

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕМОЦІЙНОГО СТАНУ ЩУРІВ, МАТЕРІ ЯКИХ ПІД ЧАС ЛАКТАЦІЇ ЗАЗНАВАЛИ ВПЛИВУ ЕСТРОГЕНІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

Смоленко Н. П., Карпенко Н. О.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України», м. Харків

Функціонування нейроендокринної системи і гормонозалежна поведінка особин різної статі мають значні статеві відмінності. Цей диморфізм виявляється відносно всіх видів поведінки, характеру розумової діяльності, регуляції секреції гонадотропнів, метаболізму гормонів, нейротрансмісії, гормональної рецепції, емоцій у незнайомих умовах [1, 2].

Основа відмінностей нейроендокринної регуляції поведінки закладається у процесі статевої диференціації мозку, яка відбувається у різних видів ссавців або в ембріональний період, або у перші дні після народження. Цей процес дуже чутливий до гормональних стимулів і може потребувати як наявності тестостерону (у особин чоловічої статі), так і відсутності статевих гормонів (у особин жіночої статі) [3, 4]. Руйнація статевої диференціації відбувається при низькому рівні тестостерону, що продукується сім'яниками плодів-самців, або коли гормони впливають на мозок плоду жіночої статі.

Показано, що зміни харчової, статевої, агресивної, соціальної поведінки, розвиток тривожності, депресії можуть обумовлюватись (залежно від статі та у різні стадії розвитку) відмінностями у кількості та актив-

ності естрогенових рецепторів [5]. Це пояснює чому неонатальна експозиція до ендокринно активних компонентів або агоністів естрогенових рецепторів може змінювати поведінку дорослих щурів [6]. Такими ендокринно активними компонентами виступають й сполуки рослинного походження — фітоестрогени (ФЕ), які входять до раціону. Показано, що надходження надлишку ФЕ у критичні періоди розвитку спричиняє порушення статевої диференціації самців щурів з поведінковими розладами у дорослому віці (пригнічення статевої активності самців, зміни естрогензалежних форм поведінки самок) [7–9]. Тому постає питання: які віддалені наслідки може мати наявність соєвого молока (багатого джерела ФЕ) практично в усіх сумішах для штучного вигодовування немовлят, бо відомо, що натеper на штучне вигодовування переводять близько 75% малюків у 4-місячному віці [10].

Саме тому метою нашого дослідження було встановлення наявності та стате-вих особливостей віддалених ефектів надходження естрогенів у період молочного вигодовування для емоційного стану дорослих щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент виконано на щурах лінії Вістар відповідно до національних «Загаль-

них етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001).

Самок з вигонами випадковим чином розподілили на три групи: Контроль (інтактні тварини), ФЕ, E2.

Самкам групи ФЕ з 3 по 21 день лактації згодовували суміш ФЕ у дозі 100 мг/кг маси тіла матері за «геністеїновим еквівалентом». Використовували Genistein Soy Complex isoflavone-rich (Soylife, USA), відносний вміст ізофлавононів у якому був: для дайдзеїну 60 %, для гліцистеїну 22 %, для геністеїну 18 % [11].

Як позитивний контроль для порівняння дії ФЕ з дією природного естрогену самки групи E2 отримували з їжею 17 β -естрадіол (E₂) у дозі 0,25 мг/кг маси тіла [12] також з 3 по 21 добу лактації. Доза E₂ була обрана на підставі результатів дослідження ефектів різних доз E₂ на репродуктивну систему щурів [13], а саме аналогічності змін вмісту статевих гормонів при надходженні E₂ у дозі 2,5 ppm (або 0,25 мг/кг) тим, що ми спостерігали при застосуванні ФЕ [14].

Після досягнення тваринами 90-денного віку у них визначали рівень тривожності за допомогою двох експериментальних моделей — піднятого хрестоподібного лабіринту (ПХЛ) та тесту «підвішування за хвіст».

Тестування у ПХЛ проводилося за моди-

фікацією S. E. Fille [15] у експериментальній камері у вигляді хрестоподібного лабіринту з фарбованого дерева. Протягом 5 хв. в проміжку між 15 і 16 годинами візуально реєстрували кількісні та часові (за секундоміром «Агат») характеристики поведінки тварин, яких висаджували у центр перехрестя.

Тест «підвішування за хвіст» [16] базується на спостереженні, що гризуни при піднятті за хвіст демонструють період іммобільності, за латентністю якого можна судити про рівень тривожності, страху та відчаю. Тестування проводили одноразово, в проміжку між 15 і 16 годинами, піднімаючи тварин за хвіст та утримуючи над поверхнею підлоги на висоті 1 метр до повного підняття щуром тулуба.

Отримані дані наведені як середня арифметична та її похибка ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) кількісних показників, де характер розподілу даних у вибірках відповідав закону нормального розподілу, або як медіана та її похибка ($Me \pm S_{Me}$) у часових показниках з невідповідністю їх розподілу вищезгаданому закону. Відмінності між групами визначали за критерієм t Ст'юдента або Вілкоксона-Манна-Вітні та вважали статистично значущими при $P < 0,05$ [17].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Тестування у ПХЛ позиціонується як одна з найбільш адекватних і чутливих моделей тривожності і традиційно застосовується для вивчення анксиолітичної активності різних речовин [1, 18].

При дослідженні характеру відповіді інтактних тварин на стресорні умови нового середовища виявлено, що показник вертикальної активності самців цієї групи склав $4,0 \pm 0,6$ стійок, у той час, як показник оцінки ризику, яким вважають кількість заглядань униз із закритого рукава, дорівнював $1,4 \pm 0,6$ рази за тест. Кількість заглядань униз із відкритого рукава була значно меншою — $0,4 \pm 0,4$ рази за тест. У цих тварин кількість актів грумінгу та дефекації була однаковою — $0,4 \pm 0,3$ за тест, уринації під час перебування у ПХЛ взагалі не спостерігались (див. табл.).

При дослідженні рівня тривоги у ПХЛ

самців-щурів, матері яких під час лактації отримували з кормом надлишок ФЕ (група ФЕ), у порівнянні з тваринами групи Контроль, відмічено зниження показника вертикальної дослідницької активності у 2,9 рази ($P < 0,05$, див. табл.). Водночас у щурів значно збільшувалась кількість заглядань униз з відкритого рукава — у 22,6 рази ($P < 0,01$) та кількість дефекацій — у 9,5 раз ($P < 0,01$). Останню поведінкову реакцію дослідники відносять до пасивно-оборонної. Тобто, отримані дані свідчать про підвищення рівня тривоги у цих тварин. Подібні зміни емоційної поведінки спостерігались по досягненні дорослого віку у щурів за умов неонатальної експозиції сполук з естрогенною активністю [6]. Таким чином, уведення надлишку ФЕ не тільки безпосередньо впливає на емоційний стан тварин, як це показано І. В. Єрмаковою та

Показники рівня тривожності у щурів, матері яких під час лактації зазнали дії естрогенів різної природи

Показник	Група		
	Контроль (n = 8)	ФЕ (n = 5)	Е ₂ (n = 10)
Самці			
Кількість виходів у відкриті рукава	1,4 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,5 ± 0,3
Кількість виходів у закриті рукава	3,0 ± 0,2	3,8 ± 1,1	5,3 ± 0,4 *
Загальна кількість виходів	4,4 ± 0,3	5,6 ± 1,1	6,0 ± 0,3 *
Кількість стійок	4,0 ± 0,6	1,4 ± 0,5 *	2,1 ± 0,9 *
Кількість заглядань униз із закритих рукавів	1,4 ± 0,6	3,0 ± 1,2	5,5 ± 1,0 *
Кількість заглядань униз з відкритих рукавів	0,4 ± 0,4	8,6 ± 2,2 *	1,1 ± 0,8 **
Кількість переходів через центр майданчика	3,4 ± 0,3	4,6 ± 1,1	5,8 ± 0,6 *
Кількість грумінгу	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
Кількість дефекацій	0,4 ± 0,3	3,6 ± 0,8*	2,9 ± 1,2*
Кількість урінацій	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,4	0,1 ± 0,1
Латентний період заходу до закритого рукава, с (Me±S _{Me})	30,0 ± 9,7	90,0 ± 64,6	16,5 ± 10,6**
Час у відкритих рукавах, с (Me±S _{Me})	28,0 ± 15,6	35,0 ± 32,9	10,0 ± 13,1
Самки			
Кількість виходів у відкриті рукава	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,5	0,6 ± 0,2
Кількість виходів у закриті рукава	3,9 ± 0,7	3,6 ± 1,0	4,1 ± 0,8
Загальна кількість виходів	4,6 ± 0,8	4,7 ± 1,3	4,6 ± 0,8
Кількість стійок	2,8 ± 0,6	1,4 ± 0,8 *	2,3 ± 0,6
Кількість заглядань униз із закритих рукавів	2,2 ± 0,3	1,1 ± 0,6 *	1,6 ± 0,6
Кількість заглядань униз з відкритих рукавів	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,3	0,1 ± 0,1
Кількість переходів через центр майданчика	3,6 ± 0,8	3,7 ± 1,3	3,9 ± 0,8
Кількість грумінгу	1,1 ± 0,3	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,6
Кількість дефекацій	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4
Кількість урінацій	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
Латентний період заходу до закритого рукава, с (Me ± S _{Me})	20,0 ± 4,2	25,0 ± 47,3	10,5 ± 45,2
Час у відкритих рукавах, с (Me±S _{Me})	12,0 ± 12,4	13,0 ± 4,6	2,0 ± 3,1

Примітка. * — вірогідні відмінності від групи Контроль (P < 0,05); ** — вірогідні відмінності між групами ФЕ та Е₂ (P < 0,05).

В. А. Глазковою [2], але має й довгострокові наслідки при введенні у критичний період онтогенезу.

У групі самців-щурів, матері яких отримували Е₂ (група Е₂, див. табл.) також виявлено наявність анксиогенного ефекту. У цих тварин ми спостерігали збільшення кількості виходів у закриті рукави ПХЛ (на

76,7 %, P < 0,01), що призводило до збільшення загальної кількості виходів (на 37,0 %, P < 0,05) та кількості переходів через центр майданчика (на 71,6 %, P < 0,05). Також у цих тварин відмічалось зниження вертикальної дослідницької активності, що сполучалося з підвищенням оцінки ризику та кількості дефекацій. В той же час, у те-

сті «підвішування за хвіст» змін тривалості іммобільності у них виявлено не було. Отриманні результати в котрий раз підтверджують відмінність тривожності, яку моделюють в ПХЛ, від тривожності, що провокується у тварин у тесті «підвішування за хвіст», тобто тестовані препарати можуть проявляти анкіоселективні властивості, які діють на один вид тривожності і не впливають на інший [19].

При порівнянні самців, які з молоком матері отримували різні сполуки з естрогеноподібною активністю, можна бачити більшу ступінь тривожності самців групи E₂, бо в них спостерігалось зниження кількості заглядань униз з відкритих рукавів та скорочення латентного періоду заходу до закритого рукава.

При дослідженні рівня тривоги в ПХЛ у самок-щурів, матері яких під час лактації отримували надлишок ФЕ (група ФЕ), порівняно з інтактними тваринами відмічено зниження кількості стійок (на 49,7%, $P < 0,05$, див. табл.) та кількості заглядань униз із закритого рукава (на 49,6%, $P < 0,05$). Такий характер відповіді на ПХЛ може розглядатися як посилення пасивної поведінки у незнайомому середовищі. Треба відмітити, що під час вивчення рівня тривоги у тесті «підвішування за хвіст» тривалість іммобільності у цих щурів була у межах контрольних значень.

Комплекс змін показників у щурів рідної статі вказує на більш тривожний стан самців у незнайомому середовищі. Про це свідчить порівняння поведінки самців групи ФЕ, які демонстрували зниження вер-

тикальної дослідницької активності на тлі збільшення кількості оцінки ризику та пасивно-оборонної активності, в той час як у самок цієї групи знижувалась тільки вертикальна дослідницька активність та оцінка ризику.

При тестуванні у ПХЛ самок, матері яких з кормом отримували E₂ (група E₂, див. табл.), порівняно з інтактними тваринами спостерігалось зниження кількості заглядань у відкриті рукави (на 45,3%, $P < 0,05$). При вивченні рівня депресивності у цих тварин у тесті «підвішування за хвіст» спостерігалось збільшення тривалості реакції (на 86,8%, $P < 0,05$).

При порівнянні поведінки самок щурів груп ФЕ та E₂ вірогідних відмінностей в тесті ПХЛ виявлено не було. Проте, в тесті «підвішування за хвіст» тривалість іммобільності у тварин групи E₂ була значно більшою (в 1,9 рази), ніж у самок групи ФЕ ($P < 0,05$). Такі подовження часу нерухомоті у тесті «підвішування за хвіст» дослідниками розглядаються як свідчення наявності у тварин депресивного синдрому [20].

Треба підкреслити, що у самців групи E₂ спостерігалось збільшення орієнтовно-рухової, пасивно-оборонної активності та оцінки ризику, що ми розцінювали як підвищення рівня тривожності. В той же час у самок групи E₂ вірогідних змін поведінки у ПХЛ не реєструвалось, хоча вона змінювалась у тесті «підвішування за хвіст». Тому ми вважаємо, що вплив E₂ на формування характеру поведінки у незнайомому середовищі більш значний у самців.

ВИСНОВКИ

1. Надходження з молоком матері до дітей сполук з естрогеноподібною активністю має віддалені наслідки, які проявляються у дорослому віці і залежить від статі щурів.
2. У самців щурів надходження фітоестрогенів або естрадіолу у критичний період розвитку призводить до підвищеної тривожності цих тварин у зрілому віці.
3. У дорослих самок, які зазнали дії естрогеноподібних сполук у період фізіологічного молочного вигодовування, тривожність менш виражена, ніж у самців.
4. Вплив естрадіолу на формування характеру поведінки у незнайомому середовищі більш значний, ніж вплив фітоестрогенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Rodgers R. J.* Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors [Text] / R. J. Rodgers, J. C. Cole // *Physiol. Behav.* — 1993. — Vol. 53. — P. 383–388.
2. *Ермакова И. В.* Адаптивные процессы при решении когнитивных задач крысами с разным уровнем и типом тревожности [Текст] / И. В. Ермакова, В. А. Глазкова // *Совр. пробл. науки и образования.* — 2008. — № 6. — С. 20.
3. *Резников А. Г.* Функциональная тератология нейроэндокринной системы: этиология, патогенез, профилактика [Текст] / А. Г. Резников // *Здоров'я України.* — 2007. — Т. 22, № 1. — С. 19–21.
4. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. [Текст] / А. Г. Резников, Н. П. Пишак, Н. Д. Носенко, В. Ф. Мыслицкий. — Черновцы: Медакадемия. — 2004. — 351 с.
5. Estrogen receptor beta agonists in neurobehavioral investigations [Text] / E. Choleris, A. E. Clipper-ton, A. Phan, M. Kavaliers // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* — 2008. — Vol. 9, № 7. — P. 760–773.
6. *Patisaul H. B.* Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ERbeta agonist increases adult anxiety and aggression in gonadal intact male rats [Text] / H. B. Patisaul, H. L. Bateman // *Horm. Behav.* — 2008. — Vol. 53, № 4. — P. 580–588.
7. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function [Text] / P. L. Whitten [et al.] // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1995. — Vol. 208, № 1. — P. 82–86.
8. Exposure to Genistein during Gestation and lactation demasculinized the reproductive system in rats [Text] / A. B. Wisniewski [et al.] // *J. Urol.* — 2003. — Vol. 169, № 4. — P. 1582–1586.
9. *Henry L.* Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats [Text] / L. Henry, D. Witt // *Horm. Behav.* — 2002. — Vol. 41, № 2. — P. 220–228.
10. *Щеплягина Л. А.* Пренатальная и постнатальная профилактика и коррекция дефицита микроэлементов у детей [Текст] / Л. А. Щеплягина // *Российский мед. журн.* — 2001. — Т. 9, № 19. — С. 7–12.
11. Визначити вікову залежність реактивності до несприятливих чинників у нащадків батьків з репродуктивними розладами [Текст]: звіт про НДР (заключний): АМН 04.06 / Ін-т проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України; кер. А. І. Гладкова; викон.: Н. О. Карпенко [та ін.]. — Х., 2006. — 145 с. — № ДР 0106U002109.
12. 90-Day Feeding and One-Generation Reproductive Study in Crl:CD BR Rats with 17beta-Estradiol [Text] / L. B. Biegel, A. N. Hirshfield, J. C. O'Connor [et al.] // *Toxicol. Sciences.* — 1998. — Vol. 44. — P. 116–142.
13. Effects of Dietary 17beta-Estradiol Exposure on Serum Hormone Concentrations and Testicular Parameters in Male Crl:CD BR Rats [Text] / J. C. Cook, L. Johnson, J. C. O'Connor [et al.] // *Toxicol. Sciences.* — 1998. — Vol. 44. — P. 155–168.
14. Влияние фитоестрогенов на уровень половых гормонов и фертильность крыс [Текст] / Е. В. Сомова, А. И. Гладкова, Н. А. Карпенко [и др.] // *Пробл. эндокрин. патології.* — 2010. — № 1 — С. 82–89.
15. *Fille S. E.* Recent developments in anxiety, stress, and depression [Text] / S. E. Fille // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1996. — Vol. 54, № 1. — P. 3–12.
16. Depressive behavior and alterations in receptors for dopamine and 5-hydroxytryptamine in the brain of the senescence accelerated mouse (SAM)-P10 [Text] / T. Onodera, R. Watanabe, K. Tha [et al.] // *Jpn. J. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 83, № 4. — P. 312–318.
17. *Лакин Г. Ф.* Биометрия [Текст]: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
18. *Калуев А. В.* Нейротропные эффекты бензилпенициллина в экспериментальных моделях стресса у крыс [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Калуев Алан Валерьевич. — К., 2002. — 150 с.
19. *Калуев А. В.* Изучение тревожности у животных — вчера, сегодня, завтра [Text] / А. В. Калуев // *Стресс и поведение: материалы VII Междисциплин. конф. по биологической психиатрии, Москва, 28 февр. 2003 г.* — М., 2003 — С. 64.
20. *Лоскутова Л. В.* Сверхмалые дозы антител к белку S100 и пептиду дельта-сна: эффективность при депрессивно-тревожном состоянии у крыс [Текст] / Л. В. Лоскутова, М. Б. Штарк, О. И. Эпштейн // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* — 2003. — Приложение. — С. 24–26.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕМОЦІЙНОГО СТАНУ ЩУРІВ, МАТЕРІ ЯКИХ ПІД ЧАС ЛАКТАЦІЇ ЗАЗНАВАЛИ ДІЇ ЕСТРОГЕНІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

Смоленко Н. П., Карпенко Н. О.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України», м. Харків

Досліджено емоційний стан дорослих щурів обох статей, матерям яких під час лактації згодовували 17β -естрадіол або фітоестрогени, у тестах «піднятий хрестоподібний лабіринт» та «підвішування за хвіст». Віддалені наслідки естрогенізації у критичний період онтогенезу проявлялися зростанням тривожності тварин. Цей ефект був більш значним у щурів-самців, тоді як самки були менш уразливими. Виявлено більше виражений вплив естрадіолу, ніж фітоестрогенів, на формування характеру поведінки.

К л ю ч о в і с л о в а : фітоестрогени, естрадіол, лактація, тривожність, щури.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КРЫС, МАТЕРИ КОТОРЫХ ВО ВРЕМЯ ЛАКТАЦИИ ИСПЫТЫВАЛИ ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ

Смоленко Н. П., Карпенко Н. А.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского АМН Украины», г. Харьков

Исследовано эмоциональное состояние взрослых крыс обоего пола, матерям которых во время лактации вскармливали 17β -эстрадиол или фитоэстрогены, в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «подвешивание за хвост». Отдаленные последствия эстрогенизации в критический период онтогенеза проявлялись ростом тревожности у животных. Этот эффект был значительно сильнее у крыс-самцов, тогда как самки были менее уязвимыми. Обнаружено большее влияние эстрадиола, чем фитоэстрогенов, на формирование характера поведения.

К л ю ч е в ы е с л о в а : фитоэстрогены, эстрадиол, лактация, тревожность, крысы.

THE CHARACTERISTIC OF THE EMOTIONAL STATE OF RATS WHOSE MOTHERS WERE AFFECTED BY ESTROGENS OF DIFFERENT NATURE DURING LACTATION PERIOD

N. P. Smolenko, N. A. Karpenko

SI «V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the AMS of Ukraine», Kharkiv

Suckling female rats had taken a 17β -estradiol or phytoestrogens from 3 till 21 day of lactation. The emotional state of their adult progeny has been investigated in the «elevated plus maze» test and the test «pick up of rats by the tail». The delayed consequences of estrogens intake during critical period of ontogenesis have caused the high level of animals' anxiety. This effect was considerably intense on male rats while females were more resistant. The 17β -estradiol has a more significant influence then phytoestrogens on formation of the behaviour pattern.

К e y w o r d s : phytoestrogens, 17β -estradiol, suckling, anxiety, rats.