

Т.Г. Цинцадзе, Г.О. Габричидзе, Н.И. Лазришвили,
Д.С. Метревели, Н.П. Митагвария

Нарушение способности к обучению у потомства крыс с дефицитом йода

Экспериментальные исследования показывают, что гипотиреоз может привести к депрессивному поведению и, что тиреоидные гормоны могут оказать эффект антидепрессантов. В настоящем исследовании мы попытались изучить постнатальные изменения в процессах обучения, памяти и эмоционального статуса у потомства, родившегося от крыс, находящихся в условиях йоддефицита разной степени как до зачатия, так и в процессе всей гестации. Полученные результаты показывают, что резкое ограничение приема йода до и в процессе гестации приводит к выраженному неврологическому дефициту, который в нашем случае демонстрируется полным нарушением одной из наиболее важных функций головного мозга новорожденных – утратой способности к обучению и проявлением явных признаков депрессивного состояния. Добавление йода в диету самок полностью устраняет указанные явления.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение функции щитовидной железы в процессе развития плода человека могут привести к существенным нарушениям в центральной нервной системе, включая тяжелое отставание в умственном развитии. Однако последнее можно предупредить, если сразу же после рождения детей с врожденным гипотиреозом начать их лечение L-тироксинам (T_4) [6]. Оказалось, что к наиболее тяжелым последствиям ведет не врожденный гипотиреоз, а неврологический кретинизм, могущий проявиться у лиц, рожденных в регионах со значительным дефицитом йода в продуктах питания [5]. Речевые и слуховые дефекты, умственная отсталость, моторный дефицит, мышечное истощение – это неполный перечень осложнений, возникающих при неврологическом кретинизме.

На основе клинических наблюдений был сделан вывод, что выраженные анатомические изменения скорее всего охваты-

вают ассоциативную и фронтальную области коры, амигдалу, гиппокамп, а также базальные ганглии (скорлупу и бледный шар) и кортикоспинальный тракт [7]. Превенция тяжелых и необратимых повреждений ЦНС, могущих возникнуть при этом, возможна лишь в случае коррекции материнского йоддефицита на стадии ранней беременности [12].

Экспериментальными исследованиями показано, что у крыс гормоны материнской щитовидной железы достигают плод в ходе гестации, и T_4 предохраняет мозг плода от дефицита T_3 [3]. Если беременность женщины проходит в условиях тяжелого дефицита йода, ее организм не способен продуцировать то содержание T_4 , которое необходимо для развития плода, а сам эмбрион, опять же по причине йоддефицита не способен синтезировать T_4 [11]. Таким образом, в процессе беременности головной мозг плода не получает достаточное содержание T_4 , который является единственным источником для T_3 , что и объяс-

няет тяжелые повреждения ЦНС, могущие возникнуть при остром дефиците йода.

Некоторые экспериментальные исследования показывают, что гипотиреоз может также привести к депрессивному поведению и что тиреоидные гормоны могут оказать эффект антидепрессантов [10]. В настоящем исследовании мы попытались изучить постнатальные изменения в процессах обучения, памяти и эмоционального статуса у потомства, родившегося от крыс, находящихся в условиях йоддефицита разной степени как до зачатия, так и в процессе всей гестации.

МЕТОДИКА

Животные. В качестве экспериментальной модели для создания йоддефицита была использована модель, описанная в работе Martinez–Galan и соавт. [7]. Исследования проводили на четырех группах беспородных самок белых крыс (по 6 животных в каждой группе), диета трех групп содержала йод в различных дозах, а четвертая группа находилась на нормальном питании. Группа I получала эту диету с очень низким содержанием йода (базовая диета), II – эту же диету с добавкой 0,005 % $KClO_4$, что не позволяло тому малому количеству йода, который все же имелся в диете, поступать к щитовидной железе и этим самым достигалось усиление дефицита йода. В III группе к диете добавляли KI (10 мг в сутки), что обеспечивало свободное поступление нормального количества йода в организм. Животным всех трех групп без ограничений давали дистиллированную воду, а IV группе обычную воду. Указанную диету поддерживали в течение 3 мес, после чего самок совокупляли с нормальными самцами. В день совокупления у самок брали вагинальный мазок и с помощью светового микроскопа оценивали наличие сперматозоидов. На 21-е сутки гестации трем животным из каждой группы

делали гистеректомию для определения содержания T_4 и T_3 в головном мозгу плодов. Как до совокупления, так и на 21-е сутки гестации определяли содержание T_4 в плазме крови матери. Потомство оставшихся самок через месяц после рождения проходило тестирование в открытом поле и многоходовом лабиринте.

Диета. Базовая йоддефицитная диета (I группа животных) содержала следующие ингредиенты: кукурузная мука – 6 единиц массы (е.м.), пшеничная клейковина – 2,5 е.м, пивные дрожжи – 1 е.м., NaCl – 0,15 е.м. и $CaCO_3$ – 0,15 е.м. [7]. Для обеспечения нормального роста потомства на каждый килограмм указанной базисной диеты добавляли смесь 18 г макро- и 0,25 г микроминералов, 1 г смеси различных витаминов, 10 г L-лизина, 1,9 г L-триптофана, 2,2 г L-метионина, 3,4 г L-треонина и 2 г L-холина. Кроме этого добавляли 10 мл кукурузного масла. Для II группы животных к указанной базисной диете, как отмечалось выше, добавляли незначительное содержание $KClO_4$ (50 мг/кг диеты) и тем самым предотвращали доступ имеющихся малых количеств йода к щитовидной железе. При нормальном снабжении йодом (III группа) указанная добавка не оказывает влияния на функцию щитовидной железы [7].

Радиоиммунный анализ. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови матери и головном мозгу плода определяли радиоиммунным анализом с использованием тест-систем RIA-gnost T_3 и RIA-gnost T_4 “Sea-Ire-Sorin” (Франция). Пробы ткани головного мозга плодов брали после их перфузии 0,1 М фосфатным буфером, а затем немедленно подвергали охлаждению в сухом льде и хранили до проведения экстракции при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Изучение поведения крыс. Через месяц после рождения потомство всех групп самок проходило тестирование в открытом поле и многоходовом лабиринте. Для этой

цели из помета оставшихся в каждой группе трех самок рандомизировано отбирали по два детеныша от каждой матери и таким образом вновь были составлены четыре группы (по 6 животных): группа Ia – потомство самок, принимавших базовую диету с дефицитом йода, группа IIa – потомство самок, принимавших ту же диету с добавкой 0,005 % $KClO_4$, группа IIIa – потомство самок, получавших добавку к базовой диете в виде KI, группа IVa – потомство контрольной группы самок, получавших нормальную диету. Каждое животное этих групп проходило 5-минутный тест в открытом поле, а затем в течение 10 сут – тестирование в многоходовом лабиринте.

Открытое поле. «Открытое поле» [2] представляло собой круглую камеру диаметром 80 см, пол был разделен на 16 квадратов (20x20 см), высота стенки – 16 см. При 5-минутном тестировании в открытом поле регистрировали следующие показатели: количество пересеченных квадратов; число вхождений в центральные квадраты; количество вертикальных стоек; частота груминга.

Многоходовой лабиринт. Изучение обучения и тестирование памяти проводили в многоходовом лабиринте эстакадного типа [1]. Лабиринт состоит из 10 платформ высотой 25 см. В конце лабиринта имеется ящик-гнездо. Перед экспериментом животные, как правило, находятся в указанном ящике и не ограничены в приеме пищи и воды.

В первый день экспериментатор легкими подталкиваниями помогает животному находить оптимальную траекторию для

попадания со стартовой площадки в ящик-гнездо, в дальнейшем животные обучаются самостоятельно, методом проб и ошибок. В таких условиях эксперимента мотивацией для движения по лабиринту служит избавление от неэтологических условий и попадание в ящик-гнездо, где находятся другие животные данной группы. Опыт использования лабиринтных тестов показывает, что нормальные животные в среднем через 5–8 сут обучаются безошибочному прохождению лабиринта и достигают «автоматизма» в поведении. В ходе лабиринтной сессии обычно регистрируется количество ошибок (отклонение от оптимальной траектории и попадания в тупиковые платформы), допускаемых животными, а также время прохождения лабиринта. При этом указанные показатели в процессе обучения фиксировали лишь со второго дня, когда животные перемещались по лабиринту самостоятельно и находили оптимальный путь без помощи экспериментатора. Всего обучение длилось 10 сут и ежедневно каждому животному предоставлялось по пять попыток.

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывались статистически. Достоверность средних величин и разницы между ними оценивали по критерию *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерение содержания циркулирующего тироксина в сыворотке крови крыс-самок к концу третьего месяца (до совокупления с нормальными самцами) нахождения на описанной выше диете и на 21-е сутки

Таблица 1. Содержание тироксина (T_4 , нг/мл) в сыворотке самок-крыс ($M \pm m$)

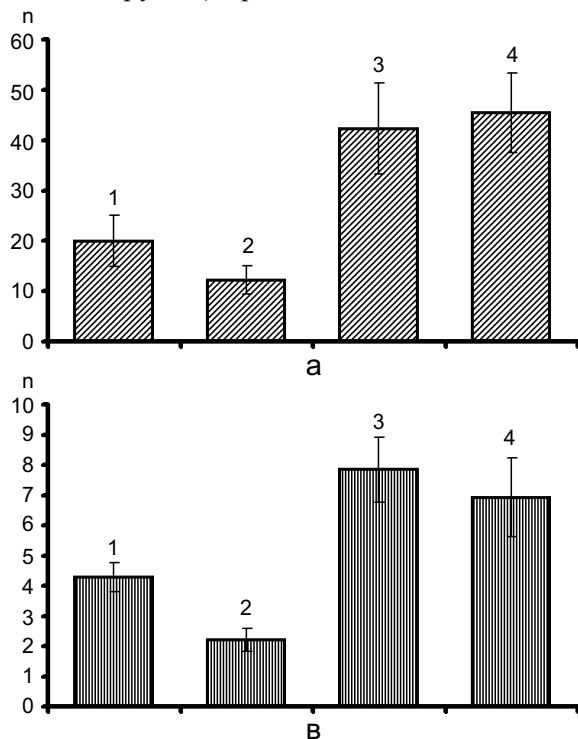
Схема опыта, группа животных	Конец 3-го месяца диеты	21-е сутки гестации
Базовая диета (I группа)	4,9±0,8	4,7±0,6
Базовая диета с добавкой $KClO_4$ (II группа)	1,4±0,22	1,1±0,4
Базовая диета с добавкой KI (III группа)	48,8±7,7	52,5±8,2
Нормальная диета (IV группа, контроль)	45,2±6,8	49,4±8,8

Таблица 2. Изменение содержания (%) трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) в головном мозгу эмбрионов на 21-е сутки гестации по сравнению с контролем при нахождении животных на диете с разным содержанием йода ($M \pm m$)

Схема опыта, группа эмбрионов	T_3	T_4
Базовая диета (Ia группа)	$69 \pm 10,1$	$61 \pm 9,6$
Базовая диета с добавкой $KClO_4$ (IIa группа)	$22 \pm 8,2$	$62 \pm 5,4$
Базовая диета с добавкой KI (IIIa группа)	$95 \pm 9,8$	$115 \pm 12,5$
Нормальная диета (IVa группа, контроль)	100	100

гестации показал его достаточно низкий уровень в экспериментальных (I и II) группах по сравнению с контрольной (III) группой (табл. 1).

Усредненные результаты измерений содержания T_3 и T_4 в головном мозгу крыс-самок четвертой (контрольной) группы соответственно были: $1,135 \pm 0,364$ и $1,442$ нг/мл $\pm 0,231$ нг/мл. Изменения этих показателей в экспериментальных группах (выраженные в процентах по отношению к контрольной группе) представлены в табл. 2.



Опыты в «открытом поле» выявили, что животные контрольной группы достаточно активны: среднее число пересеченных квадратов больше сорока, в том числе в среднем 1,7 раз они попадают в центральные квадраты, достаточно высока и поисковая активность – число вертикальных стоек равно в среднем семи, частота груминга не более $1,2 \pm 0,4$ (рис. 1). Такие животные достаточно быстро обучаются в лабиринте (рис. 2) и с 8-х суток практически достигают состояния автоматизма,

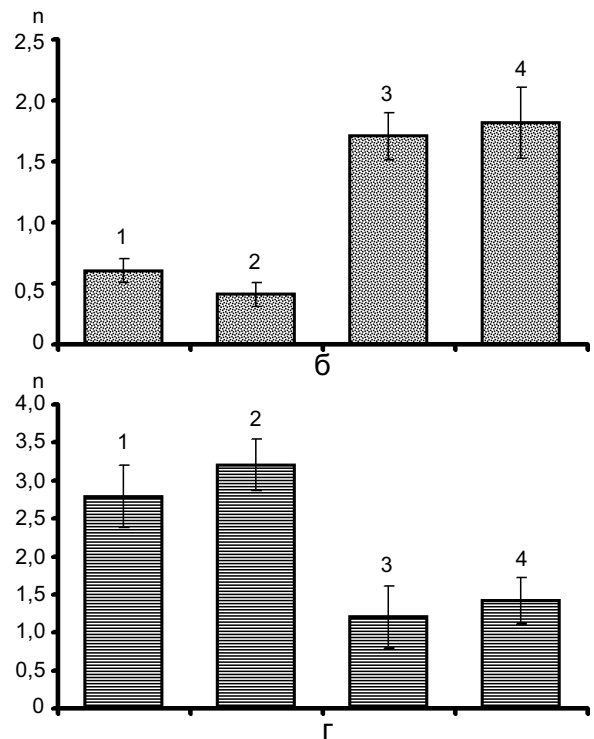


Рис. 1. Опыты в «открытом поле», 5-минутный тест: а – количество пересекаемых квадратов, б – число вхождений в центральные квадраты, в – число вертикальных стоек, г – частота груминга; 1 – базовая диета (группа Ia), 2 – базовая диета с добавлением $KClO_4$ (группа IIa), 3 – базовая диета с добавлением KI (группа IIIa), 4 – контроль – (группа IVa)

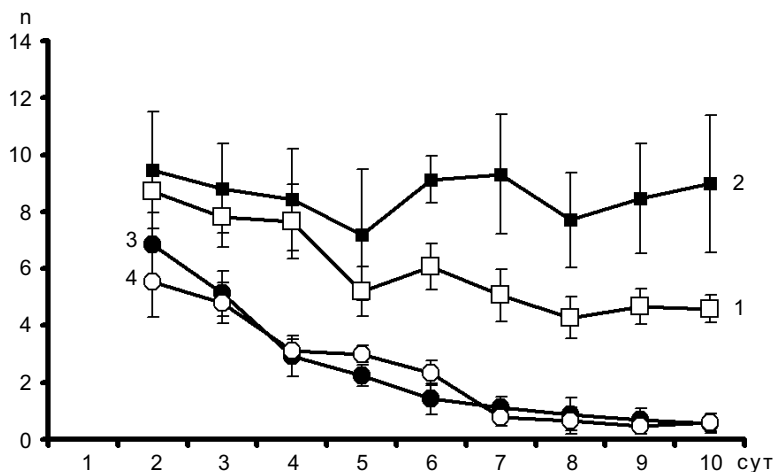


Рис. 2. Результаты 10-суточной сессии обучения животных в многоходовом лабиринте эстакадного типа: 1 – Ia группа, 2 – IIa группа, 3 – IIIa группа, 4 – IVa группа (контроль). По оси абсцисс – день проведения опытов; по оси ординат – количество совершаемых ошибок в результате 5 ежедневных предъявлений

затрачивая на пробежку всего лабиринта 8–12 с (рис. 3).

Использованная нами базовая диета существенно понизила двигательную и поисковую активность животных, что достаточно четко отражается на результатах тестирования в открытом поле (см. рис. 1). Вместе с тем заметно ухудшилась способность к обучению прохождения многоходового лабиринта, даже на 10-е сутки обучения животные не оказались способны достичь состояния «автома-

тизма», что у крыс с дефицитом йода (III группа) обычно наступает на 7–8-е сутки. Выраженные изменения коснулись не только количества совершаемых ошибок, но и времени нахождения на мостках лабиринта. В среднем это время с 8–12 с, наблюдаемых примерно с 7-х суток обучения, повысилось до 3-х и более минут.

Еще более выраженными оказались изменения в поведении животных II группы, которые дополнительно к базовой диете получали $KClO_4$. Отметим прежде всего то,

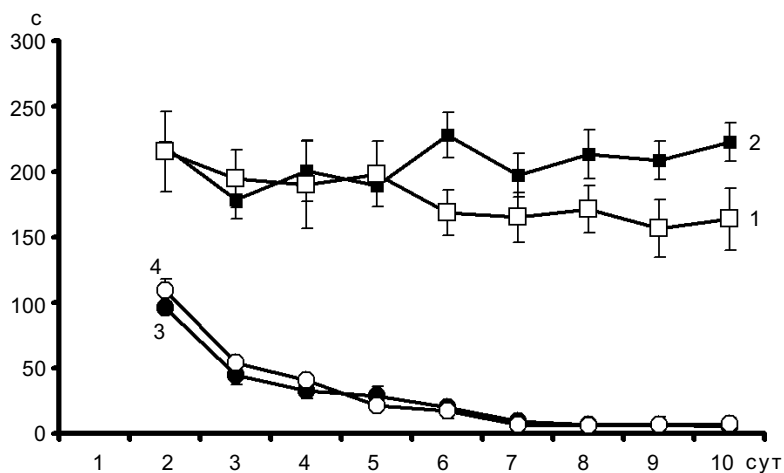


Рис. 3. Изменение времени пробежки всего лабиринта в ходе 10-суточной сессии: 1 – Ia группа, 2 – IIa группа, 3 – IIIa группа, 4 – IVa группа (контроль). По оси абсцисс – день проведения опытов; по оси ординат – время пробежки всего лабиринта

что у этих животных практически отсутствует способность к обучению прохождения лабиринта (см. рис. 2). Попадание в ящик-гнездо у них носит чисто вероятностный характер со средним числом допускаемых при этом ошибок, равным девяти. Как видно из указанного рисунка, несмотря на количество дней тестирования, эта вероятность не улучшается, т.е. отсутствует процесс обучения. Соответственно высоким остается и время нахождения на мостках лабиринта (см. рис. 3). Усугубились и показания тестирования в «открытом поле» по сравнению с группой животных, находящихся на чисто базовой диете (I группа), резко уменьшилось количество пересекаемых квадратов, число вхождений в центральные квадраты и число вертикальных стоек, но повысилась частота груминга.

Статистический анализ полученных результатов показал, что разница между показателями III и IV групп животных в открытом поле статистически недостоверна. Разница между показателями I и II групп в этих же опытах достоверна ($P < 0,05$). Также достоверна разница между показателями контрольной группы и групп Ia и IIa ($P < 0,01$), а также между группой IIIa и группами Ia и IIa ($P < 0,01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего необходимо подчеркнуть, что разница, наблюдаемая в поведении животных, должна быть обусловлена лишь количеством находящегося в диете йода. Все остальные экспериментальные условия были идентичны, постнатальное прибавление массы у новорожденных было в пределах нормы, отбор животных для тестирования и изменений содержания T_3 и T_4 носил рандомизированный характер.

Как известно, постнатальный этап развития головного мозга у крыс соответствует процессам, которые наблюдаются во второй половине беременности у чело-

века [9]. Соответственно, степень развития головного мозга новорожденных крысят можно сравнить со степенью развития головного мозга эмбриона человека в первой половине беременности, когда могут развиваться необратимые изменения, приводящие к неврологическому кретинизму. Именно с учетом этих положений и была выбрана нами экспериментальная модель йоддефицита, которая подразумевает поддержание специальной диеты самки за 3 мес до зачатия плода и далее в процессе всей гестации. Как показали результаты исследований данная экспериментальная модель является вполне адекватной поставленной задаче.

Передача тиреоидного гормона от матери к детенышу не прерывается и после формирования тиреоидной функции эмбриона [8]. При этом следует учитывать, что материнские гормоны T_4 и T_3 не являются эквивалентными с точки зрения защиты головного мозга гипотиреоидного плода от дефицита T_3 . Оказалось, что в случае низкого содержания циркулирующего материнского гормона T_4 нормальное содержание T_3 (как в сыворотке крови матери, так и плода) не может оказать протекторный эффект, поскольку во время эмбрионального и раннего постнатального развития состояние мозговых структур крысы зависит от локальной генерации T_3 , а для этого необходимо не только наличие T_4 , но и активация 5-йодтирониндеиодиназы. Активность данного фермента обратно пропорциональна содержанию T_4 . В этот период развития эмбриона вклад системного T_3 в повышение содержания T_3 в его мозговых структурах незначителен. Таким образом, принципиальное значение имеет достаточное содержание именно T_4 . Даже в случае его избытка соблюдается гомеостаз содержания T_3 эмбрионального мозга, что вовсе не гарантировано в случае избытка циркулирующего материнского T_3 . Эти результаты показывают, что передо-

зировка в формировании материнского циркулирующего T_4 является менее вредным для головного мозга эмбриона по сравнению с материнской тироксинемией.

Полагают, что онтогенетически запрограммированная экспрессия 5-йодтиронин-деиодиназы (типа D_2 и D_3) и реакция данного фермента на дефицит или избыток тиреоидного гормона, является механизмом, обеспечивающим поддержание адекватного уровня T_3 в различных мозговых структурах на всех этапах развития головного мозга [4].

Мы полагаем, что изложенные положения являются наиболее адекватными для объяснения причин формирования неврологического кретинизма у потомства, родившегося от самок, достаточно длительно находящихся в условиях дефицита йода. Наши исследования подтверждают, что резкое ограничение приема йода до и в процессе гестации приводит к выраженному неврологическому дефициту, который в нашем случае демонстрируется полным нарушением одной из наиболее важных функций головного мозга новорожденных – утратой способности к обучению и проявление явных признаков депрессивного состояния.

**T.G. Tsintsadze, G.O. Gabrichidze, N.I. Lazrshvili,
D.S. Metreveli, N.P. Mitagvariya**

ALTERED ABILITY TO LEARN IN POSTERITY OF RATS WITH IODINE DEFICIENCY

Experimental data demonstrate that hypothyroidism could result in depressive behavior and subsequently thyroid hormones could act as antidepressants. Postnatal changes in learning ability, memory and emotional status in posterity of rats, which have experienced different level of iodine deficiency before conception and during all gestation period were investigated in this study. Results obtained suggest that sudden iodine deprivation before and during gestation led to a significant neurological defect, which was represented by loss of ability to learn, one of the most important functions of brain in newborn and by evidence of depression. Iodine sup-

ply to the diet of female rats eliminates these effects completely.

Tbilisi State Medical University, Tbilisi, Georgia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Митагвария Н.П. Устойчивость циркуляторного обеспечения функций головного мозга. – Тбилиси: Мецниереба, 1983.
2. Buresh.J., Bureshova O., Huston J. Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior. – Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Scientific Company, 1976.
3. Calvo R.M., Obregon M.J., Ruiz de Ona C. et al. Congenital HY pothyroidism as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodthyronine in the protection of the fetal // J. Clin Invest. – 1990. – **86**. – P. 889–899.
4. Guadan-Ferraz A., Escamez M.J., Raussell J. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems // Neurosci. – 1999. – **19**. – P. 3430–3439.
5. Hetzel B.S. Iodine Deficiency Disorders and their Eradication // Lancet. – 1983. – **2**. – P. 1126–1129.
6. Illig R., Largo R.H., Qin Q. et al. Mental development in congenital hypothyroidism after neonatal screening // Arch. Dis. Child. – 1987. – **62**. – P. 1050–1055.
7. Martinez-Galan J.R., Pedraza P., Santacana M. Early effect of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus // J. Clin Invest. – 1997. – **99**. – P. 2701–2709.
8. Morreale de Escobar G., Obregon M.J., Escobar del Rey F. Is Neuropsychological. Development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. – 2000. – **85**, № 11. – P. 3975–3987.
9. Morreale de Escobar G., Obregon M.J., Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development // Europ. J. Endocrinol. – 2004. – **151**. – P. 25–37.
10. Redei E.E., Solberg L.C., Kluezyński J.M., Pare W.P. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat // Neuropsychopharmacology. – 2001. – **24**, № 6. – P. 632–639.
11. Ruiz de Ona C., Obregon M.J., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G. Development changes in rat brain 5'-deiodinase and thyroid hormones during the fetal period: the effect of fetal hypothyroidism and maternal thyroid hormones // Pediatr. Res. – 1988. – **24**. – P. 588–594.
12. Xue-Yi C., Xin-Min J., Zhi-Jong D. et al. Timing of vulnerability of the brain to iodine deficiency in endemic cretinism // N. Engl. J. Med. – 1994. – **331**. – P. 1739–1744.

*Тбил. гос. мед. ун-т;
Ин-т физиологии им. И.С. Бериташвили АН Грузии*

*Материал поступил в
редакцию 24.06.2005*