

А. А. БАСАЛАЙ

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЖИРОВОГО РАЦИОНА ПИТАНИЯ САМОК КРЫС ВИСТАР НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИХ ПОТОМСТВА МУЖСКОГО ПОЛА

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Проведено исследование влияния высокожировой диеты (ВЖД) самок крыс на поведенческие характеристики и уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF) у потомства мужского пола в сопоставлении с последствиями фетального вальпроатного синдрома (ФВС), который является общепринятой моделью дисфункции нервной системы. Показано, что потребление ВЖД самками крыс приводит к появлению признаков повышенной тревожности и сниженной двигательной активности у потомства мужского пола. Потомство с ФВС характеризуется выраженным тревожным поведением, снижением исследовательской и двигательной активности. Сочетанное воздействие ВЖД и ФВС вызывает суммирование ряда негативных последствий. Определение BDNF в сыворотке крови потомства в экспериментальных группах позволило выявить статистически значимое снижение уровня данного белка, наиболее выраженное в группе сочетанного воздействия.

Ключевые слова: высокожировая диета, фетальный вальпроатный синдром, фетальное программирование, поведенческие реакции, нейротрофический фактор мозга.

Введение. Фетальное программирование представляет собой процесс воздействия факторов внешней и внутренней среды на внутриутробное развитие плода путем модификации синтеза фетальных и плацентарных гормонов. Данный процесс может быть, как адаптивным, так и дезадаптивным, приводя к метаболическим нарушениям и вызывая предрасположенность к различным заболеваниям в течение дальнейшего постнатального развития. Известно, что адаптация взрослого организма к условиям среды является обратимой, тогда как адаптация плода может приводить к необратимым изменениям в геноме и отражаться на функциональном состоянии развивающегося организма [1].

В настоящее время пищевой статус матери (масса тела и рацион питания) рассматривается как один из эпигенетических факторов фетального воздействия на развитие ребенка, который действует наряду с генетической программой. Состояние эндокринной и иммунной систем матери, стрессы и вредные привычки во время беременности вносят вклад в последующее развитие заболеваний у плода [2]. Показано, что развитие плода, происходящее в условиях недостаточного питания или избыточного снабжения эмбриона питательными веществами, в дальнейшем повышает риски формирования индивидуальной склонности к ожирению, метаболическому синдрому, сахарному диабету 2 типа, и сердечно-сосудистым заболеваниям [2, 3]. Показано, что помимо метаболических и эндокринных эффектов, рацион матери во время беременности оказывает влияние на формирование и функционирование нервной системы плода, что в последующем может привести к развитию поведенческих нарушений и расстройств психики у ребенка [4, 5]. Механизмы развития подобных отклонений на сегодняшний день остаются невыясненными и требуют дальнейших исследований.

Изучение влияния рациона самок крыс на поведенческие характеристики потомства целесообразно проводить в сравнительном аспекте, используя для сопоставления известные модели дисфункции нервной системы. Одной из таких хорошо изученных моделей является ФВС. Данный экспериментальный синдром у крыс приводит к развитию целого ряда поведенческих отклонений, схожих с симптомами расстройств аутистического спектра (РАС) у людей [6]. Также представляет интерес изучить влияние рациона самок крыс на состояние их потомства, используя диету, имитирующую по своему составу нездоровый стиль питания, который включает обилие натуральных или модифицированных жиров, быстрых углеводов, характерный для современного человека.

Цель исследования: оценить поведенческие характеристики и уровень нейротрофического фактора мозга у потомства мужского пола, рожденного от самок крыс, получавших высокожировую

диету; сопоставить влияние высокожировой диеты с характеристиками фетального вальпроатного синдрома.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на крысах Вистар (самки, $n=100$; потомство мужского пола, $n=240$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, 12/12-часовом режиме освещения и темноты. Все эксперименты проведены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными и одобрены Комитетом по биоэтике Института физиологии [7].

Крысы-самки ($n=100$) были введены в эксперимент в 8-ми недельном возрасте с исходной массой тела 60–80 г. На протяжении следующих 8-ми недель 50 самок находились на стандартном питании вивария, остальные 50 особей получали ВЖД. Далее половозрелых самок крыс (возраст 16 недель) для получения потомства спаривали с самцами, содержавшимися на стандартной диете вивария. День обнаружения спермы в вагинальных мазках считался первым днем беременности крысы.

Для изучения фетального программирования самки были разделены на следующие группы:

- 1) Контроль – стандартный рацион вивария ($n=25$);
- 2) «Жиры» – ВЖД ($n=25$);
- 3) «ФВС» – стандартный рацион вивария и введение вальпроевой кислоты в период беременности ($n=25$);
- 4) «Жиры+ФВС» – ВЖД и введение вальпроевой кислоты в период беременности ($n=25$).

На следующем этапе эксперимента новорожденных крысят-самцов отлучали от самок на 30-й день жизни и подразделяли на группы в соответствии с исходными группами самок: «Потомство. Контроль» ($n=60$); «Потомство. ФВС» ($n=31$); «Потомство. Жиры» ($n=88$); «Потомство. Жиры+ФВС» ($n=61$). Все крысята из групп «Потомство» получали стандартный рацион вивария. Далее проводилось изучение особенностей поведения потомства мужского пола и определение BDNF в сыворотке крови.

Экспериментальное моделирование ВЖД: самкам крыс с 8-ми недельного возраста и в течение 16-ти недель (8 недель до беременности, во время беременности и в период лактации) дополнительно к стандартному рациону питания вивария добавляли модифицированные жиры растительного происхождения (в виде маргарина с массовой долей жира 82 %) из расчета 20 % от суточной калорийности корма.

ФВС у потомства крыс моделировали путем однократного внутривентрального введения самкам на 13-й день беременности раствора натриевой соли вальпроевой кислоты в дозе 600 мг/кг [8].

Ориентировочно-двигательную активность потомства крыс в возрасте 57–62 дня изучали в тесте «Открытое поле», для интерпретации полученных показателей использовали методические рекомендации [9–11]. Для изучения исследовательской и двигательной активности, уровня тревожности у потомства крыс в возрасте 63–69 дней использовали тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» («ПКЛ») [9]. Регистрацию поведения каждого животного проводили в течении 5-ти минут с помощью видеокамеры Logitech Webcam 905 (Logitech, Китай). Обработку полученных данных осуществляли в специализированной программе ANY-Maze (Stoelting Inc., США).

Содержание BDNF в сыворотке крови потомства определяли методом неконкурентного иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа (Fine Test, Китай).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием статистической программы «Statistica 10» (StatSoft Inc., USA). Характер распределения исследуемых показателей проверяли по критерию Шапиро-Уилка. При условии нормальности распределения использовали параметрические методы статистики: данные были представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$), статистически значимые различия между группами были оценены на основании t-критерия Стьюдента. При ненормальном распределении значений применяли непараметрические методы статистики: результаты были представлены в виде медианы и процентилей ($Me [25;75]$), статистически значимые различия рассчитывали по U-критерию Манна-Уитни. Статистически значимые различия выявляли при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По результатам теста «Открытое поле» у крысят-самцов группы «Потомство. Жиры» было выявлено увеличение времени выхода из центральной зоны на 38,5 % ($p < 0,05$) и снижение актов груминга на 66,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. Полученные данные свидетельствуют о нарушении адаптационных реакций и повышенном уровне тревожности у животных при помещении их в незнакомые условия: установка большой площади с интенсивным освещением (таблица 1).

Табл. 1. Результаты теста «Открытое поле» у потомства мужского пола

Показатель	Группы			
	«Потомство. Контроль»	«Потомство. Жиры»	«Потомство. ФВС»	«Потомство. Жиры+ФВС»
Латентный период выхода из центральной зоны, с	6,50 (4,00;11,50)	9,00 (6,50;13,00) *	7,00 (5,00;16,00)	10,00 (6,00;13,00) *
Число центральных секторов	6,50 (3,00;14,00)	6,00 (2,00;11,00)	4,00 (1,00;7,00) **	4,00 (1,00;9,00) *
Число периферических секторов	38,50 (28,00;48,00)	36,00 (28,00;43,00)	30,00 (22,00;44,00)	35,00 (25,00;42,00)
Общее число секторов	46,50 (33,00;57,50)	40,00 (32,00;53,00)	36,00 (23,00;50,00) *	39,00 (29,00;52,00) *
Эпизоды груминга	3,00 (2,00;5,00)	1,00 (1,00;2,00) *°	4,00 (1,00;8,00)	2,00 (0,00;3,00) *°

Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от «Потомство. Контроль», # – от «Потомство. Жиры», ° – от «Потомство. ФВС»

У крыс-самцов «Потомство. ФВС» в поведенческом тесте «Открытое поле» при обработке полученных данных выявили снижение пересечений всех секторов арены на 22,6 % ($p < 0,05$), а также избегание центральной зоны на 38,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении исследовательской активности и высоком уровне тревожности у экспериментальных животных (таблица 1). Полученные данные соответствуют характеристикам модели ФВС [12, 13].

У крыс-самцов из группы сочетанного воздействия «Потомство. Жиры+ФВС» при прохождении теста «Открытое поле» было обнаружено снижение как исследовательской, так и горизонтальной двигательной активности, на это указывало статистически значимое уменьшение количества пересеченных центральных секторов на 38,5 % ($p < 0,05$) и общего количества пересеченных секторов на 16,1 % ($p < 0,05$), увеличение длительности латентного периода выхода из центральной зоны арены на 53,8 % ($p < 0,05$) и уменьшение числа актов груминга на 33,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица 1). Выявленные сдвиги характеризуют выраженную дезадаптацию в незнакомой обстановке у животных, подвергавшихся сочетанному воздействию в период внутриутробного развития.

По результатам теста «ПКЛ» в группе «Потомство. Жиры» выявлено достоверное снижение пройденной дистанции на 25,8 % ($p < 0,05$), общей скорости движения на 26,9 % ($p < 0,05$) и количества вертикальных стоек на 21,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении двигательной активности животных; время продолжительности актов груминга и время активности в закрытой зоне лабиринта было снижено, что указывает на высокий уровень тревожности, однако количество линий пересечения всех зон лабиринта и время, проведенное в каждой зоне, было сопоставимо с контролем, что демонстрирует сохраненную исследовательскую активность крысят (таблица 2).

Табл. 2. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» у потомства мужского пола

Показатель	Группы			
	«Потомство. Контроль»	«Потомство. Жиры»	«Потомство. ФВС»	«Потомство. Жиры + ФВС»
Общая пройденная дистанция, м	7,63 (4,94;9,47)	5,66 (3,17;7,91) *	5,18 (2,31;6,77) *	5,48 (3,23;8,38) *
Средняя скорость движения, м/с	0,026 (0,016;0,032)	0,019 (0,011;0,027) *	0,017 (0,008;0,023) *	0,019 (0,011;0,028) *
Количество вертикальных стоек	19,00 (14,00;23,00)	15,00 (11,00;21,50) *	13,00 (7,00;19,00) *	16,50 (11,00;23,00)
Количество линий пересечения всех зон лабиринта	28,50 (15,00;38,00)	25,50 (11,00;37,00)	8,00 (3,00;20,00) **	13,50 (10,00;27,00) **

Продолжение таблицы 2

Общее время груминга, с	27,35 (13,90;45,90)	14,65 (4,50;26,35) *°	33,30 (13,30;83,50)	16,75 (5,50;29,20) *°
Время нахождения в центральной зоне, с	36,85 (21,80;52,50)	35,70 (13,10;61,85)	9,50 (6,70;21,60) *#	23,55 (10,40;46,70) *#°
Количество выходов в открытую зону	5,50 (3,00;10,00)	5,00 (2,50;8,00)	2,00 (1,00;4,00) *#	3,00 (1,00;5,00) *#
Время нахождения в открытой зоне, с	12,25 (7,20;35,50)	10,60 (2,70;19,75)	2,50 (0,70;8,50) *#	7,70 (0,60;16,90) *
Время нахождения в закрытой зоне, с	242,40 (210,00;270,80)	245,65 (220,25;283,55)	280,50 (270,00;293,20) *#	269,35 (241,60;283,10) *°
Время активности в закрытой зоне, с	127,75 (103,00;142,10)	112,85 (78,45;123,40) *°	143,50 (82,50;178,30)	106,90 (80,70;126,50) *°
Время неподвижности в закрытой зоне, с	143,90 (108,90;203,3)	155,75 (130,05;236,00)	211,30 (175,90;244,90) *#	200,00 (152,80;225,50) *
Время замирания в закрытой зоне, с	54,40 (27,70;90,80)	53,50 (30,10;111,00)	100,10 (50,30;142,40) *	98,65 (54,40;177,90) *#

Примечание: статистически значимые различия при $p < 0,05$: * – от «Потомство. Контроль», # – от «Потомство. Жиры», ° – от «Потомство. ФВС»

При проведении теста «ПКЛ» у крыс с ФВС зафиксировано статистически значимое уменьшение пройденной дистанции на 32,1 % ($p < 0,05$), скорости передвижения на 34,6 % ($p < 0,05$) и количества вертикальных стоек на 31,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о торможении двигательной активности; снижение исследовательской активности и высокий уровень тревожности отмечали по фактам уменьшения количества пересечений всех зон лабиринта на 71,9 % ($p < 0,05$), увеличения времени нахождения в закрытых зонах на 15,7 % ($p < 0,05$), снижения количества выходов и времени пребывания в открытых зонах ПКЛ; на высокий уровень тревожности также указывало увеличение времени неподвижности на 46,8 % ($p < 0,05$) и замирания на 84,0 % ($p < 0,05$) в закрытой «безопасной» зоне лабиринта по сравнению с контролем (таблица 2) [12, 13].

При прохождении теста «ПКЛ» у крыс из группы сочетанного воздействия выявлено нарушение двигательной и исследовательской активности, а также отмечен высокий уровень тревожности. Зафиксировано снижение пройденной дистанции на 28,2 % и скорости движения по лабиринту на 26,9 % ($p < 0,05$), уменьшение на 52,6 % ($p < 0,05$) количества линий пересечения лабиринта, увеличение времени, проведенного в закрытых зонах, и его снижение в центральной и открытых зонах лабиринта на 36,1 % ($p < 0,05$) и 37,1 % ($p < 0,05$), уменьшение общего времени актов груминга на 38,8 % ($p < 0,05$), снижение времени активности на 16,3 % ($p < 0,05$) и увеличение времени неподвижности на 39,0 % ($p < 0,05$) и замирания на 81,3 % ($p < 0,05$) в закрытой зоне ПКЛ по отношению к крысам «Потомство. Контроль» (таблица 2).

Учитывая многочисленные поведенческие отклонения у потомства крыс с различными вариантами влияния на фетальное развитие, было проведено изучение содержания в сыворотке крови нейротрофического фактора мозга BDNF. Как показано на рисунке 1, у крыс всех опытных групп концентрация BDNF в сыворотке крови была статистически значимо снижена по отношению к контролю: у животных из группы «Потомство. Жиры» данный показатель был снижен на 15,2 % ($p < 0,05$), у крыс из группы «Потомство. ФВС» – на 16,2 % ($p < 0,05$), а из группы сочетанного воздействия «Потомство. Жиры+ФВС» – на 42,4 % ($p < 0,05$).

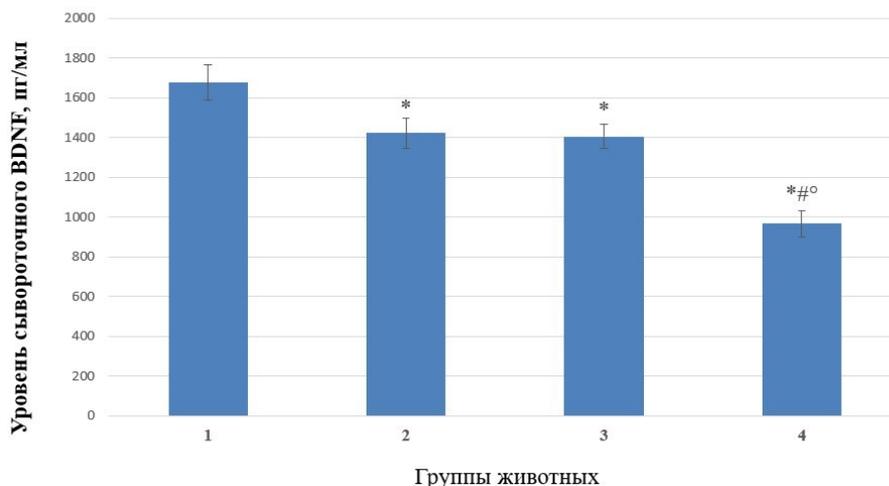


Рис. Уровень BDNF в сыворотке крови у крыс-самцов всех экспериментальных групп (M ± SEM): 1 – «Потомство. Контроль», 2 – «Потомство. Жиры», 3 – «Потомство. ФВС», 4 – «Потомство. Жиры+ФВС». Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы контроля, # – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «Потомство. Жиры», ° – $p < 0,05$ по отношению к показателям группы «Потомство. ФВС»

Необходимо отметить, что уровень BDNF у самцов из группы сочетанного воздействия был снижен относительно групп «Потомство. ФВС» на 31,2 % ($p < 0,05$) и «Потомство. Жиры» на 32,0 % ($p < 0,05$; рисунок).

BDNF является членом семейства нейротрофинов, играющим важную роль в созревании центральной нервной системы и поддержании ее функционирования. Данный белок участвует в процессах нейрогенеза, дифференцировки нейронов, синаптогенеза и синаптической пластичности [14]. Поскольку нейротрофический фактор мозга по современным данным вовлечен в патогенетические механизмы развития различных психоневрологических заболеваний [14, 15], можно предположить, что нарушения поведенческих реакций в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» могут быть связаны со снижением уровня исследуемого нейротрофина.

Заключение. Изучение поведенческих реакций крыс-самцов в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт», а также определение уровня нейротрофического фактора мозга BDNF в сыворотке крови позволяет сделать следующие выводы:

- 1) потребление ВЖД самками крыс приводит к появлению у их потомства признаков повышенной тревожности и сниженной двигательной активности на фоне сохраненной исследовательской активности;
- 2) потомство с индуцированным ФВС характеризуется выраженным тревожным поведением, зафиксированным по многим показателям, а также сниженной исследовательской и двигательной активностью;
- 3) сочетанное фетальное воздействие (ВЖД+ФВС) вызывает суммирование поведенческих отклонений: нарушение адаптационных реакций, снижение горизонтальной двигательной и исследовательской активности, а также высокий уровень тревожности у животных;
- 4) определение содержания BDNF в сыворотке крови потомства всех опытных групп демонстрирует статистически значимое снижение этого показателя, наиболее выраженное в группе сочетанного воздействия («Потомство. Жиры+ФВС»).

Таким образом, применение ВЖД у самок крыс приводит к развитию у их потомства поведенческих отклонений, связанных с высоким уровнем тревожности при адаптации к новым условиям среды, но уступающим по характеру и выраженности дезадаптивным сдвигам при индуцированном ФВС. Сочетанное воздействие ВЖД и ФВС вызывает суммирование ряда негативных последствий. Предположительно, одним из механизмов неблагоприятного фетального программирования является снижение нейротрофической обеспеченности головного мозга у потомства, за счет снижения уровня BDNF.

Литература:

- [1] *Moreno-Fernandez J., Ochoa J.J., Lopez-Frias M. et al.* Impact of early nutrition, physical activity and sleep on the fetal programming of disease in the pregnancy: a narrative review // *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 12. Art. 3900. P. 1–18.
- [2] *Петров Ю.А., Купина А.Д.* Фетальное программирование – способ предупреждения заболеваний во взрослом возрасте // *Медицинский совет*. 2020. Т. 13. С. 50–56.
- [3] *Marciniak A., Patro-Małyśza J., Kimber-Trojnar Ż. et al.* Fetal programming of the metabolic syndrome // *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017. Vol. 56, № 2. P. 133–138.
- [4] *Panjwani A.A., Ji Y., Fahey J.W et al.* Maternal obesity/diabetes, plasma branched-chain amino acids, and autism spectrum disorder risk in urban low-income children: Evidence of sex difference // *Autism Research*. 2019. Vol. 12, № 10. P. 1562–1573.
- [5] *Urbonaite G., Knyzeliene A., Bunn F.S. et al.* The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment // *Frontiers in neuroscience*. 2022. Vol. 16. Art. 909762. P. 1–24.
- [6] *Nicolini C, Fahnestock M.* The valproic acid-induced rodent model of autism // *Experimental neurology*. 2018. Vol. 299, Part A. P. 217–227.
- [7] European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg. 1986. 52 p.
- [8] *Ruhela R.K., Sarma P., Soni S. et al.* Congenital malformation and autism spectrum disorder: Insight from a rat model of autism spectrum disorder // *Indian J Pharmacol*. 2017. Vol. 49, № 3. P. 243–249.
- [9] *Миронов А.Н.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- [10] *Майоров О.Ю.* Оценка индивидуально-типологических особенностей поведения и устойчивости интактных белых крыс-самцов на основе факторной модели нормального этологического спектра показателей в тесте «открытое поле» // *Клин. информат. и Телемед*. 2011. Т. 7, вып. 8. С. 21–32.
- [11] *Пермяков А.А., Елисеева Е.В., Юдицкий А.Д. и др.* Поведенческие реакции у экспериментальных животных с различной прогностической устойчивостью к стрессу в тесте «Открытое поле» // *Вестник Удмуртского университета*. 2013. № 3. С. 83–89.
- [12] *Wang X., Tao J., Qiao Y. et al.* Gastrodin rescues autistic-like phenotypes in valproic acid-induced animal model // *Frontiers in Neurology*. 2018. Vol. 9. Art. 1052. P. 1–10.
- [13] *Khodaverdi M., Rahdar M., Davoudi S. et al.* 5-HT7 receptor activation rescues impaired synaptic plasticity in an autistic-like rat model induced by prenatal VPA exposure // *Neurobiology of Learning and Memory*. 2021. Vol. 183. Art. 107462. P. 1–43.
- [14] *Ferraguti G., Terracina S., Micangeli G. et al.* NGF and BDNF in pediatrics syndromes // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2023. Vol. 145. Art. 105015.
- [15] *Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F.* Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer // *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21. Art. 7777. P. 1–29.

A. A. BASALAI

EFFECT OF HIGH-FAT DIET OF FEMALE WISTAR RATS ON BEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF THEIR MALE OFFSPRING

State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

The effects of a high-fat diet (HFD) in female rats on behavioral characteristics and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in male offspring were investigated in comparison with the effects of fetal valproate syndrome (FVS), which is a well-established model of nervous system dysfunction. It has been shown that the consumption of HFD by female rats leads to signs of increased anxiety and decreased motor activity in male offspring. Offspring with FVS are characterized by marked anxious behavior, decreased exploratory and motor activity. The combined effects of HFD and FVS cause the summation of a number of negative consequences. Determination of BDNF in the blood serum of offspring of all experimental groups demonstrates a decrease in the level of this protein, most pronounced in the group of combined effect.

Key words: high-fat diet, fetal valproate syndrome, fetal programming, behavioral reactions, brain-derived neurotrophic factor.