

УДК 636.591+612.664:616.89-008.441+591.36

РІВЕНЬ ТРИВОЖНОСТІ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ, ЩО БУЛИ ПІДДАНІ У РАННІЙ ПОСТНАТАЛЬНИЙ ПЕРІОД ДІЇ СТРЕСУ ТА СПОЛУК З ЕСТРОГЕНОВОЮ АКТИВНІСТЮ

Карпенко Н.О., Смоленко Н.П.

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН
України», Харків, Україна
E-mail: nina_karpenko@mail.ru*

Досліджено рівень тривожності у тесті «Піднятий хрестоподібний лабіринт» у дорослих щурів обох статей, матері яких в період лактації отримували з раціоном сполуки з естрогенною активністю та/або зазнавали емоційного стресу відокремлення від виводку. У самців імпринтинговими наслідками стресу були прояви тривожно-депресивного стану. Цей анксиогенний ефект стресу пом'якшувався у разі надходження з молоком сполук з естрогенною активністю. У самок маніпуляції під час молочного вигодовування не змінювали поведінку у дорослому віці.

Ключові слова: стрес, фітоестрогени, естрадіол, підсосний період, тривожність, щури.

ВСТУП

Активні процеси росту та розвитку молодого організму визначають величезне значення психоемоційного стану та характеру харчування у групування мати-дитина під час вагітності та лактації для створення міцного фундаменту здоров'я дорослої особини.

В останнє десятиріччя як клінічні, так і експериментальні дослідження свідчать про сталі та потенційно небезпечні нейроендокринні наслідки стресових впливів на ранніх стадіях онтогенезу [1]. У модельних дослідках (на гризунах та мавпах) показано, що стрес у нащадків внаслідок порушення звичного взаємозв'язку з матір'ю може викликати збудження або пригнічення реактивності стрес-систем, яке зберігається і у дорослих тварин. Спрямованість викликаних відмінностей гіпофізарно-адреналової відповіді залежить як від віку, коли відбувався стрес [2], так і від природи та періодичності стресових умов [3]. З іншого боку, через зміни у харчовій промисловості, спрямовані на здешевлення виробництва, постерігається збільшення в раціоні вагітних жінок та матерів-годувальниць питомої частини сої та її похідних, які є багатим джерелом фітоестрогенів (ФЕ). Останні надходять до амніотичної рідини та до грудного молока [4] і здатні змінювати гормональну індукцію формування структур головного мозку у плода, дозріванні центральної нервової системи нащадків [5], викликати транзиторні або перманентні зміни процесів статевого розвитку та дозрівання особин [6]. Останні, крім усього, можуть посилюватись порушенням балансу нейропептидів у гіпоталамусі [7].

З огляду на вищенаведене виникає питання про можливість зміни імпринтингової дії стресу у ранньому постнатальному періоді онтогенезу сполуками з естрогеноподібною дією. Тому метою нашої роботи було визначення змін емоційного стану за показниками поведінки у незнайомих умовах, тобто стрес-реактивності, у щурів обох статей, які під час фізіологічного молочного вигодовування зазнавали емоційного стресу та отримували з молоком матері надлишок ФЕ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Інтактні вагітні самки популяції Вістар, запліднені інтактними самцями, за 2-3 дні до пологів були рандомізовані на групи з умовними позначками Контроль (інтактні тварини), Стрес, Стрес+ФЕ, Стрес+Е2.

Після пологів у групі Стрес був відтворений емоційний стрес нащадків за моделлю «clean bedding»), для чого їх з 3 по 15 добу життя відокремлювали від виводку та матері на 15 хв і розміщували на чисту підстилку. На цей час самка поміщалась у пусту клітку, де до того знаходились самці (експозиція до запаху "чужого" самця) [8]. У групах Стрес+ФЕ та Стрес+Е2 тварини зазнавали одночасного впливу такого ж стресу та отримували з молоком матері надлишок ФЕ або Е2. Для цього самкам групи Стрес+ФЕ з 3 по 21 день лактації згодовували ФЕ у дозі 100 мг/кг м. т. матері. Для порівняння дії ФЕ з дією природного естрогену у той же період самки групи Стрес+Е2 отримували з їжею 17 β - естрадіол (Е2) у дозі 0,25 мг/кг м. т. [9].

Для моделювання аліментарного надходження надлишку ФЕ використовували БАД Genistein Soy Complex isoflavone-rich, фірми SoyLife, USA з відносним вмістом даїдзетину – 60, гліцитетину –22 та геністеїну 18 % [10]. Дозу розраховували за так званим „геністеїновим еквівалентом”. Дозу Е2 було обрано на підставі порівняння змін гормонального профілю при дії різних доз естрогена [11] та ФЕ [12].

По досягненні тваринами 90-денного віку у щурів визначали рівень тривожності у піднятому хрестоподібному лабіринті (ПХЛ) [13]. У хрестоподібній камері протягом 5 хв в проміжку між 15 і 16 год візуально реєстрували кількісні та часові (за секундоміром "Агат") характеристики поведінки, перелік яких наведено у таблиці.

Експеримент виконано відповідно до національних “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах” (Україна, 2001).

Отримані дані представлені як середнє арифметичне та його похибка ($\bar{x} \pm S\bar{x}$, розподіл даних у групах відповідає закону нормального розподілу), значущість різниці між групами визначали за допомогою множинних порівнянь за Шеффе і вважали статистично достовірними при $P < 0,05$ [14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз поведінки щурів у ПХЛ дає можливість визначити у тварин, які опинилися у нових умовах, ступінь вираженості емоційної реакції страху та

тривоги, рухову активність, швидкість орієнтовних реакцій. Цей тест вважають дуже чутливим і використовують для оцінки дії анксиолітичних і анксиогенних препаратів [15].

При дослідженні 90-денних інтактних тварин було виявлено, що показник вертикальної активності самців цієї групи складав $4,0 \pm 0,6$ стійок, у той час, як показник оцінки ризику, про що свідчить кількість заглядань униз із закритого рукава, дорівнював $1,4 \pm 0,6$ (таблиця). Кількість заглядань униз із відкритого рукава була значно меншою – $0,4 \pm 0,4$. У цих тварин кількість актів грумінгу та дефекації була однаковою – $0,4 \pm 0,3$ за тест. Уринації у цих тварин під час перебування у ПХЛ взагалі не спостерігались. При порівнянні отриманих даних з даними літератури [16] звертає увагу наявність значних відмінностей поведінки щурів за усіма показниками. Так, у дорослому віці (12-14 міс.) кількість окремих елементів поведінки щурів перевищувала таку у 90-денних у кілька разів. На наш погляд це пов'язано з віковими особливостями реагування на нові обставини і може пояснюватись більшим досвідом доросліших тварин.

Маніпуляції під час лактації по відокремленню від виводку та експозиція до запаху чужих самців викликали у лактуючих самок у перші дні стресування занепокоєння, через що вони не одразу поверталися до гнізда годувати щурят. На 4-5 доби досліду ця реакція поступово зникала, що співпадало з даними літератури [8].

Крім строків наслідків емоційного стресу під час молочного вигодовування виявлені й віддалені зміни поведінки нащадків – на 90 добу життя. У самців щурів значуще знижувалась кількість стійок у ПХЛ за тест (на 55 %, $P < 0,05$). У той же час, у них на 66 % збільшувались показники оцінки ризику ($P < 0,05$), про що свідчили зміни кількості заглядань униз із закритого рукава. Треба відзначити, що у стресованих у ранньому віці щурів у 4,7 рази збільшилась частота реакцій грумінгу ($P < 0,05$). Але необхідно підкреслити, що час одного акту грумінгу у тварин цієї групи скоротився, у його характері проявлялася стереотипія (зацикловання на одному й тому ж елементі умивання), а сам цей поведінковий акт не досягав своїх фінальних стадій. Аналогічні дані щодо стереотипії грумінгу у дорослих щурів, підданих стресу, були отримані Лоскутовою Л.В. [17]. Також на те, що незавершений грумінг вказує на його стресорний характер, звертає увагу Калугев А. В. [18]. Усі ці зміни свідчать, що у цій групі емоційний статус тварин, які опинилися у нових умовах, характеризується вираженою реакцією тривоги з фобічним компонентом.

Дослідження поведінки самців групи Стрес + ФЕ порівняно з групою Контроль показало, що мали місце аналогічні зміни. У тварин спостерігалось збільшення кількості заглядань униз із закритих (на 58%, $P < 0,05$) та відкритих рукавів (на 66,5 %, $P < 0,05$), а також частоти грумінгу (на 66,7 %, $P < 0,05$). В той же час знижувалась кількість стійок (на 62,5 %, $P < 0,05$). За дослідженими показниками статистично достовірних відмінностей між групами Стрес та Стрес + ФЕ нами не виявлено.

Таблиця

Показники рівня тривожності щурів у ПХЛ, які у післянатальний період життя були піддані стресу та отримували сполуки з естрогенною активністю

Показник	Група			
	Контроль (n=8)	Стрес (n=10)	Стрес+ ФЕ (n=11)	Стрес+E2 (n=12)
самці				
Кількість виходів у відкриті рукава	1,4±0,3	1,6±0,3	1,8±0,4	0,8±0,3
Кількість стійок	4,0±0,6	1,8±0,5 ^{a)}	1,5±0,5 ^{a)}	2,0±0,6 ^{a)}
Кількість заглядань униз із закритих рукавів	1,4±0,56	2,3±0,3 ^{a)}	3,3±0,7 ^{a)}	2,1±0,4
Кількість заглядань униз з відкритих рукавів	0,4±0,4	2,2±0,6 ^{a)}	2,9±1,3 ^{a)}	0,7±0,4 ^{b)}
Кількість переходів через центр майданчика	3,4±0,3	4,5±0,7	4,1±0,7	4,8±0,8
Кількість грумінгів	0,4±0,3	1,8±0,5 ^{a)}	1,2±0,3	0,7±0,3 ^{b)}
Кількість дефекацій	0,4±0,3	2,8±0,7	1,0±0,4	1,0±0,5
Кількість урінацій	0,0±0,0	0,3±0,3	0,5±0,2	0,1±0,1
Латентний період заходу до закритого рукава, с	35,9±7,8	47,6±22,0	43,6±19,5	34,7±9,6
Час у відкритих рукавах, с	37,0±12,5	47,5±21,2	46,9±18,7	21,3±8,4
самки				
Кількість виходів у відкриті рукава	0,8±0,3	1,0±0,4	1,0±0,2	1,3±0,3
Кількість стійок	2,8±0,6	2,3±1,0	5,3±1,1	2,5±0,5
Кількість заглядань униз із закритих рукавів	2,2±0,3	3,0±0,7	3,3±0,7	2,5±0,6
Кількість заглядань униз з відкритих рукавів	0,8±0,3	0,3±0,3	0,9±0,4	0,9±0,41
Кількість переходів через центр майданчика	3,6±0,8	4,7±0,9	4,7±0,4	4,1±1,0
Кількість грумінгів	1,1±0,3	0,7±0,5	1,1±0,3	1,2±0,3
Кількість дефекацій	0,0±0,0	0,3±0,3	0,6±0,4	0,4±0,3
Кількість урінацій	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Латентний період заходу до закритого рукава, с	22,3±3,4	49,3±19,8	25,7±7,3	47,9±11,4 ^{b)}
Час у відкритих рукавах, с	20,0±9,9	23,7±10,5	12,5±3,5	31,1±8,2

Примітка. ^{a)} статистично достовірні відмінності від показників групи Контроль; ^{b)} – від показників групи Стрес та Стрес+E2; ^{a)} – між групами Стрес+ ФЕ та Стрес+E2

У випадку надходження надлишку E2 на тлі стресу відмічено статистично значуще зниження оцінки ризику – зменшення кількості заглядань униз з відкритих рукавів (на 69,1 %, $P < 0,05$), а також частоти грумінгу (на 62,8 %, $P < 0,05$) порівняно з групою Стрес. Низький рівень грумінгу у цих самців свідчив про низьку емоційність і, ймовірно, про низький рівень страху [18]. Ці зміни говорять про анксиолітичну дію поєданого впливу дії E2 та ситуації стресу, яка носить імпринтинговий характер.

При порівнянні віддалених наслідків комбінованого впливу стресу та того чи іншого чинника з естрогенною активністю було виявлено більш високу кількість виходів у відкриті рукава у щурів групи Стрес+ФЕ порівняно з самцями групи Стрес+E2 (у 2,4 рази, $P < 0,05$). Це дозволяє припустити наявність менш виражених анксиогенних компонентів в поведінці тварин, які отримували з молоком фітоестрогени на тлі стресу.

Тестування у ПХЛ самок щурів контрольної групи показало, що кількість стойок (вертикальна активність) дорівнювала – $2,8 \pm 0,6$ за тест. Кількість заглядань униз із закритого та відкритого рукавів складала $2,2 \pm 0,3$ та $0,8 \pm 0,3$, відповідно. Кількість грумінгів була $1,1 \pm 0,3$. Дефекації та уринацій у цих самок під час знаходження у ПХЛ не спостерігалось.

На відміну від самців, самки щурів, які зазнавали стресу під час фізіологічного молочного вигодовування (група Стрес), реагували на умови ПХЛ практично так же, як інтактні тварини.

При тестуванні в ПХЛ рівня тривожності самок щурів групи Стрес+ФЕ у порівнянні з показниками групи Стрес виявлено статистично вірогідне збільшення кількості заглядань у закриті рукава. За іншими показниками відмінностей не знайдено (див. табл.). У самок групи Стрес+E2 рівень тривожності був аналогічним такому у групах Стрес та Контроль. Тобто, у самок за показниками тривожності ФЕ та E2 не оказують потенціюючого або пом'якшуючого впливу на дію післянатального стресу.

При порівнянні груп самок Стрес+ФЕ та Стрес+E2 було виявлено більш подовжений латентний період заходу до закритого рукава у групі Стрес+E2 (на 86 %, $P < 0,05$) на тлі тенденції до збільшення часу перебування у відкритих рукавах. Це може говорити про дещо знижений рівень тривоги у групі самок, які під час лактації на фоні стресу отримували E2, а не ФЕ. Тобто, можна казати про активацію позитивних систем мозку у цих тварин.

Повідомляють, що естрогени здатні пригнічувати синтез мРНК проопіомеланокортину - попередника АКТГ, призводячи до зменшення доступності та вивільнення АКТГ, тобто жіночий статевий гормон може зменшити розмах стрес-відповіді [19]. Відносно ФЕ, які здатні зв'язуватись з рецепторами до E2 і імітувати його дію, дані суперечливі. Так, показано здатність ізофлавонів змінювати активність гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової вісі та пригнічувати секрецію глюкокортикоїдних гормонів у дорослих щурів [20], хоча за даними інших дослідників у дорослих щурів додавання ФЕ до раціону сприяє зростанню тривожності в стресових умовах [21], що може пояснити отримані результати.

Таким чином, порушення програми становлення поведінки дорослої особини під час критичних періодів онтогенезу внаслідок дії стресу можуть бути модифіковані за умов одночасного впливу сполук з естрогенною активністю. Такий

ефект, що залежить від статі тварин, можливо визначається й силою стрес-фактора. Тому перспективним вважається дослідження різних видів поведінки (статевої, харчової, агресивної, батьківської) та емоційних реакцій на такому модельному об'єкті, як щур, за умов різної насиченості організму глюкокортикоїдами та естрогенами у ранньому постнатальному періоді. Це дозволить виявити деякі причини поведінкових розладів у людини у зрілому віці та патогенетично обґрунтувати шляхи їх профілактики та корекції.

ВИСНОВОК

1. Відокремлення нащадків від матері та вигону, додатковий вплив її тривожної поведінки після експозиції до запаху "чужого" самця у дорослих нащадків чоловічої статі приводять до появи у поведінці компонентів тривожно-депресивного стану. У самок щурів імпринтингової дії емоційного стресу не виявлено.
2. Аліментарне надходження сполук з естрогенною активністю пом'якшує у самців анксиогенну дію емоційного стресу у критичний період фізіологічного молочного вигодовування, що у дорослому віці проявляється меншою тривожністю у нових умовах. У самок такий поєднаний вплив змінами у поведінці у дорослому віці не позначається.

Список літератури

1. Interaction with stressed mothers affects corticosterone levels in pups after reunion and impairs the response to dexamethasone in adult mice / A. Moles [et al.] // *Psychoneuroendocrinology*. – 2008. – Vol. 33, № 4. – P. 462–470.
2. Cerebrospinal fluid concentrations of biogenic amines and corticotropin-releasing factor in adolescent non-human primates as a function of the timing of adverse early rearing / S.J. Mathew, J.D. Coplan, E.L. Smith [et al.] // *Stress*. – 2002; – Vol. 5. – P. 185–193.
3. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research / C.R. Pryce, Ruedi- D. Bettschen, A.C. Dettling [et al.] // *Neurosci Biobehav Rev*. – 2005. – Vol. 29. – P. 649–674.
4. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid / S.M. Engel, B. Levy, Z. Liu [et al.] // *Reprod. Toxicol*. – 2006. – Vol. 21. – P. 110–112.
5. Patisaul, H.B. Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ERbeta agonist increases adult anxiety and aggression in gonadal intact male rats / H.B. Patisaul, H.L. Bateman // *Horm. Behav*. – 2008. – Vol. 53. № 4. – P. 580-588.
6. Effects of Genistein or Soy Milk During Late Gestation and Lactation on Adult Uterine Organization in the Rat [Text] / C. L. Hughes, G. Liu, S. Beall [et al.] // *Experim. Biol. Med*. – 2004. – № 229. – P. 108-117.
7. Nilsson, R. Endocrine modulators in the food chain and environment [Text] / R. Nilsson // *Toxicol. Pathol*. – 2000. – Vol. 28, № 3. – P. 420–431.
8. Moles, A. Postnatal stress in mice: does "stressing" the mother have the same effect as "stressing" the pups? [Text] / A. Moles, R. Rizzi, F. R. D'Amato // *Dev. Psychobiol*. – 2004. –Vol. 44, № 4. – P. 230–237.
9. 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.
10. Вивчення складу соєвого продукту Genistein Soy Complex хроматографічними методами / А.І. Гладкова, Ф.Г. Яременко, Л.Є. Нікішина, С.В. Кравченко // «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології»: Матер. наук.-практ. конф. Харків, 3-4 бер. 2011 р. Харків. - 2011. – С. 29-30.

11. Effects of Dietary 17beta-Estradiol Exposure on Serum Hormone Concentrations and Testicular Parameters in Male Crl:CD BR Rats / J. C. Cook, L. Johnson, J. C. O'Connor [et al.] // *Toxicol. Sciences.* – 1998. – Vol. 44. – P. 155–168.
12. Влияние фитоэстрогенов 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.
13. File, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression / S. E. File // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1996. – V. 54, № 1. – P. 3–12.
14. Лакин, Г. Ф. Биометрия : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
15. Rodgers, R.J. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors / R.J. Rodgers, J.C. Cole // *Physiol. Behav.* – 1993. – Vol. 53. – P. 83–388.
16. Картавцева, О.В. Вплив стресу харчової депривації та гіпокінезії на показники тривожності в самиць щурів-нашадків гестаційно стресованих матерів / О.В. Картавцева, Л.Ю. Сергієнко, О.В.Перець // *Проблеми ендокринної патології.* - 2010. - № 4. – С. 78-84.
17. Лоскутова, Л.В. Сверхмалые дозы антител к белку S100 и пептиду дельта-сна: эффективность при депрессивно-тревожном состоянии у крыс / Л.В. Лоскутова, М.Б. Штарк, О.И. Эпштейн // *Бюл. Эксперим. Биологии и медицины.* – 2003.- Приложение. С. 24-26.
18. Калуев, А.В. Разбор груминга в нейробиологических исследованиях: нейрогенетика, нейрофармакология и экспериментальные модели стресса / А.В. Калуев // *Нейронауки.* - 2006. – Т. 4, № 6. - С. 27-30.
19. Redei, E. Fast glucocorticoid feedback inhibition of ACTH secretion in the ovariectomized rat: effect of chronic estrogen and progesterone / E. Redei, L. Li, I.Halasz [et al.] // *Neuroendocrinol.* – 1994. - Vol. 60, № 2. - P. 113-23.
20. Genistein affects the morphology of pituitary ACTH cells and decreases circulating levels of ACTH and corticosterone in middle-aged male rats / V.Z. Ajdzanovi, B.T. Sosi-Jurjevi, B.R. Filipóvi, [et al.] // *Biol Res.* – 2009. - Vol 42, № 1. – P. 13-23.
21. Ермакова, И.В. Адаптивные процессы при решении когнитивных задач крысами с разным уровнем и типом тревожности / И.В. Ермакова, В.А. Глазкова // *Современ. пробл. науки и образования.* – 2008. – № 6. – С. 20.

Карпенко Н.А. Уровень тревожности взрослых крыс, подвергнутых в ранний постнатальный период действию стресса и соединений с эстрогенной активностью / Н.А. Карпенко, Н.П. Смоленко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 136-142

Исследован уровень тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у взрослых крыс обоего пола, матери которых в период лактации получали с кормом вещества с эстрогенной активностью и/или подвергались стрессу отделения от выводка. У самцов импринтинговыми последствиями стресса были проявления тревожно-депрессивного состояния. Этот анксиогенный эффект стресса смягчался в случае поступления с молоком соединений с эстрогенным действием. У самок манипуляции во время молочного вскармливания не меняли поведение во взрослом состоянии.

Ключевые слова: стресс, фитоэстрогены, эстрадиол, подсосный период, тревожность, крысы.

Karpenko N.O. The level of anxiety of adult rats were stressed and feed substances with estrogenic property at early postnatal period / N.O. Karpenko, N.P. Smolenko // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 2. – P. 136-142.

The level of anxiety of adult rats which were exposed to maternal separation stress or abundance of substances with estrogenic property during suckling has been examined. The imprinting anxiety-depressing events had been found out in adult males from the Stress group. The weakening of this anxiogenic effect of stress is observed at males were exposed to both stress and substances with estrogenic property. The manipulations during suckling have not influence on the behaviour of adult females.

Keywords: stress, phytoestrogens, estradiol, suckling, anxiety, rats.

Поступила в редакцию 12.05.2011 г.