

О.Г. Шахова, О.М., Краснікова, Н.О. Бабенко

Вплив хронічного обмеження калорійності раціону на вікові особливості орієнтувально-дослідницької поведінки щурів

Вивчали вплив обмеження калорійності раціону на орієнтувально-дослідницький компонент поведінки 3-, 12-, 24–25-, 28–29- і 35–44-місячних щурів лінії Вістар. У контрольних тварин встановлене прогресуюче вікове зниження рівня локомоторної активності. Переведення і довічне утримування щурів на раціоні з обмеженням калорійності супроводжується пригніченням орієнтувально-дослідницької активності тварин у віці 3 міс і деякою її активацією в 24–25 міс у порівнянні з контрольними тваринами такого самого віку. Обмеження калорійності раціону формує особливий паттерн поведінки тварин у тесті “відкритого поля”, що практично не змінюється з віком.

Ключові слова: обмеження калорійності раціону, орієнтувально-дослідницька поведінка, тест “відкрите поле”.

ВСТУП

Численні дані літератури свідчать про розвиток когнітивної дисфункції в процесі старіння людини та тварин, що відбувається на тлі вікових нейродегенеративних змін [16, 17, 22, 23]. Важливими її поведінковими проявами вважають: порушення орієнтації в просторі, зміну рівня локомоторної активності, зниження швидкості реагування, а також зміну емоційних реакцій – підвищення тривожності, дратівливості й агресивності [22, 23].

Однією з небагатьох ефективних експериментальних моделей зниження ризику розвитку вікових патологій та підвищення тривалості життя є обмеження калорійності дієти [9, 15, 17]. Тривале обмеження калорійності раціону підвищує опір мозку до старіння та уповільнює зниження когнітивних функцій організму, що відбувається на фоні стимуляції експресії стресорних білків, нейротрофічних факторів і нейрогенезу [15, 17, 24]. Однак є експериментальні дані, які свідчать про те, що деякі

моделі зниження калорійності раціону подовжують життя, але призводять до пригнічення когнітивних функцій [26]. Отримання таких суперечливих відомостей може бути пов'язано з розбіжностями у складі дієт, ступені обмеження калорійності раціону, віці та лініях тварин.

Відповідно до даних багаторічних досліджень Нікітіна та співавт. [9], довічне утримання щурів в особливих умовах на повноцінній за складом, але калорійно обмеженій дієті (КОД), супроводжується збільшенням тривалості їх життя на 40–50 %, а в деяких випадках навіть на 100 %. Однак поведінкові реакції та, зокрема, дослідницька поведінка тварин, що утримуються на такій дієті, невивчені.

Для оцінки орієнтовно-дослідницького компоненту поведінки тварин широко використовують тест “відкритого поля” [25]. Вважають, що різні рівні рухової активності (горизонтальної та вертикальної) та емоційного реагування, які реєструють в цьому тесті, відображають функціональний стан відділів нервової

системи, що мають безпосереднє відношення до процесів навчання та пам'яті [3, 5].

Неоднозначність даних літератури щодо впливу обмеження калорійності раціону на когнітивні функції тварин і актуальність пошуку шляхів запобігання розвитку вікових порушень функцій мозку та їх поведінкових проявів зумовили мету нашого дослідження: вивчення впливу КОД на орієнтувально-дослідницький компонент поведінки щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 142 щурах, яких було розподілено на 5 вікових груп: I – молоді 3-місячні, II – дорослі 12-місячні, III – старі 24–25-місячні, IV – дуже старі 28–29 місячні та V – найстаріші 35–44-місячні. Вік 28–29 міс близький до максимальної тривалості життя контрольних тварин, а 35–44 міс – тварин, що утримувалися на КОД. У групі “контроль” немає тварин віком від 35 до 44 міс, тому що вони, як правило, до нього не доживали.

Дослідних тварин віком 1 міс ізолювали, переводили на КОД (дієта С.М. McCaу в модифікації Нікітіна) [9] та утримували на цьому раціоні довічно. По закінченні кожних 100 діб протягом експерименту тваринам давали можливість підвищити масу на 10 г, збільшуючи кількість їжі, та знову протягом наступних 100 діб утримували на раціоні, який стримував їх зростання. Загальне зниження калорійності раціону сягало 60 % від норми та відбувалося за рахунок ліпідного компонента. Контрольні щури протягом життя отримували звичайний раціон *ad libitum*.

Орієнтувально-дослідницький компонент поведінки щурів вивчали в умовах “відкритого поля” за стандартною методикою Буреша [2]. Тривалість тесту становила 5 хв. Реєстрували вертикальну активність (стійки з опорою і без опори на стінку), горизонтальну активність (кількість

перетнутих квадратів у центрі поля та на периферії), реакції грумінгу (умивання, чищення, викушування шерсті та лапок, почісування), кількість виходів у центр “поля”, латентний період руху із центру “поля” на початку тестування, реакції принохування та завмирання.

Для порівняння результатів використовували критерій Манна–Уїтні та критерій *t* Стьюдента. Розходження між групами вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення вікових аспектів поведінки контрольних тварин в умовах “відкритого поля” виявило прогресуюче зниження у старих (III група) і дуже старих (IV група) щурів загальної (горизонтальної та вертикальної) рухової активності (амбуляції) (рис. 1,а), зниження кількості стійок з опорою на стінку (див. рис. 1,в), а також збільшення тривалості латентного періоду виходу із центра поля (рис. 2 ,а) у порівнянні з молодими 3-місячними тваринами.

У загальній поведінці щурів у “відкритому полі” прийнято виділяти емоційні, рухові та орієнтовно-дослідницькі компоненти [7]. Латентний період відходу з центру “поля” вважають критерієм емоційності, що відображує рівень тривожності [25], тому що реакція “завмирання” у тварини, яка знаходиться в незнайомих умовах, як правило, є наслідком страху, що пригнічує орієнтувально-дослідницьку поведінку [8]. Загальну рухову активність прийнято вважати комплексним показником, що відображує дослідницьку активність та емоційність, а стійки з опорою на стінку – компонентом активної дослідницької поведінки, спрямованої на пошук можливості уникнення стресової ситуації [25].

Відповідно до зазначених інтерпретацій поведінкових реакцій, встановлене в цьому дослідженні, в контрольних щурів вікове

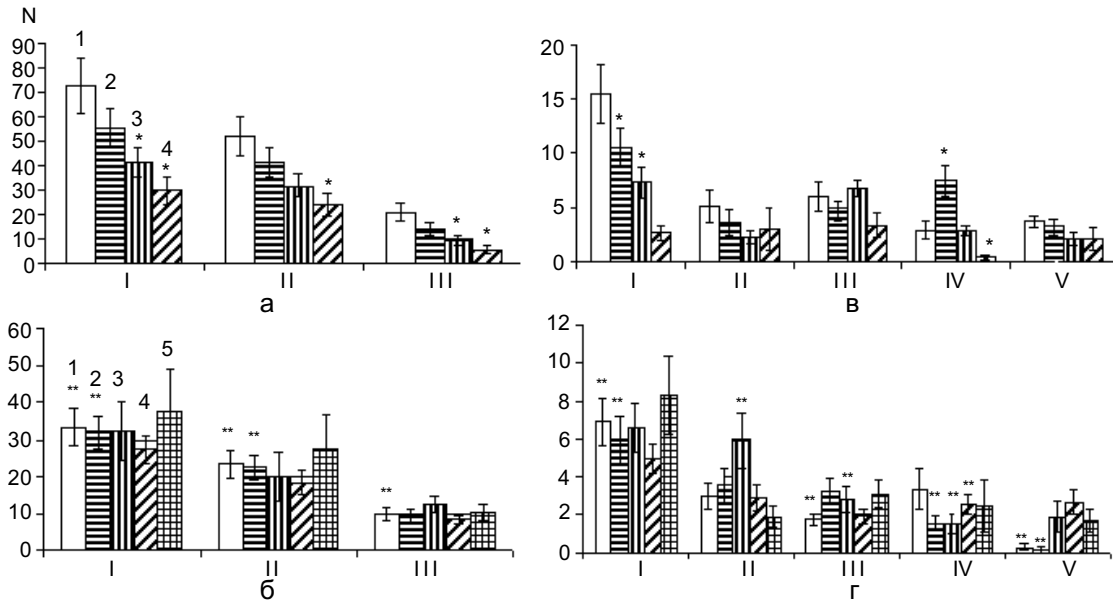


Рис. 1. Кількісні показники поведінки контрольних щурів (а, в) та тварин з калорійно обмеженою дієтою (б, г) різного віку у тесті “відкритого поля”: 1 – 3 міс, 2 – 12 міс, 3 – 24–25 міс, 4 – 28–29 міс, 5 – 35–44 міс. За віссю абсцис на рис. а та б (показники рухової активності) – I – загальна рухова активність, II – загальна горизонтальна рухова активність, III – загальна вертикальна рухова активність; на рис. в і г (показники поведінки) – I – стійки з опорою на стінку, II – стійки без опори на стінку, III – реакції грумінгу, IV – уринації, V – дефекації. За віссю ординат – кількість реакцій поведінки. *P < 0,05 відмінності, вірогідні щодо 3-місячних тварин, ** – щодо контрольних тварин

зниження рухової активності й збільшення тривалості латентного періоду виходу із центра поля можна розцінювати, як зниження орієнтувально-дослідницької поведінки та підвищення емоційної реактивності, тобто як зміну стратегій дослідницької поведінки та активного уникання на стратегію пасивного уникання [6]. Однак у

нашому дослідженні не відзначено зниження з віком кількості стійок без опори на стінку (див. рис. 1,в), які є орієнтовною реакцією – фактором вищого порядку в ієрархії поведінкових реакцій, а також кількості принюхувань (3 міс – $31,7 \pm 4,1$; 24 міс – $40,3 \pm 3,96$), що є дослідницьким компонентом амбуляції [25]. У старих і

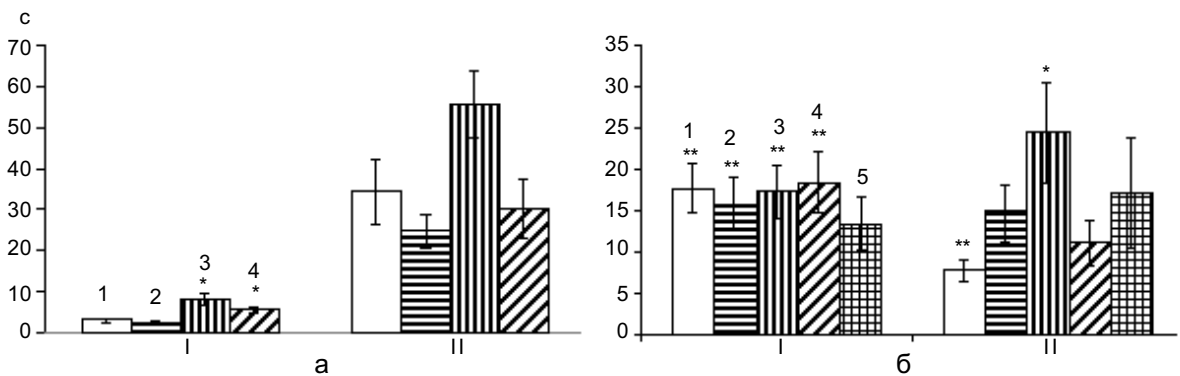


Рис. 2. Тривалість реакцій поведінки контрольних щурів (а) та тварин з калорійно обмеженою дієтою (б) різного віку в тесті “відкритого поля”: 1 – 3 міс, 2 – 12 міс, 3 – 24–25 міс, 4 – 28–29 міс, 5 – 35–44 міс. За віссю абсцис – реакції поведінки – I – латентний період виходу з центру поля, II – загальна тривалість грумінгу. За віссю ординат – тривалість реакцій поведінки, с. *P < 0,05 відмінності, вірогідні щодо 3-місячних тварин, ** – щодо контрольних тварин

дуже старих контрольних щурів також не спостерігалось вікового підвищення кількості дефекацій, які вважають критерієм емоційної реактивності, тривоги, страху, і не відзначено зниження кількості та тривалості грумінгу – форми поведінки, що свідчить про звикання до нової ситуації [25]. Очевидно, вікове зниження рухової активності, яке спостерігалось в старих і дуже старих щурів у відкритому полі, не можна однозначно розцінювати як зниження дослідницької активності, як це звичайно інтерпретується для молодих тварин.

Деякі автори відзначають, що дослідницька та рухова активності можуть бути роз'єднані [12, 22]. Амбуляція тісно пов'язана із загальними метаболічними процесами в організмі [12], і існує зворотна кореляція між руховою активністю та масою тіла [10]. Відомо, що щури є тваринами, які ростуть протягом усього життя та у старості маса їхнього тіла в 2–3 рази вища, ніж у молодості (3 міс – $173,9 \pm 10,4$; 24 міс – $406,9 \text{ г} \pm 9,11 \text{ г}$; $P < 0,05$), тому не виключено, що зниження рухової активності у старих щурів пов'язано зі значним зростанням маси їхнього тіла.

Проте існує велика кількість досліджень на багатьох видах тварин, що демонструють зниження когнітивних функцій у старості – пам'яті, уваги, швидкості обробки інформації, а також моторної функції та дослідницької поведінки [11, 16, 23]. Нині дослідники відзначають широку варіабельність виконання когнітивних тестів серед старих тварин одного виду та гетерогенність ступеня порушення різних функцій організму: виділяють тварин із відсутністю вікових змін когнітивних функцій і різним ступенем порушення виконання когнітивних тестів [16, 23]. Вважають, що варіативність даних поведінкової активності, які одержують в “відкритому полі”, багато в чому пов'язана з проявом індивідуальних типологічних властивостей нервової системи тварин,

основою яких є індивідуальні особливості метаболізму та нейрогуморальної регуляції [3, 5, 8]. Дослідження вікової динаміки поведінкового прояву індивідуальних типологічних властивостей нервової системи тварин може сприяти розумінню причин гетерогенності даних про вікове зниження когнітивних функцій.

Переведення щурів на КОД супроводжувалося зниженням загальної локомоторної активності (див. рис. 1,б), кількості стійок з опорою на стінку (див. рис. 1,г), частоти та тривалості грумінгу та підвищенням латентного періоду виходу з центра поля в 3-місячних дослідних тварин у порівнянні з контрольними щурами такого самого віку (див. рис. 1,б, 2,б).

Зазначені зміни поведінки тварин у цілому можна розцінювати як пригнічення дослідницької активності в умовах негативного емоційного напруження, яке є характерною для стану стресу [10]. Важливо відзначити, що патерн поведінки в умовах “відкритого поля”, що сформувався в дослідних щурів після їхнього переведення на КОД, зберігається у тварин протягом усього життя від молодого до найстарішого віку (за винятком 24–25 міс; див. рис. 1,б,г; 2,б). Це дає змогу говорити про нівелювання вікових змін поведінкових реакцій в умовах КОД. Наші результати підтверджують дані літератури, де вказують, що переведення тварин на КОД супроводжується швидкою зміною фізіологічних показників, які зберігаються протягом усього життя і практично не піддаються віковим змінам [27].

Довічне утримання щурів на КОД супроводжувалося підвищенням тривалості грумінгу (див. рис. 2,б) й збільшенням кількості стійок без опори на стінку (на 99 %; див. рис. 1,г) у 24–25-місячних тварин у порівнянні з 3-місячними. Кількість стійок без опори на стінку в 24–25-місячних дослідних щурів також була вища щодо значень у контрольних тварин такого

самого віку (див. рис. 1, в, г). Ці зміни можуть вказувати на деяке зниження негативного емоційного напруження та активацію орієнтувально-дослідницької поведінки в старих дослідних щурів у порівнянні з молодими дослідними та старими контрольними тваринами такого самого віку. Однак ці вікові відмінності відсутні у дуже старих 28–29-місячних контрольних і дослідних тварин (див. рис. 1, в, г).

Дотепер залишаються нез'ясованими точні механізми дії обмеження калорійності раціону на процеси старіння та тривалість життя. Переведення тварин на низькокалорійний раціон можна назвати хронічним “нутриціоанальним стресом”, адаптація до якого супроводжується переходом на особливий рівень нейрогуморальної регуляції та метаболічної активності організму, що підтримується протягом усього експерименту та формує стратегію виживання [9, 15, 27]. Зниження споживання калорій активує гіпоталамо-гіпофізарно-адреналову систему та індукує в тварин поведінкову адаптацію, яка спрямована на економію енергії та проявляється в зниженні загальної локомоторної активності й появі феномена “заціпеніння” [19].

Відомо, що тривале обмеження калорійності раціону викликає підвищення вмісту глюкокортикоїдів у плазмі крові [20]. Кортикостерон фізіологічно має адаптивний ефект протягом періоду гострого стресу, але при хронічному стресі може викликати патолофізіологічні зміни в мозку. Деякі автори вказують на те, що різні моделі обмеження калорійності раціону на тлі підвищеного вмісту кортикостерону спричиняють значне зниження вмісту нейромедіаторів (дофаміну, серотоніну та епінефрину) у різних структурах мозку тварин, що супроводжується розвитком депресії та значним зниженням рухової та дослідницької активності у тесті відкритого поля, однак може модулювати нормальний темп старіння [13,

18]. Вважають, що нейропротекторний ефект обмеження калорійності раціону, який включає підвищення експресії нейротрофічних факторів і зниження вікової активації глії, перевищує пошкоджувальний ефект глюкокортикоїдів [20].

Серед факторів, що сприяють позитивному ефекту КОД, слід зазначити одну особливість її складу. Обмеження калорійності дієти відбувається за рахунок зменшення вмісту насичених жирів, що призводить до значного підвищення в ній відносної частки поліненасичених ліпідів у порівнянні із раціоном контрольних тварин. Відомо, що ω -3 поліненасичені жирні кислоти (ω - ПНЖК) відіграють важливу роль у функціонуванні клітин мозку в нормі та при патологічних станах [4]. Механізми їх дії пов'язують із модифікацією плинності мембран нейрональних клітин і впливом на нейротрансмітерну функцію [21]. Встановлено участь ω -3 ПНЖК у регуляції когнітивної функції, локомоторної та дослідницької активності та емоційного статусу тварин [1, 14]. Зниження вмісту докозагексаєнової кислоти в нервовій тканині старих тварин призводить до зниження загальної локомоторної та дослідницької активності, викликає порушення когнітивних функцій і поведінкових реакцій у тварин. Водночас введення ω -3 ПНЖК у раціон нормалізує склад фосfolіпідів мозку, поліпшує когнітивні функції та запобігає розвитку нейродегенеративних захворювань [1]. З огляду на сказане вище, не виключено, що високий вміст ω -3 ПНЖК у раціоні щурів із КОД сприяє попередженню вікового зниження локомоторної активності та орієнтувально-дослідницької поведінки щурів, та є одним із факторів, які компенсують шкідливу дію на мозок підвищеного вмісту кортикостерону.

Таким чином, переведення і довічне утримання щурів на дієті з обмеженням калорійності формує особливий патерн поведінки тварин у тесті “відкритого поля”, який практично не змінюється з віком. КОД

індукує у щурів специфічний стан організму, поведінковим проявом якого є пригнічення орієнтувально-дослідницької активності у віці 3 міс та деякою її активацією у 24–25 міс.

**Е.Г. ШАХОВА, О.Н. КРАСНИКОВА,
Н.А. БАБЕНКО**

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОГРАНИЧЕНИЯ КАЛОРИЙНОСТИ РАЦИОНА НА ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС

Исследовали влияние калорийно-ограниченного рациона на ориентировочно-исследовательский компонент поведения 3-, 12-, 24–25-, 28–29- и 35–44-месячных крыс линии Вистар. У контрольных животных установлено прогрессирующее возрастное снижение уровня локомоторной активности. Перевод и пожизненное содержание крыс на рационе с ограничением калорийности сопровождается угнетением ориентировочно-исследовательской активности в возрасте 3 мес и некоторой ее активацией в 24–25 мес по сравнению с контрольными животными того же возраста. Ограничение калорийности рациона формирует особый паттерн поведения животных в тесте “открытого поля”, который практически не изменяется с возрастом.

Ключевые слова: ограничение калорийности рациона, ориентировочно-исследовательское поведение, тест “открытое поле”.

E.G. Shakhova, O.N. Krasnikova, N.A. Babenko

EFFECTS OF CHRONIC CALORIC RESTRICTION ON THE AGE-ASSOCIATED PECULIARITIES OF EXPLORATIVE BEHAVIOUR IN RATS

Long-term caloric restriction (CR) has been reported to extend the life spans, delay the onset and decrease the incidence of a broad spectrum of age-associated diseases. However, its effect on rat explorative behaviour is still unclear. In the present study, a number of behavioural measures were continuously monitored in 3-, 12-, 24–25-, 28–29- and 35–44-month-old male Wistar rats that were fed either ad libitum or placed on a caloric restricted diet. A gradual decline in locomotor activity of the ad libitum fed rats has been determined during aging in the open field test. In the CR groups, 3-month-old rats exhibited lower levels of exploratory behavior, compared to rats on the control diet. 24–25-month-old CR rats exhibited higher levels of exploratory behaviour, compared to ad libitum fed animals of the same age. Chronic dietary restriction nullified the age-dependent decline in locomotor activity and explorative behaviour of rats.

Key words: caloric restriction, explorative behavior, open field test.

Institute of Biology, Kharkov Karazin National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабенко Н.А., Семенова Я.А. Влияние диеты, обогащенной полиненасыщенными жирными кислотами рыбьего жира, на обмен фосфолипидов и когнитивные функции старых крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2008. – № 12. – С. 1400–1406.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высш. шк., 1991. – 299 с.
3. Гуляева Н.В., Степанчиков М.Ю. Биохимические корреляты индивидуально-типологических особенностей поведения крыс // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1997. – 47, вып. 2. – С. 239–338.
4. Когтева Г.С., Безуглов В.В. Ненасыщенные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы // Биохимия. – 1998. – 63, №1. – С. 6–15.
5. Костенкова В.Н., Никольская К.А. Сравнительная характеристика психоэмоциональных проявлений у беспородных крыс и крыс линии Вистар // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2004. – 54, № 5. – С. 620–631.
6. Кременевская С.И., Гельман В.Я., Зацепин Э.П. Выделение различных компонентов ориентировочной реакции крыс в условиях открытого поля // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1991. – 77, № 2. – С. 124–129.
7. Кулагин Д.А., Болондинский В.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке // Успехи физиол. наук. – 1986. – 17, № 1. – С. 92–108.
8. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте “открытого поля” // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1981. – 31, вып. 2. – С. 301–307.
9. Никитин В.Н. Экспериментальные подходы к продлению жизни // Итоги науки и техники: общие проблемы биологии. – М., 1984. – 4. – С. 6–43.
10. Титов С.А., Каменский А.А. Роль ориентировочного и оборонительного компонентов в поведении белых крыс в условиях “открытого поля” // Журн. высш. нервн. деятельности. – 1980. – 30, вып. 4. – С. 704–709.
11. Фролькис В.В., Безруков В.В., Богацкая Л.Н. Старение мозга. – Л.: Наука, 1991. – 277 с.
12. Birke L.I., Archer J. Open-field behaviour of oestrous and dioestrous rats: evidence against an emotionally interpretation // Anim. Behav. – 1975. – 23, № 3. – P. 509–512.
13. Chandler-Laney P.C., Castaneda E., Pritchetta C.E., Smith M.L., Giddings M., Artiga A.I., Boggiano M.M. A history of caloric restriction induces

- neurochemical and behavioral changes in rats consistent with models of depression // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2007. – **87**, № 1. – P. 104–114.
14. Fedorova I., Salem N.J. Omega-3 fatty acids and rodent behavior // *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids.* – 2006. – **75**, № 4–5. – P. 271–289.
 15. Fontan-Lozano A., Lopez-Lluch G., Delgado-Garcia J.M., Navas P., Carrion A.M. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity // *Nol. Neurobiol.* – 2008. – **38**, № 2. – P. 167–177.
 16. Gage F.H. Experimental approaches to age-related cognitive impairments // *Neurobiol Aging.* – 1988. – **9**, № 5–6. – P. 645–655.
 17. Gillette-Guyonnet S., Vellas B. Caloric restriction and brain function // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2008. – **11**, № 6. – P. 686–692.
 18. Jang J.W., Kim J.G., Kim H.J., Kim B.T., Kang D.W., Lee J.E. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter // *Brain Res.* – 2007. – **1150**. – P. 100–107.
 19. Li X., Cope M.B., Johnson M.S., Smith D.L., Nagy T.R. Mild calorie restriction induces fat accumulation in female C57BL/6J mice // *Obesity (Silver Spring).* – 2010. – **18**, № 3. – P. 456–462.
 20. Patel N.V., Finch C.E. The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging // *Neurobiol. Aging.* – 2002. – **23**, № 5. – P. 707–717.
 21. Rogers P.J. A healthy body, a healthy mind: long-term impact of diet on mood and cognitive function // *Proc Nutr Soc.* – 2001. – **60**, № 1. – P. 135–143.
 22. Siwak C.T., Tapp P.D., Milgram N.W. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the Beagle dog // *Learning and memory.* – 2010. – № 8. – P. 317–325.
 23. Sotolongo C.P., Carrillo C.P., Carrillo C.C. Memory. An introduction to the study of the cognitive disorders in normal and pathological aging // *Rev. Neurol.* – 2004. – **38**, № 5. – P. 469–472.
 24. Stewart J., Mitchell J., Kalant N. The effect of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes // *Neurobiol Aging.* – 1989. – **10**, № 6. – P. 669–675.
 25. Walsh R.N., Cummins R.A. The open field test: a critical review // *Psychol. Bull.* – 1976. – **83**, № 3. – P. 482–504.
 26. Yanai S., Okaichi Y., Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats // *Neurobiol Aging.* – 2004. – **25**, № 3. – P. 325–332.
 27. Masoro E.J. Role of hormesis in life extension by caloric restriction // *Dose-Response.* – 2007. – **5**, № 2. – P. 163–173.

НДІ біології Харків. нац. ун-ту ім. В.Н.Каразіна
E-mail: farmaleg@rambler.ru

Матеріал надійшов до
редакції 30.09.2010