МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра физиологии человека и зоологии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

Сагадеева Алия Алифовна

Реактивные изменения поведения крыс в динамике эстрального цикла

Выполнила:
Студентка 4 курса очной формы обучения
Направление подготовки
(специальность): Биология
Направленность (профиль): Генетика

Допущено к защите в ГЭК и проверено на
объем заимствования:

Заведующий кафедрой
Д.б.н.,профессор
_____ / Хисматуллина З.Р.
«___» _____ 2017г.

Руководитель
к.б.н.,ст.преп.
_____/ Садртдинова И.И.

Уфа – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……3-4

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……5

1.1 Морфофункциональные изменения женской репродуктивной системы…….5-11

1.2 Понятие эстрального цикла и его этапы……11-13

1.3 Эстральный цикл у крыс…….13-14

1.4 Поведенческие эффекты женских половых гормонов……...14-16

1.5 Поведенческие особенности крыс линии WAG/Rij……...16-17

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……..18

2.1 Объекты исследования……..18

2.2 Методы исследования……..18-26

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ……..27

3.1 Изучение эстрального цикла методом влагалищных мазков……27-29

3.2 Исследование уровня тревожности крыс в зависимости от эстрального цикла……..29-36

3.3 Оценка уровня депрессивности самок крыс в зависимости от эстрального цикла……...36-39

3.4 Оценка когнитивного поведения самок крыс в зависимости от эстрального цикла……...39-41

ВЫВОДЫ……...42

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ……..43-47

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы поведенческие особенности животных привлекают все внимание исследователей и ученых самых различных профессий. Институты физиологии и психологии исследуют поведение человека и животных с помощью разнообразных методов и подходов. Исследователям-зоологам при работе по систематике, исследований по ориентации и адаптации животных необходимо изучение поведения животного мира. При одомашнивании и содержании животноводами сельскохозяйственных животных необходима роль поведенческих особенностей. Кроме того, исследование поведения животных играет важную роль в развитии бионики[35].

Известно, что поведение - это физиологический процесс, представляющий собой адаптивную связь между организмом и окружающей средой. Ответная реакция организма изменяется в связи с изменением среды потому, что организмы взаимодействуют с живой или неживой окружающей средой. Поведение, как мы понимаем, это активные изменения или направленные действия, которые способ-ствуют выживанию[18]. По литературным данным, эстрогены и прогестерон выполняют функцию, которая отвечает за контроль полового поведения. Как писал Бич, поведение самок значительно сложный процесс и его необходимо рассмотреть его в целом[41].

Теоретическую модель, предложенная Лешнером из обзора многочисленных исследований гормонов и агрессивного поведения, учитывает гормональный статус организма, влияние окружающей среды, развитие и свойства самого животного как объекта, вызывающего агрессивную реакцию [51].

Результаты, полученные в различных условиях на крысах разных линий (Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, Fisher 344, WAG/Rij, SHR и др.), показывают существование определенной зависимости поведения от стадии эстрального цикла, что связывается с циклическими изменениями концентрации половых стероидов в плазме и в ткани мозга [11].

Поскольку, железы внутренней секреции и нервная система имеют общие функции коммуникации и координации внутри организма следует обратить внимание на взаимодействие половых гормонов и поведенческих особенностей. Гормоны, которые циркулируют в крови, часто рассматриваются как первичные мотивирующие факторы поведения животных, а измененный их уровень внутренними и внешними факторами отражается на особенностях поведения. Работы, посвященные ориентировочно-исследовательской деятельности занимают основное место в психофизиологических исследованиях. Однако воздействие гормональных факторов на высшие функции головного мозга неоднозначно и характеризуется множественностью физиологических эффектов. Поэтому в настоящее время построение модели, которая отражала бы зависимость между уровнем гормонов в организме и его влиянием на высшие функции мозга, представляется актуальным [35].

Исходя из вышеизложенного, **целью** работы стало исследование поведенческих особенностей крыс линий Wistar и WAG/Rij в зависимости от стадии эстрального цикла.

В соответствии с целью исследования, были были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить регулярность половых циклов у самок крыс линии Wistar и WAG/Rij.
2. Выявить уровни тревожности в динамике эстрального цикла у самок крыс линии Wistar и WAG/Rij.
3. Исследовать уровень депрессивности в динамике эстрального цикла у самок крыс линии Wistar и WAG/Rij.
4. Изучить нарушения когнитивных функций у самок крыс линии Wistar и WAG/Rij в динамике эстрального цикла.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Морфофункциональные изменения женской репродуктивной системы

Яичники – это парный орган, который выполняет эндокринную (продукция половых гормонов) и репродуктивную (формирование женских половых клеток) функции. Они расположены асимметрично на заднем листке широкой связки в малом тазу и прикреплены нижним краем к короткой части мезовария. У каждого яичника имеется две связки: собственная связка яичника связывает яичник с маткой, которая заканчивается несколько ниже и позади маточной трубы и воронко-тазовая связка, которая направляется к боковой стенки таза от верхнего полюса яичника. В них и через мезоварий проходит основная часть нервов, лимфатических и кровеносных сосудов[44].

У яичника функционирование цикличное и, поэтому, его строение зависит от наличия беременности или от стадии эстрального цикла[26].

С наружней стороны, кроме области ворот, яичник покрыт эпителием, которого именуют по-разному покровной, поверхностный, зачатковый, или герминативный [13].

С поверхности яичник окружен плотной волокнистой соединительной тканью - белочной оболочкой, покрытой мезотелием. Остальная часть поверхности мезотелия обеспечена микроворсинками[4].

Яичник состоит из коркового и мозгового вещества. Корковое вещество расположено на периферии яичника и характеризуется наличием овариальных фолликулов. Мозговое вещество свободно от фолликулов и находится посередине яичника. В нем располагаются крупные органные сосуды, распадающиеся на более мелкие и, уходящие в корковое вещество, ветви. Специализированная рыхлая волокнистая соединительная ткань - стромальная часть этих веществ яичника и рпедставляет собой производную мезенхимы[14].

Соединительнотканная строма является основой обоих веществ. В корковом веществе она представлена из межклеточного вещества и лежащих

плотно фибробластов, а в мозговом веществе состоит из большого количества неупорядоченных эластических волокон, гладкомышечных клеток и огромного числа кровеносных сосудов. И преобладающая часть кровеносных сосудов сосредоточена в этом веществе [1,14].

Толщина коркового вещества постепенно возрастает от рождения до репродуктивного периода онтогенеза, а потом медленным темпом уменьшается. Толщина мозгового вещества –в период новорожденности самая наименьшая, а в период старости -наибольшая [50].

Корковое вещество состоит из веретеновидных тесно расположенных клеток, напоминающих набухшие фибробласты, и межклеточного вещества, которого очень мало. Но его тонкая внешняя зона представляет собой полосу коллагеновой стромы, которая содержит относительно мало клеток. Внутренняя зона коркового вещества яичников состоит из фолликулов, являющихся основной структурно-функциональной единицей [9].

Фолликулы подразделяются на примордиальные, первичные, вторичные и третичные(Граафовы), согласно Международной гистологической номенклатуры(1999). Их развитие происходит по схеме: примордиальный → первичный → вторичный → третичный [21]. Начало развития примордиальных фолликулов спиралевидных артерий и примордиальных фолликулов отмечается с периода полового созревания. В репродуктивный период фолликулы расположены в строме коркового вещества, примордиальные – на периферии, а зреющие в более глубоких зонах[25,51].

Примордиальный фолликул состоит из одного слоя плоских фолликулярных клеток ооцита первого порядка. Ооцит - ключевой элемент, основа функционального и структурного единства фолликулярного комплекса [49].

В примордиальных фолликулах гранулезные клетки небольших размеров. В дальнейшем увеличивается число и размеры гранулезы. Они становятся кубическими, цилиндрическими, формируют несколько слоев [27,28].

На начальных стадиях фолликулогенеза изменение размеров ооцита пропорционально росту примордиального фолликула [33]. Первичные фолликулы формированы ооцитом первого порядка, который окружен немногочисленными слоями фолликулярных клеток в виде формы цилиндра или куба. Как только созревает фолликул, его окружают слоями веретенообразные клетки и увеличиваются в объеме, формируясь эпителиоидные. На периферии остаются слои веретенообразных клеток, которые потом сливаются со стромой.

Вторичный фолликул окружен наружней и внутренней текой, полость выстлана гранулезными клетками. В яичнике одновременно развиваются несколько полостных фолликулов, но доминантным становится только один [12,13,24].

Он заполняется фолликулярной жидкостью по мере роста, оттесняет яйцеклетку к одному из полюсов, и превращается в граафов пузырек. В яйценосном холмике располагается яйцеклетка. С верхней стороны она покрывается лучистым венцом, блестящей и зернистой оболочками. [1,12,26].

Яйцеклетка с фолликулярной жидкостью выбрасывается в результате разрастания Граафова пузырька. На месте фолликула после овуляции и выброса яйцеклетки образуется желтое тело [12].

При оценке этапов развития фолликула по основным морфологическим признакам (форма и количество слоев фолликулярных клеток, наличие лакун) выделяют такие группы, как:

-примордиальные,

-вступившие в рост однослойные фолликулы,

-однослойные фолликулы с примордиальными ,

-двуслойные,

-многослойные,

-лакунарные.

Рост и развитие фолликулов делятся на стадии:

1) образование пула растущих фолликулов;

2) рост до стадии антрального фолликула 4-го класса или базальный рост;

3) формирование и развитие доминантного фолликула.

Зависимость первых двух этапов от гипофизарных гонадотропинов является непрямой и опосредована факторами внутрияичников, а заключительный этап регулируется гипофизом напрямую [12]. Роль факторов клеточной адгезии, которые отвечают за межклеточные взаимодействия, несомненна. Интегрины α 3,6, и β принимают участие в миграции первичной половой клетки [47]. Важна роль Е-кадерина и Р-кадерина в агрегации клеток при колонизации урогенитальных гребешков, экспрессирующиеся в предшественниках клеток Сертоли [46]. Факторы клеточной адгезии коннексинов играют важную роль в установлении взаимодействия ооцита и окружающих соматических клеток,а также в образовании фолликулов. По литературным данным, грызуны, у которых дефицит по коннексину CX43, имеют серьезные нарушения в образовании примордиальных фолликулов [56]. Р-селектин играет важную роль на ранних этапах диапедеза лейкоцитов из кровотока во время воспаления [55].

Мозговое вещество яичников обраазовано рыхлой соединительной тканью. Вокруг нервных стволиков и сосудов нередко определяются маленькие пучки из полигональных или округлых клеток эпителиоидного вида. Эти клетки - рудиментарные остатки гонад, проходящих примитивную двуполую фазу развития. Они напоминают интерстициальные элементы яичек из-за выработки стероидов. Фолликулоциты гранулезной оболочки, текоциты внутренней теки, текоцитоподобные клетки стромы являются стероидпродуцирующими клетками яичников [44].

В литературных источниках нет единого мнения о строении стромы яичника. По данным Боровой Т. Г. (1993), строма яичников представляет собой самый «простой вариант» рыхлой соединительной ткани, практически единственными клеточными элементами, которой в корковом и мозговом

веществе являются фибробласты и фиброциты. Помимо этого, в мозговом веществе присутствуют тучные и гладкомышечные клетки, небольшое количество лейкоцитов разной формы. По данным других исследователей строма она представлена двумя видами клеток:

1. веретенообразные, со скудной цитоплазмой, похожие на фибробласты, располагающиеся в плотной сети волокон с различными количествами коллагена;
2. полигональные, с эозинофильной цитоплазмой, свойственными стероидопродуцирующим клеткам ультраструктурными особенностями, богатые липидными включениями [8].

На основании современных представлений, гиалиноз артерий является основным морфологическим признаком стареющей гонады, при этом, вены компенсаторно расширяются. Инволюционный тип строения яичника характеризуется крупнобугристой поверхностью органа, склероз стромы, уплотнение белочной оболочки, малочисленность различных типов фолликул, наличие множества белых и фиброзных тел [28].

Овуляция –это динамическое явление, которое характеризуется воспалительным выбросом макрофагами цитокинов [56]. Однако, точной роли воспалительных и иммунологических событий в овуляции остается невыясненной. Моноциты, макрофаги, ацидофильные гранулоциты, и нейтрофилы, инфильтрируют область, окружающую доминирующий фолликул перед овуляцией. Проникновение лейкоцитов, особенно нейтро- филов, наблюдается в theca слое яичника у человека [52] и крысы непосредственно перед овуляцией. Стромальные макрофаги могут быть вовлечены в регуляцию фолликулярного роста и разрыва, регуляцию эстрального цикла [59].

Только ограниченное число примордиальных фолликулов в яичниках млекопитающих растѐт и дифференцируется, достигая стадии доминантного фолликула и впоследствии овулирует. 99% фолликулов в яичнике подвергаются атрезии на различных стадиях развития. В репродуктивном возрасте атрезия

совместно с формированием доминантного фолликула является одним из проявлений физиологии овариальной функции и фолликулогенеза: в ходе роста фолликулы соревнуются за лидерство, и поступательное развитие продолжают только те из них, которые способны обеспечить оптималь- ное морфофункциональное состояние собственного гистиона. В течение жизни в яичниках человека прогрессивно сокращается содержание половых клеток. Сравнительно небольшой процент этой убыли связан с созреванием и овуляцией ооцитов в репродуктивном периоде, и значительно больший - с атрезией овариальных фолликулов и гибелью половых клеток, происходящими практически в течение всей жизни. Апоптоз – фундаментальный механизм фолликулярной атрезии и постовуляторного регресса у млекопитающих [61].

Со временем наступления половозрелости половые органы самки подвергаются циклическим изменениям, протекающим в организме при участии нейроэндокринных стимулов и находящихся под влиянием факторов внешней и внутренней среды, которые, вероятно, оказывают влияние на формирование женских половых органов[28].

В результате большого количества антропогенных влияний число экологически зависимых патологических нарушений в женской репродуктивной системе растет. Как уже известно, по данным Губаревой Л. И. (2001), в яичниках крыс, которые подверглись воздействию сульфида и кадмия, значительная часть фолликулов на разных фазах созревания погибают. Следовательно, яичник- это уникальный орган, где происходит постоянное изменение микроциркуляторного русла в течение жизни женщины, перестройка компонентов внеклеточного матрикса, транспорт лейкоцитов и тучных клеток, рост и развитие различных функциональных структур: малых, средних, больших и атретических фолликулов, жѐлтых тел. В соответствии с данными литературы можно прийти к выводу, что генеративная и эндокринная функции яичников регулируются сложным комплексом гуморальных показателей[17].

1.2 Понятие эстрального цикла и его этапы

Под эстральным циклом понимается морфологические изменения, которые происходят циклически в генеративной системе самок, во время которого происходит созревание гамет и их выход в брюшную полость во время овуляции. Регуляцию эстрального цикла обеспечивают гормоны гипоталамо-аденогипофизарной конструкции и женской половой железы. Эстральный цикл делится на четыре фазы: проэструс (предтечка), эструс (течка), метаэструс (послетечка) и диэструс (межтечка). Каждая из фаз характеризуется определенным функциональным и клеточным составом слизистой влагалища, а также его гладко-мышечного слоя [8].

Подготовительной фазой эстрального цикла является проэструс. Происходит усиление продукции гонадотропоцитами аденогипофиза ФСГ под влиянием либеринов гипоталамуса. На данном этапе они переходят в фазу разрастания и начинается выработка эстрогенов. Их основной целью является матка. На данной фазе наблюдаются следующие изменения – слизистая оболочка начинает набухать и утолщаться, количество железистых клеток резко увеличивается, который начинают образовывать жидкий секрет, при этом происходит углубление желез и их разветвивание [36].

Следующая фаза – это фаза эструса. В крови по понятию обратной связи начинается нарастание концентрация эстрогенов,повышение продукции в гипоталамусе статинов. При этом происходит подавление секреции ФСГ и люлиберинов, следовательно, секреция лютеинизирующего гормона (ЛГ) начинается в гонадотропоцитах аденогипофиза . В результате того, что произошел рост концентрации в крови ЛГ, разрываются стенки зрелого фолликула в женской половой железе. Происходит овуляция, следствием чего в крови скапливаются эстрогены. Особенностью эструса является видовая специфика. В это время из наружных половых органов обильно выделяется слизь, когда матка готова принять зародыш [36].

Третьей фазой является метаэструс. Во время данной фазы в том месте, где лопнул зародыш образовывается желтое тело, основной целью которого является выработка прогестерона. Его основной целью является матка, в которой уже наблюдаются выраженные изменения в эндометрии. Эндометрий имеет наибольшую величину в периоде роста желтого тела. При этом железы становятся более глубокими и развлетленными. Гландулоциты начинают выделение густого секрета, который насыщен глюкогеном. В сосудах эндометрия наблюдается переполнения крови. Матка находится на стадии ожидания зародыша [36].

Последней стадией эстрального цикла является диэструс. В случае, если желтое тело не оплодотворилось, оно начинает увядать. Количество прогестерона в крови снижается, и описанные ранее процессы начинают протекать в обратном порядке.

Таким образом, в аденогипофизе продукции ЛГ и ФСГ протекают не в одно и то же время, в связи, с чем в яичнике секреция эстрогена последовательно сменяется продукцией прогестерона и, наоборот, в результате чего в половой системе самок протекают циклические изменения.

1.3 Эстральный цикл у крыс

Интервал эстрального цикла у мышей и крыс составляет 4-6 дней. Эстральный цикл продолжатся до наступления беременности. Во время беременности, протекающей 19-20 дней деятельность полового аппарата не наблюдается. У крыс наступает течка на следующий день. После этого наступление эстрального цикла происходит только после завершения периода лактации [19].

Если процесс спаривания не закончился оплодотворением, либо в результате проведенного эксперимента наблюдается ложная беременность, то в матке и влагалище наблюдается изменения, длительность которых составляет 11 суток. значительные изменения влагалищных мазков и эпителия матки на морсикх свинках показали Stockard и Papanicolaou .

Когда влагалище находится в стадии покоя, оно покрыто слоями плоского эпителия. Вагинальные мазки содержат большой уровень лейкоцитов и малое количество эпителиальных клеток с ядрами.

В период течки клетки верхнего слоя слизистой оболочки влагалища отшелушиваются и происходит потеря ядер. В пробах мазка, которые были сделаны во время течки, находится достаточно большое количество данных чешуйчатых клеток. При этом наблюдается усиление секреции влагалищных желез.

Когда наступает стадия послетечки видно, что лейкоцитарная инфильтрация стенки влагалища исчезает на стадии покоя. После чего в мазках можно наблюдать не большое количество клеток эпителиальных и большое число лейкоцитов.

Те изменения, которые были описаны, сопровождаются теми или иными видоизменениями матки. Во время предтечки она растет, железы ее расширяются и начинают выделять жидкость, растягивающая орган. после происходит дегенерация маточного эпителия и лейкоцитарная инфильтрация эндо- и миометрия. После этого лейкоциты исчезают, эпителий восстанавливается и у эндометрия образуется способность формирования децидуальных клеток при последующем спаривании.

1.4 Поведенческие эффекты женских половых гормонов.

Женский половой гормон - эстроген, вызывающий у женского пола ощущение благополучия и удовлетворения, обуславливающий манеру поведения (стремление нянчить свое потомство и защищать свое гнездышко). Эффект эстрогенов на ЦНС делится геномный и негеномный. При первом влияние действия женских половых гормонов проходит через синаптические контакты и мозговые структуры с помощью специфических рецепторов. Стероиды, которые циркулируют в крови, влияют на функции комплекса, участвующего в

организации висцеральных, мотивационных и эмоциональных реакций организма. Геномные эффекты постоянны и контролируют нейронную архитектонику. Негеномные эффекты эстрогенов затрагивают механизмы нейропередачи: изменение концентрации и доступности серотонина и норадреналина, увеличение времени деградации моноаминоксидазы (фермент, метаболизирующий и усиливающий транспорт серотонина), вытеснение триптофана из связанного состояния с альбумином плазмы, что повышает число свободного триптофана, поступающего в мозг, где и превращается в серотонин. Подтверждение важности этих моноаминных нейротрансмиттерных систем в регуляции настроения есть заслуга влияния женских половых гормонов на обмен норадреналина и серотонина в центральной нервной системе. Они оказывают серотонинэргический эффект (повышение активности серотонина). Ряд научных исследований указывают на положительный эффект применения заместительной гормональной терапии на настроение и чувство общего благополучия у женщин в постменопаузе, включая женщин с отсутствием психологических симптомов. Также выявлено, что женские половые гормоны купируют такие симптомы, как тревогу, снижение самооценки и депрессивное настроение. Эстрогены оказывают влияние на ЦНС, и на психическую сферу в частности, посредством нескольких механизмов. Одним из них является прямое психотропное (психостимулирующее и антидепрессивное) действие эстрогенов за счет их серотонинэргического и адренергического эффектов. С другой стороны, вследствие уменьшения вазомоторных симптомов (приливов жара, потливости) улучшается общее самочувствие и психическое состояние пациенток («домино-эффект») [16].

Существуют еще гормон, влияющий на состояние женщины,-прогестерон. Известно, что среди хорошо изученных эндокринных и репродуктивных эффектов, он играет главную роль в регуляции пластических процессов в головном и спинном мозге, периферической нервной системе. Также установлено, что он синтезируется в одинаковых концентрациях у мужского и

женского пола в глиальных клетках и нейронах центральной и периферической нервной системы. Его метаболиты связываются с теми же рецепторами, которые опосредуют эффекты противотревожных средств (бензодиазепиновых транквивлизаторов) – ГАМК-А/бензодиазепиновым рецепторным комплексом, и оказывают психотропное действие на организм женщины, что нашло свое место в лечении некоторых форм депрессии, агрессии, мигрени. Активация ГАМК-рецепторов ведет также к улучшению питания нервной ткани. Когда в конце месячного цикла резко снижается секреция прогестерона, ослабляется трофическая функция ЦНС, что проявляется в повышенной утомляемости, раздражительности, расстройствами настроения, среди которых преобладают чувство беспричинной тревоги. С резким падением продукции прогестерона по окончанию беременности связано и повышение частоты депрессивных состояний в послеродовом периоде. Производные прогестерона в гормональных контрацептивах оказывают гипнотический эффект, который используется для лечения предменструального синдрома и психологического стресса [32].

Специфической общепризнанной поведенческой реакцией на стресс является груминг .По данному параметру можно оценить нейрогуморальные изменения в организме. Анализируя характер влияния женских половых гормонов различного происхождения на груминговую активность крыс с исходно разным уровнем активности, выявлено, что естественный женский стероид эстрон стимулирует груминг у низкоактивных крыс и подавляет у средне- и высокоактивных животных. Синэстрол, напротив, не повлиял на груминговое поведение стрессированных крыс. Данный факт указывает на анксиогенное влияние эстрона на низкоактивных в контроле крыс и анксиолитическое – на средне- и высокоактивных стрессированных самцов белых крыс[37].

Учитывая полученные данные, было сделано предположение, что изменения в эстральном цикле и половом поведении обусловлены с дисбалансом эстрогенов

и гестогенов в крови связанным с дефицитом магния. В этой связи сочли целесообразным изучить и процессы зачатия у этих самок [29].

1.5 Поведенческие особенности крыс линии WAG/Rij

В настоящее время в практике поведения клинических исследований используются животные различных линий. Крысы нужны для установления токсичности лекарственных веществ и ядов, широко используются при изучении вопросов питания, проведения биологической стандартизации гормональных препаратов для постановки научных исследований по витаминологии, физиологии, фармакологии, эндокринологии, биохимии и для изучения процессов поведения и других вопросов психологии. Но следует знать поведенческие реакции крыс разных линий.

WAG/Rij – инбредная линия крыс, выведенная из крыс Wistar Albino Glaxo в Великобритании (Wistar Albino Glaxo Laboratory, UK) в 1924г. Позднее эта линия крыс была ввезена в Нидерланды (REPGO Institute of TNO at Rijswijk, The Netherlands). WAG/Rij означает Wistar Albino Glaxo/Rijswijk (Саркисова К.Ю., 2005). Крысы линии WAG/Rij – результат скрещиваний более 130 поколений (Depaulis A., van Luijtelaar G., 2006).

Известно, что один из патогенетических механизмов эпилептической активности у крыс линии WAG/Rij является гипофункция дофаминергической системы мозга [50].

Несмотря на это, механизмы формирующегося снижения активности этой системы нераскрыты. Определено, что дефицит дофаминергической системы у крыс линии WAG/Rij может быть предопределен динамикой функционирования дофаминовых рецепторов [50,53].

Рецепторы D2- самый распространённый тип дофаминовых рецепторов. Они расположены в большем количестве в лимбической системе, в коре головного мозга, в среднем мозге. Стратегия приспособительного поведения

зависит от уровня и функционирования данных рецепторов, которая проявляется в двух формах - активная и пассивная [40].

Таким образом, исследование тревожно-депрессивных состояний в зависимости от уровня половых стероидов при изучении эпилепсии и других патологий нервной системы является актуальным и имеет большое практическое значение. Однако эта область исследований мало изученная и требует детальное выяснение взаимосвязи поведения, эмоциональной реактивности и тревожности с уровнем стероидных гормонов в различных отделах мозга для понимания их нейроактивных и нейроэндокринных функций.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Эксперименты проводились на крысах линии Wistar (n=20) и WAG/Rij (n=20), которые содержались в условиях вивария кафедры физиологии человека и зоологии Башкирского государственного университета, характеризующихся постоянством комнатной температуры (20-22 °C) и уровнем влажности. Животные находились в стандартных пластмассовых клетках по 3-4 особи. Условия содержания для всех крыс были одинаковыми. Клетки, кормушки, поилки и весь необходимый инвентарь систематически обрабатывались с использованием специальных дезинфицирующих средств. В качестве подстилки использовали опилки и мелкую стружку, которые менялись по мере загрязнения, но не реже 1 раза в неделю. Питались в основном зерновой смесью, свежими овощами и творогом. При работе с крысами полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (2000 год).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение стадий эстрального цикла самок крыс методом влагалищных мазков

Мазки из влагалища крыс можно брали двумя способами: с помощью пипетки или ватной палочки. Заранее следует заготовить достаточное количество палочек, так как каждую можно использовать только один раз. На рабочем столе должны находиться емкость с водой, нужное количество обезжиренных предметных стекол и восковой карандаш (маркер использовать не рекомендуется, так как при фиксации препарата надпись растворится). Обезжиривание обычно проводят длительным выдерживанием предметных стекол в растворе этанола с диметиловым эфиром в пропорции 1:1.

Перед взятием мазка ватная палочка погружается в чашку с водой, и капля воды переносится на предметное стекло. Прикасаться пальцами к тампону

нежелательно, так как клетки эпидермиса кожи пальцев, попав мазок, могут нарушить микроскопическую картину. После этого намоченный конец ватной палочки осторожно вводят во влагалище и слегка там поворачивают. Вынув его из влагалища, размазывают захваченную ватой пробу в капле воды, нанесенной на предметное стекло. На стекле подписывают дату взятия мазка и номер крысы.

При систематическом взятии мазков у одних и тех же животных, предпочитают брать пробы глазной пипеткой, во избежание механического повреждения влагалища. Для этого набирается несколько капель воды в пипетку и, неглубоко вводя кончик во влагалище, 1-2 раза выжимают воду из пипетки и насасывают ее обратно. Взятая проба переносится на обезжиренное предметное стекло.

В условиях длительного эксперимента забор влагалищных мазков необходимо проводить в фиксированное время суток [30].

Неокрашенные пробы лучше рассматривать под микроскопом немедленно, так как по мере подсыхания изучение мазка становится более затруднительным. Считается, что более точно мазок распознается в фиксированном и окрашенном препарате [22].

С целью определения ритмичности функционирования яичников, ежедневно анализировали влагалищные мазки. По следующей методике проводили приготовление мазков и анализировали их. Влагалищные смывы брали тонкой глазной пипеткой, помещали на предметное стекло и рассматривали под микроскопом при увеличении в 300 раз в слегка затемненном поле [7]. Эстральный цикл крысы состоит из 4-х фаз: проэструс (предтечка), эструс (течка), метаэструс (послетечка) и диэструс (межтечка, или стадия покоя). Каждой стадии эстрального цикла соответствует определенный клеточный состав влагалищного мазка (табл.1).

После определения фазы полового цикла каждого животного результаты были подвергнуты обработке и анализу.

2.2.2 Тест «Открытое поле»

Самые разные поведенческие тесты используются для изучения количественных и качественных индексов поведения [22]. Одним из самых распространенных тестов, который используется в основном в составе комплекса тестов, является тест «открытое поле». Круглое открытое поле представляет собой арену 1,5 м в диаметре с высотой стенок 0,8 м, дно которой было расчерчено на сектора. В открытом поле выделяли 3 зоны, по которым далее производили оценку всех количественных показателей: центральная зона, зона середины (6 сегментов), периферическая зона (12 сегментов), (рис. 1).

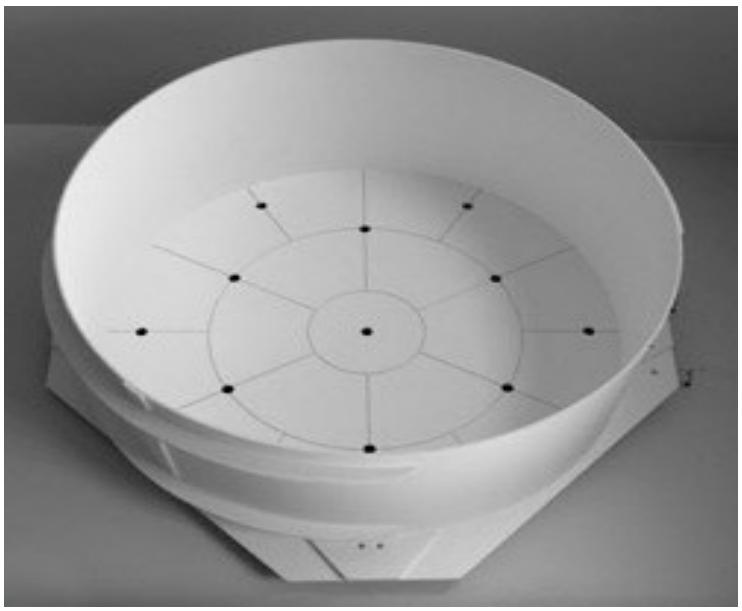

Рис. 1. Круглое открытое поле

Таблица 1. Клеточный состав влагалищного мазка и средняя продолжительность стадий эстрального цикла.

Стадия	Средняя продолжительность в часах	Состав содержимого влагалища
Проэструс	12 ч	Слизь и лейкоциты исчезают,мазок почти исключительно состоит из эпителиальных клеток,слущенных со стенки поодиночно или небольшими группами. Все эпителиальные клетки примерно одинаковой величины,имеют овальную форму на окрашенном мазке видно, что все эпителиальные клетки содержат ядра.
Эструс	27 ч	Одинаковые ороговевшие чешуйки - безъядерные ,ороговевшие клетки. Лейкоциты и эпителиальные клетки с ядрами совершенно отсутствуют. На этой стадии полового цикла нормально происходит спаривание. К концу стадии чешуйки образуют хорошо видимые беловатые скопления.
Метаэструс	6 ч	Среди массы ороговевших клеток (чешуек) появляются лейкоциты. На короткое время могут появиться и эпителиальные клетки, так что в мазке встречаются все 3 типа клеток (чешуйки, эпителиальные клетки и лейкоциты).
Диэструс	Значительно варьирует	Значительное количество слизи. Основную массу клеток составляют лейкоциты

Освещение производилось 2 лампами, мощностью по 60 Вт, которые располагались на высоте 1,5 м от дна камеры над центральными сегментами поля. Все процедуры связанные с тестированием в открытом поле проводились с 14.00 до 18.00.

Крыс помещали в центр открытого поля хвостом к экспериментатору и оценивали двигательную и исследовательскую активность животного. Двигательную активность определяли путем подсчета числа пересеченных животным сегментов. Сегмент считался пересеченным, если крыса переступала через линию передними и задними лапами. Общая двигательная активность вычислялась путем суммирования числа пересеченных квадратов в центре, в середине поля и по его периферии. Неподвижностью (сек.) являлся период замирания животного или пассивного бодрствования. Она характеризовалась полным отсутствием локомоции. При обработке эксперимента выделяли неподвижность до первого двигательного акта в поле – латентный период и неподвижность, зафиксированную в течение сеанса тестирования.

Исследовательскую деятельность определяли путем подсчета совершенных вертикальных стоек в различных зонах поля. За стойку принимали положение животного, когда оно отрывало передние лапы от пола, и оставалось лишь на задних лапах. При этом животное вытягивало шею, часто поворачивая голову, и принюхивалось. Общее количество совершенных стоек подсчитывалось при суммировании стоек, совершенных в центре, в середине и на периферии поля.

За эпизод груминга принимали все периоды времени, когда животное проявляло соответствующее поведение по уходу за собственным телом (умывание, вылизывание, вычесывание). Время, посвященное процессу чистки, фиксировалось по зонам, и затем вычислялся общий показатель длительности груминга. Общее число эпизодов груминга характеризовали его интенсивность. Под общим числом мы понимали количество совершенных актов чистки в различных зонах поля. Вегетативные показатели, определяющие эмоциональный

статус животного, представляли из себя акты уринации и дефекации. Количество дефекаций и уринаций высчитывали по окончанию тестирования каждого животного. Данные за пятнадцать минут суммировали и заносили в таблицу, после вычисляли среднее значение за 5 дней тестирования. Стандартный режим регистрации соблюдался нами в течение всех 5 дней тестирования. Эксперимент проводился в одно и тоже время дня, в затемненной комнате с освещением центральной площадки поля, без постороннего шума и других раздражителей. После тестирования каждого животного поле тщательно обрабатывалось спиртовым раствором и промывалось водой.

2.2.3 Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

«Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) представляет собой площадку, имеющую 2 закрытых (со стенками) и 2 открытых (без стенок) рукава, шириной 10 см и длиной 45 см каждый. Лабиринт располагался на высоте 80 см от пола. В центре расположенных крест-накрест рукавов лабиринта находилась открытая площадка ,размером 10*10 см [12].



Рис 2. Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Животное помещали на данную площадку и в течение 5 минут регистрировали следующие параметры: число заходов на светлое и темное поле, время нахождения в каждом поле, количество совершенных стоек,

неподвижность, частоту уринаций и дефекаций, количество свешивания в светлом рукаве , длительность груминга (сек.),количество эпизодов груминга.

Стандартный режим тестирования сохранялся нами для всех животных. Эксперимент проводился в одно и тоже время дня, без постороннего шума и других раздражителей. После тестирования каждого животного установка тщательно обрабатывалась спиртовым раствором и промывалась водой.

2.2.4 Тест «Вынужденное плавание»

Для оценки уровня депрессивности мы проводили тест «вынужденное плавание» по Порсолту (Porsolt R.D. et al., 1977). Опыты проводились с 13.00. до 17.00. Животных помещали в цилиндрический сосуд (высота 70 см, внутренний диаметр 38 см), заполненный водой на высоту 33 см.: в данных условиях крыса не может ни выбраться, ни найти опору в нем. Температуру воды поддерживали на уровне 25±2ºС. Поведение регистрировали в течение 5 минут.



Рис 3. Установка теста «Вынужденное плавание»

Отмечали основные тестируемые параметры: 1) длительность активного плавания,(сек) (энергичные гребковые движения всеми конечностями); 2) суммарное время иммобилизации,(сек); 3) количество актов груминга; 4) количество ныряний; 5) количество отряхиваний; 6) количество фекальных болюсов. Кроме того, вычисляли индекс депрессивности (ИД), определяемый

отношением числа самых коротких периодов иммобилизации длительностью до 6 сек к общему числу периодов активного плавания [7].

2.2.5 Тест «Экстраполяционное избавление»

В настоящей работе для выявления способности крыс к спонтанному решению иерархических задач мы использовали экспериментальную установку, в определенной степени имитирующую ситуацию неожиданного «застревания в лифте» - тест «Экстраполяционное избавление» (ТЭИ), основанный на свойственной лабораторным грызунам аверсии воды.

Экспериментальная установка предназначена для изучения когнитивных функций грызунов и представляет собой цилиндрическую емкость (диаметр 35см, высота 40 см), наполненную водой с температурой 15°С на глубину 17,5 см от дна. В центре сосуда укреплен прозрачный стеклянный ци- линдр диаметром 9 см, высотой 22 см, нижний край которого погружен в воду на глубину 2,5 см (рис.4). Крыс помещали внутрь цилиндра хвостом вниз и наблюдали за поведением на протяжении 3 мин. Регистрировали латентный период двигательной активности, число безуспешных попыток избегания, реализуемых в форме прыжков, и латентный период подныривания.



Рис 4. Установка "Экстраполяционное избавление" для изучения когнитивных функций грызунов

Если в течение времени наблюдения животное не решало экстраполяционную задачу, его вынимали из установки, демонстрируя способ ее решения.

2.2.6 Метод статистической обработки результатов исследования

Математико-статистическую обработку данных производили с использованием лицензионного пакета прикладных программ «STATISTICA» v.8.0 (Stat Soft Inc., США). В модуле «Основные статистики» («Basic Statistics») по всем изученным количественным показателям были подсчитаны следующие основные характеристики: выборочное среднее (среднее арифметическое, Mean), стандартную ошибку среднего (Standard Error of Mean) и стандартное отклонение (Standard Deviation).

Анализ проводили в программе «Statistica 8.0» в модуле «Базовая статистика/Таблицы» («Basic statistics/Tables») с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Количественные данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – стандартная ошибка средней.

Глава 3. Результаты собственных исследований и их обсуждение

3.1 Изучение эстрального цикла методом влагалищных мазков

Стадии эстрального цикла определяли, исследуя влагалищные мазки, в течение 21 дня ежедневно в 10 часов утра. Изменения влагалищной стенки в течение эстрального цикла отражаются на содержимом влагалища, исследуемом взятием мазка.

Анализ полученных результатов позволил выявить следующие закономерности. У обеих групп крыс прослеживались все фазы: проэструс, эструс, метаэструс и диэструс.

Проэструс (р) – предтечка – характеризуется исчезновением слизи и лейкоцитов, мазок состоял из крупных овальных эпителиальных клеток с хорошо различимыми ядрами. Клетки располагались поодиночно или небольшими группами (рис. 1).

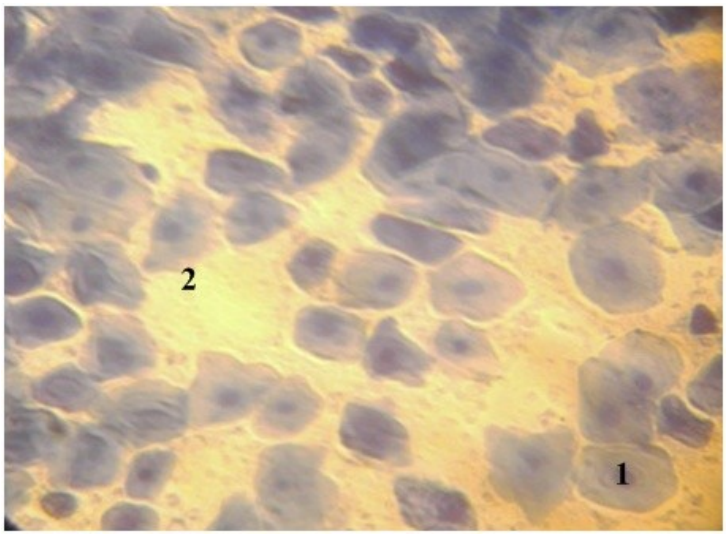

Рисунок 1. Проэструс. Об. 40, ок. 10.Окраска метиленовым синим.
Обозначения: 1 – эпителиальные клетки; 2 - ядра

В фазу эструс (о) – течка – мазок содержал только безъядерные, ороговевшие клетки (чешуйки). Остальные типы клеток совершенно отсутствовали (рис. 2).

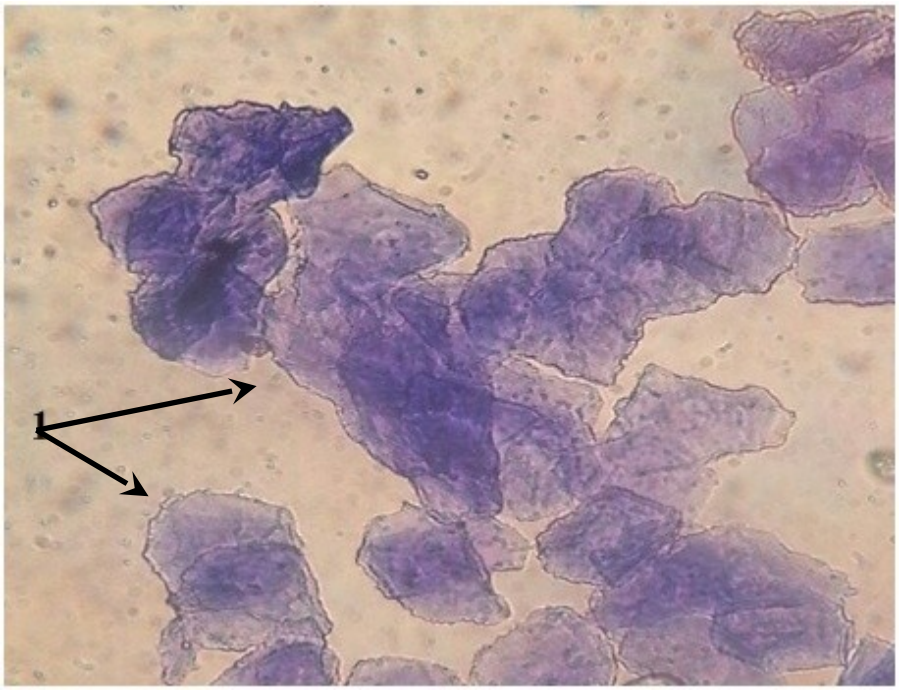

Рисунок 2. Эструс. Об. 40, ок. 10. Окраска метиленовым синим.

Обозначения: 1 – ороговевшие клетки

В фазу метаэструс (m) – «послетечка» – влагалищный мазок состоял из разрозненных клеток всех трех типов: лейкоцитов, эпителиальных клеток, роговых чешуек (рис. 3).



Рисунок 3. Метаэструс. Об. 40, ок. 10.Окраска метиленовым синим.

Обозначения: 1 – лейкоциты; 2 – ороговевшие клетки; 3 – эпителиальные клетки

В фазу диэструс (d) – фаза покоя – влагалищный мазок состоял из множества лейкоцитов, также присутствовало значительное количество слизи (рис 4.)

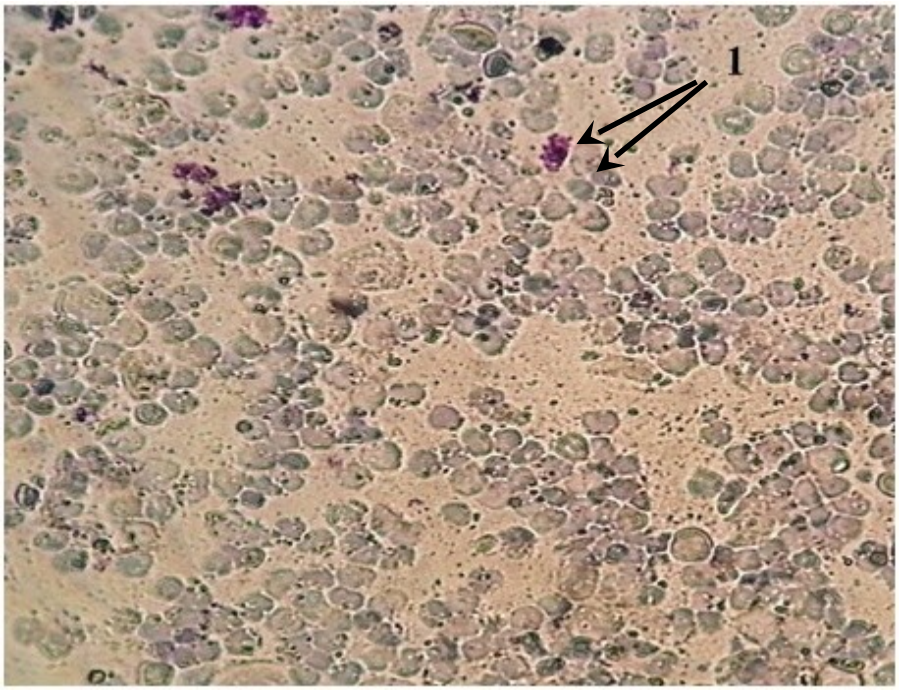

Рисунок 4. Диэструс. Об. 40, ок. 10. Окраска метиленовым синим.

Обозначения: 1 – лейкоциты

Все фазы были последовательны и ритмичны. Продолжительность определенной фазы в каждом цикле была одинакова. Продолжительность циклов колебались в пределах 4-7 дней. Анализ характера эстральной цикличности на протяжении этих дней показал, что самки крыс линии Wistar (75%) имеют регулярные половые циклы, самки крыс линии WAG/Rij характеризовались нерегулярностью половых циклов (70%), только 30% из всей выборки имели регулярный половой цикл.

3.2 Исследование уровня тревожности крыс в зависимости от эстрального цикла

Тест «Открытое поле» - один из известных и часто используемых тестов в мире. Тест «Открытое поле» позволяет исследовать поведенческую активность животных, различные компоненты поведения (исследовательская деятельность, общая двигательная активность, эмоциональный статус).

Из данных литературы известно, что число пересеченных квадратов является показателем двигательной активности крыс. Мы наблюдали увеличение этого показателя, как в центре, так и на периферии (рис.5,6) от проэструса (Wistar-7,08±0,39 и 65,58±11,22; WAG/Rij-16,00±4,58 и 164,00±4,16 соответственно, при $p<0,05$) к эструсу (Wistar-14,00±2,05 и 116,46±29,54; WAG/Rij -23,00±4,00 и 174,00±48,00; соответственно, при $p<0,05$) и постепенное уменьшение в метаэструсе (Wistar -9,38±0,24 и 105,37±24,35; WAG/Rij -8,33±1,67 и 132,00±12,29 соответственно, при $p<0,05$) и диэструсе (Wistar-4,14±0,9 и 72,42±23,65; WAG/Rij -5,50±0,50 и 91,00±15,00; соответственно, при $p<0,05$), что связано со сменой эстрогенной и прогестероновой гормональных фаз.

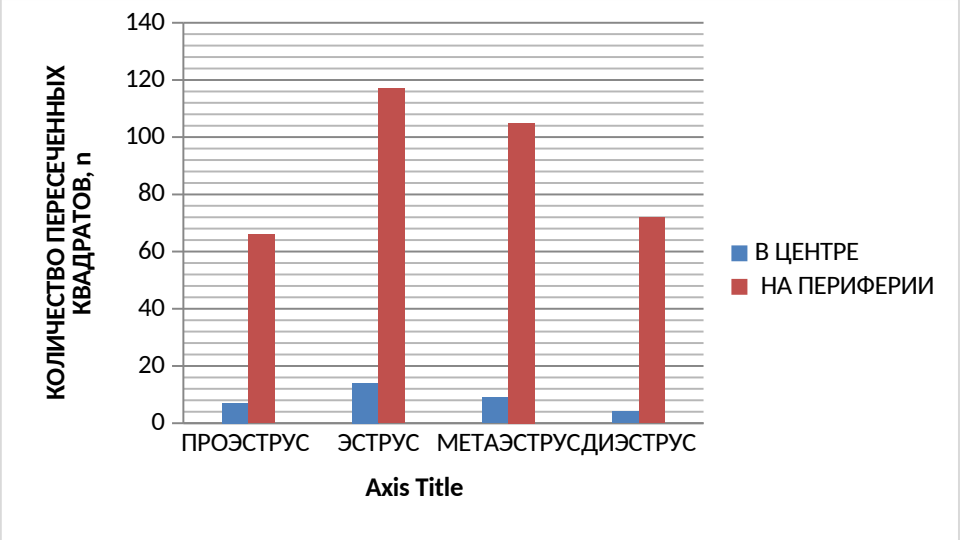

Рис 5. Средние показатели двигательной активности у самок крыс линии Wistar

При сравнении продолжительности латентного периода в тесте «Открытое поле» было установлено, что у самок линии WAG/Rij данный показатель был ниже чем у самок линии Wistar (рис.7). Самые высокие показатели были в стадии диэструс (Wistar -367,43±24,23 сек.; WAG/Rij -117,00 сек.; при $p<0,05$) и самые низкие в стадии эструс (Wistar -107,23±0,75 сек., WAG/Rij -0,00 сек.; при $p<0,05$). Возможно, высокий уровень эстрогенов способствует увеличению подвижности в стадии эструса.

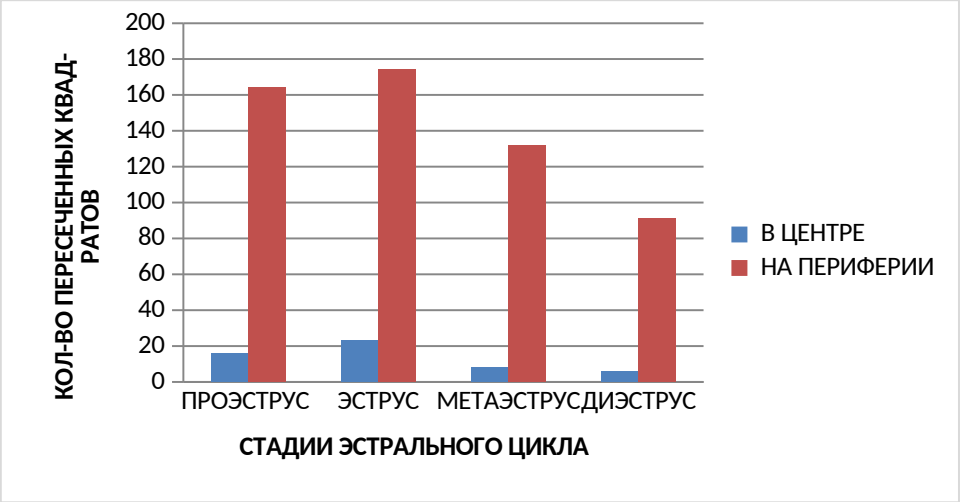

Рис 6. Средние показатели двигательной активности у самок крыс линии WAG/Rij

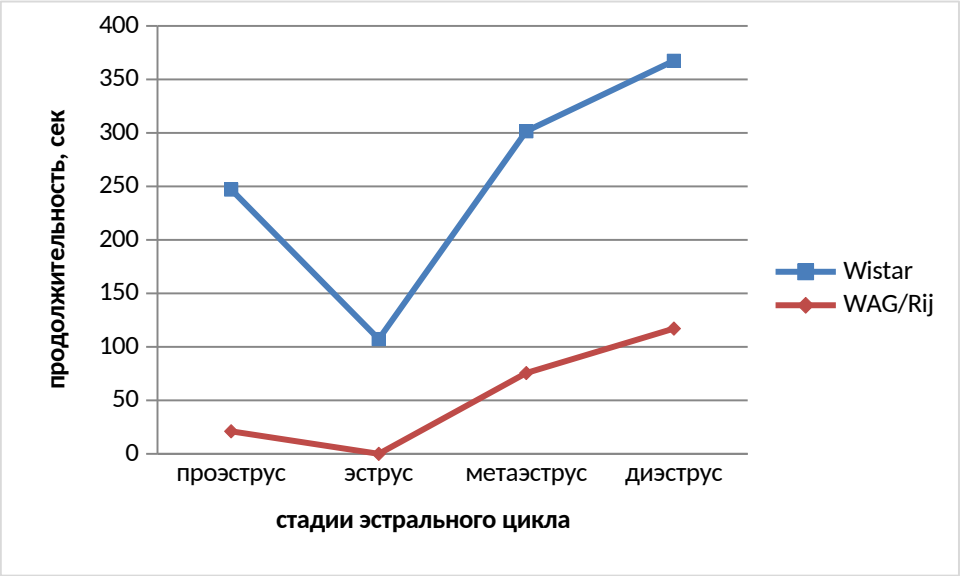

Рис 7. Средние показатели латентного периода в тесте «Открытое поле» у самок крыс линии Wistar и WAG/Rij в динамике эстрального цикла

Груминг у животных – важный поведенческий акт, выполняющий ряд функций, включая уход за кожей и шерстью, терморегуляцию, распределение химических веществ по телу и т. д. Наряду с потягиваниями, зеванием и купанием, естественный груминг относят к так называемой категории комфортного поведения. Помимо прямой биологической функции, груминг часто используется как адаптивная реакция при боли, стрессе и т.д., у грызунов являясь специфической общепризнанной поведенческой реакцией на стресс. Интересно, что сильный стресс приводит к снижению двигательной активности животных в целом ряде тестов на фоне возросшего

груминга. Приведенные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что характеристики груминга (количества его эпизодов и продолжительность) изменяются параллельно друг другу, самые редкие и продолжительные эпизоды отмечали на стадии эструс в отличие от остальных стадий эстрального цикла, что может свидетельствовать о снижении тревожности, так как на фоне головой доминанты биологически целесообразным является уменьшение восприятия потенциальной опасности [11].

Следующим тестом для оценки уровня тревожности в рамках данной экспериментальной серии был тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Время пребывания в открытом и закрытом рукавах лабиринта, зарегистрированное на всех стадиях эстрального цикла различается при высоком уровне значимости, показывая, что крысы этих групп предпочитают пребывать в закрытом рукаве лабиринта.

Известно, что количество заходов в открытые и закрытые рукава в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» являются показателями двигательной активности крыс. По нашим данным, происходило достоверное увеличение количества заходов в рукава в приподнятом крестообразном лабиринте от проэструса (Wistar-8,05±0,38 и WAG/Rij -2,29±0,18; при $p<0,05$) к эструсу (Wistar-10,40±0,13 и WAG/Rij-2,67±0,29; при $p<0,05$) и постепенное уменьшение этих показателей в метаэструсе (Wistar-4,49±0,57 и WAG/Rij-1,81±0,12; при $p<0,05$) и диэструсе (Wistar-2,81±0,12 и WAG/Rij-1,40±0,21; при $p<0,05$) (рис.8, рис.9).

Таблица 2.Количество эпизодов и продолжительность груминга у самок крыс линий Wistar и WAG/Rij в тесте «Открытое поле» на разных стадиях эстрального цикла

Показатели				Проэструс	Эструс	Метаэструс	Диэструс
Грумин г	Длительность	В центре	Wistar	0	0	0	0
			WAG/ Rij	0	0	0	0
		На периферии	Wistar	113,33±14,75	120,83±14,68	103,88±0,07	73,16±12,74
			WAG/ Rij	84,67±13,50	138,50±30,50	81,67±21,69	61,50±13,50
	Кол-во эпизодов	В центре	Wistar	0	0	0	0
			WAG/ Rij	0	0	0	0

		На периферии	Wistar	9,75±0,75	6,50±0,09	17,00±6,00	15,67±1,34
			WAG/ Rij	15,33±2,91	14,50±3,50	16,50 ±4,50	17,50±1,50

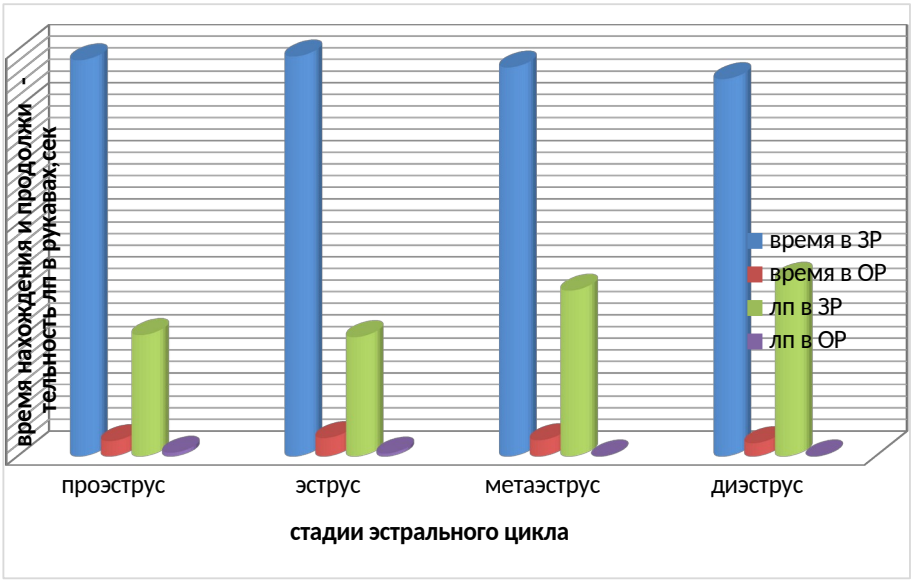

Рис 8. Средние показатели двигательной активности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у самок крыс линии Wistar в динамике эстрального цикла

Самые высокие показатели латентного периода отмечали в стадии диэструс (Wistar-153,00±23,88 сек. и WAG/Rij-158,00±13,98 при $p<0,05$) и самые низкие в стадии эструс (Wistar 105,30±17,82 сек., WAG/Rij-36,80±18,40 сек., при $p<0,05$). Итак, по результатам наших данных, высокий уровень эстрогенов способствует увеличению подвижности в стадии эструс.

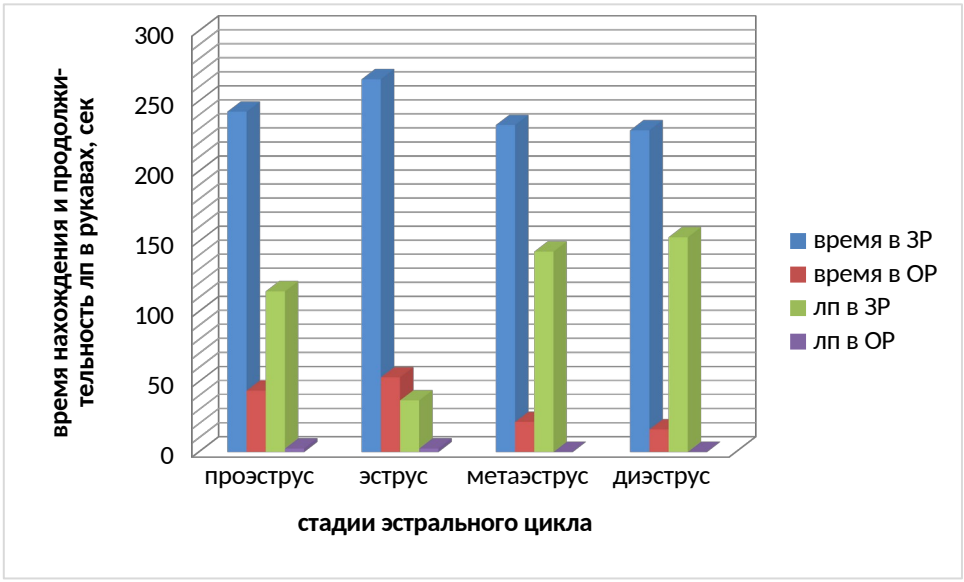

Рис 9.Средние показатели двигательной активности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у самок крыс линии WAG/Rij в динамике эстрального цикла

По числу вертикальных стоек и свешиваний крысы с открытого рукава ПКЛ можно судить об исследовательской деятельности: общее количество

стоек повышается на стадии эструс по сравнению с остальными стадиями (рис.10). Все различия являются статически значимыми ($p<0,05$).

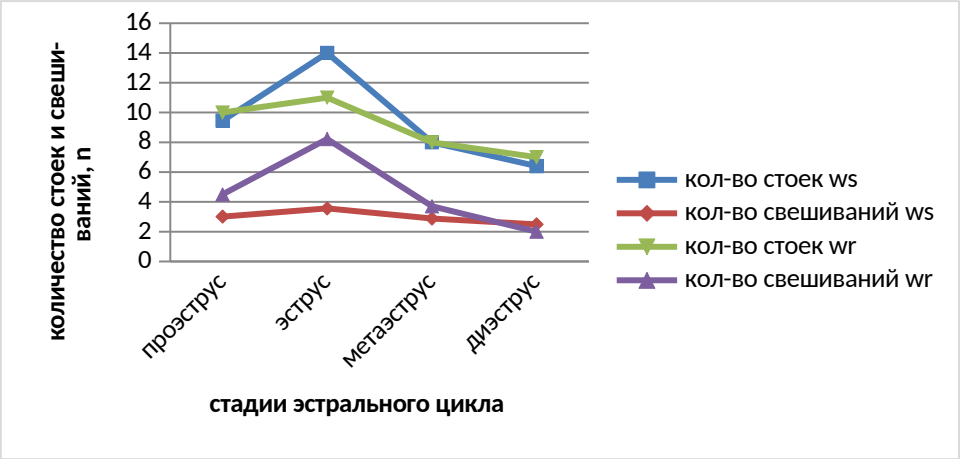

Рис 10. Средние показатели исследовательской активности в тесте « Приподнято-крестообразный лабиринт» у самок крыс линий Wistar и WAG/Rij

Приведенные в таблицах 3 и 4 данные показывают то, что самые редкие и продолжительные эпизоды груминга отмечали в эструсе в отличие от проэструса, метаэструса и диэструса, что может свидетельствовать о снижении тревожности. Так как на фоне половой доминанты биологически целесообразным является уменьшение восприятия потенциальной опасности.

Таблица 3. Средние показатели эмоционального статуса в тесте « Приподнято-крестообразный лабиринт» у самок крыс линий Wistar

Стадия/ Показатели	Длит-ть в ОР	Длит-ть в ЗР	Кол-во эпизодов в ОР	Кол-во эпизодов в ЗР
Проэструс	19,89±0,98	106,70±27,21	0,67±0,01	7,64±1,78
Эструс	34,77±1,57	111,56±11,22	0,59±0,00	4,56±0,07
Метаэструс	17,13±0,16	98,14±28,40	5,16±2,08	11,33±8,30
Диэструс	6,90±0,76	90,33±12,67	5,49±1,94	12,90±1,09

Таблица 4. Средние показатели эмоционального статуса в тесте « Приподнято-крестообразный лабиринт» у самок крыс линий WAG/Rij

Стадия/ Показатели	Длит-ть в ОР	Длит-ть в ЗР	Кол-во эпизодов в ОР	Кол-во эпизодов в ЗР
Проэструс	17,89±0,98	116,70±27,21	3,50±0,94	7,57±0,98
Эструс	77,13±0,17	155,07±16,92	0,67±0,01	5,90±1,09
Метаэструс	6,90±0,76	98,14±28,40	17,67±11,78	10,13±4,04
Диэструс	4,77±1,57	70,34±12,67	35,00±0,00	15,33±0,45

Таким образом, из результатов тестов «Открытое поле» и «Приподнято-крестообразный лабиринтов» мы выявили, что самки крыс ведут себя более тревожно на стадии эструс.

3.3 Оценка уровня депрессивности самок крыс в зависимости от эстрального цикла

Следующим этапом исследования стало изучение депрессивноподобного поведения животных в тесте Порсолта («Вынужденное плавание»). Результаты эксперимента показали, что у крыс в проэструсе наблюдается короткое время иммобилизации (Wistar=19,76±1,99 с.; WAG/Rij =23.81±3,47 с.; при $p<0,05$), а также время латентного периода до первой иммобилизации(Wistar =9,47±1,33 с.; WAG/Rij =11,55±1,43 с., при $p<0,05$) (рис.11,12). Кроме того, мы отмечали у них наименьшее количество подныриваний (Wistar=3,99±1,19;WAG/Rij =5,29±1,17; при $p<0,05$).

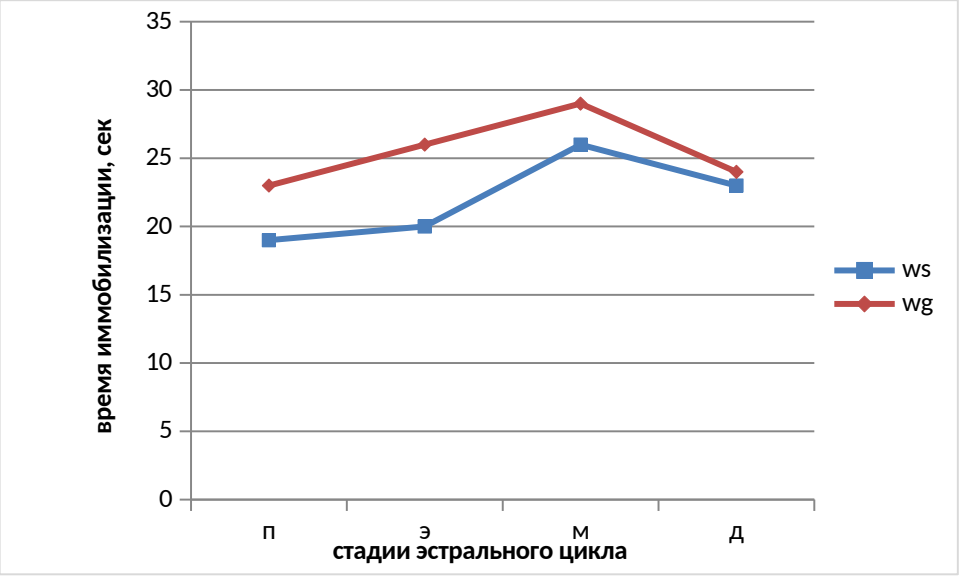

Рис 11. Средние показатели времени иммобилизации линии Wistar и WAG/Rij в динамике эстрального цикла (в сек.)

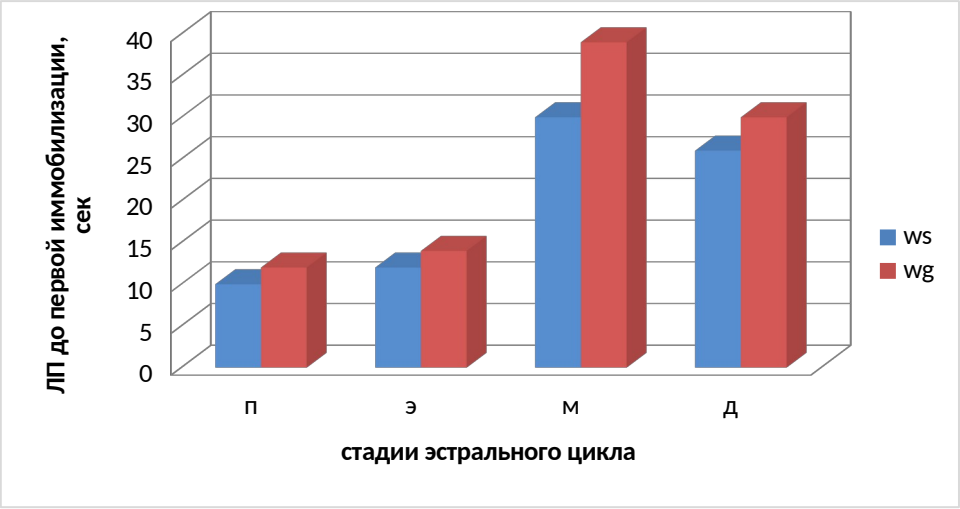

Рис 12. Средние показатели латентного периода до 1-ой иммобилизации в течение эстрального цикла (в сек.)

В стадии эструс происходило возрастание длительности иммобилизации (Wistar =20,15±1,07 с.; WAG/Rij =25,99±3,71 с., при $p<0,05$), максимального значения показатель достигал к стадии диэструс (Wistar =25,99±5,77 с.; WAG/Rij =29,17±3,98 с., при $p<0,05$). Самки в стадии эструс характеризовались высокой длительностью активного (Wistar =46,89±9,23 с.; WAG/Rij =40,57±3,89 с., при $p<0,05$) (рис.13) и низкой продолжительностью пассивного плавания (Wistar =19,56±1,22 с.; WAG/Rij =23,91±3,19 с., при $p<0,05$) (рис.14). Это можно объяснить колебаниями уровней женских половых гормонов в течение эстрального цикла. В проэструсе начинается

рост уровня эстрогенов, который максимальным становится в стадии эструс, что и может быть причиной повышения уровня депрессии.

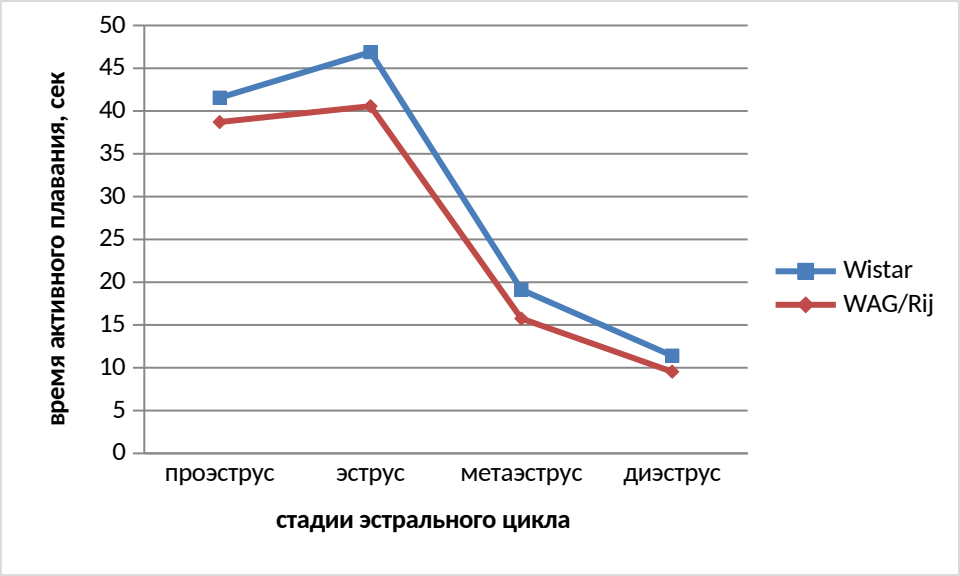

Рис 13. Средние показатели продолжительности активного плавания самок крыс линии Wistar и WAG/Rij в течение эстрального цикла(в сек.)

Самки, находящиеся в стадии метаэструс, характеризовались максимальным количеством подныриваний (Wistar =17,46±1,73; WAG/Rij =15,71±1,73; при $p<0,05$) и временем латентного периода до первой иммобилизации (Wistar =30,76±2,47 с; WAG/Rij =38,46±1,59 с., при $p<0,05$).

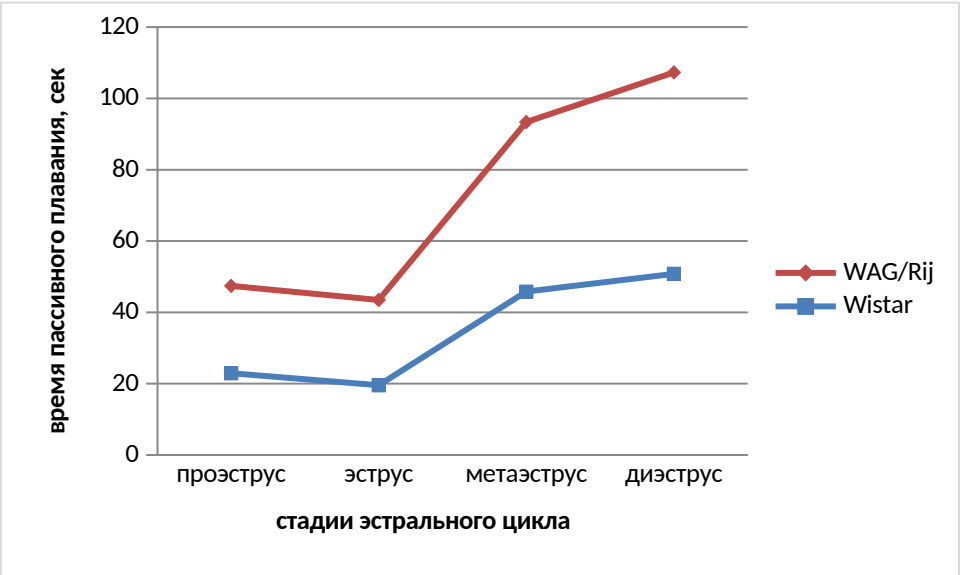

Рис 14. Средние показатели продолжительности пассивного плавания линии Wistar и WAG/Rij в динамике эстрального цикла (в сек.)

Длительность пассивного плавания была высокой (Wistar =50,78±5,99 с.; WAG/Rij =56,51±4,13 с., при $p<0,05$), тогда как время активного плавания

сократилось (Wistar =9,54±1,48 с.; WAG/Rij =11,41±3,99 с., при p<0,05), что свидетельствует о более низком уровне поведения отчаяния в данной стадии.

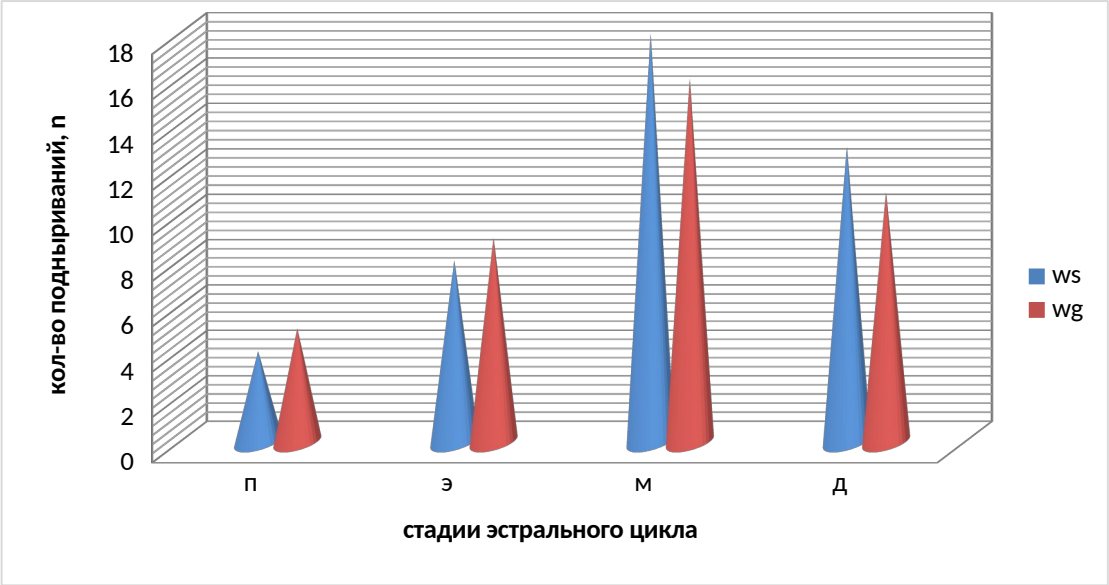

Рис 15. Количество подныриваний в тесте Порсолта линии Wistar и WAG/Rij в течение эстрального цикла

3.4 Оценка когнитивного поведения самок крыс в зависимости от эстрального цикла

Заключительным этапом исследования стало изучение когнитивных функций животных в динамике эстрального цикла с помощью теста «Экстраполяционное избавление». Он выбран нами как чувствительный метод для выявления нарушений когнитивных способностей у крыс. Для тестирования животных в тесте «Экстраполяционное избавление» необходимо наличие воды 22 °С, цилиндр должен быть погружен в воду на 2,5 см. Крыса помещается во внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Время тестирования – 2 минуты. Оценивали показатели: время, затраченное на решение задачи, и количество прыжков. При воспроизведении навыка экстраполяционного избавления в ТЭИ в обеих группах отмечалось снижение времени, затрачиваемого животным на решение задачи, что является критерием их обученности рефлексу избавления из аверсивной среды. Индивидуальные различия поведения крыс в тесте «Экстраполяционное избавление» отчетливо проявляются при первом перемещении животных в установку. После ознакомления с обстановкой (в

виде поворотов головы и туловища), животные делали попытки выбраться из узкого цилиндра, карабкаясь по его стенкам, или совершая прыжки вверх, опираясь передними лапками на стенки цилиндра. Далее, безуспешные попытки избегания сменялись подныриванием под край цилиндра.

Полученные экспериментальные данные демонстрируют статистически значимое увеличение в показателях латентного периода подныривания (время решения задачи) и количества прыжков у крыс на стадии эструс (Wistar-181,22±16,93 сек. и 5,88±0,75; WAG/Rij-300,01±29,33 сек. и 10,15±2,57; соответственно, при $p<0,05$) и уменьшение на стадии диэструс (Wistar-100,51±10,57 сек. и 0,00; WAG/Rij- 198,44±10,00 сек. и 6,00±1,27; соответственно, при $p<0,05$) (рис.16,17).

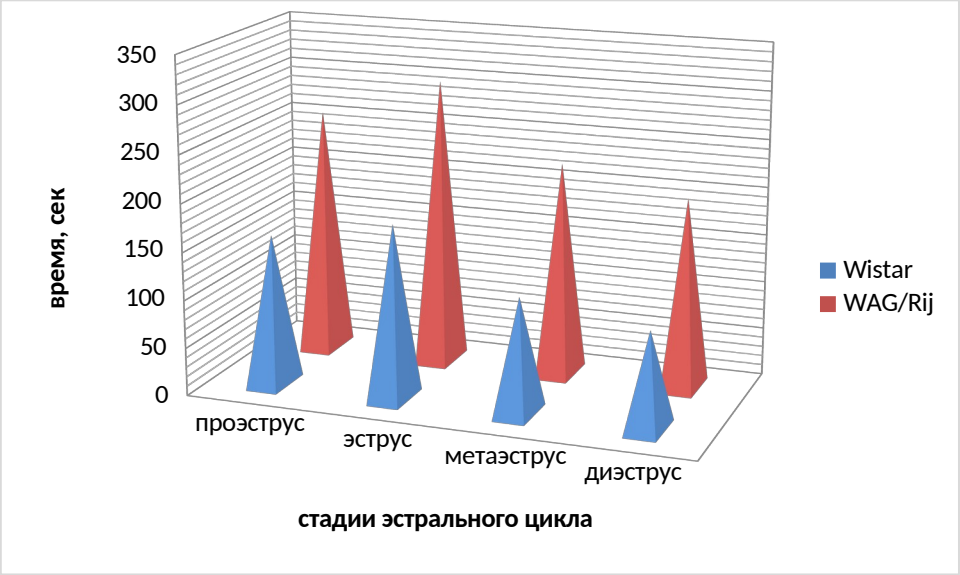

Рис 16. Время, затраченное на решение задачи самок крыс линии линии Wistar и WAG/Rij в динамике эстрального цикла

Очевидно, что ни уровень эмоциональной реактивности животных на физические стресс-факторы среды, ни различия в моторной «ловкости», необходимой для совершения подныривания или в способности к принятию решения поднырнуть, не являются причиной неодинакового поведения в ТЭИ крыс линии Wistar и линии WAG/Rij, что является следствием повышенной тревожности этих животных.

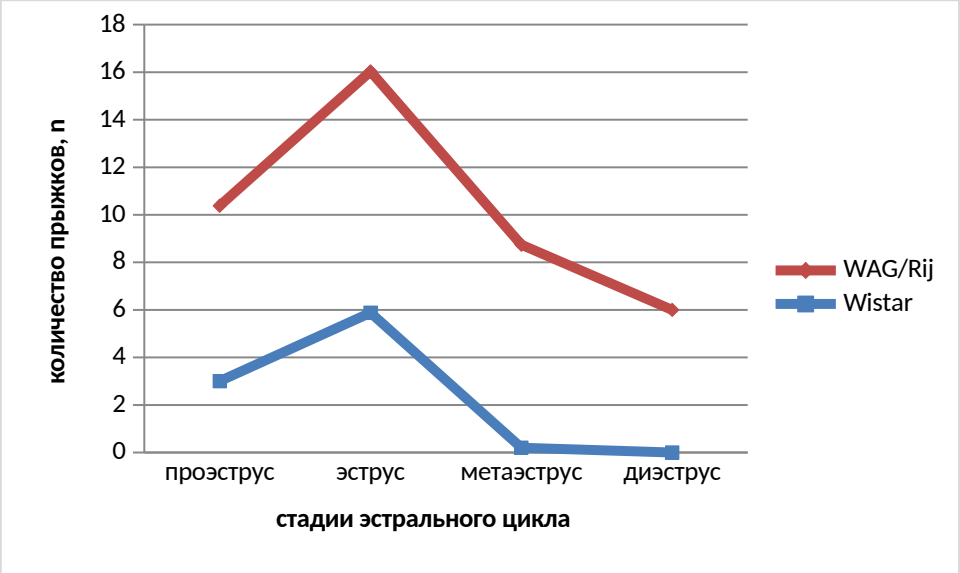

Рис 17. Количество прыжков из цилиндра самок крыс линии Wistar и WAG/Rij в динамике эстрального цикла

Таким образом, сравнение полученных нами данных показало, что самкам крыс линии WAG/Rij были характерны повышенные уровни тревожности и депрессивности по сравнению с крысами линии Wistar. Вместе с тем, у обеих линий животных мы наблюдали высокие уровни тревожности и депрессивноподобного поведения на стадии эструс, а самые низкие - на стадии диэструс. Тест «Экстраполяционное избавление» позволил предположить, что большое число безуспешных попыток у крыс линии WAG/Rij на стадии эструс свидетельствуют о повышенной реактивности животных.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования выявлено:

1. Выявлено, что самки крыс линии Wistar (75%) имеют регулярные половые циклы, самки крыс линии WAG/Rij характеризовались нерегулярностью половых циклов (70%), только 30% из всей выборки имели регулярный половой цикл.

2. Высокий уровень тревожности и эмоционального статуса зарегистрирован на стадии эструс у обеих линий животных, так как стадия эструс характеризуется высоким уровнем эстрогенов.

3. В тесте «Вынужденное плавание» выявлено что, на стадии эструс крысы линии WAG/Rij демонстрируют все типичные признаки депрессивноподобных нарушений в поведении, что выражалось в увеличении времени иммобилизации (25,99±3,71 сек.) и пассивного плавания (23,91±3,19 сек.), а также в сокращении времени активного плавания (40,57±3,89 сек.) , по сравнению с показателями у крыс линии Wistar (20,15±1,07 сек.; 19,56±1,22 сек.; 46,89±9,23 сек., соответственно).

4. Нарушения когнитивных функций были определены на стадии эструс: у самок крыс линии WAG/Rij (300,01±29,33 сек.) выше чем у самок крыс линии Wistar (181,22±16,93 сек.).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александровская О. В., Радостина Т. Н., Козлов Н. А., Цитология, гистология и эмбриология.1987г.- 442с
2. Артифексов, С. Б. Состояние органного кровотока в семенниках и придатках самцов крыс в условиях экспериментального венозного тестикулярного кровотока / С. Б. Артифексов, А. А. Артюхин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143. – № 6. – С. 623-627.
3. Астахов, О. Б. Морфофункциональный статус семенников белых крыс в процессе адаптации к условиям Высогорья / О. Б. Астахов, В. Ш. Белкин // Морфология. – 2014. – Т. 145. – № 3. – С. 21.
4. Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Гистология / Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский. – М. : Медицина, 2002. – 744 с
5. Ахмадеев А.В. Функциональная гормон-зависимая реверсия в нейронах миндалевидного комплекса мозга. //Мат-лы XX съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова. Москва, 2007, С.131.
6. Бабичев В.Н., Адамская Е.И., Самсонова В.М. Радиоиммунологическое определение лютеинизирующего гормона в гипофизе и крови крыс в эстральном цикле.//Ж-л успехи физиологических наук, 2005, т.36, № 1, с 54-67.
7. Батуев А. С. Физиология высшей нервной деятельности и сенсорных систем: Учебник для вузов. – 3-е изд. – СПб.: Питер, 2006. 317 с.
8. Боровая Т.Г., Волкова О.В Влияние экспериментальной гиперпролактинемии на половой цикл и фолликулогенез. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – №9. – 1994. – С. 326–328
9. Брюхин Г. В., Вторушина Е. В. Особенности становления фолликулогенеза в яичниках у потомства матерей с хроническим поражением гепатобилиарной системы в условиях эксперимента/ Г.В. Брюхин, Е.В. Вторушина // Проблемы репродукции.- 2004г.-№ 3.- С.54-57
10. Варшавский, А. А. Изменчивость размеров внутренних органов грызунов / А. А. Варшавский // Актуальные проблемы морфологии и экологии высших позвоночных. – 1988. – Ч. 1. – С. 230-247.
11. Виноградова Е. П. Влияние различных стадий полового цикла на поведение крыс в крестообразном лабиринте// Журн. ВНД. 1999. Т.49. №6. с. 1039-1045.
12. Волкова О.В. Структура и регуляция функции яичников. М.: Медицина, 1970.-С.5-42.

13. Волкова, О. В. Функциональная морфология женской репродуктивной системы / О. В. Волкова. – М.: Медицина, 1983. – 224 с.
14. Волкова, О. В. Структура и регуляция функции яичников / О. В. Волкова. – М. : Медицина, 1989. – 186 с.
15. Волкова, О. В. Методы количественного анализа в оценке морфо-функционального состояния яичника / О. В. Волкова. Т. Г. Боровая // Архив анатомии гистологии и эмбриологии. – 1990. – №11. – С. 81-84.
16. Волошин, Н. А. Морфофункциональные особенности формирования яичек крыс от момента рождения до второго месяца жизни / Н. А. Волошин, 118 Т. А. Тополенко // Український морфологічний альманах. – 2009. – Т. 7. – № 2. – С. 32-34.
17. Губарева, Л. И. Экологический стресс : монография / Л. И. Губа- рева. – СПб.: Издательство «Лань», 2001. – 148с.
18. Детьер В., Стеллар Э. Поведение животных. Его эволюционные и нейрологические основы. Ленинград: Издательство «Наука»,2002.-138 с.
19. Дуденкова Н.А. Морфофункциональные особенности репродуктивной системы при свинцовой интоксикации. 2015г.
20. Дьюсбери Д. Поведение животных. Сравнительные аспекты. М. 1981.
21. Иванов Ю. Н., Клочков Д. В., Позняков М. А. Исследование синхронизации полового цикла у самок серой крысы при совместном содеожании// Вавилов . Журн. генет. и селекции. 2011.-Т. 15-№ 1.-с.35-
22. Кабак, Я. М. Практикум по эндокринологии. Основы методики экспериментально эндокринологических исследований / Я. М. Кабак. – М. : МГУ, 1968. – 276 с.
23. Калимуллина Л.Б. Нейробиологические и молекулярно-генетические маркеры различных стратегий поведения / Л.Б. Калимуллина, А.В. Ахмадеев, Н.Ф. Леушкина, А.М. Мусина, А.Я. Ханнанова, Э.К. Хуснутдинова // XXI съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова. - 2010. — Тезисы докладов. - С.257.
24. Ковальский Г. Б, Китаев Э.М., Рыжавский Б. Я., Мельникова Л. М. Структурные основы генеративной и жндокринной функций яичников в норме и патологии. – Спб.: 1996г.- 204с.
25. Клочков, Д. В. Возрастные особенности эстральной цикличности и фолликулогенеза самок крыс линии ГК, селекционированных на проявление 121 кататонической реактивности / Д. В. Клочков, Т. А. Алехина, О. И. Прокудина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 2. – С. 182-185.
26. Клочков Д. В., Алехина Т. А., Селекция на усиление кататонической реактивности крыс, половая функция и синхронизация эстральной

цикличности/ Вавиловский журнал генетики и селекции, Том 16, № 4/2 2012.
27. Ковальский, Г. Б. Структурные основы генеративной и эндокринной функции яичников в норме и патологии / Г. Б Ковальский, Э.М., Китаев, Б. Я. Рыжавский, Л. М. Мельникова. – СПб, 1996. – 202 с.
28. Кустаров В Н., Линде В. А., Ильяшевич В. И. Нарушения менструального цикла/ В.Н. Кустаров, В.А. Линде, В.И. Ильяшевич/ Спб.: «Гиппократ»,2008.-128с.
29. Лебедева, Т. С. Морфодинамика фолликулогенеза млекопитающих / Т. С. Лебедева, Ю. В. Храмова // Ломоносов – 2014: тез. докл. XXI Междунар. конф.студентов, аспирантов и молодых ученых: Секция «Биология», Москва, 7-11 апреля 2014 г. – М. : Изд. Московского университета, 2014. – С. 7.
30. Леушкина Н.Ф. Особенности двигательной активности и исследовательской деятельности крыс, имеющих различия в экспрессии изоформ Д2-рецептора / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев // Фундаментальные исследования. 2014. №9 (часть 11).
31. Любашина О.А. Механизмы участия центрального ядра миндалины в модуляции рефлекторной моторной активности желудка: Автореф. Дис.канд. биол.наук. СПб.: Ин-т физиологии им. И.П.Павлова, 2001.- 21с.
32. Мелик-Алавердян, Н. О. Генеративная функция яичников и эстральный цикл у крыс при хронической хлоропреновой интоксикации / Н. О. Мелик-Алавердян. – Ереван : Айастан, 1967. – 162 с.
33. Обухова Ю. Д. Морфология яичников в различные периоды онтогенеза. Обзор литературы / Обухова Ю. Д. // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII. – № 2 – С. 301-305.
34. Равич-Щербо И.В., Марютина Т.М., Григоренко Е.Л. Психогенетика. М.,1999г.
35. Роберт Хайнд Поведение животных: Синтез этологии и сравнительной психологии / Роберт. Хайнд – М.: Книга по Требованию, 2012.
36. Розен В.Б., Смирнова О .В., Волчек А.Г. О комплексировании стероидных гормонов с клеточными рецепторными белками. – пробл. Эндокринол., 1984, т. 17, № 5, с. 109-120
37. Саркисова К. Ю., Мидзяновская И. С., Куликов М. А. Депрессивноподобные изменения в поведении и экспрессия гена c-fos в дофаминергических структурах мозга у крыс линии WAG/Rij.// Ж-л. ВНД, 2002, том 52, №6, с. 733 -742.
38. Хэм А., Кормак Д., Гистология.- 1983.-Т.4.-М.:Мир.- 496 с.

39. Чепурнов С.А., Чепурнова Н.Е. Миндалевидный комплекс мозга М. Изд-во МГУ 1981г. 255с
40. Шаляпина В.Г. Эндокринология репродукции / В. Г. Шаляпина. – СПб. : Наука, 1991. – 192 с.
41. Beach F. A. Sexual attractivity, proceplivity , and receptivity in female mammals. Hormones and Behavior, 1976, 7, 103-133.
42. Brannstrom M., Pascoe V., Norman R. J., McClure N. Localization leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle / M. Brannstrom, V. Pascoe, R. J. Norman, N. McClure // Fertil. Steril. – 1994. – Vol. 61. – P. 488-495.
43. Brannstrom M., Wang L., Norman R. J., Ovulatory effect of interleukin-IB on the perfused rat ovary / M. Brannstrom, L. Wang, R. J. Norman // Endocrinology. – 1993. –Vol. 132. – P. 399-404
44. Broekmans F. J., Visser J. A., Laven J. S. et al. Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction / F. J.Broekmans, J. A. Visser., J. S. Laven et al. // Trends Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 19. – P. 340– 347.
45. Coenen A.M.L., van Luijtelaar E.L.J.M. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats // Behavioural Genetics. 2003. Vol. 33. P. 635–655.
46. Di Carlo A., De Fella M. A role of E-cadlierin in mouse primordial germ cell development / A. Di Carlo, M. De Fella // Dev. Biol. – 2000. – Vol. 226. – P. 209-219.
47. Epifano O., Dean J. Genelic control of early folliculogenesis in mice / O. Epifano, J. Dean // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2002. – Vol. 13. – P. 169-173.
48. Fortune J. E., Rivera G. M., Yang M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle / J. E. Fortune, G. M. Rivera, M. Y. Yang // Anim. Reprod. Sci. – 2004. – Vol. 83. – P. 109-126.
49. Karaca T., Uslu S.Arch. Med. 2007.Vol. 39,N 2. P. 389-393
50. Kuznetsova G. D., Petrova E. V., Coenen A. M., van Luijtelaar E. L. Generalized absence epilepsy and catalepsy in rats// Physiol. Behav. 1996. V. 60. P. 1165-1169.
51. Leshner A, I. A model of hormones and agonistic behavior. Physiology and Behavior, 1975, 15, 225-235c.
52. Lin L., DePhilip R. Sex-dependent expression of placental (P) cadhetin during mouse gonadogenesis / L. Lin, R. DePhilip // Anat. Rec. – 1996. – Vol. 246 – P. 535-544

53. Midzyanovskaya I., Kopilov M., Fedotova E., Kuznetsova G., Tuomisto L. Dual effect of pyrilamine on absence seizures in WAG/Rij rats // Inflamm Res. 2005. Vol. 54. (Suppl. 1). S. 40-41.
54. Pellow S., Chopin P., File S.E. et al. Validation of open: closed arm entries in elevated plus-maze as a nuasure of anxiety in the rat // J. Neurosci Methods. 1985. V. 14. P. 149-167.
55. Sayasith K. et al. Molecular Characterization of Equine P-Selectin (CD62P) and Its Regulation in Ovarian Follicles During the Ovulatory Process / K. Sayasith, N. Bouchard, D. Boerboom, K. A. Brown, M. Dore, J. Sirois // Biology Of Reproduction. – 2005. – Vol. 72 – P. 736-744.
56. Simon A. Female infertility in mice lacking connexin 37 / A. Simon // Nature. – 1997. – Vol. 385 – P. 525-529.
57. Visser J. A., de Jong F. H., Laven J. S., Themmen A. P. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function / J. A. Visser, F. H de Jong., J. S. Laven, A. P. Themmen // Reproduction. – 2006. – Vol. 131. – P. 1-9.
58. Vinatier D., Dufour P., Tordjeman-Rizzi N. et al. Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines / D. Vinatier, P. Dufour, N. Tordjeman-Rizzi et al. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 1995. – Vol. 63. – P. 155-168.
59. Van der Hoek K. H. K. H. Intrabursal Injection of Clodronate Liposomes Causes Macrophage Depletion and Inhibits Ovulation in the Mouse Ovary / K. H. Van der Hoeka, S. Maddocksc, C. M.Woodhousea, N. Rooijend, S. A. Robertsonb, R. J. Norman // Biology of Reproduction. – 2000. – Vol. 62. – P. 1059-1066.
60. Van Luijtelaar G., Coonen A. The WAG/Rij rat model of absence epilepsy. Epilepsy Res. 1989. Vol. 1. P. 297-299.
61. Wood A. W., Van Der Kraak G. J. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts / A. W. Wood, G. J. Van Der Kraak // Biology of Reproduction. – 2001. –Vol. 64(1). – P. 264-271.