

ОСОБЕННОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА ЦНС ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА

© 2021 г. О. Н. Кулешова^{1, *}, Д. Л. Теплый¹, Д. Д. Теплый¹, А. С. Семенова²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Воронежский государственный университет”, Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 04.11.2020 г.

После доработки 19.12.2020 г.

Принята к публикации 22.01.2021 г.

В условиях пренатального периода при активной дифференциации клеток повышение уровня АФК приводит к формированию тератогенных эффектов, дозозависимого характера. Целью данного исследования стало определение связи продолжительности стресса, перенесенного беременными самками крыс на третьем триместре, со степенью сдвига свободно радикального гомеостаза в плазме крови и на разных уровнях ЦНС. Изучали изменения уровня активности супероксиддисмутаза, продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в гомогенатах коры больших полушарий, гипоталамуса, мозжечка и спинного мозга пренатальнострессированных половозрелых самцов беспородных белых крыс. Для этого их матери с 16 по 19 дни беременности ежедневно подвергались иммобилизационному стрессу в пластиковых пеналах в течение одного и трех часов. Самки контрольных групп содержались в стандартных условиях вивария в свободном доступе к пище и воде. Пренатальный стресс оказал влияние на свободно-радикальный гомеостаз всех изученных отделов ЦНС 90-дневных самцов крыс. Более значительные эффекты были отмечены после 3-часовой иммобилизации. Потомки стрессированных матерей характеризовались более выраженными сдвигами свободнорадикального баланса. Вследствие односторонней ежедневной иммобилизации с 16 по 19 дни беременности у половозрелых потомков стрессированных матерей отмечено увеличение показателей окислительной модификации белковых и липидных компонентов, в то время, как для последствий трехчасовой пренатальной иммобилизации характерно, напротив, снижение изучаемых показателей продуктов свободнорадикального окисления и повышение активности СОД. Вне зависимости от длительности экспозиции наиболее выраженные сдвиги изучаемых параметров СР гомеостаза были характерны для гипоталамической области.

Ключевые слова: пренатальный стресс, ЦНС, окислительная модификация белков, свободнорадикальный гомеостаз, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, α -токоферола-ацетат, иммобилизация, половозрелые самцы крыс

DOI: 10.31857/S1027813321020096

К настоящему времени разнообразные исследования создали убедительную концепцию “пренатального программирования” – идею о том, что изменения условий развития на ранних этапах формирования может подготовить почву для хронических заболеваний в период постнатального онтогенеза [1]. Со временем эта концепция стала рассматриваться как “программирование развития” [2].

Основным источником патогенных влияний рассматривают стрессы различной природы, пе-

ренесенные в ранний период развития. Они “программируют” развитие мозга и приводят к долгосрочным морфо-физиологическим изменениям ЦНС и организации поведения [3]. Одним из механизмов такого “программирования” является рост окислительного стресса еще в плаценте [4]. Чрезмерная продукция АФК в плаценте приводит к повреждению ДНК, денатурации белков и перекисному окислению липидов, что может изменять функцию плаценты, приводя к снижению содержания кислорода и питательных веществ у плода [5]. Повышенная продукция АФК и окислительный стресс во время органогенеза, когда клетки продолжают активно дифференци-

* Адресат для корреспонденции: 414000 Россия, Астрахань, пл. Шаумяна, 1, e-mail: pozdniakova_olga@list.ru.

роваться, действуют как тератогенные агенты, вызывая структурные аномалии, потерю клеточной функции или самопроизвольный аборт развивающегося плода [6]. Как и у большинства тератогенных агентов, эффекты от стресса могут быть дозозависимыми. Можно предположить, что оказываемые эффекты будут изменяться не только в зависимости от интенсивности, но и от продолжительности стресса.

Корреляция между внутриутробным стрессом и негативными последствиями у потомства была продемонстрирована при заболеваниях, опосредованных свободными радикалами [7]. Окислительно-восстановительные процессы определяют практически все фундаментальные процессы жизни – от биоэнергетики до метаболизма и жизненных функций [8], многообразны и организованы в соответствии с принципами редокс-кода. Таким образом, уровень эффектов “пренатального программирования” можно оценивать по степени сдвигов свободно-радикального гомеостаза. Окислительный стресс является основным фактором, вызывающим нарушения и гибель нейрональных клеток в еще незрелом мозге [9] и может быть главной причиной неврологических нарушений [10].

Таким образом, целью данного исследования стало определение связи продолжительности стресса, перенесенного беременными самками крыс на третьем триместре, со степенью сдвига свободно-радикального гомеостаза в плазме крови и на разных уровнях ЦНС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент был разделен на 2 серии, в обеих сериях эксперимента участвовали по 10 первородящих самок беспородных белых крыс в возрасте 6–8 месяцев и их потомство в возрасте 90 дней (84 животных). У самок определяли стадии эстрального цикла стандартным методом взятия и анализа влажной мазки [11]. При обнаружении эструса или проэструса к самке подсаживали самца и первым днем беременности считали день обнаружения в мазке сперматозоидов. В первую серию самки со средней массой тела 221 ± 4.32 г с 16 по 19 дни беременности подвергались иммобилизационному стрессу в пластиковых пеналах на протяжении одного часа, во вторую серию самки со средней массой 234 ± 7.34 г – на протяжении трех часов. Животные контрольных групп не подвергались негативным воздействиям, содержались в клетках по 6 особей, в свободном доступе к пище и воде, до возраста 90 дней. На 90-ый день постнатального онтогенеза половозрелых пренатально стрессированных самцов и самцов контрольных групп наркотизировали этиминалом натрия и декапитировали. Головной и спинной мозг выделяли на холоде, готовили 10% гомогенаты

на 0.1 М фосфатном буфере, кровь собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали при 3000 об./мин, после чего отбирали плазму для дальнейшего изучения. Изменение свободнорадикального гомеостаза оценивали в плазме и гомогенатах ткани коры больших полушарий, гипоталамуса и спинного мозга. Все методики по изучению свободнорадикального гомеостаза были проведены не позднее 2 нед. с момента выделения ткани и приготовления гомогенатов, изучаемый материал хранили при температуре -20°C в присутствии ЭДТА.

Свободнорадикальный гомеостаз оценивали по уровню продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [12], уровню продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) [13] определяли на стадии инициации (270 нм) и элонгации (363 нм) [14]. Уровень антиокислительной активности – по уровню активности супероксиддисмутазы (СОД) [15]. Перерасчет уровня активности СОД и степени ОМБ производили из расчета на грамм белка, который определяли по методу Лоури. Пробы спектрофотометрировали на Цифровом UV-спектрофотометре PD-303UV (Arel, Япония). Статистическая обработка полученных результатов производилась с применением U непараметрического критерия Манна–Уитни, достоверность оценивали по таблице критических значений для уровней статистической значимости $p < 0.05$, $p < 0.01$, Гублера и Генкина (1973). Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одночасовая пренатальная иммобилизация в период третьего триместра вызвала изменения СР гомеостаза у взрослых половозрелых животных (табл. 1). Уровень промежуточных продуктов ПОЛ увеличился в ткани спинного мозга ($p < 0.01$; $p < 0.05$, диеновые конъюгаты, кетодиены и сопряженные триены соответственно), коры больших полушарий ($p < 0.01$) и гипоталамуса ($p < 0.01$), так же как и уровень продуктов ОМБ в коре больших полушарий ($p < 0.01$) и гипоталамуса ($p < 0.01$). В ткани коры больших полушарий и гипоталамуса уровень оснований Шиффа оказался ниже контрольной группы, $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно. На активности СОД одночасовая пренатальная иммобилизация повлияла только в ткани гипоталамической области, заметно уменьшив ее активность ($p < 0.05$).

По сравнению с одночасовой иммобилизацией в пренатальный период, трехчасовая привела к более значительным изменениям свободнорадикального гомеостаза (табл. 2). Уменьшился уровень ПП ПОЛ во всех рассматриваемых отделах ЦНС, и уровень оснований Шиффа в гипоталамусе ($p < 0.05$). В плазме уровень продуктов Шиффа увеличился по сравнению с контрольной группой

Таблица 1. Свободнорадикальный гомеостаз у пренатально стрессированных (1 ч) половозрелых самцов крыс

Ткань	Группы	Активность СОД, у.е./мг белка × мин	СРО белков, нмоль/мг белка		ПОЛ, у.е., индекс окисления		
			инициация, 270 нм	элонгация, 370 нм	диеновые конъюгаты	кетодиены и сопряженные триены	основания Шиффа
Плазма	Контроль, n = 11	0.035 ± 0.0048	0.52 ± 0.031	1.84 ± 0.141	0.45 ± 0.048	0.38 ± 0.049	0.009 ± 0.0005
	Стресс, n = 11	0.037 ± 0.0032	0.67 ± 0.052	2.45 ± 0.467	0.36 ± 0.025	0.26 ± 0.006	0.009 ± 0.0009
Кора больших полушарий	Контроль, n = 10	0.42 ± 0.044	1.629 ± 0.233	0.677 ± 0.071	0.58 ± 0.028	0.21 ± 0.020	0.086 ± 0.003
	Стресс, n = 8	0.44 ± 0.065	2.542 ± 0.766	1.603 ± 0.302##	0.76 ± 0.064##	0.26 ± 0.082	0.019 ± 0.003#
Гипоталамус	Контроль, n = 9	0.22 ± 0.011	0.43 ± 0.055	0.45 ± 0.069	0.60 ± 0.020	0.24 ± 0.004	0.032 ± 0.003
	Стресс, n = 10	0.19 ± 0.007#	1.557 ± 0.347##	0.80 ± 0.157	0.62 ± 0.012	0.26 ± 0.002##	0.022 ± 0.001##
Спинной мозг	Контроль, n = 9	0.20 ± 0.015	1.27 ± 0.178	0.60 ± 0.071	0.37 ± 0.024	0.12 ± 0.022	0.017 ± 0.0034
	Стресс, n = 8	0.22 ± 0.026	1.03 ± 0.178	0.61 ± 0.116	0.46 ± 0.016##	0.19 ± 0.016#	0.031 ± 0.0096

Примечания: достоверные различия между контрольными и опытными животными (критерий Манна–Уитни) обозначены для уровней статистической значимости # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; между опытными группами и группой стресса * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (по Гублеру и Генкину, 1973).

пой ($p < 0.01$). Уровень продуктов ОМБ на стадии инициации увеличился в гипоталамусе ($p < 0.05$) и спинном мозге ($p < 0.01$), уровень продуктов, характерных для стадии элонгации, увеличился в плазме ($p < 0.05$) и ткани спинного мозга ($p < 0.01$) и уменьшился в коре больших полушарий ($p < 0.01$) и гипоталамусе ($p < 0.01$). Изменение активности СОД имело тканеспецифические особенности: отмечено уменьшение ее активности в плазме крови ($p < 0.01$) и увеличение во всех изучаемых отделах ЦНС ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

АФК играют ключевую физиологическую роль в формировании плода, включая биосинтез стероидов яичников, созревание яйцеклеток, овуляцию, образование бластоцист, оплодотворение, имплантацию, лютеолиз и поддержание лютеиновой активности [16]. АФК вовлечены в пролиферацию и дифференцировку трофобластов, а также в модуляцию сосудистых реакций плаценты [17]. Повышение их уровня приводит к функциональным изменениям плаценты, повреждению ДНК и белков, перекисному окислению липидов, и, как следствие, происходит снижение содержания кислорода и питательных веществ у плода [18]. В современных обзорных публикациях отмечаются значительные вариации последствий перенесенного стресса в зависимости от его продолжительности, вида и периода, в течение которого он возникает, при этом подчеркивается общая за-

кономерность: более длительное время воздействия кортикостероидов приводит к более выраженным негативным последствиям для ЦНС [19]. Вероятно, более продолжительное (трехчасовое) воздействие в пренатальный период привело к более существенным сдвигам свободнорадикального гомеостаза во всех изучаемых отделах ЦНС и в изменении свободнорадикального баланса в плазме крови, что не было отмечено при одночасовой пренатальной иммобилизации.

Нами так же были обнаружены некоторые особенности изменения свободнорадикального гомеостаза, связанные с 1-часовой и 3-часовой стресс-экспозицией в пренатальном периоде. Вследствие одночасовой ежедневной иммобилизации с 16 по 19 дни беременности у половозрелых потомков стрессированных матерей было отмечено преимущественно увеличение показателей СРО белковых и липидных компонентов, в то время, как для последствий трехчасовой иммобилизации характерно снижение уровня продуктов ПОЛ, рост уровня активности СОД и продуктов СРО белков. Подобная динамика могла быть связана с адаптацией к периодически повторяющемуся стрессу и подчинена закону обратной связи.

Вне зависимости от длительности ежедневной пренатальной иммобилизации на третьем триместре наиболее значительные изменения СР гомеостаза отмечены в гипоталамусе половозрелых потомков. Выбранный период стресса с 16 по 19 дни беременности характеризуется как период интеграции всех звеньев нейроэндокринной системы.

Таблица 2. Свободнорадикальный гомеостаз у пренатально стрессированных (3 ч) половозрелых самцов крыс

Ткань	Группа	Активность СОД, у.е. / мг белка мин	СРО белков, нмоль/мг белка		ПОЛ, у.е., индекс окисления		
			инициация, 270 нм	элонгация, 370 нм	диеновые конъюгаты	кетодиены и сопряженные триены	основания Шиффа
Плазма	Контроль, n = 11	0.058 ± 0.0056	1.32 ± 0.122	0.20 ± 0.020	0.39 ± 0.019	0.27 ± 0.034	0.05 ± 0.008
	Стресс, n = 11	0.051 ± 0.0042	1.07 ± 0.083	0.29 ± 0.035#	0.34 ± 0.014	0.28 ± 0.039	0.08 ± 0.011##
Кора больших полушарий	Контроль, n = 10	1.09 ± 0.053	4.38 ± 0.394	2.89 ± 0.274	0.60 ± 0.015	0.25 ± 0.006	0.018 ± 0.001
	Стресс, n = 8	4.23 ± 0.424##	6.06 ± 2.120	0.76 ± 0.148##	0.58 ± 0.009	0.23 ± 0.003#	0.016 ± 0.001
Гипоталамус	Контроль, n = 11	1.07 ± 0.166	2.27 ± 0.463	1.99 ± 0.313	0.59 ± 0.009	0.25 ± 0.026	0.04 ± 0.011
	Стресс, n = 7	3.47 ± 0.394##	3.12 ± 0.423#	0.47 ± 0.070##	0.56 ± 0.011##	0.22 ± 0.006#	0.016 ± 0.0016#
Спинной мозг	Контроль, n = 9	0.49 ± 0.083	0.83 ± 0.14	0.64 ± 0.04	0.114 ± 0.0067	0.099 ± 0.0157	0.017 ± 0.0021
	Стресс, n = 8	2.47 ± 0.268##	31.44 ± 2.14##	2.69 ± 0.3##	0.063 ± 0.0139##	0.050 ± 0.0083##	0.013 ± 0.0023

Примечания: достоверные различия между контрольными и опытными животными (критерий Манна–Уитни) обозначены для уровней статистической значимости # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; между опытными группами и группой стресса * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (по Гублеру и Генкину, 1973).

Изменение нейроэндокринной регуляции приспособительного поведения после стресса в позднем пренатальном онтогенезе [20]. Известно, что повышение уровня гормонов стресса матери может приводить к различным эффектам в зависимости от стадии развития плода, вызывая значительные изменения в критический период формирования органа, а за пределами критического периода оказывая ограниченное воздействие даже при значительных концентрациях [21]. Таким образом, выявленная особенность может быть связана с периодом воздействия материнского стресса. Подобная выраженная реакция со стороны гипоталамуса отмечается и другими авторами [22], и связывают эти эффекты с мультиструктурностью и полифункциональностью изучаемого отдела и большей включенностью его в формирование и реализацию стресс-реакции.

Свободнорадикальный статус в ткани спинного мозга зависел от продолжительности пренатального воздействия: 3-часовой стресс привел к более существенным сдвигам окислительного гомеостаза ткани (увеличилась активность СОД и уровень продуктов СРО белков, уменьшилось содержание ПП ПОЛ), в то время, как после 1-часового пренатального стресса был отмечен только рост уровня ПП ПОЛ. Таким образом, увеличение длительности пренатального стресса до 3-х часов проявилось не только в изменении уровня окисления липидов, но и белковых компонентов ткани, а также, вероятно, в компенсаторном сдвиге активности СОД. Такая реакция может

быть связана как с особенностями созревания этого уровня ЦНС, процессы нейрогенеза в котором начинаются на более ранних этапах пренатального онтогенеза и заканчивается к 16-ому дню пренатального развития [23], так и с большей устойчивостью ткани, как филогенетически более древней структуры.

Менее выраженная реакция на пренатальный стресс вне зависимости от продолжительности стресса отмечена со стороны коры больших полушарий, такие реакции отмечали и другие авторы, делая акцент на то, что значительный вклад в устойчивость свободнорадикального гомеостаза коры головного мозга вносит нейроглия [14].

Таким образом, пренатальный стресс оказал влияние на свободнорадикальный гомеостаз всех отделов ЦНС, при более значительном влиянии после перенесенной 3-часовой иммобилизации на 3 триместре. Потомки этих матерей, характеризовались более выраженными сдвигами СР баланса. Наблюдаемые сдвиги имели характерные особенности в зависимости от длительности стресса: вследствие одночасовой ежедневной иммобилизации с 16 по 19 дни беременности у половозрелых потомков стрессированных матерей отмечено преимущественно увеличение показателей СРО белковых и липидных компонентов, в то время, как для последствий трехчасовой иммобилизации характерно, напротив, преимущественно снижение изучаемых показателей СРО и повышение активности СОД. Вне зависимости от длительности экспозиции наиболее вы-

раженные сдвиги изучаемых параметров СР гомеостаза были характерны для гипоталамуса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barker D.J.* // J. Am. Coll. 2004. V. 23. P. 588–595.
2. *McCarty R.* // Neurosci. Biobehav. 2017. V. 73. P. 219–254.
3. *Depino A.M.* // Semin. Cell Dev. Biol. 2018. V. 77. P. 104–114.
4. *Silvestro S, Calcaterra V, Pelizzo G, Bramanti P, Mazon E.* // Antioxidants (Basel). 2020. V. 9(5). P. 414.
5. *Fisher J.J., Bartho L.A., Perkins A.V.* // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2020. V. 47. P. 176–184.
6. *Laforgia N., Di Mauro A., Guarnieri G.F., Varvara D., De Cosmo L., Panza R., Capozza M., Baldassarre M.E., Resta N.* // Oxidative Med. Cell. Longev. 2018. P. 1–12.
7. *Perrone S., Santacroce A., Picardi A., Buonocore G.* // World J. Clin. Pediatrics. 2016. V. 5. P. 172.
8. *Sies H., Berndt C., Jones D.P.* // Annual Review of Biochemistry. 2017. V. 86(1). P. 715–748.
9. *Buonocore G., Perrone S., Muraca M.* // Ann. Dell'istituto Super. Di Sanita. 2001. V. 37. P. 527–535.
10. *Baud O., Daire J.L., Dalmaç Y., Fontaine R.H., Krueger R.C., Sebag G., Evrard P., Gressens P., Verney C.* // Brain Pathol. 2004. V. 14. P. 1–10.
11. *Владимирская Т.Э., Швед И.А., Криворот С.Г., Веякина Н.Н., Адамович А.В.* // Вести национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2011. № 4. С. 88–91.
12. *Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И.* // Вопр. мед. химии. 1989. Т. 35. № 3. С. 127–131.
13. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А. и др.* // Вопр. мед. химии. 1999. Т. 45. № 1. С. 47–54.
14. *Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В., Притворова А.В.* // Российский физиологический журн. им. Сеченова. 2008. Т. 94. № 4. С. 406–413.
15. *Сирота Т.В.* // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59. № 4. С. 399–410.
16. *Lu J., Wang Z., Cao J., Chen Y., Dong Y.* // Reprod. Biol. Endocrinol. 2018. V. 16. P. 80.
17. *Herrera E.A., Krause B., Ebensperger G., Reyes R.V., Casanello P., Parra-Cordero M., Llanos A.J.* // Front. Pharmacol. 2014. V. 5. P. 149.
18. *Fisher J.J., Bartho L.A., Perkins A.V.* // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2020. V. 47. P. 176–184.
19. *Miao Z., Wang Y., Sun Z.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21(4). P. 1375.
20. *Шалапина В.Г., Зайченко И.Н., Батуев А.С., Ордян Н.Э.* // Российский физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87. № 9. С. 1193–1201.
21. *Auyeung B., Lombardo M.V., Baron-Cohen S.* // Pflugers Archiv. European J. Physiology. 2013. V. 465. P. 557–571.
22. *Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Флеров М.А., Ордян Н.Э.* // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019. Т. 82. № 10. С. 13–18.
23. *Суханова Ю.А., Себенцова Е.А., Левицкая Н.Г.* // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 4. С. 276–292.

Features of Free Radical Homeostasis of the Central Nervous System of Mature Male Rats Depending on the Duration of Prenatal Stress

O. N. Kuleshova^a, D. L. Teply^a, D. D. Teply^a, and A. S. Semenova^b

^aAstrakhan State University, Astrakhan, Russia

^bVoronezh State University, Voronezh, Russian

Was studied changes in the level of activity of superoxide dismutase, lipid peroxidation products, and oxidative modification of proteins in the homogenates of the cerebral cortex, hypothalamus, cerebellum, and spinal cord of prenatally-stressed mature male mongrel white rats. To do this, their mothers were subjected to daily immobilization stress in plastic pencil cases for one and three hours from days 16 to 19 of pregnancy. Females of the control groups were kept in standard conditions with free access to food and water. Prenatal stress affected the free radical homeostasis of all the studied CNS regions in 90-day-old male rats. More significant effects were observed after 3 hours of immobilization. Descendants of stressed mothers were characterized by more pronounced shifts in free radical balance. As a result of one-hour daily immobilization from 16 to 19 days of pregnancy, sexually mature descendants of stressed mothers showed an increase in the indicators of oxidative modification of protein and lipid components, while the consequences of three-hour prenatal immobilization are characterized, on the contrary, by a decrease in the studied indicators of free radical oxidation products and an increase in SOD activity. Regardless of the duration of exposure, the most pronounced shifts in the studied parameters of CP homeostasis were characteristic of the hypothalamic region.

Keywords: prenatal stress, CNS, oxidative modification of proteins, free radical homeostasis, lipid peroxidation, superoxide dismutase, α -tocopherol-acetate, immobilization, mature male rats