

Особенности гормонального ответа на иммобилизацию у пренатально стрессированных крыс

А.Д. Худавердян¹, М.Ю. Сароян²

*ЕГМУ им. М. Гераци, ¹кафедра акушерства и гинекологии N2,
²кафедра физиологии
0025, Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: крысы, пренатальный стресс, иммобилизация, АКТГ, кортизол

В последние годы большое внимание уделяется изучению механизмов, обуславливающих нарушения деятельности различных систем организма, которые возникают после воздействия неблагоприятных факторов внешней среды в пренатальный период индивидуального развития [5, 7, 11, 13, 14]. Установлено, в частности, что стресс, перенесенный в период гестации, является причиной различных функциональных и патологических нарушений в развитии плода и у потомства [18, 22, 23]. Есть основание полагать, что существенную роль в этих процессах играют нарушения иммунных механизмов защиты [4, 6], а также приспособительной способности стрессперенесших лиц [8, 10, 15, 17, 19, 21]. Последняя же, как известно [1, 24, 25], осуществляется нейрогуморальным путем, где гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковому звену реализации адаптивной реакции придается ключевая роль. В связи с этим исследование у животных и лиц, перенесших пренатальный стресс, механизмов формирования приспособительных реакций в ответ на действие различных раздражителей может быть полезным для выявления степени их устойчивости к повреждающим факторам.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы было сравнительное исследование содержания стрессреализующих гормонов – АКТГ и кортизола – в крови интактных и пренатально стрессированных крыс до и после их иммобилизации.

Материал и методы

Исследования осуществлялись на 30 беспородных шестимесечных крысах, которые были разделены на интактных (контрольная группа – 12 крыс) и перенесших пренатальный стресс (опытная группа – 12 крыс).

Крысы содержались в обычных условиях вивариума с температурой воздуха, поддерживаемой на уровне 20-22⁰С. Пренатально стрессированные крысы являлись потомками беременных крыс, подвергнутых в течение всего периода беременности воздействию хронического психоэмоционального стресса, включающего в себя сочетанное воздействие двух экзогенных факторов – звукового и светового раздражителей. Параметры экспозиции: звук – мощность 70 дБ, частота 4 кГц; свет – частота 13Гц, длительность воздействия 350 сек с интервалами между воздействиями в 15 000 сек (6 экспозиций за сутки в течение всей беременности).

Иммобилизацию крыс осуществляли путем помещения в специальные пластиковые пеналы, максимально ограничивающие их движения, сроком на 5, 24 и 48 часов. Исследование уровней АКТГ и кортизола в крови крыс осуществляли до и после указанных сроков иммобилизации, которые в целом соответствуют фазам тревоги, резистентности и истощения стресс-реакции.

Хотя основным глюкокортикоидом у крыс считается кортикостерон, это не исключает наличия у них малых, но определяемых количеств кортизола. По имеющимся данным [9], соотношение кортикостерона и кортизола в крови крыс составляет 1:0,05. Исходя из этого, для общей оценки функционального состояния основной оси стресс-реакции (АКТГ-глюкокортикоиды) правомерно было исследование и уровня кортизола в крови, как это сделано и другими авторами [16, 20].

Определение уровня кортизола в крови проводили методом иммуноферментного (ИФА), а АКТГ – радиоиммунологического (РИА) анализа с использованием соответствующих тест-наборов фирмы DRG Instruments GmbH (Германия), в соответствии с инструкциями производителя. Материалом для определения кортизола служила сыворотка крови, а АКТГ – плазма, для получения которых кровь забирали методом кардиопункции в пробирки, не покрытые и покрытые ЭДТА, после чего центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 2000 об/мин. Сыворотку и плазму хранили в морозильной камере при температуре -20⁰С, с последующим определением в них исследуемых гормонов.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с применением пакета программ “Statistica 10”. Для определения достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты сравнительных исследований по изучению колебаний уровня стресс-гормонов в крови у пренатально не стрессированных и стрессированных крыс шестимесячного возраста до и после их иммо-

билизации свидетельствуют о существенных различиях этих показателей у крыс опытной группы.

Как показали исследования, у пренатально не стрессированных крыс содержание АКТГ в крови составляет $61,19 \pm 4,35$ пг/мл, а у пренатально стрессированных – $29,09 \pm 2,32$ пг/мл ($p < 0,001$). Направленность изменений уровня кортизола в крови исследуемых групп животных аналогична. У пренатально не стрессированных крыс содержание кортизола в крови составляет $104,26 \pm 8,95$ нг/мл, а у стрессированных – $60,31 \pm 5,72$ нг/мл ($p < 0,001$).

Таким образом, в отличие от контрольных крыс, у которых уровень АКТГ и кортизола к шестому месяцу исследования доходит до уровня гормона, определяемого у половозрелых особей, в стресс-группе к этому возрасту показатели оказались намного ниже, это указывает на то, что процессы становления систем, ответственных за синтез и выброс АКТГ и кортизола у крыс, перенесших пренатальный стресс, существенно подавлены.

Ряд авторов [2, 3, 12] рассматривают иммобилизацию как стресс, вызывающий каскад характерных адаптивных реакций различных органов и систем, что является причиной его широкого использования в качестве модели стресса.

При иммобилизации контрольных крыс обнаружено достоверное повышение в крови содержания АКТГ и кортизола, что соответствует существующим представлениям об аналогичной направленности изменений уровня этих гормонов при действии на организм различных стрессоров.

Как видно из таблицы, содержание АКТГ и кортизола в крови контрольных крыс составляет соответственно $61,19 \pm 4,35$ пг/мл и $104,26 \pm 8,95$ нг/мл. Через 5, 24 и 48 часов после их иммобилизации уровень АКТГ повышается и доходит соответственно до $87,19 \pm 7,06$ пг/мл (142%), $104,94 \pm 12,48$ пг/мл (172%) и $83,11 \pm 4,35$ пг/мл (136%). Для кортизола они составляют: $140,15 \pm 20,51$ нг/мл (134%), $179,26 \pm 21,14$ нг/мл (172%) и $343,96 \pm 47,29$ нг/мл (329%).

Так же, как у контрольных животных, ответная реакция на иммобилизацию у пренатально стрессированных крыс характеризуется возрастанием уровней АКТГ и кортизола в динамике действия стресса, однако степень выраженности гормонального ответа, выраженная в процентах, у пренатально стрессированных крыс различна. Так, по сравнению с уровнем АКТГ, зарегистрированным у пренатально стрессированных крыс до иммобилизации ($29,09 \pm 2,32$ пг/мл), через 5 и 24 часа после ограничения движений, содержание гормона в крови возрастает и составляет $42,78 \pm 4,37$ пг/мл ($p < 0,01$) и $34,42 \pm 4,25$ пг/мл ($p > 0,05$), а через 48 часов понижается до $13,56 \pm 1,71$ пг/мл ($p < 0,001$). Степень выраженности этих изменений в процентах составляет через 5 и 24 часа – 144% и 117%, а

через 48 часов уменьшается на 46%, что, по сравнению с процентными показателями, зарегистрированными у контрольных крыс, менее выражено, причем через 48 часов уровень АКТГ понижается более, чем в 2 раза ($13,56 \pm 1,71$ пг/мл против $29,09 \pm 2,32$ пг/мл в контроле). Эти данные указывают на понижение реактивности АКТГ-продуцирующих центров аденогипофиза и связанных с ним центральных структур у пренатально стрессированных крыс.

Таблица

Показатели уровня АКТГ и кортизола в крови контрольных и пренатально стрессированных крыс до и после 5, 24 и 48 ч их иммобилизации

Гормоны	Группы животных	Сроки иммобилизации			
		до	5 часов	24 часа	48 часов
АКТГ, пг/мл	контроль	$61,19 \pm 4,35$	$87,19 \pm 7,06$ $p < 0,01$	$104,94 \pm 12,48$ $p < 0,01$	$83,11 \pm 4,35$ $p < 0,01$
	опыт	$29,09 \pm 2,32$	$42,78 \pm 4,37$ $p_1 < 0,01$	$34,42 \pm 4,25$ $p_1 > 0,05$	$13,56 \pm 1,71$ $p_1 < 0,001$
		$p_2 < 0,001$	$p_2 < 0,001$	$p_2 < 0,001$	$p_2 < 0,001$
Кортизол, нг/мл	контроль	$104,26 \pm 8,95$	$140,15 \pm 20,51$ $p > 0,05$	$179,26 \pm 21,14$ $p < 0,01$	$343,96 \pm 47,29$ $p < 0,001$
	опыт	$60,31 \pm 5,72$	$121,08 \pm 19,62$ $p_1 < 0,01$	$136,11 \pm 10,65$ $p_1 < 0,001$	$145,87 \pm 17,55$ $p_1 < 0,001$
		$p_2 < 0,001$	$p_2 > 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,01$

Примечание. p и p_1 – показатели достоверности для каждой группы, рассчитанные по горизонтали, то есть путем сравнения данных до и в различные сроки после иммобилизации; p_2 – показатели достоверности, рассчитанные по вертикали, то есть путем сравнения данных контрольной и опытной групп (в контроле и опыте $n=12$)

Сравнительный анализ показателей уровня кортизола у исследуемых групп крыс до и в различные сроки после их иммобилизации также характеризуется их возрастанием, причем по сравнению с АКТГ степень выраженности кортизолного ответа на иммобилизацию у пренатально стрессированных крыс в различные сроки исследования более высока, что указывает на активацию у них механизмов кортизолзависимой реактивности. Так, по сравнению с данными, полученными у контрольных крыс, содержание кортизола и степень выраженности колебаний его уровня в крови пренатально стрессированных крыс существенно возрастают. До иммобилизации они составляют $60,31 \pm 5,72$ нг/мл, а через 5, 24 и 48 часов после нее – $121,08 \pm 19,62$ нг/мл (200%), $136,11 \pm 10,65$ нг/мл (202,7%) и $145,87 \pm 17,55$ нг/мл (204,2%) соответственно. Следует однако подчеркнуть, что если у контрольных крыс через 48 часов иммобилизации степень

выраженности кортизольного ответа значительно возрастает и составляет 329%, то у крыс, перенесших пренатальный стресс, это увеличение менее выражено и составляет 204,2%. Это свидетельствует о том, что хотя у пренатально стрессированных крыс степень выраженности кортизольного ответа, а соответственно и стресс-реактивность в ранние сроки иммобилизации, по сравнению с контролем, более высокая, в поздние сроки действия стрессора она существенно ослабевает, это указывает на то, что животные, перенесшие пренатальный стресс, менее приспособлены к длительно действующим воздействиям окружающей среды.

Сравнение показателей уровня АКТГ и кортизола у пренатально стрессированных крыс указывает на отсутствие четкой корреляции между ними. Это, в свою очередь, свидетельствует о том, что механизмы включения АКТГ и кортизола в формирование стресс-реактивности у пренатально стрессированных животных не находятся в прямой, взаимообусловленной связи и осуществляются в определенной степени независимо друг от друга.

Интересным представляется сравнительный анализ усредненных показателей содержания АКТГ и кортизола у подвергнутых иммобилизации контрольных и пренатально стрессированных крыс. При ознакомлении с таблицей нетрудно заметить, что по сравнению с контролем, у пренатально стрессированных крыс наблюдается понижение содержания АКТГ и кортизола как до, так и во все сроки после иммобилизации. Причем, обращает на себя особое внимание то, что исходные, до иммобилизационные, уровни АКТГ и кортизола у пренатально стрессированных крыс почти в 2 раза ниже таковых, определяемых у контрольных, пренатально не стрессированных крыс. Исходя из этих данных, можно заключить, что стресс, перенесенный крысами (животными и людьми) в период внутриутробного развития, приводит к подавлению функциональных возможностей ГНС, механизмов синтеза и выброса АКТГ и кортизола, а также стресс-реактивности в позднем постнатальном периоде их онтогенетического развития. Это, в свою очередь, может иметь существенное значение в реализации эффектов этих гормонов на уровне различных органов и систем с соответствующими функциональными нарушениями. При этом принципиально важным представляются процессы, предопределяющие отмеченные изменения в уровне АКТГ и кортизола в организме пренатально стрессированных крыс. Можно лишь предположить, что они формируются во внутриутробном периоде их развития и для их выяснения необходимы исследования особенностей эмбрионального развития ГНС, а также других органов и тканей у плодов, переносящих стресс.

Сравнивая показатели уровня стресс-гормонов в крови контрольной и опытной групп крыс в динамике их постнатального развития, а также до и после действия на них иммобилизационного стресса, можно прийти к заключению о подавлении у последних механизмов синтеза и выброса

стресс-гормонов, стресс-реактивности, а также приспособительной способности. Такие изменения могут быть причиной возникновения различных заболеваний у животных и лиц, перенесших внутриутробный стресс, и для их предотвращения необходимы разработка и проведение соответствующих профилактических мероприятий как у беременных, переносящих стресс, так и у их потомства в раннем и позднем периодах их постнатального развития.

Поступила 11.03.16

**Պրենատալ սթրեսի ենթարկված առնետների մոտ
խոռոչիլիզացիայի նկատմամբ հորմոնալ պատասխանի
առանձնահատկությունները**

Ա.Դ. Խուդավերդյան, Մ.Յու. Սարոյան

Ուսումնասիրվել է ստուգիչ և պրենատալ սթրեսի ենթարկված առնետների արյան մեջ ԱԿՏՀ-ի և կորտիզոլի պարունակությունը ծնվելուց 6 ամիս հետո իմոբիլիզացիայի ազդեցությունից 5, 24 և 48 ժամ անց: Պրենատալ սթրեսի ենթարկված առնետները՝ հղիության ողջ ընթացքում քրոնիկական սթրեսի ենթարկված կենդանիների սերունդներն են (ազդեցության պարամետրերը. Ձայն-հզորությունը 70 դԲ, հաճախությունը 4 կՀց, լույս-հաճախությունը 13 Հց, տևողությունը 350վ, ազդեցությունների միջև ինտերվալները՝ 15000վ, օրական 6 ազդեցություն ամբողջ հղիության ընթացքում):

Արյան մեջ ԱԿՏՀ-ի և կորտիզոլի մակարդակների որոշումը իրականացվել է համապատասխանաբար ռադիոիմունային և իմունաֆերմենտային վերլուծության միջոցով: Իմոբիլիզացիան իրականացվել է կենդանիների շարժումները սահմանափակող հատուկ պլաստիկ խցիկների կիրառմամբ:

Ստացված արդյունքների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ բնականոն առնետների համեմատ պրենատալ սթրեսի ենթարկված առնետների արյան մեջ ԱԿՏՀ-ի և կորտիզոլի պարունակությունը երկու և ավել անգամ ցածր է: Այս առնետների մոտ իմոբիլիզացիայի նկատմամբ պատասխան ռեակցիան խանգարված է. ըստ ԱԿՏՀ-ի ցածր է, իսկ ըստ կորտիզոլի՝ իմոբիլիզացիայի նախնական փուլերում բարձր է, իսկ վերջում՝ զգալիորեն թուլացած:

Ելնելով ստացված արդյունքներից, կարելի է եզրակացնել պրենատալ սթրեսի ենթարկված առնետների օրգանիզմում սթրես-հորմոնների սինթեզի և ներգատման մեխանիզմների, սթրես-ռեակտի-

վորթյան և հարմարողական հնարավորությունների ճնշման, ինչպես նաև պրենատալ սթրեսի ենթարկված հղիների և նրանց սերնդի համար համապատասխան կանխարգելիչ միջոցառումների մշակման և կիրառման անհրաժեշտության մասին:

Peculiarities of hormonal response to immobilization in prenatally stressed rats

A.D. Khudaverdyn, M.Yu. Saroyan

The levels of ACTH and cortisol were determined in the blood of normal rats and those that had undergone chronic stress during gestation. ELISA and RIA studies of hormones were performed in six-months-old animals in 5, 24 and 48 hours after their immobilization.

The analysis of the data showed that the ACTH and cortisol levels were two or more times lower in rats that had undergone prenatal stress compared to normal rats. The response to immobilization of those rats was also disturbed: the levels of ACTH reduced and of cortisol increased in the initial stages, and in the end of immobilization significantly decreased.

It is concluded that mechanisms of synthesis and release of stress hormones, as well as stress reactivity and adaptive capacity of rats undergoing prenatal stress are suppressed, so it is necessary to develop and implement appropriate preventive procedures for pregnant women undergoing stress, and their progeny in the early and late periods of postnatal development.

Литература

1. *Бурлака Е.В.* Стресс и его роль в формировании дисгормональных нарушений репродуктивного здоровья. *Здоровье Украины*, 2007, т. 10 (1), с.2-25.
2. *Елисеева Е.В., Васильева Н.Н., Исакова Л.С., Овечкин А.Ю.* Изменение обмена коллагена при сочетании иммобилизационного стресса с электрической стимуляцией стресслимитирующих структур. *Вестник новых медицинских технологий*, 2002, т.1, с.27-29.
3. *Камскова Ю.Г., Латюшин Я.В., Мамылина Н.В., Щетинкина Л.П.* Взаимодействие провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в процессе адаптации организма к 30-суточной гипокинезии. *Вестник Уральской медицинской академической науки*, 2008, т.1, с.53-54.
4. *Ордян Н.Э.* Нейроэндокринные механизмы действия материнского стресса на адаптивные функции и поведение потомков. *Основы нейроэндокринологии*. СПб., 2005, с.307-336.
5. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.* Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты. СПб., 2007.
6. *Парцернак С.А.* Стресс. Вегетозы. Психосоматика. СПб., 2002.

7. Резников А.Г. Половые особенности нейроэндокринных эффектов пренатального воздействия экзогенных глюкокортикоидов. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 2006, т.92 (2), с.238-248.
8. Abe T. Premorbid personality of patients with depressive disorders. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, 2007; 109 (9): 846-853.
9. Bush I. E. Species differences in adrenocortical secretion. *Journal of Endocrinology*, 1953; 9: 95-100.
10. Glover V. Annual research review: prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 2011; 52(4): 356-67.
11. Hodyl N.A., Krivanek K.M., Lawrence E., Clifton V.L., Hodgson D.M. Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring. *J. Neuroimmunol.*, 2007; 190(1-2): 61-71.
12. Kido S., Kuriwaka-Kido R., Imamura T., Ito Y., Inoue D., Matsumoto T. Mechanical stress induces Interleukin-11 expression to stimulate osteoblast differentiation. *Bone*, 2009; 45 (6): 1125-32.
13. Knackstedt M.K., Hamelmann E., Arck P.C. Mothers in stress: consequences for the offspring. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2005; 54 (2): 63-9.
14. Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2002; 26 (4): 457-70.
15. Mairesse J., Viltart O., Salome N., Giuliani A., Catalani A., Casolini P. Prenatal stress alters the negative correlation between neuronal activation in limbic regions and behavioral responses in rats exposed to high and low anxiogenic environments. *Psychoneuroendocrinology*, 2007; 32 (7): 765-76.
16. Maryam Radahmadi, Farrokh Shadan, Seied Morteza Karimian, Seied Shahab-e-din Sadr, Ali Nasimi Effects of stress on exacerbation of diabetes mellitus, serum glucose and cortisol levels and body weight in rats. *Pathophysiology*, 2006; 13 (1) 51-5.
17. Mastorci F., Vicentini M., Viltart O., Manghi M., Graiani G., Quaini F. Long-term effects of prenatal stress: changes in adult cardiovascular regulation and sensitivity to stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2009; 33 (2): 191-03.
18. McTernan C.L., Draper N., Nicholson H., Chalder S.M., Driver P., Hewison M. Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86 (10): 4979-83.
19. Mikhailenko V.A., Butkevich I.P., Bagaeva T.R., Makukhina G.V., Otellin V.A. Early and delayed effects of hypoxia during the infantile period on behavioral and hormonal reactions of rats. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2010; 149 (4): 405-8.
20. Mohammed Khaleel Jameel, Anuradha Rajiv Joshi, Jayashree Dawane et al. Effect of Various Physical Stress Models on Serum Cortisol Level in Wistar Rats. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2014; 8 (3): 181-3.
21. Ordyan N.E., Pivina S.G. Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brains of prenatally stressed male rats. *Neuroscience and behav. Physiology*, 2003; 33 (9): 899-903.
22. Riecher-Rossler A., Steiner M. Perinatal stress, mood, and anxiety disorders. From bench to bedside. *Bibl. Psychiatr.*, Basel, Karger, 2005; 173: 1-8.
23. Seckl J.R. Glucocorticoids, developmental "programming" and the risk of affective dysfunction. *Prog. Brain Res.*, 2008; 167: 17-37.
24. Takahashi L.K., Turner J.G., Kalin N.H. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. *Brain Res.*, 1992; 574: 131-7.
25. Weinstock M., Poltyrev T., Schorer-Apelbaum D., Men D., McCarty R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol. Behav.*, 1998; 64: 439-44.