/ 50940.

13. *Richter S.H., Zeuch B., Lankisch K., Gass P., Durstewitz D., Vollmayr B.* Where have

I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression. PLoS One 2013; 8 (4): e62458.

14. *Yin H., Xu L., Porter N.A.* Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem Rev 2011; 111(10): 5944–5972.

Материал поступил в редакцию 1.08.2018