

**ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА С ИЗБЫТКОМ ЖИРОВ И УГЛЕВОДОВ
НА НЕЙРОМОТОРНУЮ ФУНКЦИЮ, КОГНИТИВНЫЕ,
ИНТЕГРАЛЬНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС
И МЫШЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ**

© К. В. Мжельская, В. А. Шупелин, С. А. Апрятин, Х. С. Сото,
А. А. Шумакова, В. С. Евстратова, Н. В. Курбаева,
Н. В. Трусов, И. В. Гмошинский

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии
и безопасности пищи, Москва, Россия
E-mail: kristik13@yandex.ru

Изучены нейромоторная функция, уровень тревожности и показатели памяти в тестах силы мышечного сжатия, приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) и условного рефлекса пассивного избегания соответственно у самцов крыс аутбредной линии Вистар, мышей инбредных линий C57Black/6J и DBA/2J, аутбредной линии ICR-1 и тетрагибрида DBCB в ходе потребления в течение 92 суток углеводно-жирового рациона (УЖР) с 30 % жира и добавкой 20%-ного раствора фруктозы вместо воды. По окончании эксперимента определяли массу тела, интегральные и биохимические показатели плазмы крови. В результате потребления УЖР у крыс Вистар и мышей DBA/2J развивались фенотипические признаки ожирения и отмечалось снижение показателя нейромоторики; у мышей линии DBA/2J увеличивался уровень тревожности в тесте ПКЛ, а у мышей линии C57Black/6J ухудшалась краткосрочная память. Среди различных линий мышей уровень тревожности был наибольшим у C57Black/6J и DBA/2J и наименьшим — у DBCB. С возрастом у мышей C57Black/6J тревожность достоверно возрастала независимо от потребляемого рациона, а у мышей ICR-1 — снижалась в контроле, но не при потреблении УЖР. Таким образом, потребление УЖР вызывает изменения в когнитивной функции и уровне тревожности у крыс и мышей независимо от наличия либо отсутствия фенотипических признаков ожирения, тогда как уровень нейромоторики с ними, по-видимому, взаимосвязан.

Ключевые слова: ожирение, нейромоторная функция, когнитивные показатели, in vivo модели, крыса, мышь.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 4. С. 452—465. 2018

K. V. Mzhel'skaya, V. A. Shipelin, S. A. Apryatin, Kh. S. Soto, A. A. Shumakova, V. S. Evstratova, N. V. Kirbaeva, N. V. Trusov, I. V. Gmoshinski. INFLUENCE OF EXCESS FAT AND CARBOHYDRATES FEEDING ON NEUROMOTOR FUNCTION, COGNITIVE, INTEGRAL AND BIOCHEMICAL INDICATORS OF VARIOUS LINES OF MICE AND RATS. Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia; e-mail: kristik13@yandex.ru

The neuromotor function, anxiety level and memory parameters were measured in male outbred Wistar rats, C57Black/6J and DBA/2J inbred mice, outbred ICR-1 and tetrahybrid DBCB mice during 92 day consumption of high carbohydrate-fat diet (HFCD) with 30 % fat and 20 %

fructose solution instead of water. Tests of «muscle contraction force», «elevated cross-shaped labyrinth» (ECL) and «conditioned reflex of passive avoidance», respectively, were used. At the end of the experiment, the body weight, integral and biochemical parameters of the blood plasma were determined. At HFCD consumption the phenotypic signs of obesity developed and the neuromotoric index decreased in Wistar rats and DBA/2J mice, in DBA/2J mice, the level of anxiety in the ECL test increased, and the short-term memory worsened in C57Black/6J mice. Among the various mouse strains, the anxiety level was the greatest in C57Black/6J and DBA/2J and the lowest in DBCB. Anxiety significantly increased with age in C57Black/6J mice, regardless of the consumed diet, whereas in ICR-1 mice it decreased in control, but not in consumption of HFCD. It is assumed that the consumption of HFCD causes changes in cognitive function and anxiety level in rats and mice, regardless of the presence or absence of phenotypic signs of obesity, whereas the level of neuromotorics appears to be interrelated with them.

Key words: obesity, neuromotor function, cognitive indices, *in vivo* models, rat, mouse.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 4. P. 452—465. 2018

В современном обществе ожирение взрослого и детского населения является одной из ведущих по своей значимости алиментарно-зависимых патологий [5]. Этиологическая основа ожирения состоит в определяемом образом жизни современного человека дисбалансом между энерготратами и энергетической ценностью рациона. Вместе с тем патогенез ожирения по современным представлениям имеет сложную структуру, включающую явления воспаления в жировой ткани, различные иммунные реакции, изменения в метаболизме и рецепции нейромедиаторов (дофамин, серотонин), нейропептидов, стойкие сдвиги в функции отделов ЦНС, отвечающих за чувство голода и насыщения, аппетит и пищевое поведение [4, 8, 11].

Разработка методов диетической и фармакологической коррекции обменных нарушений при ожирении требует учета большого числа факторов и биомаркеров, что возможно в исследованиях на *in vivo* моделях у экспериментальных животных. Наиболее часто при воспроизведении таких моделей используют крыс и мышей с делецией или нокаутом определенных генов (например, лептина), либо кормление животных обычных линий рационами, избыточными по энергетической ценности вследствие введения добавочных квот жиров и легкоусвояемых углеводов (так называемая диета «западного типа») [2, 4, 8]. При этом особый интерес представляют изменения поведенческих реакций, характеризующих состояние нейромоторики, тревожности и когнитивной функции [2]. По данным работы [4], развитие в эксперименте ожирения у крыс и мышей, получавших рационы с избыточной калорийностью, сопровождается сенсорной невропатией. Изменения в ЦНС при алиментарном диабете включают активацию нейроглии [2].

Целью данной работы является сравнительный анализ влияния потребления рациона с повышенной квотой жиров и фруктозы на развитие фенотипических признаков алиментарного ожирения, количественные показатели нейромоторики и когнитивной функции у крыс аутбредной линии Вистар и мышей инбредных линий C57Black/6 и DBA/2J, аутбредной линии ICR-1 и тетрагибрида DBCB, характеризующихся различными уровнями экспрессии ключевых генов липидного, углеводного и энергетического обмена.

МЕТОДИКА

Работа проведена на 20 крысах-самцах аутбредной линии Вистар (возраст 6—8 недель) с исходной массой тела 180 ± 5 г и 80 мышах-самцах (возраст 6—8 недель): 20 — инбредной линии DBA/2J (исходная масса тела 20 ± 0.5 г),

20 — инбредной линии C57Black/6 (исходная масса тела 20 ± 0.5 г), 20 — аутбредной линии ICR-1 (исходная масса тела 30 ± 1 г), полученных из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» и 20 — тетрагибридах DBCV (исходная масса тела 26 ± 1 г). Этот сложный гибрид 2-го поколения был выведен авторами самостоятельно в виварии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» путем скрещивания 4 различных инбредных линий мышей, поступивших из вышеуказанного питомника. А именно для получения F1 самки DBA/2J были скрещены с самцами BALB/c (1-й гибрид F₁), а самки CBA/lac с самцами C57Black/6J (2-й гибрид F₁). Для получения тетрагибридов особи из обоих гибридов F₁ были скрещены между собой. Животных содержали группами по 2 (крысы) или 4 (мыши) особи в одной клетке при температуре 21 ± 1 °C и режиме освещения 12/12 ч.

Работу с животными выполняли в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199 н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Дизайн эксперимента был одобрен Комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (протокол № 4 от 20.04.2017 г.). Животные каждого вида и линии были разделены на 2 группы равной численности по 10 особей. Средняя исходная масса тела в группах не различалась ($p > 0.05$, ANOVA). Мыши контрольных групп каждой линии и тетрагибрида (группы № 1, 3, 5, 7 соответственно) и крысы контрольной группы № 9 получали сбалансированный полусинтетический рацион по AIN93M с некоторыми модификациями [1] изначально из расчета 15 г сухого корма на крысу и 4 г на мышь в сутки, а животные опытных групп (мыши групп № 2, 4, 6, 8; крысы группы № 10) — высокожировой, высокоуглеводный рацион (УЖР) с увеличенной до 30 % по массе квотой жиров и 20%-ным водным раствором фруктозы вместо воды в режиме свободного доступа на протяжении всего эксперимента длительностью 92 суток (табл. 1). Количество съеденного рациона и выпитой жидкости фиксировали ежедневно и рассчитывали удельное энергопотребление (ккал/кг массы тела). Крыс и мышей еженедельно взвешивали с точностью до 1 и 0.1 г соответственно; фиксировали заболеваемость, летальность, внешний вид, активность, состояние шерстяного покрова, стула, особенности поведения.

Оценку состояния нейромоторики (мышечного тонуса) крыс и мышей проводили с помощью определения мышечной силы сжатия (силы хватки) передних лап на 0-е (до начала кормления; 0), 45—47-е (I) и 86—88-е (II) сутки проведения эксперимента. Силу хватки определяли в граммах, измеряя максимальные показания динамометра в двух повторах (в тот момент, когда животное отцепляется от рамки).

Оценку когнитивной функции проводили, используя тест условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) на установке производства фирмы «Panlab Harvard Apparatus» (Испания). При обучении животных однократно помещали в светлый отсек камеры спиной к темному отсеку. Под влиянием исследовательского поведения и врожденного предпочтения темных участков пространства (фотофобии) крысы и мыши достаточно быстро заходили в темный отсек. Регистрировали латентный период (ЛП) пребывания в светлом отсеке камеры. Как только животное переходило в темный отсек, оно получало электрокожное раздражение на лапы (не более 8 с; ток 0.15 мА для мышей и 0.3 мА для крыс; сопротивление 150 Ом), после чего его немедленно перемещали в отдельную клетку до окончания тестирования всех животных из клетки. Через 24 ч после обучения у животных проверяли закрепление памятного

Таблица 1
Биохимические показатели плазмы крови мышей и крыс (M ± m)

№ п/п	Линия животных, рацион (n = 10)	Глюкоза, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Билирубин общий, ммоль/л	Мочевина, ммоль/л	Мочевая кислота, мкмоль/л	Кальций, ммоль/л	Фосфор, ммоль/л
Мыши									
1	DВА/2I, контроль	12.5 ± 0.9	2.89 ± 0.14 ^{3,7}	1.35 ± 0.12 ^{3,5,7}	10.5 ± 0.3 ³	8.90 ± 0.78	248 ± 35 ^{3,7}	2.39 ± 0.04	2.47 ± 0.13 ⁷
2	DВА/2I, опыт	11.8 ± 1.3 ⁸	2.64 ± 0.35 ^{6,8}	1.75 ± 0.27 ^{4,6,8}	16.4 ± 3.4 ⁶	5.24 ± 0.62*	82 ± 27 ^{*6}	2.10 ± 0.26	2.37 ± 0.33
3	C57BI/6, контроль	13.2 ± 1.0	2.75 ± 0.19 ^{1,7}	0.61 ± 0.05 ^{1,5}	5.1 ± 0.8 ¹	8.39 ± 1.28	112 ± 23 ¹	2.37 ± 0.14	2.57 ± 0.25
4	C57BI/6, опыт	13.9 ± 1.6	2.47 ± 0.37 ⁸	0.65 ± 0.13 ²	8.1 ± 1.6	5.62 ± 0.86	110 ± 28	2.16 ± 0.23	2.02 ± 0.26
5	ICR-1, контроль	11.5 ± 1.3	3.06 ± 0.26 ⁷	0.88 ± 0.08 ^{1,3}	6.9 ± 1.2	7.08 ± 0.60	153 ± 34	2.21 ± 0.21	2.21 ± 0.26
6	ICR-1, опыт	12.1 ± 1.5	2.77 ± 0.30 ²	0.76 ± 0.12 ²	6.6 ± 1.0 ²	5.18 ± 0.56*	172 ± 27 ²	2.10 ± 0.22	1.96 ± 0.23
7	DVCB, контроль	14.6 ± 1.4	3.94 ± 0.47 ³	0.80 ± 0.08 ¹	8.0 ± 1.4	7.84 ± 0.79	113 ± 14 ¹	2.32 ± 0.18	2.03 ± 0.14 ¹
8	DVCB, опыт	15.3 ± 1.3 ²	3.68 ± 0.29 ^{2,4}	0.97 ± 0.11 ²	7.7 ± 1.2	6.61 ± 0.81	139 ± 21	2.31 ± 0.18	2.22 ± 0.21
Крысы									
9	Вистар, контроль	5.6 ± 0.3	2.00 ± 0.08	1.08 ± 0.12	9.19 ± 0.84	6.29 ± 0.15	112 ± 12	3.00 ± 0.04	1.89 ± 0.13
10	Вистар, опыт	8.4 ± 0.2*	1.78 ± 0.11	2.25 ± 0.36*	25.8 ± 3.9*	4.77 ± 0.37*	96 ± 12	3.11 ± 0.11*	2.27 ± 0.06*

Примечание. * Различие с соответствующей контрольной группой достоверно; надстрочные индексы — номера групп мышей, получавших соответствующий рацион, различие с которыми достоверно; p < 0.05; t-тест Стьюдента и/или непараметрический критерий Манна—Уитни.

следа. Для этого их тестировали в той же камере, но без подачи тока. Крысу или мышь помещали в светлый отсек камеры в стартовое положение и фиксировали ЛП нахождения в светлом отсеке до ее перехода в темный. Если животное не переходило в темный отсек камеры в течение 180 с, то считалось, что памятный след закрепился. Тестирование сохранения памятного следа проводили через 3 недели по аналогичной методике. Обучение проводили на 65-е сутки эксперимента, проверку обучения (закрепления памятного следа) — на 66-е сутки эксперимента и оценку долгосрочной памяти — на 87-е сутки периода кормления.

Уровень тревожности животных оценивали в тесте приподнятого крестообразного лабиринта («Panlab», Испания, ПКЛ). Данный тест позволяет оценить степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги, двигательную активность (подвижность), скорость ориентировочных реакций. С помощью системы видеонаблюдения «Smart 3.0.04» («Panlab Harvard Apparatus», Испания) регистрировали время, проведенное животным в открытых (ОР) и закрытых (ЗР) рукавах лабиринта, латентное время (задержку) входа в ЗР, число переходов между зонами и пройденный в лабиринте путь (дистанцию). Время пребывания лабораторных животных в лабиринте составляло 300 с. Тестирование проводили на 0-е (до начала кормления; тест 0), 36-е (тест I) и 57-е сутки (тест II) эксперимента.

Выведение животных (по 10 особей каждой группы) из эксперимента осуществляли на 93-и сутки путем обескровливания из нижней полой вены под эфирной анестезией. Массу органов, забрюшинной и бурой жировой ткани определяли с точностью до 0.01 г; относительную массу внутренних органов рассчитывали в процентах от массы тела. Кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом 1.0%-ным раствором гепарина в 0.15 М NaCl (1:10 по объему), плазму отделяли центрифугированием и проводили исследование биохимических показателей (содержание глюкозы, триглицеридов, холестерина, билирубина, мочевины, мочевой кислоты, кальция и фосфора) на биохимическом анализаторе «Konelab 20i» (Финляндия) по стандартным методикам.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев χ -квадрат (для альтернативных показателей), парного теста Стьюдента, непараметрических ранговых критериев Вилкоксона, Манна—Уитни и Краскала—Уоллеса при уровне значимости $p < 0.05$. Данные измерений представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика воспроизводимости модели алиментарного ожирения. Как следует из данных рис. 1, на протяжении всего эксперимента среднее удельное потребление энергии крысами опытной группы было достоверно повышено по сравнению с контролем ($p < 0.001$, парный t -тест Стьюдента). Аналогичная картина наблюдалась для мышей всех линий и тетрагибрида на протяжении первой половины срока кормления ($p < 0.02$), однако после 35-х суток опыта, по мере адаптации животных к особенностям пищевого режима, удельное энергопотребление в сравниваемых группах сближалось ($p > 0.05$) за счет снижения потребления твердого корма в опытных группах. Следует отметить, что у мышей линии DBA/2J выравнивание удельного энергопотребления между группами наблюдалось позднее, чем у животных других линий.

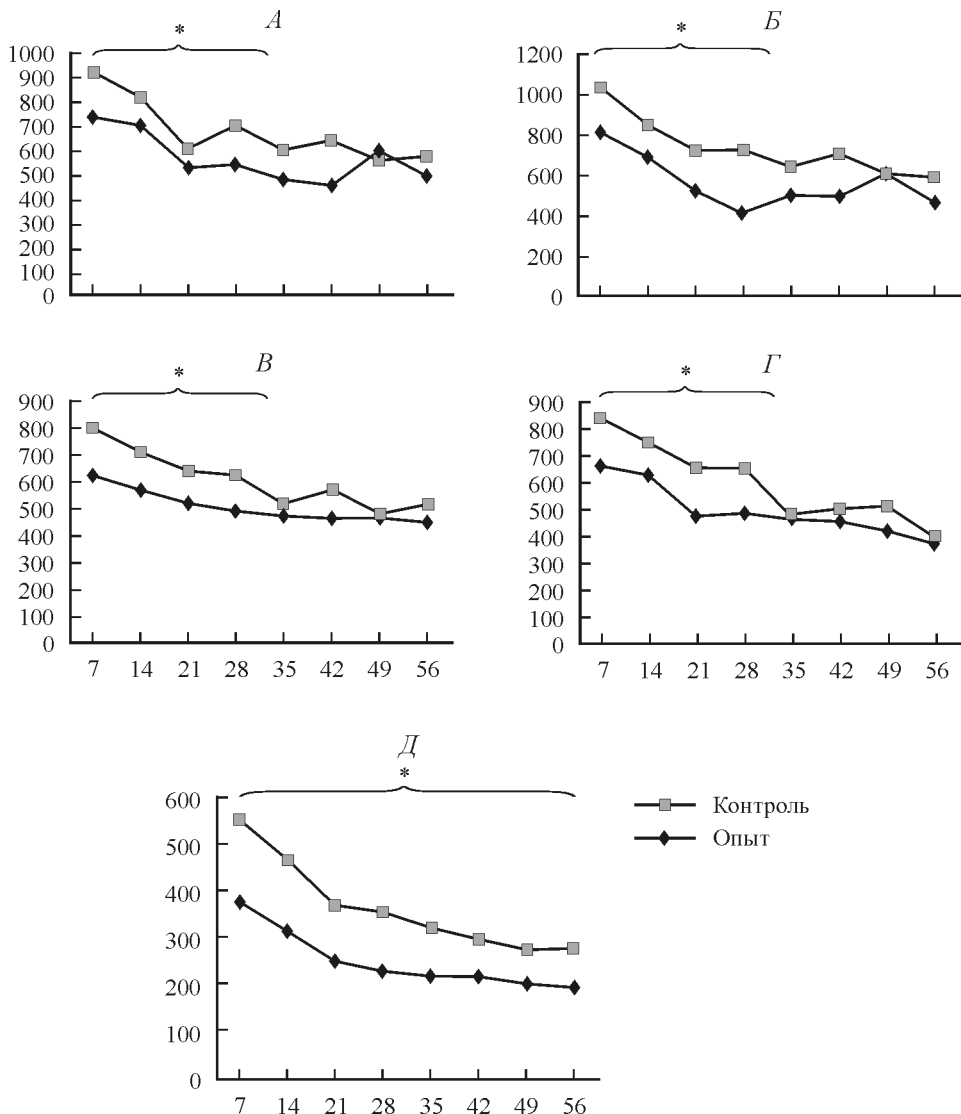


Рис. 1. Удельное энергопотребление самцов мышей и крыс контрольных и опытных групп в ходе эксперимента.

А — мыши DBA/2J; Б — мыши C57Bl/6; В — мыши ICR-1; Г — мыши DVCB, Д — крысы Вистар. По оси абсцисс — сутки кормления; по оси ординат — энергопотребление, ккал/кг массы тела, среднее по группе животных (М). *Интервал времени, в котором энергопотребление опытной и контрольной групп различается достоверно, $p < 0.05$, парный t -тест Стьюдента.

По окончании эксперимента масса тела мышей DBA/2J составила в среднем 35.5 ± 1.2 г в опытной и 29.2 ± 0.8 г в контрольной группе ($p_{1,2} < 0.05$), линии C57Black/6 — 29.5 ± 0.8 и 29.4 ± 1.0 г соответственно ($p_{3,4} > 0.1$); линии ICR-1 — 44.3 ± 2.2 и 47.3 ± 2.2 г ($p_{5,6} > 0.1$); тетрагибрида DVCB — 39.3 ± 1.9 и 39.8 ± 1.5 г ($p_{7,8} > 0.1$). Крысы линии Вистар имели в конце кормления массу тела 592 ± 28 г (опыт) и 439 ± 18 г (контроль), $p_{9,10} < 0.05$. Из числа мышей DVCB опытной группы 2 животных погибли в конце экс-

Таблица 2

Показатели нейромоторики (силы сжатия) у мышей и крыс ($M \pm m$)

Линия животных	Тест	Сила сжатия, г/кг массы тела		Достоверность различий, p^{**}
		контроль, стандартный рацион ($n = 10$)	опыт, высокожировой рацион + фруктоза ($n = 10$)	
Мыши				
DBA/2J	0	5.14 ± 0.24	4.83 ± 0.52	>0.1
	I	$4.07 \pm 0.13^*$	$3.88 \pm 0.37^*$	>0.1
	II	4.15 ± 0.30	$3.14 \pm 0.52^*$	0.005
C57Black/6J	0	4.52 ± 0.12	4.71 ± 0.17	>0.1
	I	4.76 ± 0.48	4.20 ± 0.39	>0.1
	II	$3.95 \pm 0.20^*$	4.41 ± 0.26	0.074
ICR-1	0	5.37 ± 0.25	4.40 ± 0.20	0.027
	I	$4.42 \pm 0.24^*$	4.32 ± 0.20	>0.1
	II	4.98 ± 0.54	4.73 ± 0.33	>0.1
DVCB	0	4.43 ± 0.26	5.25 ± 0.48	>0.1
	I	4.77 ± 0.39	4.52 ± 0.45	>0.1
	II	4.54 ± 0.22	4.27 ± 0.25	>0.1
Крысы				
Вистар	0	3.35 ± 0.17	2.74 ± 0.11	0.014
	I	$1.96 \pm 0.17^*$	$1.98 \pm 0.17^*$	>0.1
	II	$2.48 \pm 0.19^*$	$1.90 \pm 0.15^*$	0.036

Примечание. * Различие с 0-тестом достоверно, $p < 0.05$, критерий Вилкоксона; ** достоверность различий (p) согласно непараметрическому критерию Манна—Уитни.

перимента при явлениях острой циркуляторной дисфункции; животные остальных групп имели нормальный внешний вид, заболеваемости и летальности не было выявлено. Определение относительной массы внутренних органов при выведении из эксперимента показало достоверное ($p_{1,2} < 0.05$) снижение у мышей DBA/2J опытной группы массы легких, головного мозга, гонад и возрастание массы забрюшинного белого жира до 4.2 ± 0.3 % против 2.3 ± 0.4 % в контроле; у мышей C57Black/6 достоверное ($p_{3,4} < 0.05$) снижение относительной массы сердца и селезенки; у мышей ICR-1 достоверное ($p_{5,6} < 0.05$) снижение массы бурого жира до 0.4 ± 0.1 % против 0.7 ± 0.1 % в контроле. У крыс Вистар потребление УЖР приводило к достоверному ($p_{9,10} < 0.05$) возрастанию относительной массы печени, снижению массы сердца, почек, головного мозга и гонад; более чем двукратному возрастанию массы забрюшинного белого жира до 5.2 ± 0.5 против 2.4 ± 0.6 % в контроле.

Определение биохимических показателей плазмы крови (табл. 1) у мышей при выведении из эксперимента не выявило достоверных влияний УЖР на ключевые маркеры углеводного и липидного обмена, включая уровень глюкозы, общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП, триглицеридов (ТГ), за исключением недостоверного ($p_{1,2} > 0.1$) возрастания уровня ТГ у мышей DBA/2J опытной группы. При этом у всех мышей как опытных, так и контрольных групп отмечались средние уровни глюкозы выше 11 ммоль/л (нормальные

Таблица 3

Результаты тестирования УРПИ у мышей и крыс

№ п/п	Линия животных, рацион	I тест		II тест (через 24 ч)	III тест (через 21 сутки)
		время до входа, с, $M \pm m$	число зашедших животных / общее число животных (в скобках число зашедших, %)	число не зашедших животных / общее число животных (в скобках число не зашедших, %)	
Мыши					
1	DBA/2J, контроль	86 ± 18	9/10 (90)	2/9 (22)	—
2	DBA/2J, опыт	51 ± 4*	9/9 (100)	1/9 (11)	—
3	C57Bl/6, контроль	108 ± 15	8/10 (80)	8/8 (100)	5/8 (62)
4	C57Bl/6, опыт	142 ± 18	6/10 (60)	3/6 (50)*	1/3 (33)
5	ICR-1, контроль	69 ± 16	9/10 (90)	4/9 (44)	1/4 (25)
6	ICR-1, опыт	90 ± 16	9/10 (90)	5/9 (55)	1/5 (20)
7	DVCB, контроль	143 ± 18	5/10 (50)	5/5 (100)	2/5 (40)
8	DVCB, опыт	99 ± 26	5/9 (55)	3/5 (60)	2/2 (100)
Крысы					
9	Вистар, контроль	26 ± 16	10/10 (100)	9/10 (90)	6/9 (67)
10	Вистар, опыт	61 ± 21	9/10 (90)	8/9 (88)	7/8 (88)

Примечание. * Различие с группой контроля достоверно, $p < 0.05$, t -тест Стьюдента или критерий χ -квадрат.

значения для животных данного пола и возраста не превышают 10 ммоль/л). Наиболее высокий уровень глюкозы отмечен у тетрагибридов DVCB (опыт — 15.3 ± 1.3 , контроль — 14.6 ± 1.4 ммоль/л, $p_{7,8} > 0.1$). Мыши DBA/2J, потреблявшие УЖР, имели пониженные уровни мочевой кислоты ($p_{1,2} < 0.05$), а мыши ICR-1 — также и мочевины ($p_{1,2} < 0.05$; $p_{5,6} < 0.05$). У крыс Вистар потребление УЖР приводило к достоверному ($p_{9,10} < 0.05$) возрастанию уровня глюкозы, триглицеридов, фосфора, кальция, общего билирубина (табл. 1).

Влияние экспериментальных рационов на показатели нейромоторики (силы хватки). Как следует из данных, представленных в табл. 2, у мышей линий C57Black/6J не наблюдается практически никаких различий между опытной и контрольной группами при трех тестированиях силы сжатия. При этом в конце эксперимента отмечается достоверное снижение показателя по сравнению с нулевой точкой только в контрольной группе животных. У тетрагибридов DVCB достоверных различий в силе сжатия между группами при трех тестированиях и возрастной динамики этого показателя не наблюдается. Мыши ICR-1 контрольной группы изначально продемонстрировали большую силу сжатия по сравнению с опытной группой, что может быть связано с широкой нормой реакции у аутбредных животных. Однако с возрастом эти различия в опытной и контрольной группах нивелировались. Наконец, у мышей DBA/2J и крыс Вистар при последнем тестировании наблюдалось достоверное ($p_{1,2} < 0.05$; $p_{9,10} < 0.05$) снижение удельной силы хватки в группах, получавших УЖР, а также снижение силы хватки с возрастом, наиболее выраженное в опытных группах.

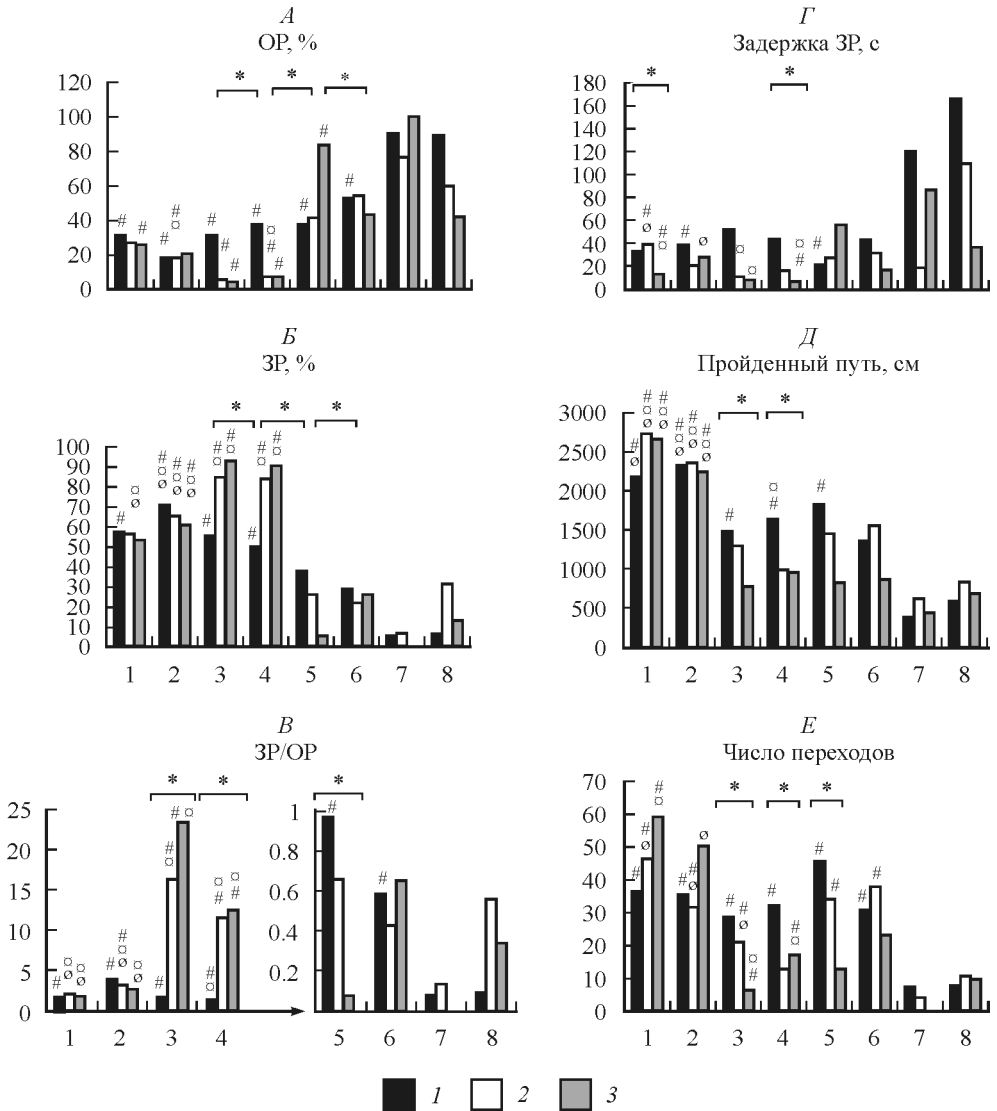


Рис. 2. Результаты исследования мышей контрольных и опытных групп в тесте ПКЛ.

А — время в ОР, %; *Б* — время в ЗР, %; *В* — отношение ЗР/ОР (безразмерное); *Г* — задержка входа в ЗР, с; *Д* — пройденный путь (дистанция в лабиринте), см; *Е* — число переходов между зонами, штук. По оси абсцисс — № групп (табл. 1 и текст статьи); по оси ординат — медиана показателя в соответствующих единицах. * Наличие достоверной временной динамики показателя, $p < 0.05$, при сравнении данных тестов 0, I и II по критерию Краскалла—Уоллеса. Достоверные различия с мышами DBCB на соответствующем районе (#), с мышами ICR-1 (°), с мышами C57Bl/6 (°), $p < 0.05$, критерий Манна—Уитни. Численность животных — 10 во всех группах.

Определение показателей когнитивной функции в тесте УРПИ. Как показали результаты определения когнитивной функции мышей и крыс (табл. 3), время до захода в темный отсек было достоверно снижено у мышей DBA/2J опытной группы по сравнению с контролем, а у остальных линий мышей и у крыс различий в этом показателе не было. При этом у DBA/2J наблюдалась наименьшая среди всех линий мышей степень закрепления УРПИ при втором

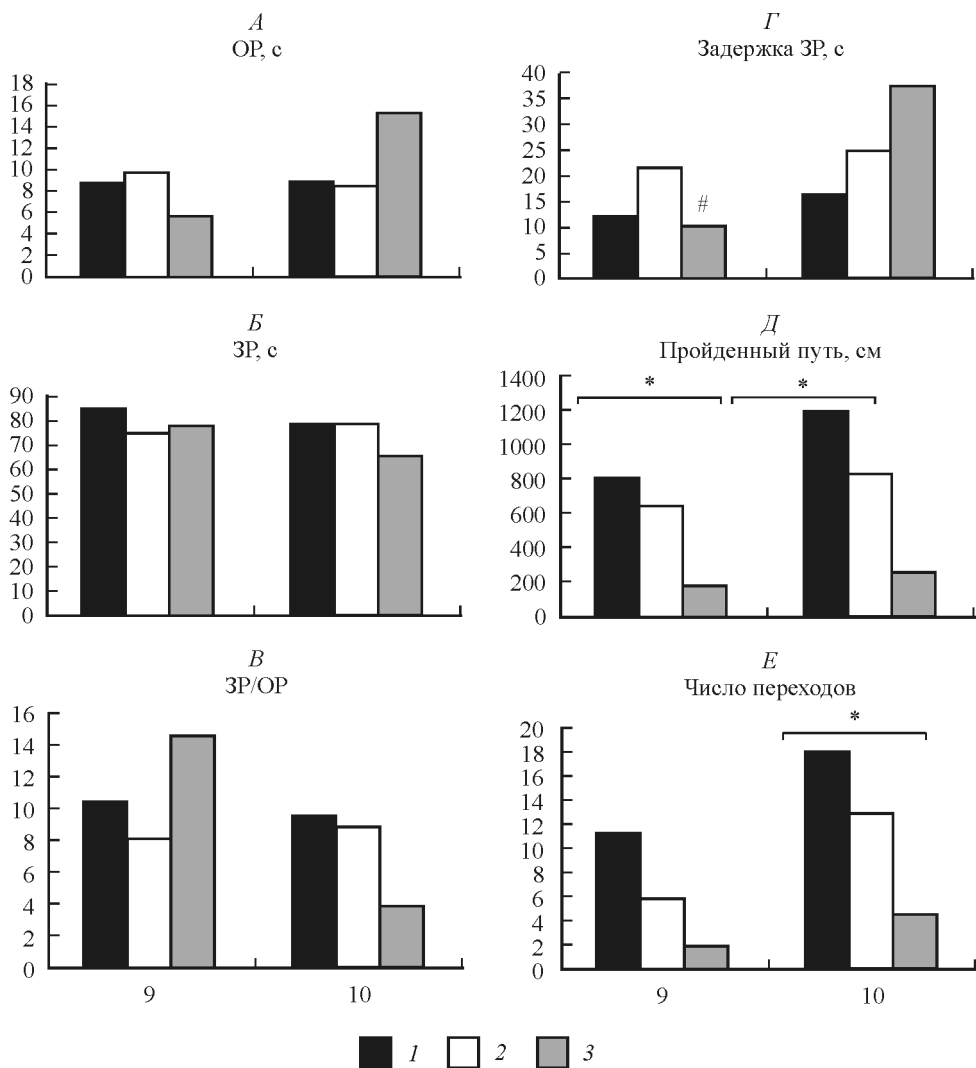


Рис. 3. Результаты исследования крыс Вистар контрольной и опытной групп в тесте ПКЛ.

* Наличие достоверной временной динамики показателя, $p < 0.05$, при сравнении данных тестов 0, I и II по критерию Краскала—Уоллеса; # различие показателя с опытной группой достоверно, $p < 0.05$, критерий Манна—Уитни. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

тесте, независимо от типа рациона. Ввиду незначительной степени закрепления рефлекса у мышей этой линии их 3-е тестирование не выполняли. Мыши линии C57Bl/6 опытной группы характеризовались достоверным снижением степени закрепления УРПИ при втором тесте, что свидетельствует о нарушении у них функции кратковременной памяти при потреблении опытного рациона. Аналогичное ослабление кратковременной памяти, прослеживаемое у мышей тетрагибридов DBCD, имело характер статистически недостоверной тенденции. Каких-либо влияний УЖР на показатели кратковременной памяти у мышей ICR-1, крыс Вистар, а также долговременной памяти (при 3-м тестировании) у животных всех групп выявлено не было.

Оценка уровня тревожности животных в тесте ПКЛ. Как следует из данных, представленных на рис. 2, у мышей линии DBA2/J контрольной группы в ходе эксперимента отмечается достоверное снижение времени задержки до входа в закрытый рукав ПКЛ, что указывает на повышение тревожности этих животных с возрастом. Однако в опытной группе аналогичный эффект не является достоверным. У этих мышей время пребывания в ЗР и ОР и их отношение (ЗР/ОР) указывали на некоторое повышение уровня тревожности при потреблении УЖР, однако эти различия не были достоверными.

У мышей C57Bl/6, независимо от применявшегося рациона, в ходе эксперимента снижались время пребывания в ОР, пройденная дистанция в лабиринте, задержка до входа в ЗР и возрастало время, проведенное в ЗР и отношение ЗР/ОР. Из этих данных следует, что животные этой линии с возрастом становятся более тревожными, и опытный рацион не оказывает на это существенного воздействия.

У мышей ICR-1 контрольной группы, в противоположность C57Bl/6, уровень тревожности с возрастом не возрастал, а снижался, судя по показателям времени пребывания в ЗР, ОР и их отношению. Примечательно, однако, что потребление животными УЖР приводило, по-видимому, к отмене этого эффекта.

Тетрагибриды мышей DBSV характеризовались наименьшим среди всех использованных линий уровнем тревожности, что проявлялось у них в самых высоких показателях времени нахождения в ОР, задержки до входа в ЗР и низких — времени в ЗР и отношения ЗР/ОР ($p < 0.05$ по сравнению с мышами других линий, получавших соответствующие рационы). DBSV мыши были также наименее подвижными в лабиринте, судя по величине пройденной дистанции и числу переходов между рукавами. При этом ни возраст этих животных, ни состав потребляемого рациона не оказывали заметного влияния на все эти показатели.

У крыс Вистар исследование в ПКЛ показало (рис. 3), что в опытной группе ближе к концу эксперимента (при III тесте) отмечается достоверное повышение времени задержки до входа в ЗР и тенденция к повышению времени нахождения в ОР и снижению ЗР/ОР по сравнению с контролем. Это может означать, что крысы опытной группы с возрастом становятся менее тревожными. Одновременно крысы обеих групп в ходе эксперимента становились менее подвижными по показателям пройденной дистанции и числа пересеченных зон лабиринта, причем возрастная динамика была достоверной для первого из этих показателей в обеих группах, а для второго — только при потреблении УЖР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, проведенные исследования показали в целом хорошую воспроизводимость модели алиментарного ожирения у крыс Вистар на указанном типе рациона, что в основном совпадает с данными для самок этой линии, полученными ранее [1]. У мышей воспроизводимость модели была значительно менее удовлетворительной, за исключением изменения ряда показателей у линии DBA2/J. Причины этого могут состоять в неполной адекватности потребностям мышей самцов примененного контрольного рациона AIN93M, который уже обладал для них, по-видимому, избыточной удельной калорийностью и содержанием жира. Тем не менее введение дополнительной

квоты жира и фруктозы в рацион мышей приводило к определенным изменениям поведенческих реакций. В частности, отмечалось снижение кратковременной памяти в тесте УРПИ у мышей DBA/2J и аналогичная тенденция у мышей DBCB. У мышей ICR-1 кормление УЖР приводило к отмене эффекта снижения уровня тревожности с возрастом животных, а у C57Bl/6, напротив, к усилению эффекта нарастания тревожности с возрастом по показателю времени задержки до входа в ЗР.

Наиболее выраженными были межлинейные различия поведенческих реакций у мышей. Так, уровень тревожности у мышей C57Bl/6 был наибольшим среди всех изученных линий и при этом значимо увеличивался с возрастом животных, что совпадает с данными, полученными ранее [2]. Известно, что мыши данной линии отличаются повышенной агрессивностью в связи с генетически детерминированными повышенными уровнями норэпинефрина и пониженными — норадреналина в их ЦНС [10], что также может отразиться и на степени их тревожности. Напротив, мыши DBCB были наименее тревожными среди всех линий, и показатели тревожности у них не увеличивались с возрастом, что может быть следствием лучшей приспособляемости этих животных к внешним условиям вследствие повышенного уровня гетерозиготности и, следовательно, пластичности их генома.

При тестировании когнитивной функции животных в тесте УРПИ были выявлены как межлинейные различия, так и эффекты со стороны УЖР. Так, у мышей линии DBA/2J, потреблявших УЖР, достоверное снижение времени захода в темный отсек (табл. 3) может свидетельствовать о вероятном увеличении уровня тревожности. Сходная направленность изменений для животных этой группы выявлена и в тесте ПКЛ для наиболее близкого по времени 2-го тестирования по показателям времени ОР, ЗР и отношения ОР/ЗР, хотя указанные различия были статистически незначимыми. Это может свидетельствовать о том, что данные двух разных физиологических тестов не противоречат между собой. У мышей C57Black/6J при потреблении опытного рациона отмечается явное ухудшение кратковременной памяти, что также согласуется с усилением эффекта нарастания тревожности в тесте ПКЛ по показателю задержки в ЗР (рис. 2, Г).

Как аутбредные мыши ICR-1, так и аутбредные крысы Вистар сходные с ними в том отношении, что они также являются генетически разнородной линией, не продемонстрировали при потреблении опытного рациона каких-либо изменений краткосрочной и долгосрочной памяти в тесте УРПИ. Однако УЖР способствовал отмене у первых эффекта снижения тревожности с возрастом (рис. 2, А—В), а у вторых потенцировал возрастное снижение подвижности в ПКЛ (рис. 3, Е). При этом тревожность крыс Вистар, получавших УЖР, по-видимому, снижалась, судя по данным рис. 3, Г.

У крыс Вистар и у мышей DBA/2J, демонстрировавших в отличие от животных других линий сходство по фенотипическому признаку ожирения при потреблении УЖР, получены данные о сходном снижении в этих условиях показателя нейромоторики (силы сжатия), в том числе в возрастной динамике. Данный факт заслуживает отдельного исследования в связи с принципиально разным уровнем генетической гетерогенности у этих аутбредной и инбредной линий грызунов двух разных видов.

Таким образом, потребление разными линиями мышей и крыс опытных групп УЖР вызывает изменения в когнитивной функции и уровне тревожности вне зависимости от наличия либо отсутствия фенотипических признаков ожирения, тогда как уровень нейромоторики с ними, по-видимому, взаимосвязан. Рассматриваемые эффекты могут быть связаны со сдвигами под дей-

ствием пищевых жиров и углеводов в обмене ключевых нейромедиаторов и нейротрансмиттеров, в частности серотонина и дофамина. Известно, что потребление высокоуглеводной пищи, сопровождающееся повышением уровня инсулина и анаболическим эффектом, приводит к увеличению относительной доли триптофана в пуле свободных аминокислот плазмы крови. Это усиливает его проникновение через гематоэнцефалический барьер с последующим синтезом из него серотонина [6], вызывающего при действии на специфические POMC/CART нейроны гипоталамуса развитие чувства насыщения и снижение тревожности [3]. Однако фруктоза, использованная нами как основной источник простых углеводов в опытном рационе, метаболизируется по инсулиннезависимому пути [9], вследствие чего данный постулируемый механизм может не реализоваться. Кроме того, проникая через гематоэнцефалический барьер, фруктоза оказывает ингибирующее действие на метаболизм малонил-КоА в нейронах ЦНС, результатом чего может быть дисрегуляция липидного обмена, чувства голода и насыщения [7]. С другой стороны, избыток углеводов, в том числе фруктозы, и жира в рационе способны потенцировать синтез в ЦНС дофамина, усиливающего чувство тревожности и активирующего пищевое поведение [12, 13]. Для выяснения значимости указанных молекулярных механизмов, а также причин имеющихся межвидовых и межлинейных различий животных в отношении влияния высокожирового, высокоуглеводного рациона на показатели нейромоторики, тревожности и когнитивной функции необходимо проведение транскриптомных, метаболомных и протеомных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 17-16-01043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Апратин С. А., Мажельская К. В., Трусов Н. В., Балакина А. С., Кулакова С. Н., Сото Х. С., Макаренко М. А., Ризер Н. А., Тутельян В. А.* Сравнительная характеристика in vivo моделей гиперлипидемии у крыс линии Вистар и мышей линии C57Bl/6. Вопросы питания. 85(6) : 24—33. 2016.
- [2] *Апратин С. А., Сидорова Ю. С., Шипелин В. А., Балакина А. С., Трусов Н. В., Мазо В. К.* Характеристика показателей нейромоторики, тревожности и когнитивной функции на in vivo модели алиментарной гиперлипидемии и ожирения. Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 163(1) : 46—51. 2017.
- [3] *Berghlund E. D., Liu C., Sohn J. W., Liu T., Kim M. H., Lee C. E., Vianna C. R., Williams K. W., Xu Y., Elmquist J. K.* Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis. J. Clin. Invest. 123(12) : 5061—5070. 2013.
- [4] *Davidson E. P., Coppey L. J., Dake B., Yorek M. A.* Effect of treatment of sprague dawley rats with ave7688, enalapril, or candoxatril on diet-induced obesity. J. Obes. 2011 : 686952. DOI: dx.doi.org/10.1155/2011/6869522011. 2011.
- [5] *Gortmaker S. L., Swinburn B., Levy D.* Changing the future of obesity: science, policy, and action. Lancet. 378(9793) : 838—847. 2011.
- [6] *Herrera C. P., Smith K., Atkinson F., Ruell P., Chow C. M., O'Connor H., Brand-Miller J.* High-glycaemic index and -glycaemic load meals increase the availability of tryptophan in healthy volunteers. Br. J. Nutr. 105(11) : 1601—1606. 2011.
- [7] *Lane M. D., Cha S. H.* Effect of glucose and fructose on food intake via malonyl-CoA signaling in the brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 382(1) : 1—5. 2009.
- [8] *Lutz T. A., Woods S. C.* Overview of animal models of obesity. Curr. Protoc. Pharmacol. Suppl. 58 : 5.61.1—22. 2013.
- [9] *Madsen C. R., Kahn C. R.* Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32(9) : 2052—2059. 2012.

[10] *Mandel P.* Genetic control of biogenic amines the possibilities offered by new microanalytical techniques for the investigation of human cerebrospinal fluid. In: Catecholamines and schizophrenia. Oxford. 293—294. 1975.

[11] *Nagayach A., Patro N., Patro I.* Experimentally induced diabetes causes glial activation, glutamate toxicity and cellular damage leading to changes in motor function. *Front. Cell. Neurosci.* 8 : 355. 2014.

[12] *Rada P., Avena N.M., Hoebel B.G.* Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience.* 134(3) : 737—744. 2005.

[13] *Rada P., Bocarsly M. E., Barson J.* Reduced accumbens dopamine in Sprague-Dawley rats prone to overeating a fat-rich diet. *Physiol. Behav.* 101(3) : 394—400. 2010.

Поступила 4 XII 2017
После доработки 29 I 2018