

УДК 612.64:616.8-00

ПРЕНАТАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ, АССОЦИИРОВАННОЕ С ИЗМЕНЕНИЕМ КОЛИЧЕСТВА КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЭКСТРАГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ МОЗГА ВЗРОСЛЫХ КРЫС

© 2020 г. О. В. Ветровой^{1,2}, Е. И. Тюлькова^{1, *}, В. А. Стратилев¹, Л. А. Ватаева³

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, 191186 Россия

*E-mail: etylkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

После доработки 02.04.2020 г.

Принята к публикации 06.04.2020 г.

Дексаметазон, как и другие искусственные глюкокортикоиды, широко применяется в повседневной акушерской практике. Показанием для использования глюкокортикоидов является угроза прерывания беременности. Однако имеются данные, свидетельствующие о том, что введение глюкокортикоидов в период беременности может привести к нарушению развития мозга и поведения потомства, которые могут быть обусловлены изменением активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) вследствие перенесенных воздействий. Целью настоящей работы явилось изучение влияния введения синтетического гормона дексаметазона на 14–16-е (ДМ14–16) и 17–19-е (ДМ17–19) сут пренатального онтогенеза на стресс-реактивность ГГАС у взрослых 3-месячных крыс, а также на уровень глюко- (ГР) и минералокортикоидных (МР) рецепторов в наиболее уязвимых областях мозга (гиппокампе и неокортексе). Были выявлены значимые межгрупповые различия в динамике изменения уровня кортикостерона в крови взрослых крыс в ответ на слабое стрессовое воздействие (тест на быструю стресс-реактивность). С использованием иммуногистохимического метода изучали изменения экспрессии (количество иммунопозитивных клеток) ГР и МР в области СА1 и зубчатой извилины (ЗИ) гиппокампа, а также во 2-м и 5-м слоях неокортекса взрослых крыс самцов. У животных группы ДМ14–16 наблюдалось достоверное снижение количества клеток, интенсивно окрашенных с помощью антител к ГР, в области СА1, ЗИ гиппокампа и V слое неокортекса (до 24.5, 32.4 и 5.5% соответственно) по сравнению с контролем. Введение дексаметазона на 17–19-е сут гестации также приводило к уменьшению количества интенсивно окрашенных ГР-иммунопозитивных клеток в области СА1 гиппокампа и V слое неокортекса (до 31.9 и 35.7% соответственно) но в меньшей степени, чем у животных из группы ДМ14–16. Тенденция к уменьшению числа ГР-позитивных клеток сопровождается повышением иммунореактивности клеток к МР. Таким образом, введение дексаметазона в различные периоды пренатального онтогенеза модифицирует работу глюко- и минералокортикоидных рецепторов, однако степень, локализация и направленность этих изменений различаются в зависимости от сроков воздействия.

Ключевые слова: пренатальное развитие, мозг, дексаметазон, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система, глюко- и минералокортикоидные рецепторы

DOI: 10.31857/S004137712007007X

Воздействие различных стрессовых факторов в ранний период онтогенеза (пренатальный и перинатальный стресс) имеет многочисленные последствия не только для плода, но и связано с высоким уровнем риска формирования гормональных и поведенческих нарушений в последующие периоды

(Ватаева и др., 2005; Тюлькова и др., 2015а). Пренатальные стрессовые воздействия модифицируют базисные гомеостатические настройки организма, среди которых важное место принадлежит чувствительности звеньев гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС). ГГАС является основной эндокринной системой, регулирующей гомеостаз и обеспечивающей мобилизацию защитных сил организма при действии экстремальных факторов. Нарушение функции ГГАС и ее регуляции по механизму глюкокортикоидной отрицательной обратной

Принятые сокращения: ГГАС — гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система; ГР — глюкокортикоидные рецепторы; ЗИ — зубчатая извилина; МР — минералокортикоидные рецепторы.

связи вызывает развитие дезадаптивных состояний, которые могут привести к тяжелым функциональным расстройствам вплоть до гибели организма.

Стрессовые воздействия в ранний период онтогенеза вызывают стойкие эпигенетические изменения, такие как степень метилирования ДНК и соотношение ковалентных модификаций гистонов, которые могут быть вовлечены как в обеспечение активации, так и супрессию генной экспрессии (Sucheckı, Tufik, 1997; Hales, Ozanne, 2003; Andrews, Matthews, 2004; Drake, Walker, 2004; Weaver et al., 2004; Meaney, Szyf, 2005; Ellis et al., 2006). Изменения эпигенетического профиля являются ключевым механизмом “программирования” судьбы клеток. Согласно концепции раннего “программирования”, реализация генетических программ подвергается модифицирующим влияниям внешних и внутренних факторов во время эмбрионального и фетального периодов, а процессы, происходящие в ранний период онтогенеза, способны предопределять дальнейшее адекватное функционирование либо приводить к неизбежному развитию различных патологий.

Ведущими факторами риска развития различных патологий, связанных с воздействием стресса в раннем онтогенезе, являются глюкокортикоиды. Являясь важными регуляторами эмбрионального развития, глюкокортикоиды подавляют нейрогенез — пролиферацию и миграцию клеток, стимулируют терминальную дифференцировку, контролируют апоптотические процессы. Стрессовая реакция материнского организма через высокие дозы эндогенных глюкокортикоидных гормонов, так же как и введение синтетических глюкокортикоидов в терапевтических целях, в раннем онтогенезе способны оказывать влияние на настройку диапазонов чувствительности развивающихся систем организма плода на клеточном и молекулярных уровнях, ведя в конечном счете к формированию нарушений эмоциональной сферы, когнитивных функций, нарушениям гормональной регуляции метаболизма и ряда других важнейших физиологических процессов.

Воздействие стрессовых факторов во время беременности приводит к повышению уровня кортикостероидов в плазме крови матери и плода (Hompes et al., 2012). Увеличение уровня кортикостероидов плода может происходить за счет перехода через плаценту индуцированного стрессом кортиколиберина и изменения активности ГГАС плода или как следствие стимулированной глюкокортикоидами плацентарной продукции кортиколиберина, которая, в свою очередь, активирует ГГАС плода. Исследования на людях и животных показали, что эндогенные или синтетические глюкокортикоиды оказывают негативный эффект на развитие мозга (Pruce et al., 2005, 2008; Buss et al., 2012), хотя отдельные области мозга оказываются уязвимыми только после достижения определенного порога (уровня воздействия или его продолжительности). Считается, что изменение ба-

ланса в механизмах, лежащих в основе изменений в работе ГГАС составляют основу так называемого “фетального программирования” (Waffarn, Davis, 2012; Moisiadis, Matthews, 2014a, b).

Шизофрения, дефицит внимания (гиперактивность), антисоциальное и аддиктивное поведение, посттравматические стрессовые расстройства, тревожные расстройства, трудности в обучении и предрасположенность к депрессии также во многих случаях связаны с пренатальным материнским стрессом, следствием которого может являться избыток глюкокортикоидов в различные периоды пренатального онтогенеза (Barbazanges et al., 1996; Chrousos, Kino, 2009; Buss et al., 2012; Wyrwoll, Holmes, 2012).

Несмотря на проводимые в этой области исследования, глюкокортикоидная терапия продолжает применяться при патологиях беременности и вероятности преждевременных родов, помогая уменьшить дыхательный дистресс и серьезные проблемы со здоровьем у детей. Актуальность настоящего исследования обусловлена недостаточной изученностью влияния избытка глюкокортикоидов в различные периоды гестации на развитие нервной системы на ранних стадиях постнатального онтогенеза и в более поздние сроки, включая взрослую жизнь и период старения.

При проведении исследований последствий стрессовых воздействий на развитие мозга особый интерес представляет гиппокамп и новая кора. Известно, что 14–16-е сут эмбрионального развития головного мозга крыс соответствуют 5–7-ой нед беременности человека, а 17–19-е сутки гестации — 8–10-ой нед (Bayer et al., 1993; Golan, Huleihel, 2006). Как в неокортексе, так и в гиппокампе крыс на 14–16-е сут гестации происходит активное деление клеток предшественников и их миграция. В этот период закладываются все области гиппокампа (Bayer, 1980) и формируются V, VI слои неокортекса (Dehay, Kennedy, 2007). Затем, на 17–19-е сут гестации в неокортексе окончательно закладываются II, III и IV слои и происходит настройка первичных связей между нейронами различных образований головного мозга. Повреждающие воздействия в этот период могут привести к существенным изменениям этих настроек на молекулярно-клеточном уровне.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния введения синтетического гормона дексаметазона на 14–16-е и 17–19-е сут пренатального онтогенеза на стресс-реактивность ГГАС у взрослых 3-месячных крыс, а также на уровень глюко- и минералокортикоидных рецепторов в наиболее уязвимых областях мозга (гиппокампе и неокортексе).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных ис-

следований. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Работа проведена на животных из ЦКП “Коллекции лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Опыты проведены на самцах белых крыс линии Вистар в возрасте 80–90 сут. Животные были рождены интактными самками (контроль) и самками, подвергавшимися введению дексаметазона на 14–16-е (ДМ14–16) или 17–19-е (ДМ17–19) сут беременности. Синтетический гормон дексаметазон вводили внутривентрально в дозе 0.8 мг/кг беременным самкам один раз в день в течение 3 сут. Крысят отлучали от кормившей их матери в возрасте 30 сут. После отлучения самцы находились в клетках размером 60 × 30 × 20 по 6 животных в каждой. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет/темнота 12 : 12 ч, температуре 20–23°C и при постоянном доступе к воде и пище.

Базальный и стресс-индуцированный уровни кортикостерона являются важными показателями особенностей функционирования ГГАС. Учитывая циркадианную ритмическую активность ГГАС, забор крови для оценки базального уровня кортикостерона производили из хвостовой вены в одно и то же время суток (10–11 ч утра). Стресс-реактивность ГГАС у взрослых 3-месячных крыс контрольной группы и у крыс групп ДМ14–16 и ДМ17–19 исследовали по уровню содержания в плазме крови основного глюкокортикоидного гормона, кортикостерона, через 30, 60 и 180 мин после слабого стрессорного воздействия (первый забор периферический крови из хвоста). Количество кортикостерона определяли методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов “Кортикостерон крыса/мышь-ИФА” (K210R, ХЕМА, Россия).

Декапитацию 3-месячных животных каждой из экспериментальных групп (для каждой группы $n = 6$) для взятия головного мозга осуществляли с использованием гильотины. После декапитации вскрывали череп, извлекали мозг, отрезали мозжечок и помещали мозг в фиксатор. Далее образцы ткани мозга обрабатывали согласно стандартному гистологическому протоколу: фиксировали в молекулярном фиксаторе FineFix (разведение: 28 мл фиксатора + 72 мл 96% этанола, Milestone, Italy) в течение 24 ч при температуре 4°C. Затем образцы обезживали, проводя через этанол возрастающих концентраций (70% → 80% → 96% → 96% по 1 ч в каждом). На ночь оставляли в бутаноле. Затем материал проводили через 2 порции ксилола (по 30–40 мин), помещали в парафин (2 смены парафина, по 1 ч в каждой) в термостате при температуре 56°C и после заливки в парафин изготавливали парафиновые блоки. На ротационном

микротоме (Reichert, Austria) изготавливали серийные срезы мозга во фронтальной плоскости толщиной 7 мкм на уровне – 2.80–3.60 мм от брегмы. Полученные срезы монтировали на предметные стекла, обработанные полилизинном.

Далее срезы депарафинизировали в ксилоле (2 смены по 5 мин) и подвергали регидратации в спиртах (96% → 96% → 96% → 70% по 5 мин в каждом). Для оценки содержания рецепторов стероидных гормонов использовали иммуногистохимический метод. Основные этапы метода: 1) инкубация в блокирующем буфере (PK-4001, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc, США, разведение блокирующей сыворотки в PBS 1.5 : 100); 2) инкубация с первичными поликлональными кроличьими антителами к минералокортикоидным рецепторам (MP) (1 : 100, sc-11412, Santa Cruz Biotechnology, США) и глюкокортикоидным рецепторам (GP) (1 : 100, sc-1004, Santa Cruz Biotechnology, США); 3) инкубация с вторичными биотинилированными противокроличьими антителами (PK-4001, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc, США, разведение в PBS 1 : 200); 4) инкубация с комплексом авидина и биотинилированной пероксидазы (PK-4001, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc, США, разведение реагентов А и В 1 : 100); 5) визуализация реакции с помощью диаминобензидинового кита (SK-4100, DAB substrate kit for peroxidase, Vector Laboratories, Inc, США).

Анализ препаратов проводили с помощью морфометрической установки, состоящей из светового микроскопа Jenaval (Carl Zeiss, Германия), цифровой камеры Baumer CX05c (Baumer Optronic, Германия) и компьютера IBM PC с программным обеспечением ВидеоТест Мастер Морфология (разработка ООО “Видео Тест”, Санкт-Петербург). Клетки подсчитывали в поле зрения площадью 460 × 340 мкм (объектив 40×). Определяли величину средней оптической плотности клеток в условных единицах уровня серого, обратно пропорциональных единицам яркости. На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки подразделяли на 2 класса: слабо (средняя оптическая плотность ниже 0.09 условных единиц) и интенсивно окрашенные (оптическая плотность выше 0.09 условных единиц), анализировали число интенсивно окрашенных клеток (ИОК). Для каждого животного анализировали по 4 гистологических препарата, усредняя значения для каждой области мозга с одного поля зрения конкретной области мозга на срезе.

Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, использовали непараметрический критерий Манн–Уитни (Mann–Whitney U-test). Изменения считали достоверными при $p \leq 0.05$. Результаты иммуноферментного анализа выражены в наномолях кортикостерона, содержащихся в литре плазмы крови (нмоль/л), результаты представлены в

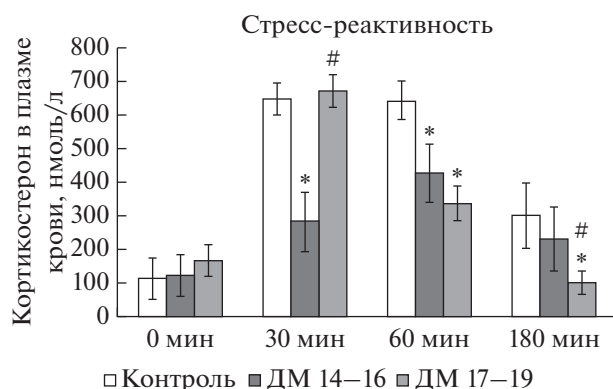


Рис. 1. Базальное и стресс-индуцированное количество кортикостерона в плазме крови контрольных крыс и крыс, переживших введение дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14–16-е (ДМ14–16) и 17–19-е (ДМ17–19) сут пренатального развития. По *горизонтали* — наименование экспериментальных групп и временные точки забора капиллярной крови, по *вертикали* — количество кортикостерона, выраженное в нмоль/л. * — различия с контролем статистически достоверны ($p \leq 0.05$), # — различия с ДМ14–16 статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

форме среднего значения $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего, standard error of the mean). Результаты иммуногистохимического исследования представлены в процентах от контроля, в форме среднего значения $\pm$ SEM, контроль принят за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По сравнению с животными контрольной группы, достоверных изменений базального уровня кортикостерона в крови крыс групп ДМ14–16 и ДМ17–19 не наблюдали (рис. 1). Однако значимые межгрупповые различия были выявлены при анализе динамики изменения уровня кортикостерона в ответ на слабое стрессовое воздействие (тест на быструю стресс-реактивность). Так, у крыс группы ДМ14–16 через 30 мин после первого забора проб крови наблюдали менее значительное повышение уровня кортикостерона в крови по сравнению с этими показателями у контрольных животных (рис. 1). Через 60 мин уровень кортикостерона в крови крыс данной экспериментальной группы достоверно не отличался от контроля. У крыс группы ДМ17–19 через 30 мин было выявлено такое же повышение уровня кортикостерона в крови, как и у животных контрольной группы. Однако через 60 и 180 мин в этой группе уровень кортикостерона в крови оставался повышенным, достоверно отличаясь от контроля, что свидетельствует о нарушениях функции ГГАС и ее регуляции у этих животных по механизму отрицательной обратной связи.

На рис. 2 и 3 представлены репрезентативные микрофотографии клеток, иммунопозитивных к глюко- (ГР) и минералокортикоидным (МР) рецеп-

торам соответственно. Основные изменения, вызываемые пренатальным введением дексаметазона, касаются количества интенсивно окрашенных иммунопозитивных клеток к ГР и МР.

У животных группы ДМ14–16 наблюдали достоверное снижение количества интенсивно окрашенных клеток к ГР в области СА1 (рис. 4а) зубчатой извилины (ЗИ) гиппокампа (рис. 4б) и V слое неокортекса (рис. 4г) (до 24.5, 32.4 и 5.5% соответственно) по сравнению с контролем. Введение дексаметазона на 17–19-е сутки гестации также приводило к уменьшению уровня интенсивно окрашенных иммунореактивных клеток к ГР в области СА1 гиппокампа (рис. 4а) и V слое неокортекса (рис. 4г) (до 31.9 и 35.7% соответственно) но в меньшей степени, чем у группы ДМ14–16.

Введение дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза приводило к увеличению количества интенсивно окрашенных с помощью антител к МР клеток в ЗИ (рис. 5б) и во II слое неокортекса (рис. 5в) (на 55.8 и 126.3% соответственно) взрослых крыс. Однако инъекции дексаметазона на 17–19-е сут гестации приводили к снижению количества интенсивно окрашенных клеток в исследованных областях неокортекса (рис. 5в, г) (до 60% во II слое и до 65.4% в V слое), но не в гиппокампе (рис. 5а, б).

Тенденция к уменьшению интенсивно иммунореактивных клеток к ГР, сопровождается повышением иммунореактивности клеток к МР.

ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении нескольких лет, занимаясь изучением последствий влияния пренатального стресса на крысах, особое внимание мы уделили двум аспектам: во-первых, сопоставлению последствий действия различных стрессовых факторов в пренатальный период на развитие функций мозга; во-вторых, мы попытались определить зависимость выраженности возможных нарушений от срока беременности в период стрессового воздействия. Наши исследования показали, что у потомков крыс, испытавших воздействие стресса на третьей неделе беременности — в период, когда происходит ряд последовательных процессов, связанных с формированием коры головного мозга (образование слоев нейробластов, дифференцировка нейронов и формирование нейронных сетей), характер выявляемых нарушений зависит от природы стрессовых факторов и от сроков их воздействия. Были выявлены связи между воздействием стрессовых факторов в различные сроки пренатального онтогенеза и конкретными изменениями как на поведенческом, так и на молекулярном уровне. Изменения поведения имеют разнонаправленный характер и амплитуду в зависимости от типа воздействия: беременные самки подвергались воздействию гипоксии, или им вводили

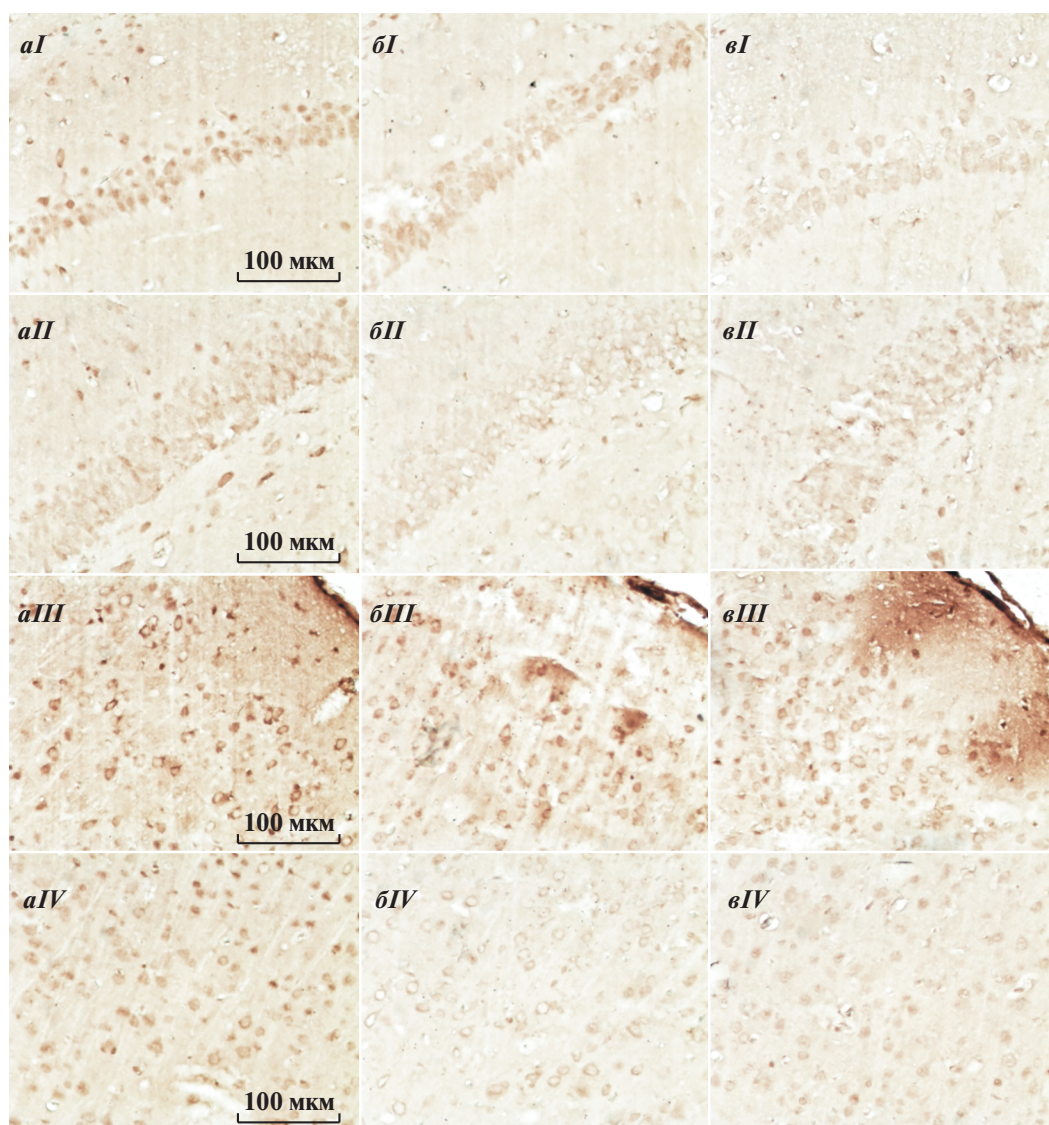


Рис. 2. Микрофотографии СА1 поля гиппокампа (*I*), зубчатой извилины (*II*), II и V слоев неокортекса (*III* и *IV*) контрольных крыс (*a*) и крыс, переживших введение дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14–16-е (ДМ14–16) (*б*) и 17–19-е (ДМ17–19) (*в*) сутки пренатального развития. Иммуногистохимическая реакция на глюкокортикоидные рецепторы. Увел. об. 40×.

дексаметазон. Было установлено, что действие широко используемого в перинатальной медицине синтетического глюкокортикоида дексаметазона в начале (14–16-е сут) или в конце (17–19-е сут) третьей недели беременности может приводить к различным последствиям (Ватаева и др., 2001, 2004, 2005; Тюлькова и др., 2010, 2015а, б). В частности, было показано, что введение дексаметазона на 14–16-е сут пренатального онтогенеза вызывало достоверное повышение двигательной активности взрослых крыс в тесте “открытого поля” (на 90%, $p < 0.001$). Однако пренатальное введение дексаметазона в более поздний период (на 17–19-е сут развития) приводило в последствии к снижению двигательной активности крыс (на 42%, $p < 0.001$) (Тюлькова, 2015). Отличия от контроля сохранялись в течение всех дней тести-

рования. У крыс, матери которых получали инъекции дексаметазона на 14–16-е сут беременности, время пребывания в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта увеличилось почти в 3 раза по сравнению с контролем. То есть введение дексаметазона беременным самкам в указанные сроки вызывает снижение уровня тревожности у их взрослых потомков. Кроме того, показано, что пренатальное введение дексаметазона вызывает изменение проявления условнорефлекторной реакции страха у взрослых самцов крыс (Ватаева и др., 2018). Характер этих изменений зависит от сроков воздействия дексаметазона в пренатальном периоде.

Важным аспектом изучаемой проблемы является исследование молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе нарушений поведения и способ-

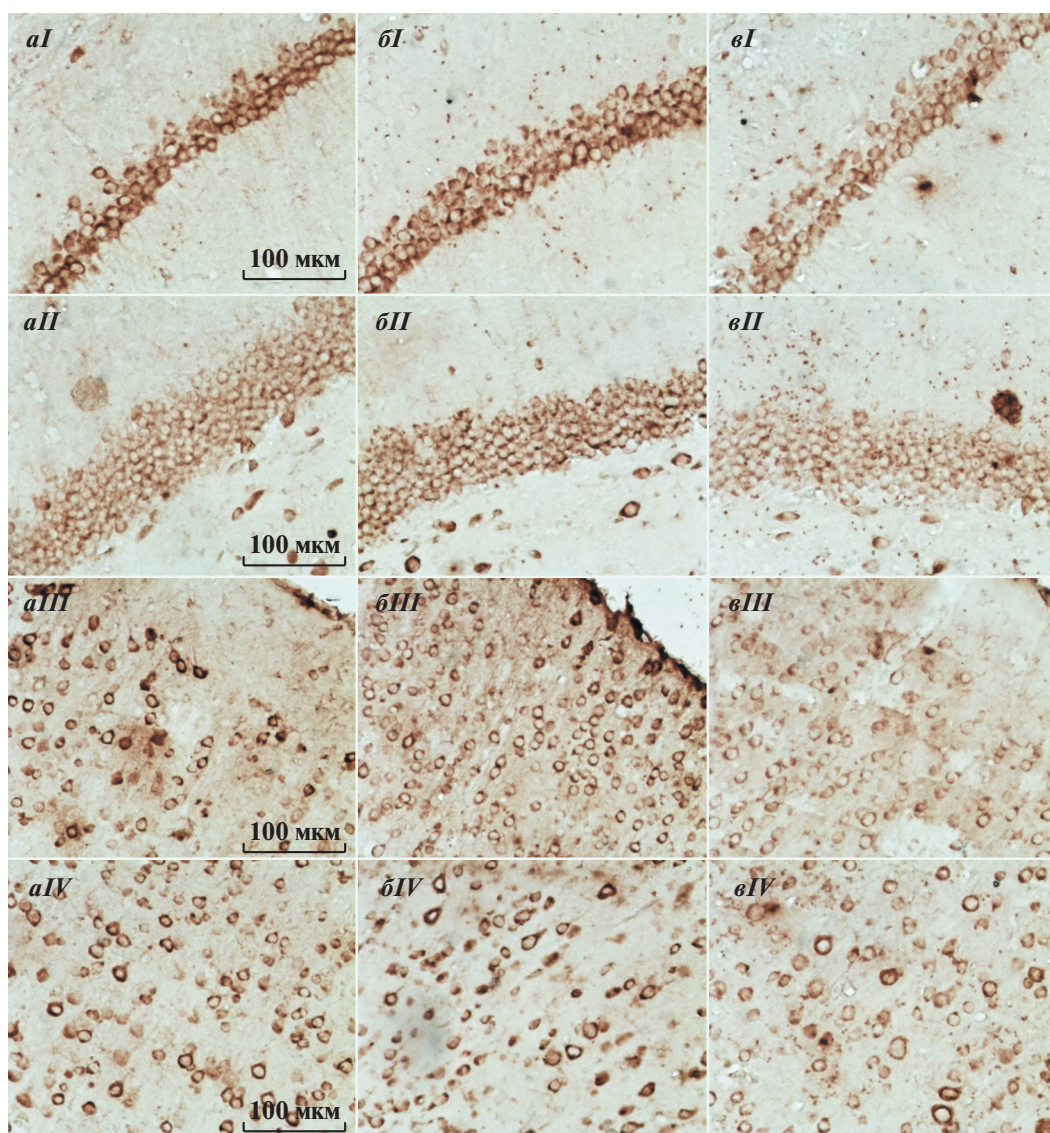


Рис. 3. Микрофотографии СА1 поля гиппокампа (*I*), зубчатой извилины (*II*), II и V слоев неокортекса (*III* и *IV*) контрольных крыс (*a*) и крыс, переживших введение дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14–16-е (ДМ14–16) (*б*) и 17–19-е (ДМ17–19) (*в*) сутки пренатального развития. Иммуногистохимическая реакция на минералокортикоидные рецепторы. Увел. об. 40×.

ности к обучению, возникающих в результате воздействия неблагоприятных факторов в разные периоды пренатального онтогенеза. Есть основания предполагать, что при применении глюкокортикоидных гормонов во время беременности функциональные нарушения ЦНС во взрослом возрасте могут возникать вторично вследствие “перепрограммирования” ГГАС (Muneoka et al., 1997; Welberg et al., 2001). ГГАС является основной эндокринной системой, регулирующей гомеостаз и обеспечивающей необходимую для формирования адаптивных реакций мобилизацию защитных сил организма при действии экстремальных факторов. Нарушения функции ГГАС и ее регуляции по механизму глюкокортикоидной отрицательной обратной связи вызывает

развитие дезадаптивных состояний, приводящих к тяжелым функциональным расстройствам вплоть до гибели организма. Полученные в этой работе данные об изменениях кривых стресс-реактивности ГГАС вследствие введения дексаметазона в различные периоды пренатального развития хорошо согласуются с различиями в поведенческих тестах. Так нарушения регуляции ГГАС по принципу отрицательной обратной связи у крыс, матерям которых вводили дексаметазон на 17–19-е сут беременности, сопровождаются увеличением уровня выраженности условнорефлекторной реакции страха в тесте “условный рефлекс пассивного избегания” (Ватаева и др., 2018). В то же время снижение стрессового ответа ГГАС у крыс, которым вводили дексаметазон на

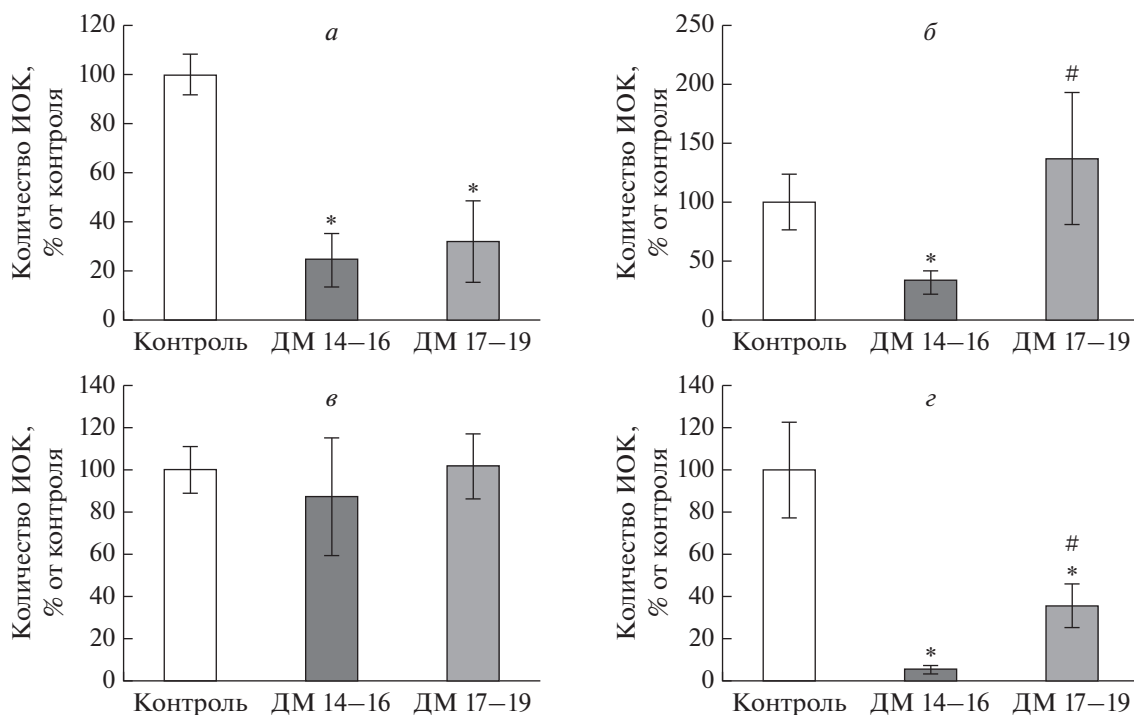


Рис. 4. Результаты иммуногистохимической реакции на глюкокортикоидные рецепторы в СА1 поле (а) и зубчатой извилине (б) гиппокампа, II и V слоях неокортекса (в, г) контрольных крыс и крыс, переживших введение дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14–16-е (ДМ14–16) и 17–19-е (ДМ17–19) сутки пренатального развития. По *горизонтали* – наименование экспериментальных групп, по *вертикали* – количество интенсивно окрашенных клеток (ИОК), выраженное в % от контроля. * – различия с контролем статистически достоверны ($p \leq 0.05$), # – различия с ДМ14–16 статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

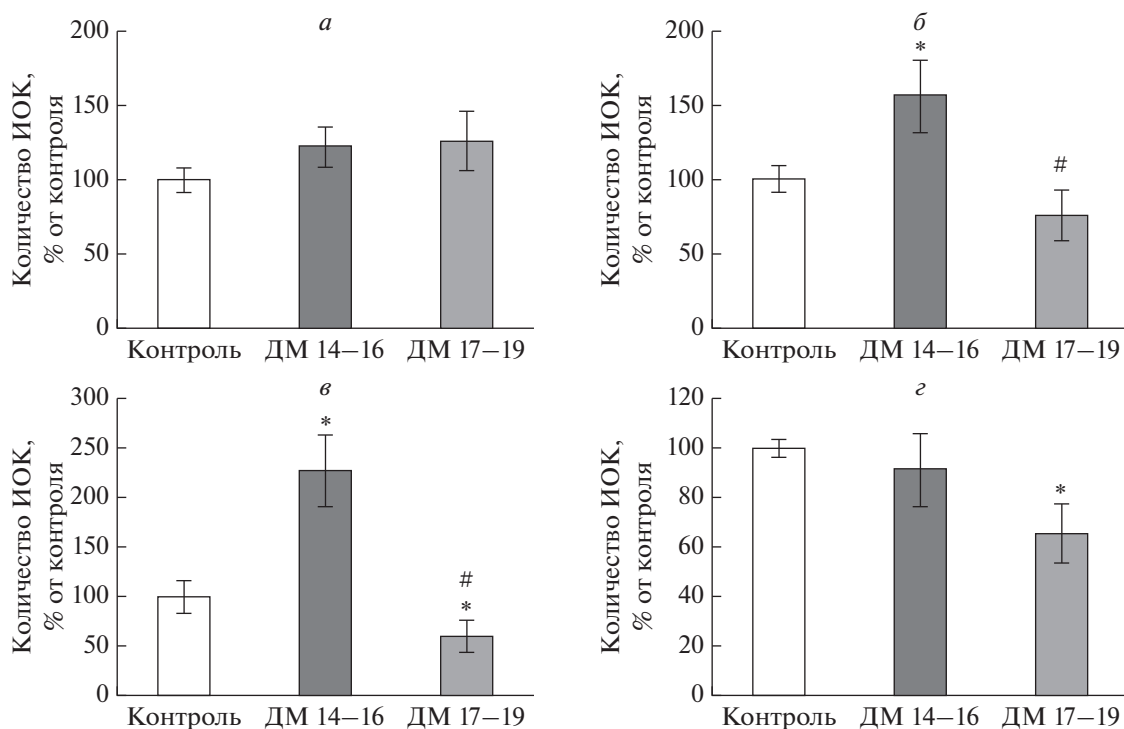


Рис. 5. Результаты иммуногистохимической реакции на минералокортикоидные рецепторы в СА1 поле (а) и зубчатой извилине (б) гиппокампа, II и V слоях неокортекса (в, г) контрольных крыс и крыс, переживших введение дексаметазона (0.8 мг/кг) на 14–16-е (ДМ14–16) (б) и 17–19-е (ДМ17–19) (в) сутки пренатального развития. По *горизонтали* – наименование экспериментальных групп, по *вертикали* – количество интенсивно окрашенных клеток (ИОК), выраженное в % от контроля. * – различия с контролем статистически достоверны ($p \leq 0.05$), # – различия с ДМ14–16 статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

14–16-е сут пренатального онтогенеза, согласуется со снижением уровня тревожности.

Дексаметазон является избирательным агонистом глюкокортикоидных рецепторов. Можно предполагать, что нарушение функции глюкокортикоидных рецепторов в первую очередь в коре и гиппокампе, а также амигдале, которая имеет прямое отношение к эмоциональному контролю процессов памяти (McGaugh, Cahill, 1997; McGaugh, 2004; De Quervain et al., 2009; Miranda, Sousa, 2018), составляет основу изменений в эмоциональной сфере и способности к обучению оборонительным реакциям, связанных с действием дексаметазона в пренатальном периоде развития.

В настоящей работе был изучен характер вовлечения экстрагипоталамических кортикостероидных рецепторов в механизмы повреждения мозга, индуцируемые пренатальным введением дексаметазона. Повышение уровня глюкокортикоидов в крови матери может приводить к нарушениям развития мозга. Физиологическое действие гормонов стресса проявляется через их взаимодействие с рецептором. Поэтому при изучении механизмов длительного модифицирующего влияния стрессовых воздействий на развитие мозга первостепенное значение имеет оценка количества функционально активных рецепторов в определенных структурах мозга. Согласно современным представлениям, большое значение в гормон-опосредованных адаптивных процессах, а также регуляции гибели/выживания нейронов мозга при окислительном стрессе, отводится ГР и МР, функционирующим в качестве транскрипционных факторов (De Kloet et al., 1998; Almeida et al., 2000; Meaney et al. 2007; Galeeva et al., 2010; Rogalska, 2010; Grace et al., 2011). Важная роль в интегративной реакции организма на стресс принадлежит гиппокампу, который, как известно, участвует в процессах отбора и закрепления эмоционально значимых событий, регуляции двигательной и исследовательской активности и в контроле состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (De Kloet et al., 1998, 2005; Rogalska, 2010), осуществляя, таким образом, двустороннюю связь между гормональными механизмами и центрами регуляции поведения.

В работе показаны достоверные различия динамики изменений количества интенсивно иммунопозитивных клеток к ГР и МР в гиппокампе и неокортексе крыс, подвергавшихся введению дексаметазона на 14–16-е и 17–19-е сут пренатального онтогенеза между контрольной и экспериментальными группами.

Координированная активность ГР и МР необходима для обеспечения нормального функционирования ГГАС, вовлекаемой в регуляцию стресс-ответов, поведения, обучения и памяти. Причем в этих процессах существенное значение имеет характер изменения соотношения (баланса) ГР/МР. Характер воздействия глюкокортикоидов на конкретную

клетку определяется концентрацией гормона, наличием и соотношением типов рецепторов, с которыми связывается гормон. Существующие в настоящее время данные позволяют сделать вывод, что соотношение ГР/МР имеет большое значение для реализации физиологического эффекта глюкокортикоидов на клетки-мишени. Разнонаправленные изменения в уровне экспрессии ГР и МР в структурах мозга, чувствительных к действию стресса, могут приводить к сдвигу баланса между данными рецепторами, что позволяет, в зависимости от соотношения между ГР и МР, уменьшить или увеличить адаптивный потенциал клетки и организма в целом. Как было показано ранее, введение дексаметазона влияет на соотношение иммунопозитивных клеток, интенсивно окрашивающихся с помощью антител к ГР и МР. Различия в соотношении ГР/МР обнаружены во всех исследованных областях мозга, но их локализация и направленность зависят от типа и сроков воздействия. Наибольшие изменения наблюдаются в области СА1 гиппокампа и во 5-м слое неокортекса. При анализе отношения ГР/МР видно, что в области СА1 гиппокампа и 5-м слое неокортекса в мозге взрослых крыс это отношение сдвигается в сторону увеличения доли МР после пренатального воздействия дексаметазона. Дисбаланс ГР и МР, как следствие пренатальных воздействий повреждающих факторов, может приводить к изменениям поведенческих реакций. В нашей работе показано значительное снижение (на 80%) отношения ГР/МР в области СА1 и зубчатой извилине гиппокампа и неокортексе после введения дексаметазона на 14–16-е, но не на 17–19-е сут пренатального онтогенеза. Эти результаты коррелируют с разнонаправленными нарушениями эмоционального поведения в тесте “условный рефлекс пассивного избегания” (Ватаева и др., 2018) крыс линии Вистар, подвергавшихся таким же воздействиям в наших предыдущих исследованиях.

Таким образом, введение дексаметазона в различные периоды пренатального онтогенеза модифицирует работу глюко- и минералокортикоидных рецепторов, однако степень, локализация и направленность этих изменений отличаются в зависимости от сроков воздействия. Будущие исследования должны быть посвящены мониторингу уровня кортикостероидов во время беременности в стратификации риска нарушения постнатального развития.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01118).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные и национальные принципы использования лабораторных животных. Протоколы экс-

периментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ватаева Л.А., Косткин В.Б., Макухина Г.В., Хожай Л.И., Отеллин В.А. 2001. Поведение в “открытом поле” у самок и самцов крыс, подвергавшихся действию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития. ДАН. Т. 380. № 1. С. 125. (Vataeva L.A., Kostkin V.B., Makuhina G.V., Khozhay L.I., Otellin V.A. 2001. Behavior in an “open field” test in female and male rats exposed to hypoxia at different periods of the prenatal development. DBS. V. 380. № 1. P. 125.)
- Ватаева Л.А., Косткин В.Б., Макухина Г.В., Хожай Л.И., Отеллин В.А. 2004. Условнорефлекторная реакция пассивного избегания у самок и самцов крыс, подвергшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития. Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 40. № 3. С. 250. (Vataeva L.A., Kostkin V.B., Makuhina G.V., Khozhay L.I., Otellin V.A. 2004. Conditional reflexreaction of the passive avoidance in female and male rats exposed to hypoxia at different terms of prenatal development. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 40. № 3. P. 307.)
- Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Алёхин А.Н., Стратиллов В.А. 2018. Влияние гипоксии или дексаметазона в различные сроки гестации на проявление условно-рефлекторного страха у взрослых крыс. Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 54. № 6. С. 392. (Vataeva L.A., Tyulkova E.I., Alekhin A.N., Stratilov V.A. 2018. Effects of hypoxia or dexamethasone at different gestation periods on fear conditioning in adult rats. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 54. № 6. P. 442.)
- Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Хожай Л.И., Самойлов М.О., Отеллин В.А. 2005. Обучение в водном лабиринте Морриса самок и самцов крыс, подвергавшихся воздействию гипоксии в различные сроки пренатального периода развития. Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 41. № 6. С. 530. (Vataeva L.A., Tyul'kova E.I., Khozhay L.I., Samoilov M.O., Otellin V.A. 2005. Training in the Morris water maze of female and male rats exposed to hypoxia at various periods of prenatal development. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 41. № 6. P. 660.)
- Тюлькова Е.И. 2015. Механизмы формирования патологических состояний мозга в ответ на воздействие гипоксии в пренатальном онтогенезе. Автореферат диссертации доктора биологических наук. Санкт-Петербург.
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А. 2010. Механизмы формирования реакций мозга на действие гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс. Журн. акушерства и женских болезней. Т. 59. № 4. С. 99. (Tyul'kova E.I., Vataeva L.A., Samoilov M.O., Otellin V.A. 2010. The mechanisms of brain reactions development to the effects of hypobaric hypoxia at various stages of the prenatal period in rats. J. Obstetrics and Women's Diseases. V. 59. № 4. P. 99–110.)
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Ветровой О.В., Романовский Д.Ю. 2015а. Пренатальная гипоксия модифицирует рабочую память и активность полифосфоинозитидной системы гиппокампа крыс. Журн. эволюционной биохимии и физиологии. Т. 51. № 2. С. 115. (Tyul'kova E.I., Vataeva L.A., Vetrovoi O.V., Romanovskii D.Y. 2015. Prenatal hypoxia modifies working memory and the activity of hippocampal polyphosphoinositide system in brain. J. Evol. Biochem. Physiol. V. 51. № 2. P. 131.)
- Тюлькова Е.И., Кислин М.С., Ватаева Л.А. 2015б. Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень перекисного окисления липидов в неокортексе и гиппокампе крыс. Нейрохимия. Т. 32. № 1. С. 64. (Tyul'kova E.I., Kislin M.S., Vataeva L.A. 2015. The effects of prenatal hypobaric hypoxia on the level of lipid peroxidation in the neocortex and hippocampus of rats. Neurochemical J. V. 9. № 1. P. 54.)
- Almeida O., Conde G., Crochmore C., Demenieux B., Fischer D., Hassan A., Meyer M., Holsboer F., Michaelidis T. 2000. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. Faseb J. V. 14. P. 779.
- Andrews M.H., Matthews S.G. 2004. Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: serotonergic involvement. Stress. V. 7. P. 15.
- Barbazanges A., Piazza P.V., Le Moal M., Maccari S. 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. J. Neurosci. V. 16. P. 3943.
- Bayer S.A. Development of the hippocampal region in the rat. 1980. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. J. Comp. Neurol. V. 190. P. 87.
- Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X. 1993. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. Neurotoxicology. V. 14. P. 83.
- Buss C., Davis E.P., Shahbaba B., Pruessner J.C., Head K., Sandman C.A. 2012. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. P. 1312.
- Chrousos G.P., Kino T. 2009. Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. Ann. New York Acad. Sci. V. 1179. P. 153.
- De Kloet E.R., Joels M., Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat. Rev. Neurosci. V. 6. P. 463.
- De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joëls M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocr. Rev. V. 19. P. 269.
- De Quervain D.J., Aerni A., Schelling G., Roozendaal B. 2009. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. Front. Neuroendocrinol. V. 30. P. 358.
- Dehay C., Kennedy H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. Nat. Rev. Neurosci. V. 8. P. 438.
- Drake A.J., Walker B.R. 2004. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. J. Endocrinol. V. 180. P. 1.
- Ellis S., Mouihate A., Pittman Q.J. 2006. Neonatal programming of the rat neuroimmune response: stimulus specific

- changes elicited by bacterial and viral mimetics. *J. Physiol.* V. 571. P. 695.
- Galeeva A., Pelto-Huikko M., Pivina S., Ordyan N. 2010. Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. *Vitam. Horm.* V. 82. P. 367.
- Golan H., Huleihel M. 2006. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev. Sci.* V. 9. P. 338.
- Grace C.E., Kim S., Rogers J.M., 2011. Maternal influences on epigenetic programming of the developing hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Birth Defects Res.* V. 92. P. 797.
- Hales C.N., Ozanne S.E. 2003. For debate: Fetal and early postnatal growth restrictions lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia.* V. 46. P. 1013.
- Hompes, T., Vrieze E., Fieuws S., Simons A., Jaspers L., Van Bussel J., Claes S. 2012. The influence of maternal cortisol and emotional state during pregnancy on fetal intrauterine growth. *Pediatric Res.* V. 72. P. 305.
- McGaugh J.L. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* V. 27. P. 1.
- McGaugh J.L., Cahill L. 1997. Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behav. Brain Res.* V. 83. P. 31.
- Meaney M.J., Szyf M. 2005. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: Life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialog. Clin. Neurosci.* V. 7. P. 103.
- Meaney M.J., Szyf M., Seckl J.R. 2007. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol. Med.* V. 13. P. 269.
- Miranda A., Sousa N. 2018. Maternal hormonal milieu influence on fetal brain development. *Brain Behav.* V. 8. e00920.
- Moisiadis V.G., Matthews S.G. 2014a. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. *Nat. Rev. Endocrin.* V. 10. P. 391.
- Moisiadis V.G., Matthews S.G. 2014b. Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms. *Nat. Rev. Endocrin.* V. 10. P. 403.
- Muneoka K., Mikuni M., Ogawa T., Kitera K., Kamei K., Takigawa M., Takahashi K. 1997. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* V. 27. P. 1669.
- Pryce C.R. 2008. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences. *Brain Res. Rev.* V. 57. P. 596.
- Pryce C.R., Rüedi-Bettschen D., Dettling A. C., Weston A., Russig H., Ferger B., Feldon J. 2005. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* V. 29. P. 649.
- Rogalska J. 2010. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: Their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury. *Vitamins and Hormones.* V. 82. P. 392.
- Suchecki D., Tufik S. 1997. Long-term effects of maternal deprivation on the corticosterone response to stress in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* V. 273. P. 1332.
- Waffarn F., Davis E.P. 2012. Effects of antenatal corticosteroids on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis of the fetus and newborn: Experimental findings and clinical considerations. *Am. J. Obst. Gyn.* V. 207. P. 446.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* V. 7. P. 847.
- Welberg L.A., Seckl J.R., Holmes M.C. 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behavior. *Neurosci.* V. 104. P. 71.
- Wyrwoll C.S., Holmes M.C. 2012. Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: A role for serotonergic and catecholamine pathways. *Neuroendocrinology.* V. 95. P. 47.

Prenatal Administration of Dexamethasone Causes a Violation of Glucocorticoid Feedback Associated with a Change in the Number of Corticosteroid Receptor in Extrahypothalamic Brain Structures

O. V. Vetrovoy^{a, b}, E. I. Tylkova^{a, *}, V. A. Stratilov^a, and L. A. Vataeva^c

^aPavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

^bBiology Department, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^cHerzen State Pedagogical University, St. Petersburg, 191186 Russia

*e-mail: etyulkova@yandex.ru

Dexamethasone, like other artificial glucocorticoids, is widely used in everyday obstetric practice. Glucocorticoids can be recommended for use in cases of threatened abortion. However, there is evidence that the administration of glucocorticoids during pregnancy can lead to impaired brain development and offspring behavior, which may be due to a change in the activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPAA). The aim of this work was to study the effect of the administration of the synthetic hormone dexamethasone on the 14–16th (DM14–16) and 17–19th (DM17–19) days of prenatal ontogenesis on the stress reactivity of HPAA in adult 3-month-old rats, as well as on the levels of glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors in the most vulnerable areas of the brain (hippocampus and neocortex). Significant intergroup differences in the dynamics of changes in the levels of corticosterone in the blood of adult rats were revealed in response to mild stress exposure (the rapid stress reactivity test). Using the

immunohistochemical method, we have studied changes in the GR and MR expression (number of immunopositive cells) in the CA1 region and the dentate gyrus (DG) of the hippocampus, as well as in the 2nd and 5th layers of the neocortex of adult male rats. For animals of the DM14-16 group, there was a significant decrease in the number of intensely stained GR-positive cells in the CA1 field and DG of the hippocampus and the V layer of the neocortex (up to 24.5, 32.4 and 5.5% of control, respectively). The administration of dexamethasone on the 17–19th day of gestation also led to a decrease in the levels of intensely stained GR-positive cells in the CA1 field of the hippocampus and V layer of the neocortex (31.9 and 35.7% of control, respectively), but to a lesser extent than in the group DM14-16. The tendency to a decrease in the GR immunoreactive cells intensity is accompanied by an increase in the MR immunoreactive cells. Thus, the introduction of dexamethasone at different periods of prenatal ontogenesis modifies the functioning of gluco- and mineralocorticoid receptors, however, the degree, localization, and direction of these changes differ depending on the duration of exposure.

Keywords: prenatal development, brain, dexamethasone, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, gluco- and mineralocorticoid receptors