



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102199** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

A61B 10/00

G01N 33/74 (2006.01)

A61B 5/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2012 07969	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22)	Дата подання заявки:	27.06.2012		Васильєва І.М. Кореляційні зв'язки між вмістом тестостерону тиреоїдних гормонів у щурів різних вікових груп з альтернативними типами поведінки // Експериментальна клінічна медицина. – 2012. – 1 (54). – С.61-65
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.06.2013		Сапронов Н.С., Федотова Ю.О., Гончаров Н.П. Половые гормоны и поведенческие реакции // Вестн. РАМН. – 2001. – N 12. – С. 29-34. 2003-02 ВІ27 БД ВИНІТИ
(41)	Публікація відомостей про заявку:	25.01.2013, Бюл.№ 2		O'Connell LA, Hofmann HA. Social status predicts how sex steroid receptors regulate complex behavior across levels of biological organization. Endocrinology. 2012 Mar;153(3):1341-51. doi: 10.1210/en.2011-1663. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22166981
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	10.06.2013, Бюл.№ 11		Ogawa S. et al. Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor-alpha gene disruption in male mice. Endocrinology. 1998 Dec;139(12):5058-69. PMID: 9832445
(72)	Винахідник(и):	Попова Людмила Дмитрівна (UA), Васильєва Ірина Михайлівна (UA)		Wu D, Gore AC. Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats. Horm Behav. 2010 Jul;58(2):306-16. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.001. Epub 2010 Mar 16. PMID: 20223236
(73)	Власник(и):	ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022 (UA)		Toda K. et al. A loss of aggressive behaviour and its reinstatement by oestrogen in mice lacking the aromatase gene (Cyp19). J Endocrinol. 2001 Feb;168(2):217-20. PMID: 11182758
(74)	Представник:	Євтушенко Тамара Григорівна		
(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	UA 55046 U, 10.12.2010 Васильєва І.М., Попова Л.Д. Оптимізація вибору контролю при використанні моделі «сенсорного контакту» // Експериментальна клінічна медицина. – 2010. – 3 (48). – С.37-40		

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ СУБМІСИВНОГО, ДОМІНАНТНОГО ТА УРІВНОВАЖЕНОГО ТИПІВ ПОВЕДІНКИ ГРИЗУНІВ

(57) Реферат:

Винахід належить до експериментальної медицини і може бути використаним для визначення субмісивного, домінантного та урівноваженого типів поведінки гризунів. Згідно із винаходом визначають співвідношення рівнів тестостерону та 17 β -естрадіолу, за яким судять про тип поведінки гризунів з урахуванням їх вікових груп.

UA 102199 C2

Винахід належить до експериментальної медицини і може бути використаним для визначення субмісивного, домінантного та урівноваженого типів поведінки експериментальних тварин, наприклад, гризунів.

До гризунів, що використовуються як експериментальні тварини, належать миші та щури.

5 Визначення субмісивного, домінантного та урівноваженого типів поведінки експериментальних тварин має велике значення для дослідження механізмів і ефективності дії нових лікарських препаратів (зокрема антидепресантів та анксіолітиків), тому що ефекти цих препаратів можуть бути різними в залежності від схильності людини до депресії або агресії.

10 Відомим способом визначення типу поведінки тварин є модель "сенсорного контакту", розроблена сектором нейрогенетики соціальної поведінки Інституту Цитології та Генетики Північного відділення Російської Академії Наук (Kudryavtseva N.N. Sensory Contact Model for the study of Aggressive and Submissive Behavior in Male Mice // Aggres. Behav.-1991. - Vol. 17. № 5. - P. 285-291).

15 Відомий також спосіб визначення типу поведінки експериментальних гризунів, що включає реєстрацію фізіологічних поведінкових реакцій тварини за допомогою складання протоколів дослідів, фото- або кіноматеріалів. Поведінкові реакції враховують "акт агресії", "активний захист", "освоєння території", "контакти з супротивником", "акт дефекації", "сидіння на одному місці", "ніс у кутку", "замороження", "на спині" з наступною бальною оцінкою від -2 до +3 кожної поведінкової реакції та складання одержаних балів для кожної тварини за час спостереження.

20 Якщо сума балів 0-3, тип поведінки визначають як субмісивний, при сумі балів 4-7 - урівноважений, а при 8 до 10 тип поведінки гризунів визначають як агресивний (Пат. № 55046 U, Україна, МПК А61В5/16. Спосіб визначення типу поведінки експериментальних гризунів / Попова Л.Д., Васильєва І.М.; ХНМУ - 3. № u201002821; заявл. 12.03.2010; опубл. 10.12.2010, Бюл. № 23).

25 Даний спосіб визначення субмісивного, домінантного та урівноваженого типів поведінки гризунів є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу винаходу поставлено задачу розширення арсеналу способів визначення типу поведінки експериментальних гризунів.

30 Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі визначення субмісивного, домінантного та урівноваженого типів поведінки гризунів, що включає оцінку поведінкових реакцій, які відображають особливості нейрогуморального стану тварин, згідно з винаходом, у тварин забирають кров з хвостової вени з наступним визначенням рівнів тестостерону та 17 β -естрадіолу методом імуноферментного аналізу, потім розраховують співвідношення одержаних значень тестостерону та естрадіолу і, якщо величина співвідношення є меншою 100 для ювенільного періоду, меншою 110 для зрілого репродуктивного періоду, меншою 200 для молодого репродуктивного періоду, діагностують субмісивний тип поведінки гризунів; якщо величина співвідношення коливається у межах 110-320 для зрілого репродуктивного періоду, 100-420 для ювенільного періоду та 200-600 для молодого репродуктивного періоду, діагностують урівноважений тип поведінки; якщо величина співвідношення є більшою 320 для зрілого репродуктивного періоду, більшою 420 для ювенільного періоду та більшою 600 для молодого репродуктивного періоду, діагностують домінантний тип поведінки.

45 Технічний ефект способу, що заявляється, обумовлений сукупністю дій та порядком їх виконання і доказаний експериментально.

Експеримент виконувався на 76 самцях лінії Вістар різного віку (три-, шести- та дванадцятимісячних), які утримувались у стандартних умовах виварію. Згідно класифікації вікових груп лабораторних тварин, щури тримісячного віку належать до II періоду (періоду статевого дозрівання, ювенільного); щури шести- та дванадцятимісячного віку до III періоду - репродуктивного (до молодого та зрілого, відповідно). Для контролю проводили тестування тварин згідно прототипу. У плазмі крові цих тварин також визначали вміст гормонів: тестостерону, 17 β -естрадіолу, тироксину. Дослідження саме цих гормонів обумовлено наступним: тестостерон у пренатальному періоді сприяє формуванню нейрональних сіток, які потім опосередковують агресивну поведінку. Тестостерон, що синтезується фетальними статевими залозами, дифундує до мозку самців, де він локально ароматизується до естрадіолу і потім ініціює маскулінізацію. Маскулінізація мозку візуалізується у дорослих здатністю до експресії високої агресивності. Крім того, естрадіол, що продукується сім'яниками, гальмує продукцію андрогенів або аутокринним, або паракринним шляхом. Тиреоїдний гормон тироксин впродовж внутрішньоутробного розвитку та раннього неонатального періоду стимулює проліферацію, диференціацію та міграцію нейронів і гліальних клітин, а у дорослих впливає на

нейромедіаторну нейрональну передачу (зокрема на серотонінову, норадреналінову, дофамінову системи).

Для визначення вмісту вищезазначених гормонів проводили забір 0,5 мл крові з хвостової вени, кров центрифугували 20 хв при 1500 g. Визначення вмісту тестостерону, 17 β -естрадіолу, тироксину проводили методом імуноферментного аналізу згідно з інструкціями до відповідних наборів. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Statistica, MS Excel з використанням критеріїв Ст'юдента-Фішера та Мана-Уїтні, в залежності від типу розподілу. За допомогою прикладних статистичних програм проводили кореляційний (по Спірмену) та ANOVA за Kruskal-Wallis аналізи досліджуваних параметрів.

У всіх вікових групах вміст тестостерону був достовірно вищим у домінантних тварин порівняно із субмісивними та урівноваженими, а у субмісивних спостерігався достовірно вищий рівень 17 β -естрадіолу порівняно з домінантними та урівноваженими.

ANOVA за Kruskal-Wallis аналіз виявив достовірний зв'язок між рівнем тестостерону та типом поведінки самців усіх вікових груп (3 міс.: $H=20,47$, $P<0,05$; 6 міс.: $H=22,27$, $P<0,05$; 12 міс.: $H=21,38$, $P<0,05$), та достовірний зв'язок між рівнем естрадіолу та типом поведінки самців усіх вікових груп (3 міс.: $H=20,38$, $P<0,05$; 6 міс.: $H=22,36$, $P<0,05$; 12 міс.: $H=13,93$, $P<0,05$).

Кореляційний аналіз виявив достовірно високий негативний кореляційний зв'язок між рівнем тестостерону та 17 β -естрадіолу у щурів усіх вікових груп та типів поведінки (від -0,69 до -0,98; $P<0,05$).

Щури з альтернативними типами поведінки не відрізнялися за вмістом тироксину у молодому репродуктивному віці. В інших вікових групах рівень тироксину був вищим у домінантних тварин.

Кореляційний зв'язок між рівнями тироксину та тестостерону, а також між рівнями тироксину та 17 β -естрадіолу спостерігався тільки у домінантних самців: між тестостероном і тироксином він був позитивний (3 міс.: +0,79, $P<0,05$; 6 міс.: +0,82, $P<0,05$; 12 міс.: +0,70, $P=0,05$); між естрадіолом і тироксином - негативний (3 міс.: -0,89, $P<0,05$; 6 міс.: -0,69, $P<0,05$; 12 міс.: -0,71, $P<0,05$).

Таким чином, різниця вмісту тироксину між домінантними та субмісивними самцями виявлена лише у молодому репродуктивному віці. Кореляційний зв'язок між рівнем тироксину та тестостерону або між рівнем тироксину та естрадіолу спостерігався лише у домінантних самців.

Зміни вмісту тестостерону, а також естрадіолу у домінантних самців, порівняно із субмісивними, були наявними і односпрямованими в усіх вікових групах. Між цими параметрами спостерігався тісний кореляційний зв'язок.

Особливо істотною була різниця між тваринами з домінантним, субмісивним та урівноваженим типами поведінки у співвідношенні тестостерон/17 β -естрадіол (табл.). У зв'язку з цим, саме співвідношення тестостерону до 17 β -естрадіолу було використано для розподілу тварин на групи з домінантним, субмісивним та урівноваженим типами поведінки.

Таблиця

Співвідношення тестостерон/17 β -естрадіол у щурів із альтернативними типами поведінки

	Субмісивні	Домінантні	Урівноважені
3 місяці			
Медіана Ме	43,01 ^{*x}	844,11 [*]	165,75
Квартилі 25 %; 75 %	34,05; 66,59	766,53; 2510,22	128,43; 242,69
min; max	34,05; 76,92	447,94; 3405,99	110,92; 405,57
6 місяців			
Медіана Ме	41,40 ^{*x}	2008,05 [*]	346,37
Квартилі 25 %; 75 %	44,39; 152,09	1318,12; 2794,12	278,80; 414,48
min; max	41,40; 152,85	1144,41; 3494,55	225,93; 519,70
12 місяців			
Медіана Ме	49,03 ^{*x}	759,07 [*]	233,05
Квартилі 25 %; 75 %	23,57; 85,61	552,53; 1321,53	215,20; 251,21
min; max	21,51; 104,43	338,98; 1980,02	153,54; 313,35

Примітка: * - $P<0,05$ порівняно зі щурами з урівноваженим типом поведінки,
x - порівняно зі щурами з домінантним типом поведінки.

Спосіб виконують наступним чином: з хвостової вени тварини забирають 0,5 мл крові, центрифугують протягом 20 хв при 1500 g з метою отримання плазми, використовують 100 мкл плазми крові для визначення тестостерону та 100 мкл плазми для визначення 17 β -естрадіолу високочутливим методом імуноферментного аналізу з використанням відповідних наборів.

- 5 Розраховують співвідношення тестостерон/естрадіол. Якщо величина співвідношення є меншою 100 для ювенільного періоду, меншою 110 для зрілого репродуктивного періоду, меншою 200 для молодого репродуктивного періоду, діагностують субмісивний тип поведінки гризунів. Якщо величина співвідношення коливається у межах 110-320 для зрілого репродуктивного періоду, 100-420 для ювенільного періоду та 200-600 для молодого репродуктивного періоду, діагностують урівноважений тип поведінки. Якщо величина співвідношення є більшою 320 для зрілого репродуктивного періоду, більшою 420 для ювенільного періоду та більшою 600 для молодого репродуктивного періоду, діагностують домінантний тип поведінки.

Спосіб ілюструють наступні приклади:

15 Приклад 1

Гризун № 4 (вік - 6 міс.). Вміст тестостерону складає 38,7 нмоль/л, 17 β -естрадіолу 0,029 нмоль/л, співвідношення тестостерон/естрадіол - 1318,12, щур належить до тварин з домінантним (агресивним) типом поведінки.

Приклад 2

- 20 Гризун № 11 (вік - 6 міс.). Вміст тестостерону складає 21,3 нмоль/л, 17 β -естрадіолу 0,051 нмоль/л, співвідношення тестостерон/естрадіол - 414,48, щур належить до тварин з урівноваженим типом поведінки.

Приклад 3

- 25 Гризун № 13 (вік - 6 міс.). Вміст тестостерону складає 5,20 нмоль/л, 17 β -естрадіолу 0,073 нмоль/л, співвідношення тестостерон/естрадіол - 70,83, щур належить до тварин з субмісивним типом поведінки.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 30 Спосіб визначення субмісивного, домінантного та урівноваженого типів поведінки гризунів, що включає оцінку поведінкових реакцій, які відображають особливості нейрогуморального стану тварин, який **відрізняється** тим, що у тварин забирають кров з хвостової вени з наступним визначенням рівнів тестостерону та 17 β -естрадіолу методом імуноферментного аналізу, потім розраховують співвідношення одержаних значень тестостерону та естрадіолу і, якщо величина
- 35 співвідношення є меншою 100 для ювенільного періоду, меншою 110 для зрілого репродуктивного періоду, меншою 200 для молодого репродуктивного періоду, діагностують субмісивний тип поведінки гризунів; якщо величина співвідношення коливається у межах 110-320 для зрілого репродуктивного періоду, 100-420 для ювенільного періоду та 200-600 для молодого репродуктивного періоду, діагностують урівноважений тип поведінки; якщо величина
- 40 співвідношення є більшою 320 для зрілого репродуктивного періоду, більшою 420 для ювенільного періоду та більшою 600 для молодого репродуктивного періоду, діагностують домінантний тип поведінки.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601