

**О.Г. Родинський,
В.А. Гузь,
Л.В. Гузь**

СТАН УМОВНО-РЕФЛЕКТОРНОЇ І ОРІЄНТОВНО-ДОСЛІДНИЦЬКОЇ ДІЯЛЬНОСТІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ АЛОКСАНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

*Дніпропетровська державна медична академія
кафедра фізіології
(зав. – проф., д. мед. н. О.Г. Родинський)*

Ключові слова: алоксан, моделювання ЦД, щури, пам'ять, навчання, поведінка, «відкрите поле», умовна реакція пасивного уникнення (УРПУ)

Key words: *alloxan, diabetes mellitus modeling, rats, memory, training, «open field», conditional reaction of passive avoidance (CRPA)*

Резюме. *В работе рассматривается состояние условно-рефлекторной и ориентировочно-исследовательской деятельности крыс в геронтогенезе в условиях экспериментального сахарного диабета. Для анализа двигательной-исследовательской и эмоциональной активности используется методика «открытое поле». Для изучения лабильной и стабильной фаз памяти используется методика условной реакции пассивного избегания. В обеих возрастных подопытных группах животных определяется значительное и достоверное снижение латентного периода, увеличение количества амнезированных животных, более выраженное в группе животных среднего возраста. Анализ показателей локомоторной и ориентировочно-исследовательской деятельности в обеих возрастных группах также показал значительные и достоверные изменения. Уменьшение количества пересеченных квадратов, количество стоек и обследованных норок также было более выражено у опытных животных среднего возраста.*

Summary. *State of conditionally-reflex and tentatively-research activity of rats in gerontogenesis in conditions of experimentally-induced diabetes mellitus is considered in this work. To analyze locomotor-research and emotional activity “open-field” method was used. To study labil and stable memory phases method of conditional reaction of passive avoidance was used. In both age groups of animals under investigation a significant and reliable decrease of latent period, increase of number of amnesic animals, more expressed in the group of middle age animals was determined. Analysis of findings of locomotor and tentative-research activity in both age groups also showed significant and reliable changes. Decrease of number of crossed quadrates, number of stands and holes investigated was more expressed in middle-aged animals.*

Нейро-гуморальна регуляторна система займає домінуюче місце в процесах адаптації організму до надзвичайних факторів навколишнього середовища, регуляції процесів гомеостазу, репродукції, імунного статусу, та в найбільшому ступені – вищій нервовій діяльності, тобто тих процесів, перебіг більшості з яких суттєво змінюється в процесі старіння [2,4]. Цукровий діабет (ЦД) є яскравим прикладом системних метаболічних розладів за умов гормональної дисфункції та займає одне з головних місць в «омолодженні» захворюваності на ендокринну патологію як в Україні, так і в цілому світі [2,10]. Виходячи з цього, виявляється надзвичайно актуальним комплексне вивчення механізмів розвитку порушень вищих інтегративних функцій мозку за умов ЦД у геронтогенезі.

Незважаючи на велику кількість робіт, присвячених вивченню вищих інтегративних функцій мозку та аналізу їх взаємозв'язків із нейро-гуморальними регуляторними механізмами, велику актуальність становить вивчення механізмів порушень функціонування центральної нервової системи (ЦНС) у геронтогенезі за умов ЦД.

Як відомо, ступінь розвитку та ефективність якості контролю нейро-гуморальної регуляції вищих інтегративних функцій ЦНС знаходяться в прямій залежності з віком [2,7]. У процесі старіння значно пригнічуються пластичність, синаптогенез, зменшується лабільність, що зумовлено, насамперед, віковими змінами структур ЦНС, а саме – зменшенням об'єму тканини мозку, яке відбувається більшою мірою за рахунок білої речовини та найбільш виражене в гіпокампі та

лобних частках [9]. Характерна демієлінізація, зменшення кількості синапсів [7,9]. З віком накопичуються вільні радикали та знижується ступінь захисту від них [10,11], що може мати прояв при різних видах вікасоційованої патології. І, як наслідок, паралельно з цим може розвиватися гіперліпідемія, інсулінорезистентність і, в ряді випадків, виникає гіперглікемія [2,4].

Висока функціональна і метаболічна активність головного мозку зумовлює високі потреби його нейронів у глюкозі. Незважаючи на те, що надходження глюкози в клітини головного мозку при ЦД підвищене, адекватне забезпечення процесу живлення нервових клітин в умовах хронічної гіперглікемії різко порушується. Активування поліолового шляху метаболізму призводить до накопичення сорбітолу в нервових клітинах, що сприяє розвитку осмотичного стресу, спричиняючи негативні зміни функціонального стану нейронів [2,7].

Мета роботи: враховуючи важливу роль інсуліну та рівня глюкози для всіх рівнів ЦНС, виявляється доцільним розглянути закономірності умовно-рефлекторної та орієнтовно-дослідницької діяльності щурів за умов ЦД, особливо у віковому аспекті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експерименти проведено на 90 щурах лінії Вістар, які утримувалися в стандартних умовах віварію. Тварини були представлені двома віковими групами (за класифікацією І.П. Западнюка, 1983 р.) – 6-7 місяців (далі «щури середнього віку») з вагою 140 – 160 г., та 18-22 місяці (далі «старі щури») вагою 260 – 340 г. У кожній віковій групі тварини були розділені на інтактних («контроль») та дослідних (з моделюванням ЦД - «ЦД») [5].

ЦД моделювали шляхом інтраперитонеального введення розчину алоксану моногідрату (120 мг/кг, "Sigma"). Відтворення ЦД контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали за допомогою портативного глюкометра "Bionime". На 10-й день відбирали тварин, що мали стійку гіперглікемію із показником глюкози периферичної крові вище ніж 28 ммоль/л (еуглікемія щурів обох вікових груп становить 5,05 – 6,88 ммоль/л).

Для аналізу рухово-дослідницької та емоціональної активності за умов експериментального ЦД методика "відкритого поля" є найбільш адекватною та інформативною [1,3]. Згідно з даною методикою, в експерименті використовували майданчик розміром 60 см×60 см з розкресленими на ньому 25 квадратами та 16

"нірками" в центрі кожного квадрата. У процесі спостереження, яке тривало 3 хвилини, реєстрували рухову горизонтальну та вертикальну активність (кількість перетнутих квадратів та кількість підйомів на задні лапки відповідно), дослідницьку (число заглядань у "нірки") та емоційну (грумінг та число болісних дефекацій) активність [1,3].

У тварин для вивчення лабільної і стабільної фаз пам'яті використовували класичну методику умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ), згідно з якою формування умовного рефлексу базується на інстинктивному намаганні тварини знаходитись у темному приміщенні [1]. Використовували камеру, що складалася з великого освітленого та малого темного відсіків, сполучених отвором у вигляді "нірки". Тварини становили в центрі світлого відсіку хвостом до отвору. Щурів без вираженого ніркового рефлексу (спостереження протягом 3 хвилин) у дослід не брали. При дослідженні освітленого відсіку щур знаходив "нірку" і проникав до неї. Через 0,5-1 секунду після заходу щура в "нірку" на електрифіковану підлогу темної частини камери подавався змінний струм (частота 50 Гц, тривалість стимулів 10 мс.) інтенсивністю, рівною 1,5 больовим порогам, поки тварина не покидала "нірку". Якщо протягом 3 хвилин тварина, що перебігла у світлий відсік, не намагалася повернутися в темну камеру, УРПУ вважалася виробленою з одного пред'явлення. Щурів, що повторно заходили в темний відсік протягом 180 секунд, виключали з досліду. Щури, які протягом 3 хв. знаходилися в освітленому відсіку, складали групу «неамнезованих» тварин, тобто таких, які не зберегли енграму сліду пам'яті. Больовий поріг визначали індивідуально для кожної тварини, по реакції вокалізації у відповідь на електричне подразнення шкіри кінцівок.

Формування УРПУ проводили на десяту добу після моделювання ЦД. Дослідження пам'яті проводили за тестом відтворення виробленої УРПУ через 24 години.

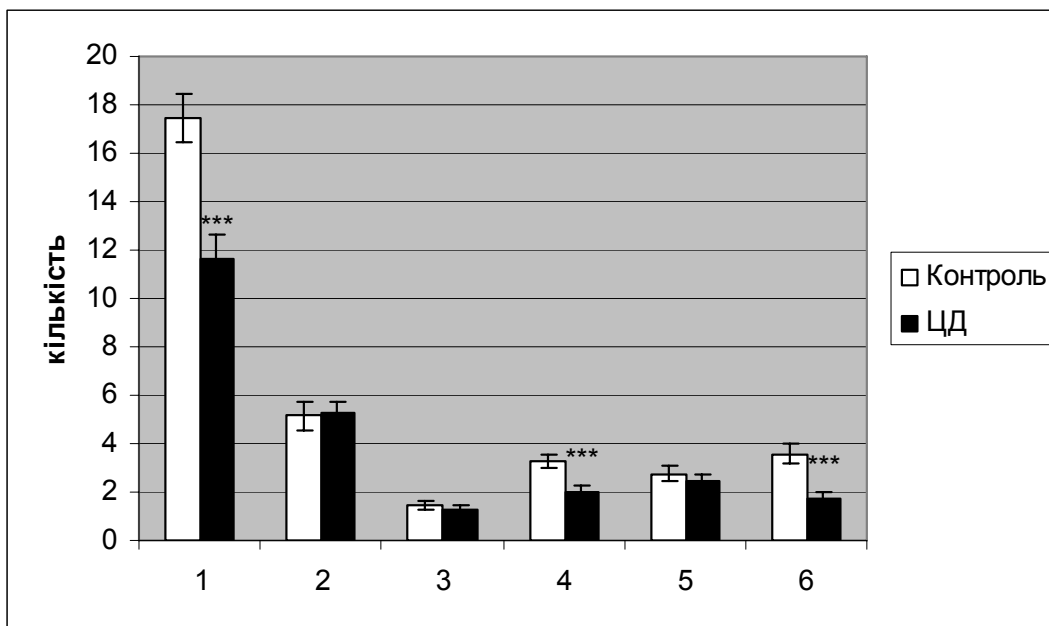
Отримані результати опрацьовували статистично з використанням t-критерію Стьюдента та визначенням нормальності розподілу значень досліджуваного ряду [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

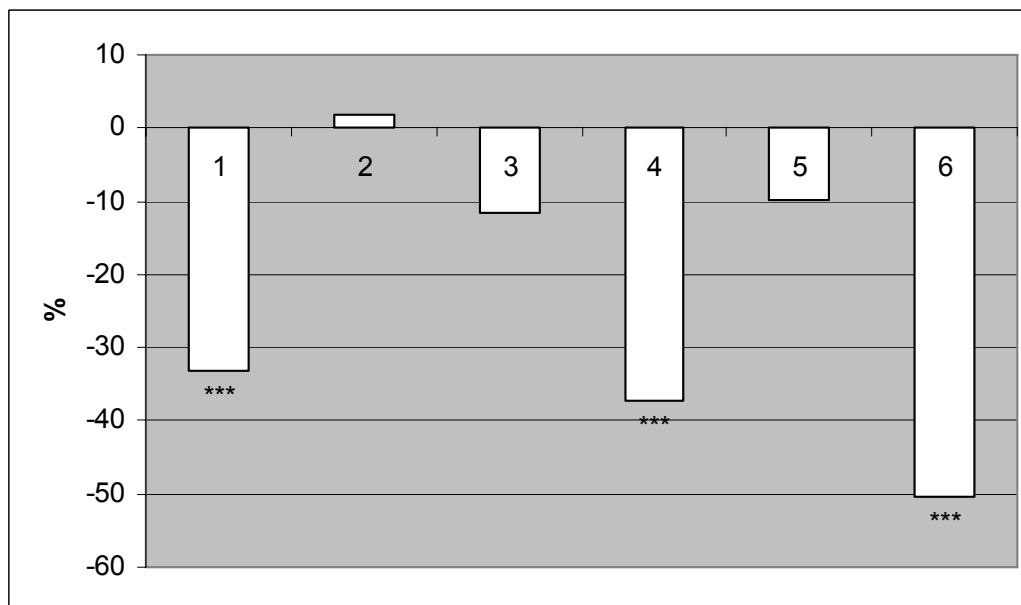
Аналіз орієнтовно-дослідницької діяльності щурів обох вікових груп показав низку змін показників поведінки. За умов ЦД показники локомоторної активності свідчили про значне та достовірне зменшення горизонтальної активності тварин із ЦД середнього віку, в групі яких

кількість пройдених квадратів становила в середньому $11,68 \pm 0,92$, що по відношенню до контрольної групи було менше на 33,07% ($p < 0,001$) (рис. 1А.1). У групі старих тварин ці дані не були достовірними ($p > 0,05$). Показники рухової активності склали $9,44 \pm 0,63$ за умов розвитку ЦД та $8,15 \pm 1,02$ у контролі (рис. 2А). Вертикальна рухливість обох вікових груп тварин суттєво змінювалась та мала достовірний харак-

тер ($p < 0,001$). Більш виразними виявились зміни в групі щурів середнього віку (рис. 1Б). Кількість стійок дослідної групи становила $2,04 \pm 0,24$, що по відношенню до контрольної групи було менше на 37,23% ($p < 0,001$) (рис. 1А), а в групі старих щурів із ЦД аналогічний показник склав $2,6 \pm 0,19$, що по відношенню до контрольної групи було менше на 23,53% ($p < 0,05$) (рис. 2Б).



А



Б

Рис. 1. Показники орієнтовно-дослідницької діяльності групи щурів середнього віку в тесті "відкрите поле" за умов експериментального ЦД. Примітки: середнє значення та похибка середнього $M \pm m$; * – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності $p < 0,001$**

1 – периферичні квадрати; 2 – внутрішні квадрати; 3 – болюси дефекацій; 4 – стійки; 5 – грумінг; 6 – нірки.

Показники	М, контроль	М, ЦД	m, контроль	m, ЦД
1 периферичні квадрати	17,45	11,68	1,04	0,92
2 внутрішні квадрати	5,15	5,24	0,59	0,53
3 болюси	1,45	1,28	0,21	0,15
4 стійки	3,25	2,04	0,26	0,24
5 грумінг	2,75	2,48	0,31	0,22
6 нірки	3,55	1,76	0,41	0,24

Зміни показників в тесті «відкрите поле» ЦД до контролю у %

1 периферичні квадрати	-33,07
2 внутрішні квадрати	1,75
3 болюси	-11,72
4 стійки	-37,23
5 грумінг	-9,82
6 нірки	-50,42

Також більш виразною в групі тварин середнього віку була і орієнтовно-дослідницька активність (рис. 1Б), що відбивалось на зменшенні кількості обстежуваних нірок з $3,55 \pm 0,41$ інтактною групу до показника $1,76 \pm 0,24$ експериментальної групи тварин середнього віку (рис. 1А), та з $3,5 \pm 0,40$ до $2,4 \pm 0,25$, відповідно, старих тварин (рис. 2А). Емоційна активність в обох вікових групах змінювалась недостовірно ($p > 0,05$). Кількість актів грумінгу щурів середнього віку дослідної та контрольної груп склали $2,48 \pm 0,22$ та $2,75 \pm 0,31$ відповідно, та в групі старих щурів $2,76 \pm 0,27$ та $2,75 \pm 0,34$ тварин із ЦД та інтактних тварин відповідно (рис 1А та 2А). Показники кількості болюсів групи щурів середнього віку склали в дослідній групі $1,28 \pm 0,15$ та $1,45 \pm 0,21$ в контролі, та $1,68 \pm 0,15$ старих піддослідних та $1,4 \pm 0,22$ інтактних тварин (рис. 1А та 2А).

Визначені відмінності показників локомоторної і орієнтовно-дослідницької активності в групі щурів з експериментальним ЦД вказують на те, що зміни поведінкових реакцій тварин пов'язані, насамперед, із розвитком діабетичної енцефалопатії [8,11].

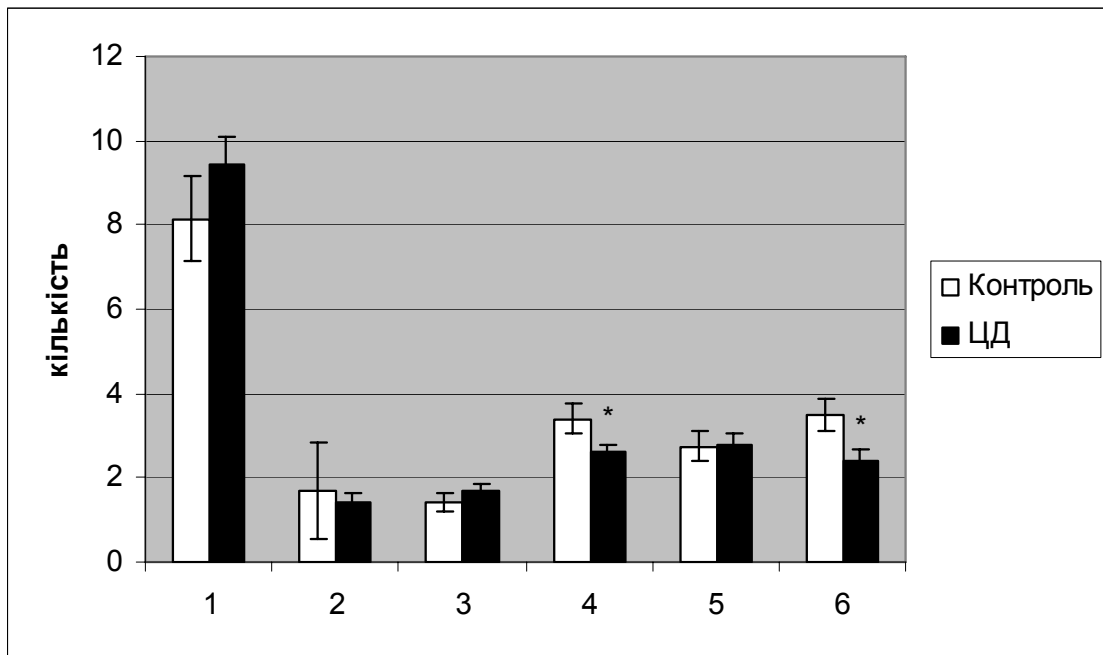
Отримані нами результати стосовно змін локомоторної та орієнтовно-дослідницької активності щурів за умов ЦД підтверджуються даними досліджень, в яких показані суттєві зміни нервових клітин різних ділянок мозку, а саме в коркових ділянках та спинному мозку [7,11]. Дослідники вказують, що за умов ЦД зменшуються маса мозку та об'єм кори, скорочується довжина капілярів, збільшується дифузійна відстань [4,11]. Відбувається редукція цитоплазми та ядра нервових клітин, зміни структури соми,

аксонів і дендритів [4,7]. Відомо також, що порушення утилізації глюкози призводить до погіршення метаболічного стану нейронів і гліальних клітин, викликає погіршення пластичності синаптичних контактів зрілої нервової системи [9,10], призводить до порушення обміну майже всіх медіаторів ЦНС [10,11]. Разом з тим, існують і дані про поліпшення процесів навчання та більш вдале запам'ятовування у тварин з ЦД [11], що можна пояснити збільшенням потреб у споживанні тканинами глюкози за умов даного захворювання і, відповідно, збільшенням мотивації голоду у тварин з ЦД, що викликає високу пошукову активність у структурі їждобувної поведінки [8].

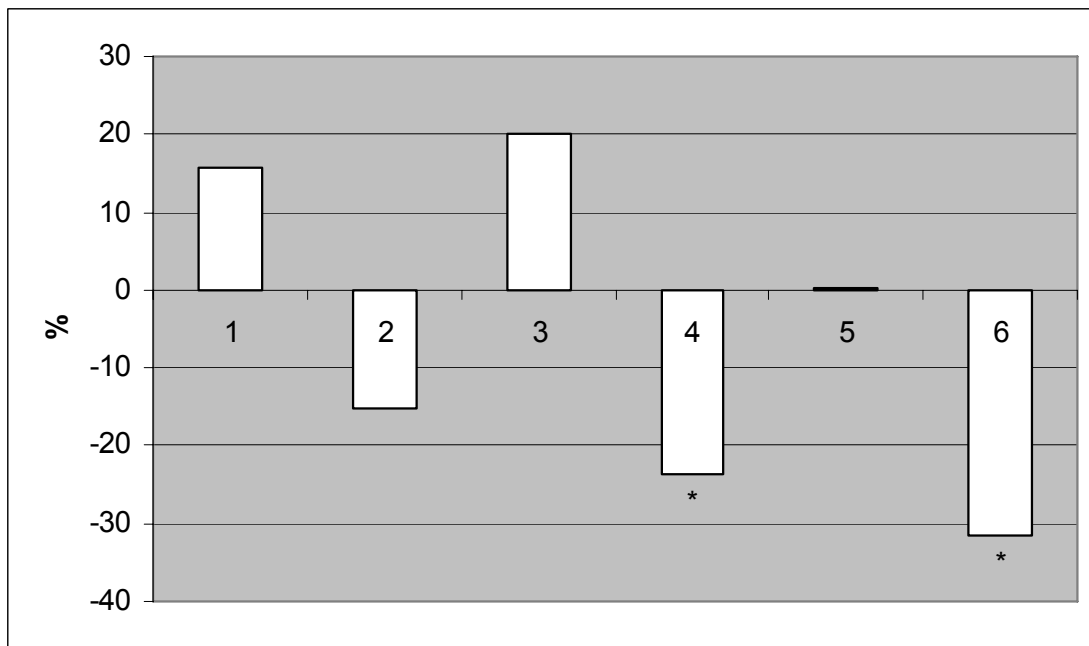
Враховуючи зниження інтенсивності метаболічних процесів за умов фізіологічного старіння та наявність вікових змін структури нервових клітин, поступовий розвиток макро- та мікроангіопатій у процесі геронтогенезу [2,7], можна припустити менш виражений токсичний вплив стану хронічної гіперглікемії та транзиторних гіпоглікемічних епізодів, що супроводжують перебіг ЦД, на когнітивні функції тварин старшого віку, що в нашому дослідженні проявилось менш виразними змінами поведінки в групі старих піддослідних тварин (рис. 2Б).

Тож, зважаючи на наявність зазначених свідчень, можна з високою часткою вірогідності припустити значну роль змін нейрохімічних властивостей нейронів у реалізації поведінкових реакцій та їх порушень [8,9].

Аналіз змін короткотривалої пам'яті дослідних щурів обох вікових груп також засвідчив суттєві та достовірні зміни. Результати дослідження УРПУ наведені в таблиці.



А



Б

Рис. 2. Показники орієнтовно-дослідницької діяльності групи старих щурів у тесті "відкрите поле" за умов експериментального ЦД

Примітки: середні значення та похибка середнього $M \pm m$; * – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності $p < 0,05$; інші примітки такі ж, як на рис. 1.

Показники	M, контроль	M, ЦД	m, контроль	m, ЦД
1 периферичні квадрати	8,15	9,44	1,02	0,63
2 внутрішні квадрати	1,7	1,44	1,13	0,201
3 болюси	1,4	1,68	0,22	0,15
4 стійки	3,4	2,6	0,34	0,19
5 грумінг	2,75	2,76	0,34	0,27
6 нірки	3,5	2,4	0,4	0,25

Зміни показників у тесті «відкрите поле» ЦД до контролю у %

1 периферичні квадрати	15,83
2 внутрішні квадрати	-15,29
3 болюси	20
4 стійки	-23,53
5 грумінг	0,36
6 нірки	-31,43

У дорослих інтактних щурів кількість амнезованих осіб становила 60%, тоді як за умов ЦД їх число зростало до 80% ($p < 0,001$) (табл. 1). При цьому в експериментальних щурів значно зменшувався показник латентного періоду переходу із освітленого в неосвітлений відсік та становив в середньому $89,76 \pm 10,7$ с ($p < 0,001$), на відміну від контрольної групи, де аналогічний показник склав $149,6 \pm 5,88$ с (рис. 3). Також значні зміни спостерігалися в групі старих тва-

рин. У старих інтактних щурів кількість амнезованих тварин становила 65%, тоді як за умов ЦД їх число зростало до 76% ($p < 0,01$) (табл. 1). При цьому в експериментальних щурів значно зменшувався показник латентного періоду переходу із освітленого в неосвітлений відсік та становив у середньому $83,4 \pm 11,33$ с ($p < 0,01$), у контрольній групі аналогічний показник склав $123,9 \pm 9,69$ с (рис. 3).

Показники умовно-рефлекторної реакції пасивного уникнення у щурів середнього віку та старих щурів за умов експериментального цукрового діабету

Група тварин	Кількість амнезованих тварин, %		Латентний період заходу в темний відсік, с	
	щери середнього віку	старі щури	щери середнього віку	старі щури
Контроль (n = 20)	60	65	149,6±5,88	123,9±9,69
Цукровий діабет (n = 25)	80 (p<0,001)	76 (p<0,01)	89,76±10,7 (p<0,001)	83,4±11,33 (p<0,01)

Достовірне зниження ЛП в обох дослідних вікових групах у порівнянні з контрольними вказує на погіршення запам'ятовування подій. Зниження ефективності закріплення умовного рефлексу – стимуляції електричним струмом після входу до темного відсіку беззаперечно може вважатися наслідком діабетичної енцефалопатії, оскільки відомо, що основними патогенетичними чинниками в процесі розвитку мнестичних порушень за умов тривалого перебігу ЦД є, насамперед, порушення процесів обміну, в тому числі безпосередньо в структурах ГМ [9,10].

Менше зростання кількості старих амнезованих тварин дослідної групи може бути пов'язане із формуванням мнестичних порушень, викликаних переважно ураженнями судин головного мозку за типом мікро- і макроангіопатій [4,7].

Виразне підвищення кількості амнезованих тварин в обох вікових групах, найімовірніше, пов'язано із впливом гіпоінсулінемії, яка призводить до зміни структури поведінки в конкретній обстановці, викликає зміни процесів формування функціональної системи при формуванні навичок [8,9].

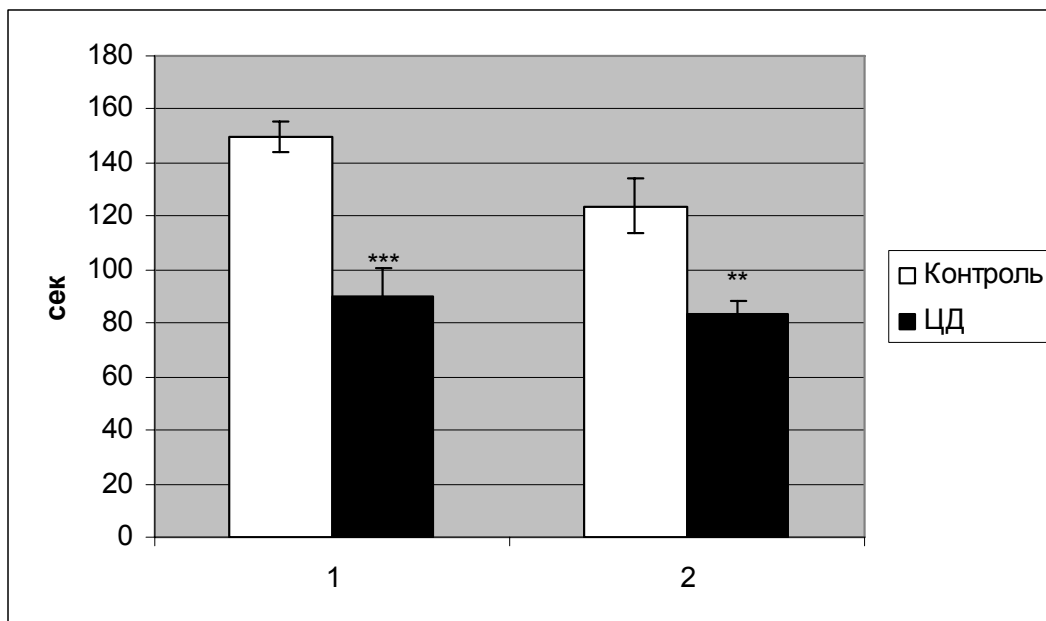


Рис. 3. Показники латентного періоду заходу у темний відсік у тесті УРПУ щурів обох вікових груп

Примітки: середнє значення та похибка середнього $M \pm m$; ** – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності $p < 0,01$; *** – вірогідність результату у порівнянні з контролем при рівні достовірності $p < 0,001$; 1 - щури середнього віку; 2 - старі щури.

	M, контроль	M, ЦД	m, контроль	m, ЦД
щури середнього віку	149,6	89,76	5,88	10,7
старі щури	123,9	83,4	10,48	5,18

ПІДСУМОК

За умов ЦД в обох вікових групах тварин відбувається значне підвищення кількості амнезованих тварин, більш виразне в групі щурів середнього віку. Показники локомоторної та орієнтовно-дослідницької діяльності в обох віко-

вих групах тварин за умов ЦД також достовірно змінювались: зменшення кількості перетнутих квадратів, кількості стійок та обстежених нірок також було більш значним у тварин середнього віку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Базян А.С. Молекулярно-химические основы эмоциональных состояний и подкрепления / А.С. Базян, Г.А. Григорьян // Успехи физиологических наук. – 2006. – Т. 37, № 1. – С. 68 – 83.
2. Двойственная (джокерная) функция глюкозы: изучение связи с возрастом и нарушениями углеводного обмена / Д.А. Васильев, Т.Е. Порошина, И.Г. Коваленко [и др.] // Успехи геронтологии. – 2008. – Т. 21, № 2. – С. 204 – 211.
3. Дмитриева Н.В. Электрофизиологические механизмы развития адаптационных процессов / Н.В. Дмитриева // Физиология человека. – 2004. – Т. 30, № 3. – С. 35 – 44.
4. Коркина М.В. Диабет и когнитивное старение / М.В. Коркина, Е.В. Елфимова // Журнал неврологии и психиатрии. – 2004. - № 3. – С. 80 – 84.
5. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария [и др.]. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
6. Лакин Г.В. Биометрия / Г.В. Лакин. – М.: Выс-
7. Изменения состава протеогликанов мозга крыс с возрастом / Е.Ю. Леберфарб, В.И. Рыкова, Н.Г. Колосова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 12. – С. 691 – 693.
8. Швыркова Н.А. Обучение животных с гипoinsулинемией: системный анализ / Н.А. Швыркова, И.Ю. Зарайская, А.О. Лукашев // Вестник Рос. АМН. – 1994. - № 10. – С. 35 – 40.
9. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes / E.O. Alvarez, J. Beauquis, Y. Revsin [et al.] // Behavioural Brain Res. – 2009. – Vol. 198, Iss. 1. – P. 224 – 230.
10. Kodl C.T. Cognitive Dysfunction and Diabetes Mellitus / C.T. Kodl, E.R. Seaquist // Endocrine Reviews. – 2008. – Vol. 29, N 4. – P. 494–511.
11. Knopman D.S. Cerebrovascular disease and dementia / D.S. Knopman // Br. J. Radiology.-2007.-Vol. 80.-P.121-127.