

ФИЗИОЛОГИЯ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

**ТРЕВОЖНОСТЬ И ПРОГЕСТЕРОН В ПЛАЗМЕ КРОВИ
В РАЗНЫЕ СТАДИИ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА У КРЫС
С ПРОТИВОПОЛОЖНЫМИ СТРАТЕГИЯМИ ПОВЕДЕНИЯ**

© *Е. П. Виноградова,¹ Н. А. Арутюнян,² Д. А. Жуков²*

¹ Кафедра высшей нервной деятельности и психофизиологии
Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия,
E-mail: katvinog@yahoo.com

² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Исследовали изменение уровня тревожности у крыс линии КНА (активная стратегия поведения) и линии КЛА (пассивная стратегии поведения) в течение эстрального цикла и содержание прогестерона в плазме крови. Тревожность оценивали по времени, проводимом в закрытых и открытых руках приподнятого крестообразного лабиринта; содержание прогестерона в плазме определяли радиоиммунологически. У крыс линии КЛА не обнаружено достоверно значимых изменений тревожности в эстральном цикле. У крыс линии КНА тревожность значимо повышается во время диэструса. Тревожность крыс КНА в диэструсе выше, чем у крыс КЛА. У крыс КЛА уровень прогестерона выше, чем у крыс КНА, как во время диэструса, так и проэструса. Таким образом, обнаружена почти линейная отрицательная корреляция между уровнем тревожности и содержанием прогестерона в плазме крови.

Ключевые слова: прогестерон, тревожность, стратегии поведения, эстральный цикл.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 5. С. 565—572. 2018

E. P. Vinogradova,¹ N. A. Arutunyan,² D. A. Zhukov.² ANXIETY AND PLASMA PROGESTERONE IN DIFFERENT STAGES OF THE ESTROUS CYCLE IN RATS WITH OPPOSITE COPING STYLE. ¹ Saint Petersburg University, St. Petersburg, Russia, e-mail: katvinog@yahoo.com; ² I.P. Pavlov Institute of Physiology of the RAN, St. Petersburg, Russia.

The changes of anxiety in rat strain KHA (active coping style) and strain KLA (passive coping style) during the estrous cycle and progesterone levels in blood plasma were studied. Anxiety was measured by the time spent in open arms of the elevated plus maze. Plasma progesterone was determined by radioimmunoassay. KLA rats have no significant changes in anxiety during estrous cycle. KHA rats showed significant variation of anxiety during estrus cycle: high in diestrus, and low in proestrus. KHA rats showed an anxiety levels in diestrus significantly higher than KLA rats. Rats KLA progesterone levels were higher than the KHA rats, both during diestrus and proestrus. Therefore, data shows near linear negative correlation between anxiety level and plasma progesterone in rats of two strains.

Key words: progesterone, anxiety, coping style, estrous cycle.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 5. P. 565—572. 2018

Две стратегии поведения в стрессогенной ситуации — активная и пассивная — описаны у животных различных биологических видов. Среди лабораторных крыс генетически селектированы несколько пар линий с противоположными стратегиями поведения. В Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН селектированы крысы линии КНА — с высокой скоростью выработки условно-рефлекторной реакции активного избегания и линии КЛА — с низкой. Крысы этих двух линий различаются по множеству поведенческих и физиологических показателей [2–7].

Подавляющее большинство исследований двух стратегий поведения выполнено на самцах. Самки крыс как объекты неудобны коротким эстральным циклом, который занимает 4–5 дней. Каждая из стадий цикла имеет не только физиологические, но и поведенческие особенности. Одним из факторов колебания поведения самок в эстральном цикле является изменение секреции половых гормонов [10], которые модулируют активность различных нейромедиаторных систем, нейрональную активность, нейрональные структуры и синаптические связи [12, 21, 22, 26, 27, 34, 35]. Мы измеряли содержание в крови прогестерона, психотропная активность которого была показана еще самим Гансом Селье [31, 32]. В последнее время внимание к прогестерону привлечено как к предшественнику нейростероида аллопрегнанолона, обладающему анксиолитическим, седативным и антиконвульсивным действием [9, 20, 25].

Целью данной работы было изучение поведения самок крыс линий КНА и КЛА в разные стадии эстрального цикла и сопоставление поведенческих характеристик с уровнем прогестерона в плазме крови.

МЕТОДИКА

Все опыты проводили в соответствии с международными нормами по проведению медико-биологических исследований с использованием животных: European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, 1986 и «Правила лабораторной практики в РФ», утвержденные приказом Минздрава РФ № 708н от 23.08.2010.

В экспериментах использовали самок крыс линий КНА и КЛА ($n = 27$ и 24 соответственно) массой 180–250 г в возрасте 12–15 недель. Животных содержали по 3 особи в клетке, в стандартных условиях при свободном доступе к пище (сухой комбинированный корм для грызунов) и воде. Две недели животных приучали к рукам экспериментатора. У всех животных ежедневно брали влажалищный мазок для определения стадии эстрального цикла.

В качестве стрессорного воздействия использовали выработку активного избегания (30 реализаций на протяжении 15 мин) в камере с токопроводящим полом размером $20 \times 30 \times 60$ см.

Через 5 ч после выработки условной реакции активного избегания УРАИ животных тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) (НПК «Открытая наука», Россия). В настоящее время данный тест считается одним из наиболее адекватных для оценки тревожности [30]. Тревожность, определяемая по данной методике, отражает естественный страх высоты и открытых пространств у грызунов. Длительность пребывания в открытых рукавах лабиринта показывает уровень тревожности животного: увеличение времени пребывания в открытых рукавах свидетельствует об уменьшении уровня тревожности [30]. В настоящее время данный тест широко используется в исследованиях, посвященных изучению тревожности и тестированию анксиолитических препаратов: согласно проведенному анализу опубликованных научных работ за период с 1990 по 2011 г., тест ПКЛ использовался примерно в 50 % подобных исследований [15]. Животное помещали в центр ПКЛ в положении, в котором голова была ориентирована к открытому рукаву. Регистрировали время пребывания в открытых рукавах

ПКЛ и количество секторов лабиринта, пересеченных за время теста. Тестирование одного животного длилось 5 мин. После тестирования каждого животного лабиринт протирали раствором перекиси водорода для уничтожения запаха. Тестирование всех животных проводили в промежуток времени с 13:00 до 17:00.

Содержание прогестерона в плазме крови проводили через 2 недели после окончания поведенческих экспериментов самок крыс, которые находились в стадиях диэструса и проэструса. Кровь отбирали из хвостовых сосудов после обрезания кончика хвоста, плазму крови хранили до определения при -20°C .

Определение проводили радиоиммунологически, используя отечественные препараты меченого тригем стероида производства ГИПХ и антисыворотки, полученные в лаборатории Института физиологии им. И. П. Павлова РАН [1].

Видеозапись поведения животных проводили на вебкамеру Logitech Webcam (Швейцария). Статистическую обработку осуществляли с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для зависимых выборок в программе SPSS (PASW Statistics 18.0). За уровень статистической значимости принято значение $p < 0.05$. В статье данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поведение крыс обеих линий статистически значимо изменялось в течение эстрального цикла. У крыс линии КНА минимальный уровень тревожности (рис. 1, А) и максимальная двигательная активность (рис. 3, А) отмечались в стадию проэструса, а противоположная выраженность характеристик в стадию диэструса. Аналогичные результаты были получены нами ранее на беспородных самках крыс и крысах линии Вистар [2].

У крыс линии KLA уровень тревожности был максимальным в эструсе (рис. 2, А), а двигательная активность в диэструсе (рис. 4, А). В стадии эструса уровень тревожности (время, проведенное в закрытых рукавах лабиринта) был

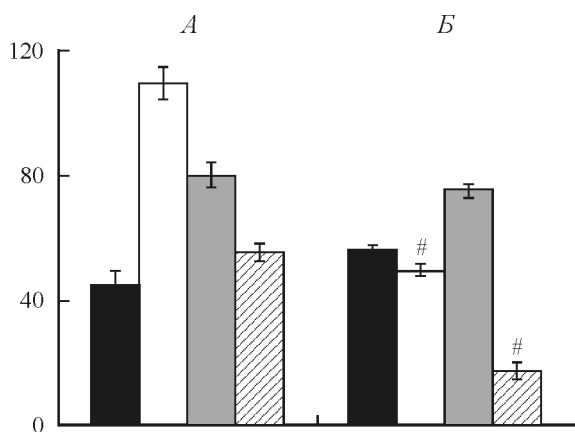


Рис. 1. Изменение уровня тревожности у самок крыс линии КНА в разные стадии эстрального цикла в контроле (А) и через 5 ч после аверсивного воздействия (Б).

По горизонтали — группы животных; по вертикали — время (с), проведенное в открытых рукавах лабиринта (величина, обратная уровню тревожности) по результатам тестирования. Черные столбики — данные по животным, находящимся в стадии диэструса, белые — проэструса, серые — эструса, штрихованные — метэструса. * $p < 0.05$ — различия между разными стадиями, # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ — различия у животных до и после стресса в соответствующих стадиях.

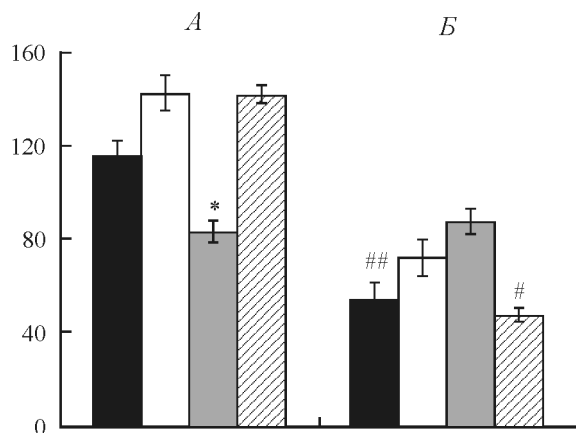


Рис. 2. Изменение уровня тревожности у самок крыс линии KLA в разные стадии эстрального цикла в контроле (А) и через 5 ч после аверсивного воздействия (Б).

По горизонтали — группы животных, по вертикали — время (с), проведенное в открытых рукавах лабиринта (величина, обратная уровню тревожности) по результатам тестирования в течение 300 с.

одинаковым у крыс двух линий. Уровень тревожности у крыс линии КНА в стадии диэструса был статистически значимо выше, чем у крыс KLA ($p < 0.01$), т. е. животные линии КНА находились в открытых рукавах лабиринта значительно меньший промежуток времени (44.2 ± 8.1 и 116.5 ± 6.2 с соответственно).

Через 5 ч после избегаемого стресса двигательная активность снизилась, а тревожность выросла у всех исследованных животных. Однако изменения имели различный характер у самок двух линий. Максимальная реакция — рост уровня тревожности (рис. 1, Б) и снижение двигательной активности (рис. 3, Б) — у крыс линии КНА был зарегистрирован в стадии проэструса на фоне максимального изменения уровня всех половых гормонов, в то время как у самок линии KLA — в стадии диэструса (рис. 2, Б; 4, Б).

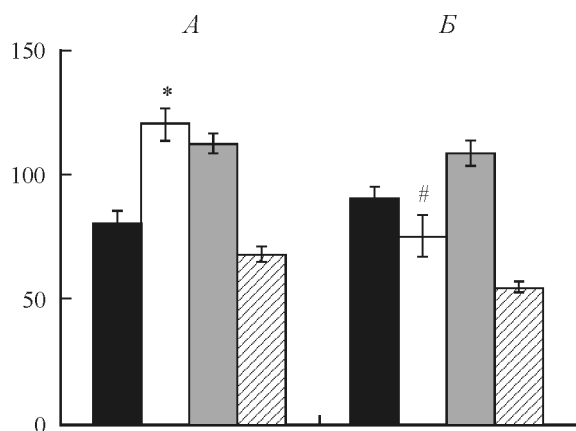


Рис. 3. Изменение двигательной активности у самок крыс линии КНА в разные стадии эстрального цикла в контроле и через 5 ч после аверсивного воздействия.

По горизонтали — группы животных, по вертикали — количество пройденных квадратов по результатам тестирования в течение 300 с. А, Б — см. в тексте.

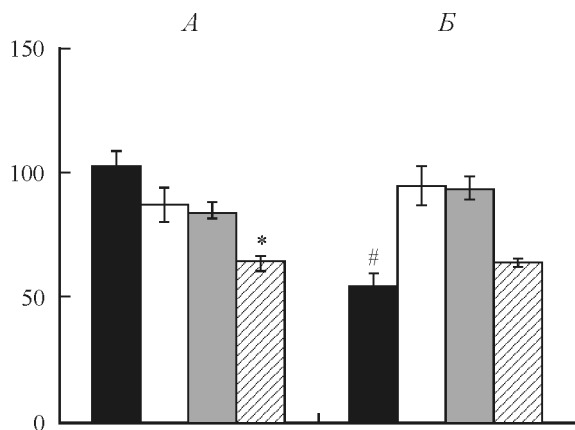


Рис. 4. Изменение двигательной активности у самок крыс линии KLA в разные стадии эстрального цикла в контроле и через 5 ч после аверсивного воздействия.

По горизонтали — группы животных, по вертикали — количество пройденных квадратов по результатам тестирования в течение 300 с. * $p < 0.05$ — различия между стадиями диэструса и метэструса. А, Б — см. в тексте.

У крыс KLA не обнаружено достоверных изменений уровня прогестерона при сравнении стадий проэструса и диэструса. У крыс линии КНА уровень прогестерона достоверно снижался во время диэструса. У крыс KLA уровень прогестерона выше, чем у крыс КНА, как во время диэструса, так и проэструса. Следовательно, обнаруживается отрицательная корреляция между уровнем тревожности и содержанием прогестерона в плазме крови

Минимальная поведенческая стрессореактивность (т. е. изменение уровня тревожности и двигательной активности по сравнению с нормой) у животных обеих линий отмечена в эструсе на фоне сформировавшейся половой доминанты.

Таким образом, обнаружена отрицательная линейная корреляция между уровнем тревожности и содержанием прогестерона в плазме крови (рис. 5). Эти ре-

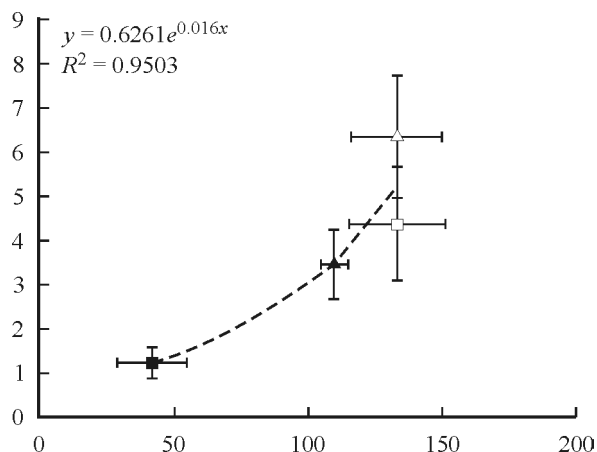


Рис. 5. Зависимость уровня тревожности от уровня прогестерона в плазме крови.

По оси абсцисс — время пребывания в открытых рукавах ПКЛ, с; по оси ординат — прогестерон плазмы крови, нМ. Квадраты — стадия диэструс, треугольники — стадия проэструс; черные — данные крыс линии КНА, белые — KLA.

зультаты подчеркивают значение периферических половых стероидов в регуляции эмоционального фона. Аверсивное воздействие привело к нивелированию различий в поведении самок крыс, наблюдаемых в различные стадии эстрального цикла.

Межлинейные различия в уровне прогестерона на протяжении эстрального цикла объясняют обнаруженное нами ранее различие в фертильности животных двух линий. При ежедневной транспортировке из вивария в рабочую комнату — хроническом стрессе — самки обеих линий очень плохо размножались, но характер нарушений был различен. Самки линии KLA находились по большей части в постоянном анэструсе, а у самок линии КНА цикл сохранялся, беременность наступала, но происходила резорбция зародышей. Относительно высокий уровень прогестерона у самок линии KLA являлся фактором, снижавшим вероятность наступления беременности. Низкий уровень прогестерона у самок линии КНА был недостаточен для поддержания нормальной беременности [3].

Обычно более высокий уровень тревожности и чувствительность к умеренному стрессорному воздействию у крыс и мышей наблюдается в диэструсе по сравнению с рецептивными фазами (проэструсом и эструсом) [13, 14, 17, 18, 24, 28, 29]. Однако данная закономерность обнаружена не во всех исследованиях [16]. Одной из причин различий, имеющих в литературе, может быть то, что в эстральном цикле лабораторных животных разных линий наблюдается различная амплитуда колебания секреции прогестерона.

Прогестерон является предшественником аллопрегнанолона (5 α -прегнан-3 α -ол-20-она), одного из стероидов, синтезируемого в нервной ткани и модулирующего работу ГАМК/А-рецепторного комплекса [23], с чем и связано психотропное действие аллопрегнанолона [9, 20, 25, 31, 33]. Стероиды, взаимодействующие с мембранными рецепторами, могут синтезироваться в нервной ткани, поэтому они и были названы нейростероидами [11]. Но эта же группа стероидов может быть и продуктами стероидов, синтезируемых в периферических железах. Психотропное действие прогестерона обусловлено 5 α -редуктазой, ключевым ферментом синтеза аллопрегнанолона. У мышей, нокаутных по гену этого фермента, введение прогестерона не изменяло поведения, связанного с тревогой [19]. Таким образом, периферический прогестерон является одним из факторов, обуславливающих тревожность поведения животных.

В данной работе показано, что у крыс с генетически детерминированными стратегиями поведения содержание прогестерона в периферической крови отрицательно коррелирует с уровнем тревожности в различные стадии эстрального цикла в состоянии покоя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Арутюнян Н. А., Секретарева Е. В., Савченко О. Н., Проїмина Ф. И. Синтез рецепторов эстрадиола и прогестерона в связи с биологическим эффектом половых гормонов у овариэктомированных крыс. Физиол. журн. СССР. 75(7): 992—1002. 1989.
- [2] Виноградова Е. П., Чаадаева Е. П. Изменение уровня тревожности у самок белых крыс в течение эстрального цикла и в зависимости от хэндлинга. Журн. высш. нерв. деятельности. 44(2): 277—282. 1994.
- [3] Виноградова Е. П., Чаадаева Е. П., Жуков Д. А. Нарушение репродуктивной функции у крыс генетически селективированных по способности к активному избеганию. Журн. высш. нерв. деятельности. 44 (6): 1106—1115. 1994.
- [4] Виноградова Е. П., Немец В. В., Жуков Д. А. Активная стратегия поведения как фактор риска депрессивноподобных нарушений после хронического умеренного стресса. Журн. высш. нерв. деятельности. 63(5): 589—596. 2013.
- [5] Виноградова Е. П., Жуков Д. А. Влияние интраназального введения окситоцина на поведение крыс с разной стратегией поведения, подвергнутых хроническому стрессу. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 103(1): 3—9. 2017.

[6] Виноградова Е. П., Каргин А. В., Огиенко Н. А., Жуков Д. А. Влияние окситоцина и тиреолиберина на тревожность у самцов белых крыс при социальном стрессе. Журн. высш. нерв. деятельности. 67(2): 1—8. 2017.

[7] Жуков Д. А. Реакция особи на неконтролируемое воздействие зависит от стратегии поведения. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 82(4): 21—29. 1996.

[8] Жуков Д. А., Виноградова Е. П. Разнонаправленное изменение тревожности после введения гидрокортизона крысам с генетическими различиями способности к обучению. Успехи физиол. наук. 25(1): 137—138. 1994.

[9] Bäckstrom T., Bixo M., Johansson M., Nyberg S., Ossewaarde L., Ragagnin G., Savic I., Strömberg J., Timby E., van Broekhoven F., van Wingen G. Allopregnanolone and mood disorders. Prog. Neurobiol. 113:88—94. 2014.

[10] Butcher R. L., Collins W. E., Fugo N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology. 94:1704—1708. 1974.

[11] Corpécho C., Robel P., Axelson M., Sjövall J., Baulieu E.-E. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(8): 4704—4707. 1981.

[12] Gangisetty O., Reddy D. S. Neurosteroid withdrawal regulates GABA-A receptor alpha4-subunit expression and seizure susceptibility by activation of progesterone receptor-independent early growth response factor-3 pathway. Neuroscience. 170: 865—880. 2010.

[13] Gangitano D., Salas R., Teng Y., Perez E., De Biasi M. Progesterone modulation of alpha5 nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle. Genes Brain Behav. 8: 398—406. 2009.

[14] Gouveia A., jr., dos Santos U. D., Felisbino F. E., de Afonseca T. L., Antunes G., Morato S. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. Behav. Processes. 67:167—171. 2004.

[15] Haller J., Aliczki M., Gyimesine Pelczér K. Classical and novel approaches to the preclinical testing of anxiolytics: A critical evaluation. Neurosci. Biobehav. Rev. 37(10, pt 1): 2318—2330. 2013.

[16] Hiroi R., Neumaier J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. Behav. Brain Res. 166(1): 93—100. 2006.

[17] Ho H. P., Olsson M., Westberg L., Melke J., Eriksson E. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: an animal model of premenstrual irritability? Neuropsychopharm. 24: 502—510. 2001.

[18] Koonce C. J., Wolf A. A., Frye C. A. Type 1 5alpha-reductase may be required for estrous cycle changes in affective behaviors of female mice. Behav. Brain Res. 226: 376—380. 2012.

[19] Koonce C. J., Frye C. A. Progesterone facilitates exploration, affective and social behaviors among wildtype, but not 5alpha-reductase Type 1 mutant, mice. Behav. Brain Res. 253: 232—239. 2013.

[20] Lévesque M., Herrington R., Leclerc L., Rogawski M. A., Avoli M. Allopregnanolone decreases interictal spiking and fast ripples in an animal model of mesial temporal lobe epilepsy. Neuropharmacol. 121: 12—19. 2017.

[21] Lovick T. A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. Braz. J. Med. Biol. Res. 45(4): 314—320. 2012.

[22] Lovick T. A., Griffiths J. L., Dunn S. M., Martin I. L. Changes in GABA(A) receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats. Neuroscience. 131: 397—405. 2005.

[23] Majewska M. D., Harrison N. L., Schwartz R. D., Barker J. L., Paul S. M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. Science. 232(4753): 1004—1007. 1986.

[24] Marcondes F. K., Miguel K. J., Melo L. L., Spadari-Bratfisch R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. Physiol. Behav. 74: 435—440. 2001.

[25] Melcangi R. C., Panzica G. C. Allopregnanolone: state of the art. Prog. Neurobiol. 113: 1—5. 2014.

[26] Mody I. Aspects of the homeostatic plasticity of GABA/A receptor-mediated inhibition. J. Physiol. 562: 37—46. 2005.

- [27] *Mónica Brauer M., Smith P. G.* Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton. Neurosci.* 187: 1—17. 2015.
- [28] *Mora S., Dussaubat N., Diaz-Veliz G.* Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinol.* 21:609—620. 1996.
- [29] *Reddy D. S., Kulkarni S. K.* Sex and estrous cycle-dependent changes in neurosteroid and benzodiazepine effects on food consumption and plus-maze learning behaviors in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62: 53—60. 1999.
- [30] *Pellow S., Chopin P., File S., Briley M.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci. Methods.* 14:149—167. 1985.
- [31] *Selye H.* Studies concerning the anesthetic action of steroid hormones. *J. Pharmacol. Exp. Therapy.* 73: 127—141. 1941.
- [32] *Selye H.* Anesthetic effect of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46:116—112. 1941.
- [33] *Schüle C., Nothdurfter C., Rupprecht R.* The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Prog. Neurobiol.* 113: 79—87. 2014.
- [34] *Smith S. S., Gong Q. H.* Neurosteroid administration and withdrawal alter GABA_A receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *J. Physiol.* 564: 421—436. 2005.
- [35] *Wei W., Zhang N., Peng Z., Houser C. R., Mody I.* Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23: 10 650—10 661. 2003.

Поступила 20 III 2018