

УДК 615.9; 573.7:57.017.55; 591.111; 591.8

ОСОБЛИВОСТІ ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЙ САМОК І САМЦІВ ЩУРІВ ЗА СУБХРОНІЧНОЇ ДІЇ 7-ГІДРОКСИКУМАРИНУ

¹М.Л. Зінов'єва, наук.співр., ²Н.О. Карпезо, к.біол.н., ²О.В. Линчак, к.біол.н.

¹Інститут екологієни і токсикології ім. Л.І. Медведя, м. Київ,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

РЕЗЮМЕ. Досліджено поведінкові реакції щурів після впливу різних доз 7-гідроксикумарину протягом трьох місяців і через місяць після припинення його введення. Отримані дані показують відмінності у поведінкових реакціях самок і самців щурів після введення 7-гідроксикумарину. Зміни в поведінці щурів значною мірою залежать від дози та тривалості введення препарату. Самці щурів виявились більш чутливими до дії 7-гідроксикумарину, але їхня нервова система швидше відновлювалась після відміни препарату.

Ключові слова: 7-гідроксикумарин, поведінкові реакції, нервова система.

РЕЗЮМЕ. Исследованы поведенческие реакции крыс после воздействия различных доз 7-гидроксикумарина в течение трех месяцев и через месяц после прекращения его введения. Полученные данные показывают различия в поведенческих реакциях самок и самцов крыс после введения 7-гидроксикумарина. Изменения в поведении крыс в значительной степени зависят от дозы и длительности введения препарата. Самцы крыс оказались более чувствительными к действию 7-гидроксикумарина, но их нервная система быстрее восстанавливается после отмены препарата.

Ключевые слова: 7-гидроксикумарин, поведенческие реакции, нервная система.

SUMMARY. The rats behavior after the influence of 7-hydroxycoumarin different doses during three months and in a month after cessation of its administration were investigated. The data obtained show the differences in behavior reactions of males and females after 7-hydroxycoumarin influence. The changes in the rat behavior noticeably depend on dose and duration of this chemical action. The rat males are more sensitive to 7-hydroxycoumarin, but the nervous system better recovers after its abolition.

Key words: 7-hydroxycoumarin, behavior reactions, nervous system.

Кумарин та його похідні є біологічно активними речовинами з широким спектром дії. Кумарини містяться в багатьох рослинах, що зумовлює їх наявність у харчових продуктах (спеціях, зеленому чаї), ефірних маслах (лавандовому, касієвому) та ін. Природні кумарини проявляють спазмолітичну, інсектицидну, бактерицидну і естрогенну дію [1]. 7-Гідроксикумарин, або умбеліферон, виявлений у складі екстрактів з лікарських рослин, має ліпазотропну [2], протизапальну, знеболюючу, імуномодельючу активності [3, 4], що дозволяє розглядати його як потенційний засіб корекції патологічних станів.

Синтетичний 7-гідроксикумарин використовується також у легкій промисловості як оптичний відбілювач та ультрафіолетовий фільтр завдяки його здатності до інтенсивної флуоресценції.

Розширення сфери застосування даної сполуки вимагає оцінки безпечності її використання. Вивчено вплив 7-гідроксикумарину на морфо-функціональний стан печінки, нирок, кишечника і міокарда щурів [5, 6]. Дослідження дії на нервову систему є одним з ключових моментів при аналізі токсичності хімічної речовини [7, 8]. Поведінкові реакції є чутливим показником, який дозволяє визначити наявність, ступінь і характер токсичного ураження нервової системи, визначити місце нейротоксичних ефектів у формуванні та розвитку

токсичного процесу. Гістопатоморфологічний аналіз дозволяє глибше проаналізувати вплив досліджуваної речовини на нервову систему.

Метою даної роботи було вивчення впливу 7-гідроксикумарину на функціональний стан центральної нервової системи білих щурів при його субхронічному впливі.

Матеріали і методи досліджень

Досліди проведено на самцях і самках щурів з початковою масою 100-120 г (5 груп по 5 самців та 5 самок у групі). Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. Усі процедури з тваринами виконували з дотриманням міжнародних правил і норм біоетики [9].

7-гідроксикумарин (водна суспензія) вводили інтрагастрально за допомогою атравматичного зонду щоденно вранці до годування тварин у дозах 50 мг/кг, 200 мг/кг та 500 мг/кг (що складала 1/200, 1/50 і 1/20 ЛД₅₀, відповідно) протягом трьох місяців. Контрольним тваринам у вищезазначений спосіб вводили воду. Проводили щоденний клінічний огляд тварин усіх груп з метою виявлення можливих симптомів інтоксикації, неврологічних порушень, таких як аномальна поведінка (стереотипія, задкування, зміна типових поведінкових патернів та ін.), порушення пози, координації рухів (атаксія та ін.), м'язового тону (ригідність м'язів, тремор, судоми) [10].

Раз на місяць досліджували поведінкові ре-

акції щурів. Вивчали їх також через місяць після припинення введення 7-гідроксикумарину (відновний період) у групі тварин, що отримували препарат у дозі 500 мг/кг, та у контрольній групі.

Для вивчення можливих впливів 7-гідроксикумарину на поведінкові реакції було використано тест "Відкрите поле", запропонований Холлом [11]. Для цього тварин поміщають у велику квадратну камеру розміром 900x900 мм з пластмасовими чорними стінками висотою 500 мм. Підлогою є лист чорного пластику, поділений на 36 квадратів (150x150 мм). Виділяють периферичні, або зовнішні, квадрати (ті, що розміщені вздовж стінок) та центральні, або внутрішні, (ті, що не торкаються стінок). Освітлення камери — яскраве рівномірне.

Методика тестування полягає в тому, що щура висаджують у центр установки і спостерігають за його поведінкою 3 хвилини. При дослідженні поведінкових реакцій реєструють такі показники: кількість центральних та периферичних квадратів (окремо), які були перетнуті твариною — горизонтальна рухова активність або локомоція; піднімання на задні лапки (стійки) — вертикальна рухова активність, дослідницька активність; фризинг (завмирання на дію неспецифічного подразника — реакція пасивно-оборонного характеру); грумінг — емоційна активність; дефекація (болюси) та уринація характеризують рівень тривожності та вегетативні реакції щурів [12].

У кінці дослідження проводили макроскопічний огляд структур головного мозку, визначення його абсолютної та відносної маси,

гістопатоморфологічне дослідження кори головного мозку. Для гістологічного аналізу шматочки мозку фіксували у рідині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали у парафін, робили зрізи товщиною 5-7 мкм та забарвлювали їх гематоксиліном-еозином-оранжем [13]. Морфо-функціональний стан тканин оцінювали, користуючись загальноприйнятими критеріями в патоморфології.

Статистична обробка результатів була проведена за критерієм Стьюдента. Для відповідних розрахунків використовували стандартний пакет програм статистичного аналізу Microsoft Excel 2007. Достовірною вважалась різниця, якщо значення $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Надходження 7-гідроксикумарину протягом 3-х місяців у дозах 50-500 мг/кг не викликало клінічних симптомів інтоксикації, видимих ознак неврологічних порушень, проявів аномальної поведінки у тварин. Не було виявлено статистично достовірних змін абсолютної і відносної маси головного мозку тварин, змін його тканин за даними макроскопічного дослідження.

Гістопатологічний аналіз кори великих півкуль головного мозку щурів не виявив порушень цито- і міелоархітекτονіки кори після субхронічного впливу 7-гідроксикумарину в усьому діапазоні доз.

Дослідження в умовах "відкритого поля" показали, що після місяця впливу 7-гідроксикумарину зміни у поведінці відбуваються лише при дії максимальної дози у самців щурів. У них спостерігали достовірне зниження горизонтальної активності у внутрішніх квадратах

Таблиця 1

Зміни показників поведінкових реакцій щурів самців після впливу 7-гідроксикумарину протягом місяця

Серія досліді	Кількість перетнутих квадратів		Кількість стійок		Грумінг (сек.)	Кількість фризингів	Кількість уринацій	Кількість дефекацій
	Внутрішні	Зовнішні	Внутрішні	Зовнішні				
Самці								
Контроль	11.0±1.88	42.0±8.74	0.6±0.25	7.2±0.92	18.4±2.07	6.4±0.98	7.2±0.86	2.2±0.71
50 мг/кг	13.8±3.88	26.2±7.41	0.8±0.38	6.2±0.58	23.6±1.70	9.0±0.71	11.2±2.01	2.6±0.24
200 мг/кг	7.6±2.14	28.2±2.64	0.6±0.40	6.4±1.29	29.8±5.11	7.4±1.21	9.0±2.28	1.2±0.20
500 мг/кг	4.2±1.24*	25.2±7.43	0.4±0.25	3.8±0.37*	28.8±7.02	18.0±0.71*	15.2±1.67*	1.8±0.38
Самки								
Контроль	9.4±1.21	26±4.90	0.8±0.38	5.6±1.33	27.8±4.13	10.8±1.63	7.8±1.32	0.8±0.38
50 мг/кг	10.6±1.08	29.2±2.09	0.4±0.24	7.2±1.39	28.0±3.86	10.4±2.30	11.8±1.40	1.0±0.45
200 мг/кг	10.0±0.71	30.6±1.29	0.6±0.24	4.2±0.66	38.0±2.71	8.8±1.16	11.2±1.16	1.0±0.31
500 мг/кг	8.0±1.09	20.6±3.09	0.6±0.40	3.8±1.07	32.2±3.85	11.6±2.14	10.8±1.86	0.8±0.38

Примітка: * — позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $P \leq 0,05$

на 62 %, зниження вертикальної активності, про що свідчить зменшення кількості зовнішніх стойок (на 47 %), а також вірогідне зростання кількості фризингів (майже в 3 рази) та уринацій (більше ніж удвічі). Інші показники залишаються без змін. У поведінці самок щурів змін під дією 7-гідроксикумарину протягом місяця не виявлено (табл. 1).

Такі зміни поведінкових реакцій після місяця впливу 7-гідроксикумарину свідчили про зниження загальної активності тварин (як моторної, так і дослідницької) та посилення стану емоційного дискомфорту — тривоги у відповідь на незнайоме оточення.

Після двох місяців впливу 7-гідроксикумарину у щурів обох статей відмічено зміни у поведінці. У самців щурів зростає кількість фризингів уже при дозі 200 мг/кг (більше ніж вдвічі) і ще більше (втричі) при максимальній дозі, більше ніж втричі зменшується тривалість грумінгу. Як і в попередній місяць, за дії препарату у дозі 500 мг/кг зменшується кількість зовнішніх стойок (більше ніж у 20 разів), крім того, зменшується кількість перетнутих зовнішніх квадратів (на 55 %). Активність тварин у центральній зоні не зазнавала статистично достовірних змін. Через два місяці впливу 7-гідроксикумарину з'являються зміни і у самок, але при дії його лише у максимальній дозі. У самок щурів знижується кількість перетнутих зовнішніх квадратів (на 50 %) і кількість зовнішніх стойок (більше ніж у 7 разів), а також зростає кількість фризингів (вдвічі) (табл. 2).

Таким чином, поведінка щурів після 2-х місяців впливу досліджуваної речовини харак-

теризувалась дозозалежним посиленням пасивно-оборонної поведінки та загальним пригніченням активності щурів.

Через три місяці впливу 7-гідроксикумарину у поведінці самок і самців щурів відбуваються майже однакові зміни. Починаючи з дози 200 мг/кг, зростає кількість фризингів у тварин обох статей приблизно вдвічі, при цьому помітно збільшується їхня тривалість. Одночасно зменшується тривалість грумінгів, особливо суттєво у самців (у 2 рази при дії речовини в дозі 200 мг/кг і до мінімальних значень під впливом речовини в дозі 500 мг/кг). У самок зменшується кількість грумінгів лише при дії максимальної дози (у 3 рази).

У щурів при дії 7-гідроксикумарину у дозі 500 мг/кг істотно знижується вертикальна та горизонтальна активність. При цьому у самок знижується кількість перетнутих зовнішніх і внутрішніх квадратів (вдвічі), а у самців — тільки зовнішніх (у 5 разів). 7-гідроксикумарин у максимальній дозі призводить до зменшення кількості стойок, особливо суттєво у самців, у яких внутрішніх стойок зовсім не спостерігали, а кількість зовнішніх зменшувалась у 10 разів (табл. 3).

Одержані дані свідчать, що за дії 7-гідроксикумарину протягом 3-х місяців у тварин обох статей відбувається значне пригнічення як рухової, так і дослідницької активності та значне посилення тривожного стану.

Відновлення поведінки після припинення введення 7-гідроксикумарину у самців щурів відбувається швидше, ніж у самок. Через місяць відновлення у них зміненним залишається лише один показник — кількість пе-

Таблиця 2

Зміни показників поведінкових реакцій щурів самців після впливу 7-гідроксикумарину протягом двох місяців

Серія досліджу	Кількість перетнутих квадратів		Кількість стойок		Грумінг (сек.)	Кількість фризингів	Кількість уринацій	Кількість дефекацій
	Внутрішні	Зовнішні	Внутрішні	Зовнішні				
Самці								
Контроль	7.8±1.40	30.2±6.08	2.0±0.45	4.8±1.63	17.8±2.09	7.4±1.48	9.6±1.64	2.0±0.81
50 мг/кг	9.4±1.61	34.8±6.88	2.6±0.51	4.4±0.93	14.0±2.20	8.8±1.02	8.6±0.92	2.2±0.86
200 мг/кг	9.0±1.58	38.6±6.36	1.4±0.25	4.6±1.35	20.8±3.93	15.2±2.70*	10.0±1.27	1.6±0.68
500 мг/кг	5.4±1.44	13.6±1.81*	1.0±0.32	0.2±0.20*	5.0±1.23*	23.0±3.12*	9.2±1.16	2.8±0.80
Самки								
Контроль	10.0±1.93	28.4±3.53	1.0±0.32	6.2±1.12	27.0±4.27	11.8±3.19	7.6±1.29	1.8±0.38
50 мг/кг	11.2±2.89	33.0±5.83	1.4±0.51	5.6±1.70	18.0±3.99	12.2±4.32	9.0±1.42	1.0±0.45
200 мг/кг	9.6±1.78	28.6±5.08	0.8±0.20	3.8±0.92	20.2±2.14	19.0±4.60	10.0±0.71	1.2±0.90
500 мг/кг	6.0±2.03	14.2±3.47*	0.8±0.38	0.8±0.38*	29.8±2.83	23.8±1.78*	6.2±1.02	1.4±0.51

Примітка: * — позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $P \leq 0,05$

Зміни показників поведінкових реакцій самців шурів після впливу
7-гідроксикумарину протягом трьох місяців

Серія дослідю	Кількість перетнутих квадратів		Кількість стойок		Грумінг (сек.)	Кількість фризингів	Кількість уринацій	Кількість дефекацій
	Внутрішні	Зовнішні	Внутрішні	Зовнішні				
Самці								
Контроль	4,2±0,58	33,4±4,41	1,4±0,25	4,0±1,14	17,2±2,32	12,0±1,14	6,6±0,93	2,0±0,45
50 мг/кг	3,6±0,51	28,4±2,45	1,2±0,20	4,2±0,58	18,2±3,22	12,4±1,92	5,0±1,05	1,8±0,38
200 мг/кг	3,6±0,81	19,2±2,40*	1,0±0,32	3,2±0,85	8,2±0,86*	21,0±2,89*	5,2±0,85	2,2±0,58
500 мг/кг	3,2±0,58	6,2±1,28*	0*	0,4±0,25*	0,2±0,20*	23,6±2,17*	7,4±0,68	1,4±0,51
Самки								
Контроль	10,0±1,87	41,0±5,88	2,4±0,51	4,6±0,82	36,2±7,19	12,6±0,75	4,4±1,13	0,6±0,26
50 мг/кг	7,6±1,33	34,0±3,27	1,8±0,38	4,8±0,74	26,8±4,17	15,0±2,35	3,6±0,51	0,6±0,25
200 мг/кг	7,8±0,58	30,8±3,24	1,6±0,24	3,4±0,51	21,2±4,13	21,8±3,18*	4,6±0,82	0,8±0,38
500 мг/кг	4,6±1,08*	23,4±2,66*	0,25±0,25*	1,8±0,38*	12,2±1,72*	19,0±1,93*	5,2±0,97	0,4±0,25

Примітка: * — позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $P \leq 0,05$

ретнутих зовнішніх квадратів (менше на 55 %). У самок залишаються зміненими такі показники як кількість перетнутих зовнішніх (менше на 48 %) і внутрішніх квадратів (менше на 46 %), зменшена кількість зовнішніх (втричі) і внутрішніх (майже в 10 разів) стойок, тривалість грумінгу (менше на 25 %) та кількість фризингів збільшена майже вдвічі (табл. 4). Отже, самці раніше починають реагувати на дію 7-гідроксикумарину, але й швидше відновлюються після припинення його дії.

Аналіз отриманих даних показав, що 7-гідроксикумарин у найменшій дозі (50 мг/кг) не чинить впливу на нервову систему шурів.

7-гідроксикумарин у дозі 200 мг/кг після двох місяців впливу викликає зміни у поведінці лише самців шурів. У них зростає

кількість фризингів. Через три місяці впливу кількість фризингів зростає у самців і самок шурів, при цьому збільшується їх тривалість.

7-гідроксикумарин у дозі 500 мг/кг починає впливати на поведінкові реакції шурів вже через місяць після початку його введення. Так, у самців шурів знижується горизонтальна і вертикальна активність, а також вірогідно зростає кількість фризингів та уринацій. Після двох місяців впливу 7-гідроксикумарину з'являються зміни у поведінці самок. У самців і у самок знижується кількість перетнутих зовнішніх квадратів і кількість зовнішніх стойок, а також зростає кількість фризингів. Через три місяці впливу 7-гідроксикумарину у поведінці самок і самців шурів відбуваються майже однакові зміни. У них зростає кількість і тривалість

Таблиця 4

Зміна показників поведінкових реакцій самців і самок шурів після місячного відновлення після впливу
7-гідроксикумарином протягом трьох місяців

Серія дослідю	Кількість перетнутих квадратів		Кількість стойок		Грумінг (сек.)	Кількість фризингів	Кількість уринацій	Кількість дефекацій
	Внутрішні	Зовнішні	Внутрішні	Зовнішні				
Самці								
Контроль	3,0±0,32	19,0±2,84	1,0±0,40	1,6±0,39	21,4±4,96	13,8±2,42	1,8±0,58	0,6±0,40
500 мг/кг	2,6±0,25	6,8±2,13*	0,6±0,24	0,8±0,38	15,2±2,74	19,9±1,87	2,8±0,58	2,4±0,68
Самки								
Контроль	12,2±1,75	52,6±2,26	4,6±0,93	3,0±0,31	20,0±3,37	10,2±1,60	1,4±0,51	1,0±0,32
500 мг/кг	5,8±1,72*	25,4±5,78*	0,5±0,25*	0,8±0,38*	15,2±3,27	19,4±1,87*	2,0±0,71	1,6±0,51

Примітка: * — позначена вірогідна різниця між дослідом і контролем при $P \leq 0,05$

фризінгів. Одночасно зменшується кількість грумінгів. Ці зміни є свідченням наростання у тварин рівня тривожності та невпевненості. У щурів істотно знижується вертикальна та горизонтальна активність, що є ознакою зниження їхньої пізнавальної активності.

Вплив 7-гідроксикумарину у дозах 200 і 500 мг/кг на поведінкові реакції щурів у "відкритому полі" характеризувався розбалансуванням показників психоемоційного стану щурів, пригніченням загальної рухової та дослідницької активності, посиленням поведінкових реакцій пасивно-оборонного характеру.

Через місяць після відміни 7-гідроксикумарину відбувається значне відновлення поведінки щурів, при цьому спостерігають відмінності у відновному процесі між самцями та самками щурів. Повного відновлення поведінки за місяць не відбувається.

Одержані результати показали, що вплив 7-гідроксикумарину на поведінкові реакції щурів починається раніше у самців, ніж у самок, і у них раніше відбувається відновлення поведінки після відміни препарату, що може

свідчити про більшу інертність вищої нервової діяльності самок за умов проведеного експерименту.

Висновки

1. 7-Гідроксикумарин при інтрагастральному введенні впродовж 3-х місяців у дозах 50-500 мг/кг не викликає симптомів інтоксикації; неврологічних порушень, (аномальної поведінки, порушення пози, координації рухів, м'язового тону); гістопатоморфологічних змін у корі головного мозку.
2. Вплив 7-гідроксикумарину на нервову систему щурів характеризується зниженням вертикальної та горизонтальної рухової активності, що є ознакою пригнічення їхньої пізнавальної діяльності, зростанням кількості та тривалості фризінгів та зменшенням тривалості грумінгів, що свідчить про порушення психоемоційного стану тварин, і є залежним від дози, тривалості введення та статі.
3. У щурів самців виявлені зміни поведінкових реакцій настають і відновлюються раніше, ніж у самок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Орлов Ю.Е. Природные кумарины в биологии и медицине / Ю.Е. Орлов, К.Ф. Кулеш // Научно-технический прогресс в медицине и фундаментальных проблемах биологии: Тез. докл. — Х., 1987. — С. 285—286.
2. Янченко П.С. Виділення та вивчення деяких кумаринів і хромонів із рослин родин бобові та селерові та їх ліпазотропна активність / П.С. Янченко, А.М. Ковальова, Г.В. Георгіївський, А.М. Комисаренко // Фармаком. — 2004. — № 2. — С. 66—73.
3. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain / T.A. Barros, L.A. de Freitas, J.M. Filho [et al.] // The Journal of pharmacy and pharmacology. — 2010. — № 2 (62). — P. 205—213.
4. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation / J.F. Vasconcelos, M.M. Teixeira, J.M. Barbosa-Filho [et al.] // European Journal of Pharmacology -- 2009. - V. 609.- Issues 1-3. — P. 126—131.
5. Вплив 7-гідроксикумарину на морфологію печінки та тонкого кишечника щурів / Є.А. Сластья, Н.О. Карпезо, І.В. Харчук [та ін.] // Зб. наук. праць "Проблеми екологічної та медичної генетики і клітинної імунології" Київ-Луганськ-Харків. — 2007. — Вип. 3—4 (78—79). — С. 34—39.
6. Порівняльна характеристика біохімічних показників крові, сечі та морфо-функціонального стану внутрішніх органів самців та самок щурів за субхронічної дії 7-гідроксикумарину / О.М. Філінська, І.В. Харчук, С.В. Яблонська [та ін.] // Современные проблемы токсикологии. — 2010. — №4 (51). — С. 14—18.
7. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. — М.: Медицина, 1991. — 399 с.
8. Богоявленська І.Ф. Особливості формування поведінкових реакцій під дією антропогенних забруднювачів в експерименті / І.Ф. Богоявленська // Современные проблемы токсикологии. — 2011. — №5(55). — С. 75—76.
9. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. — Official Journal of the European Communities, 1986. — L 358. — P. 1—29. — (EEC regulation).
10. Neurological Evaluation of Toxic Axonopathies in Rats: Acrylamide and 2,5-Hexanedione // R.M. LoPachin, J.F. Ross, M.L. Reid [et al.] / Neuro Toxicology V. 23. — Iss. 1. — 2002. — P. 95—110.
11. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. The relationship between emotionality and ambulatory activity / C.S. Hall // J. Comp. Physiol. Psychol. — 1936. — 122. — P. 345—352.
12. Antoniadis E.A. Amygdala, hippocampus, and discriminative fear conditioning to context / E.A. Antoniadis, R.J. McDonald // Behavioral Brain Research. — 2000. — № 108. — P. 1—19.
13. Волков О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волков, Ю.К. Елецкий. — М.: Медицина, 1982. — 298 с.

Надійшла до редакції 07.05.2012 р.