
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 57.032/048:612.81+612.82

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА УРОВЕНЬ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА В ЦНС

© 2024 г. О. Н. Кулешова^{1, *}, Д. Д. Теплый¹, Е. Д. Бажанова^{2, 3}

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научно-клинический центр токсикологии имени
академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства”, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова Российской академии наук”, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: pozdniakova_olga@list.ru

Поступила в редакцию 13.05.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 01.09.2023 г.

Оксид азота выполняет ряд существенных функций в ЦНС. Этот нейротрансмиттер регулирует апоптотические процессы, дифференцировку и пролиферацию нейронов, синаптическую активность, пластичность. Стресс во время внутриутробного периода может являться фактором, влияющим на уровень NO в разных отделах ЦНС. Цель работы – изучение уровня метаболитов NO в филогенетически разных отделах ЦНС у пренатально стрессированных половозрелых самцов и самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла. Для этого беременные самки крыс (12 шт.) подвергались стрессу с 16-го по 19-й дни беременности по 3 ч в утренние часы. Уровень NO оценивали у взрослых (4-месячных) потомков обоего пола. У самцов отмечены снижение уровня метаболитов NO в мозжечке и гипоталамусе и увеличение в спинном мозге. Уровень метаболитов NO в пределах изученных отделов ЦНС самок в контроле был выше, после перенесенного пренатального стресса изменился в меньшей степени, по сравнению с самцами: значительные изменения отмечены в спинном мозге независимо от стадии эстрального цикла и в мозжечке на стадии эструса. Таким образом, вне зависимости от пола наиболее устойчивой по отношению к пренатальному стрессу оказалась филогенетически более молодая структура – кора больших полушарий, наиболее выраженные изменения были отмечены в филогенетически древнем отделе ЦНС – спинном мозге. Учитывая значение NO в ЦНС как ключевой сигнальной молекулы, любые изменения его уровня под влиянием пренатального стресса могут как нести существенное адаптивное значение, так и иметь негативные последствия для функционального состояния ткани.

Ключевые слова: пренатальный стресс, оксид азота, крысы самки, крысы самцы, эстральный цикл, онтогенез

DOI: 10.31857/S1027813324020097, **EDN:** ESZOLB

NO – одна из важнейших сигнальных молекул, регулирующих физиологические функции организма и метаболизм клеток нервной системы. Установлено участие NO в модуляции процессов обучения и долговременной синаптической потенции в гиппокампе и длительной синаптической депрессии в мозжечке [1], страха и активности серотониновой системы в префронтальной коре [2]. NO участвует в регуляции большого количества сигнальных путей, обеспечивающих как компенсаторно-приспособительную реакцию клеток на экстремальные воздействия, так и запрограммированную гибель клеток [3, 4]. NO и его метаболиты

обладают прооксидантными свойствами, могут вызывать перекисное окисление фосфолипидов и окисление тиольных групп белков митохондриальной мембраны, приводя к высвобождению в цитозоль апоптогенных факторов [5]. Многочисленные исследования показали, что избыток NO может приводить к нитрозативному стрессу в нервной системе, способствуя возникновению неврологической патологии [6]. Уровень NO связывают с различными изменениями в поведении [7] и уровнем тревожности [8]. Есть данные, подтверждающие связь между тревожностью и пренатальным уровнем NO [9].

К настоящему времени накоплен убедительный объем данных, доказывающих, что стресс во время внутриутробного периода является фактором, оказывающим модифицирующее влияние на поведение [10], обучение и память [11], окислительный и нитрозативный стресс играют роль в развитии различных нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний [6]. Эффекты пренатального стресса имеют половые особенности, при этом потомство мужского пола подвергается более высокому риску, чем женского [12]. Особенности гормональной регуляции самок и характерные для их эстрального цикла изменения также оказывают значительное влияние на выраженность последствий перенесенного пренатального стресса [13]. Система синтеза NO на организменном уровне также подвергается перестройке после пренатального стресса [14]. Авторы исследования установили, что в изменении системы NO в плазме крови пренатально стрессированных животных имеются половые особенности, которые характеризуются снижением содержания eNOS и повышением содержания ингибитора NO-синтазной реакции — АДМА в сыворотке крови самцов, но не самок, при увеличении концентрации iNOS в сыворотке крови крыс обоих полов, перенесших пренатальный стресс.

Целью работы стало изучение влияния пренатального стресса на уровень NO-метаболитов в филогенетически разных отделах ЦНС (сенсомоторная кора больших полушарий, гипоталамус, кора мозжечка и моторные области спинного мозга) у половозрелых самцов и самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте участвовали 12 самок нелинейных белых крыс в возрасте 4–6 месяцев со средней массой 242 ± 11.8 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, в условиях 12-часовой освещенности в плексигласовых клетках по 6 особей. Все манипуляции с животными проводились в утренние часы. Исследование проводилось с разрешения этического комитета ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет им В. Н. Татищева» (проректор по науке — д.ф.н., профессор Л. В. Баева). Эксперименты осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (2010/63/EU) и ФЗ РФ от 21 ноября 2011 г.

У самок стандартным методом [15] определяли стадию эстрального цикла, при обнаружении эструса к самке подсаживали самца. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в мазке крысы. В качестве модели стресса была выбрана иммобилизация в пластиковых

пеналах, ограничивающих подвижность животных в период с 16 по 19 дни беременности по 3 ч в утренние часы. Самок контрольной группы негативным воздействиям не подвергали.

Определение уровня NO-метаболитов производили у взрослых (4-месячных) потомков обоего пола — у 40 самок и 20 самцов. Половозрелых самок тестировали с учетом стадий эстрального цикла. Для этого у них брали влагалищные мазки и формировали группы самок, находящихся на стадиях эструса и диэструса. После формирования групп животных наркотизировали этиминалом натрия из расчета 4 мг на 100 г веса и декапитировали. Головной и спинной мозг выделяли на холоде, готовили 10%-ные гомогенаты на 0,1М-фосфатном буфере с добавлением ЭДТА. Уровень метаболитов NO оценивали в гомогенатах ткани коры больших полушарий (сенсомоторная область), гипоталамуса, коры мозжечка и поясничного отдела спинного мозга, перед постановкой реакции гомогенаты центрифугировали 5 мин при 1.5 тыс. об/мин, проводили депротеинизацию материала с применением этанола с последующим повторным центрифугированием при 3 тыс. об/мин. В процессе метаболизма NO образуются его продукты, нитрат- и нитрит-анионы, содержание которых характеризует образование NO в ходе NO-синтазной реакции из аминокислоты L-аргинина. Уровень суммарной концентрации нитрат- и нитрит-анионов определяли путем восстановления нитратов до нитритов хлоридом ванадия (III) и окрашиванием раствора реактивом Грисса в течение 30 мин при температуре 37°C с последующим фотометрическим определением нитритов при длине волны 520 нм [16]. Работу проводили не позднее 2-х недель с момента выделения ткани и приготовления гомогенатов, изучаемый материал хранили при температуре –20°C с добавлением ЭДТА.

Обработку полученных результатов осуществляли в программах Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0. Так как объемы полученных выборок не были достаточны для проведения анализа на соответствие распределения законам нормального, полученные результаты обрабатывали с применением однофакторного (для самцов) и двухфакторного (для самок) дисперсионного анализа ANOVA, при опровержении нулевой гипотезы о равенстве средних использовали попарное сравнение с применением критерия Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, $p < 0.01$ по таблицам Гублера и Генкина [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольной группе половозрелых самцов уровень метаболитов NO значительно менялся в зависимости от уровня ЦНС (рис. 1, 2): максимальный уровень был отмечен в гипоталамусе,

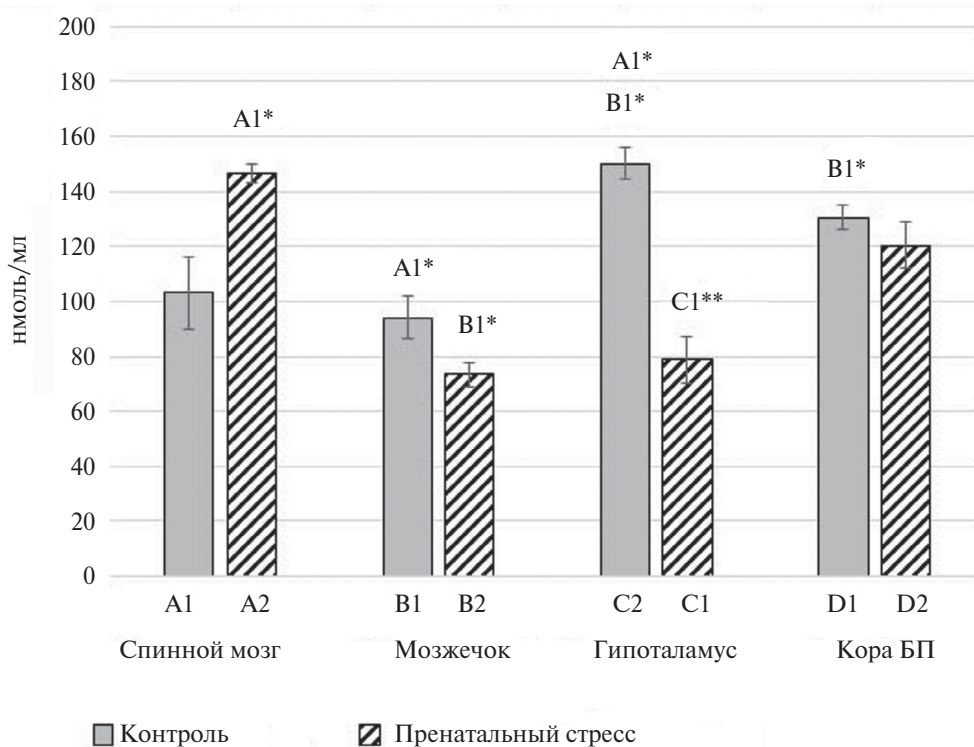


Рис. 1. Уровень NO-метаболитов в отделах мозга пренатально стрессированных самцов крыс, нмоль/мл.

Примечание: статистически значимые различия между сравниваемыми группами $p < 0.05$ — *, $p < 0.01$ — **, U-критерий Манна — Уитни.

затем следовала кора больших полушарий, спинной мозг и мозжечок, сила влияния фактора составила 40%, $p < 0.001$. Пренатальный стресс оказал влияние на исследуемый параметр, но эти изменения имели разнонаправленный характер в зависимости от уровня ЦНС. В спинном мозге после перенесенного пренатального стресса отмечено увеличение метаболитов NO ($p < 0.05$), а в мозжечке и гипоталамусе — снижение ($p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно), на уровень метаболитов NO в коре больших полушарий пренатальный стресс влияния не оказал.

У самок по сравнению с самцами во всех рассмотренных отделах ЦНС отмечен более высокий уровень метаболитов NO ($p < 0.01$) вне зависимости от стадии эстрального цикла. Максимальный уровень метаболитов NO у самок был отмечен в гипоталамусе, а минимальный — в спинном мозге, сила влияния фактора — 90%, $p < 0.001$. Уровень метаболитов NO у самок был ниже на стадии диэструса в спинном мозге ($p < 0.05$), сила влияния фактора — 70%, $p < 0.001$, и в мозжечке ($p < 0.05$). На уровне метаболитов NO в гипоталамусе и коры больших полушарий различий обнаружено не было.

Пренатальный стресс повлиял на уровень метаболитов NO в спинном мозге ((вне зависимости от стадии эстрального цикла уровень метаболитов

увеличился, $p < 0.01$), сила влияния фактора — 5%, $p < 0.01$) и в мозжечке ((отмечено уменьшение показателя только на стадии эструса, $p < 0.05$), сила влияния фактора — 15%, $p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Оксид азота (NO) вырабатывается в головном мозге из L-аргинина тремя изоформами синтазы NO (NOS). Нейрональная NOS конститутивно экспрессируется в цитозоле нейронов и глиальных клетках, индуцибельная NOS обнаруживается в цитозоле глиальных клеток, эндотелиальная NOS конститутивно экспрессируется в эндотелиальных клетках в связанном с мембраной состоянии. В норме нейрональная форма присутствует в основном в нейронах мозжечка, гипоталамуса, коре мозга, стриатуме и гиппокампе, при этом наиболее высокая активность фермента обнаружена в нейронах мозжечка. Индуцибельная NO-синтаза преимущественно обнаруживается в астроцитах и микроглие, присутствует в нейронах коры и мозжечка. Активность эндотелиальной формы выявлена в нейрональных популяциях и астроцитах.

Существуют несколько путей, посредством которых пренатальный стресс может изменять уровень NO в тканях ЦНС. Известно, что

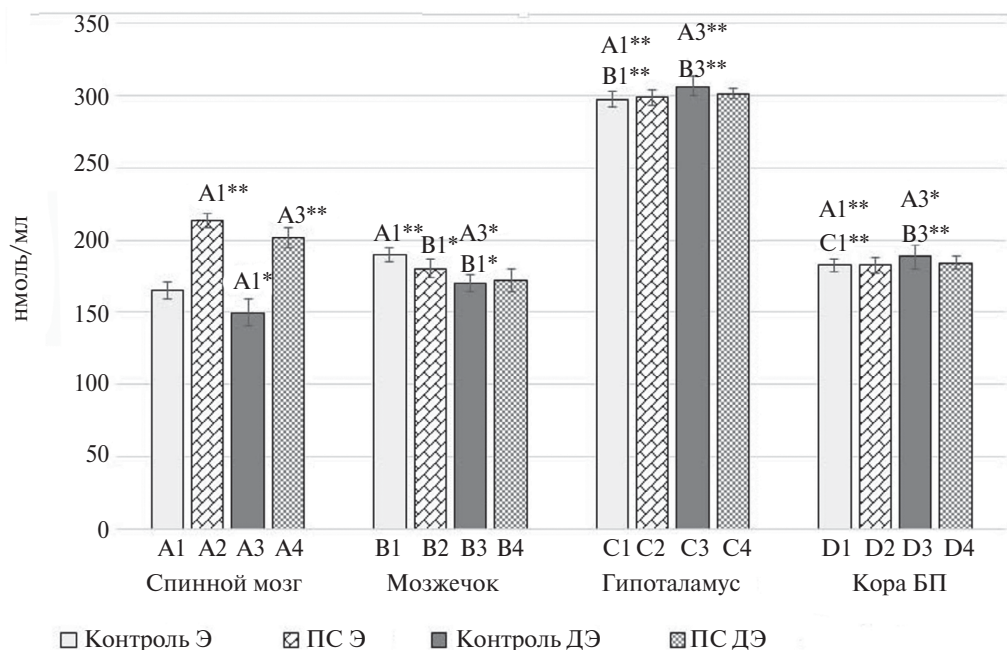


Рис. 2. Уровень NO-метаболитов в отделах мозга пренатально стрессированных самок крыс, нмоль/мл.

Примечание: статистически значимые различия между сравниваемыми группами $p < 0.05$ — *, $p < 0.01$ — **, U-критерий Манна – Уитни; ПС – пренатальный стресс; Э – эструс; ДЭ – диэструс.

пренатальный стресс оказывает существенное влияние на функциональное состояние организма через эпигенетические механизмы — изменение степени метилирования ДНК, модификации гистонов и действие малых “некодирующих РНК”. Интенсивность продукции NO зависит от экспрессии генов NO-синтазы и активности этих ферментов, которая в свою очередь регулируется эпигенетическими механизмами [18]. На уровень свободнорадикального гомеостаза может оказывать влияние пренатальный материнский кортикостерон. При высоких уровнях гормона его избыток во время беременности может проникать через плацентарный барьер к плоду и подвергать плод воздействию, это может привести к задержке внутриутробного роста и повреждению головного мозга у потомства [19, 20]. Модулирующее влияние на функциональное состояние ЦНС может оказывать и изменение концентрации NO во время пренатального стресса. На ранних стадиях нейрогенеза NO участвует в развитии нейронов и способствует пролиферации клеток [21]. Есть данные, подтверждающие, что во время пренатального стресса в мозге плодов стрессированных самцов уровень NO уменьшается по сравнению с контрольными животными [22].

В нашем эксперименте в разных отделах ЦНС взрослых животных уровень метаболитов NO значительно изменился после перенесенного пренатального стресса как у самцов, так и у самок (табл. 1). В целом, более существенные изменения после перенесенного пренатального

стресса были характерны для самцов и проявлялись в основном в мозжечке, спинном мозге и гипоталамусе. У самок уровень метаболитов азота изменился только в спинном мозге и мозжечке на стадии диэструса. Были отмечены и общие черты эффектов пренатального стресса на уровень метаболитов NO в рассмотренных отделах ЦНС самцов и самок: вне зависимости от пола наблюдалось существенное увеличение уровня метаболитов NO в ткани спинного мозга и снижение метаболитов NO в мозжечке (у самок проявившееся только на стадии эструса). В коре больших полушарий как у самцов, так и у самок изменений исследуемого параметра обнаружено не было.

Таким образом, более устойчивыми к влиянию пренатального стресса оказались филогенетически более молодые структуры (кора больших полушарий), а менее устойчивыми — филогенетически старые (спинной мозг). Такая специфика, вероятно, связана с большими адаптационными возможностями более молодой структуры. Устойчивость разных отделов ЦНС к стрессу и базовый уровень свободнорадикальных процессов и антиоксидантной защиты во многом отличаются и зависят от интенсивности систем генерации активных форм кислорода и наличия субстрата окисления [23], а также от процентного соотношения нейронов и нейроглии [24]. Детальный анализ полученных данных показал, что у самцов, перенесших стресс с 16-го по 19-й день пренатального развития, отмечено снижение продуктов окисления NO в ткани мозжечка

Таблица 1. Изменения уровня метаболитов NO на разных уровнях ЦНС пренатально стрессированных самцов и самок крыс

Параметр	Группа		
	ПС самцы, <i>n</i> = 10	ПС самки Э, <i>n</i> = 10	ПС самки ДЭ, <i>n</i> = 10
Спинной мозг	↑	↑↑	↑↑
Мозжечок	↓	↓	=
Гипоталамус	↓↓	=	=
Кора больших полушарий	=	=	=

Примечание: направления изменений в уровня метаболитов NO в разных отделах ЦНС пренатально стрессированных животных и их статистическая значимость: ↑ – *p* < 0.05, ↑↑ – *p* < 0.01, ↓ – *p* < 0.05, ↓↓ – *p* < 0.01 (критерий Манна – Уитни), = – отсутствие статистически значимых изменений между контрольной и опытной группами; ПС – пренатальный стресс; Э – эструс; ДЭ – диэструс.

и гипоталамуса (*p* ≤ 0.05 и *p* ≤ 0.01 соответственно) и увеличение в спинном мозге (*p* ≤ 0.05). Известно, что уровень нейронов, экспрессирующих нейрональную NOS, в гипоталамусе выше, чем в других отделах мозга [25]. Возможно, такие различия связаны с полифункциональностью гипоталамических ядер и структур мозжечка, вовлеченностью гипоталамуса в развертывание адаптационных процессов и стресс-реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали существенные изменения в уровне метаболитов NO у пренатально стрессированных животных, эти изменения имели половые особенности. У самцов отмечено снижение продуктов NO в мозжечке и гипоталамусе и увеличение в спинном мозге, связанные, вероятно, с морфофункциональными особенностями этих отделов. Уровень метаболитов NO в пределах изученных отделов ЦНС самок в контроле был выше, после перенесенного пренатального стресса изменился мало, значительные изменения были отмечены только в спинном мозге независимо от стадии эстрального цикла и в мозжечке на стадии эструса. Вне зависимости от пола наиболее устойчивым по отношению к пренатальному стрессу оказался уровень метаболитов NO в филогенетически более молодом отделе ЦНС – коре больших полушарий, где рассматриваемый параметр оставался без изменений. На филогенетически более древнем уровне – в ткани спинного мозга – у пренатально стрессированных животных независимо от пола и стадии эстрального цикла было отмечено существенное увеличение метаболитов NO. Учитывая значение NO как ключевой сигнальной молекулы в ЦНС, любые изменения его уровня под влиянием пренатального стресса могут нести как существенное адаптивное значение, так и иметь негативные последствия для функционального состояния ткани.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Исследование проводилось с разрешения этического комитета ФГБОУ ВО “Астраханский государственный университет им В.Н. Татищева”. Эксперименты осуществляли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (2010/63/EU) и ФЗ РФ от 21 ноября 2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silberman D.M., Acosta G.B., Zorrilla Zubilete M.A. // Pharmacol Res. 2016. № 109. P. 64–73.
2. Саульская Н.Б., Бурмакина М.А., Трофимова Н.А. // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 3. С. 249–256.
3. Левченкова О.С., Новиков В.Е. // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2014. № 2. С. 134–144.
4. Пожилова Е.В., Новиков В.Е., Левченкова О.С. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014. Т. 12. № 3. С. 13–19.
5. Tomomi G. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2006. № 26. P. 1439.
6. Tripathi M.K., Kartawy M., Amal H. // Redox Biol. 2020. V. 34.
7. Fu Y., Liu H., He L., Ma S. // Behavioural Brain Research. 2022. V. 433.
8. Gulati K., Rai N., Ray A. // Vitam Horm. 2017. V. 103. P. 169–192.

9. Башкатова В.Г., Богданова Н.Г., Алексеева Е.В., Назарова Г.А., Судаков С.К. // Научно-медицинский вестник центрального Черноземья. 2018. № 71. С. 93–96.
10. Block C.L., Eroglu O., Mague S.D., Smith C.J. // Cell reports. 2022. V. 40. № 5.
11. Mohammadi M., Rohani A.H., Yaghmaei P., Sahraei H. // Basic Clin Neurosci. 2022. V. 13(3). P. 275–283.
12. Maxwell S.D., Fineberg A.M., Drabick D.A., Murphy S.K., Ellman L.M. // Journal of Abnormal Child Psychology. 2018. V. 46. P. 381–397.
13. Moura C.A., Oliveira M.C., Costa L.F. // Acta Neuropsychiatrica. 2020. V. 32. № 3. P. 122–127.
14. Павлюкевич А.Н., Беляева Л.Е. // Вестник ВГМУ. 2020. Т. 19. № 2. С. 35–43.
15. Владимирская Т.Э., Швед И.А., Криворот С.Г., Веялкина Н.Н., Адамович А.В. // Вестник национальной академии наук Белоруссии. Серия Биологических наук. 2011. № 4. С. 88–91.
16. Мажитова М.В. // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 3. С. 2.
17. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, 1973. с. 144.
18. Lee D.Y., Chiu, J.J. // J. Biomed. Sci. 2019. V. 26. № 1. P. 56.
19. Zhu P., Wang W., Zuo R., Sun K. // Cell Mol. Life Sci. 2019. V. 76. P. 13–26.
20. Chen Y., He Z., Chen G., Liu M., Wang H. // Toxicology. 2019. V. 428.
21. Collado-Alsina A., Ramirez-Franco J., Sanchez-Prieto J., Torres M. // J. Neurosci. 2014. V. 34. P. 8788–8799.
22. Mahmoudi R., Enant E., Delaviz H., Rad P., Roozbehi A., Barmak M.J., Azizi A. // Basic Clin Neurosci. 2016. V. 7(1). P. 5–11.
23. Галкина О.В. // Нейрохимия. 2013. Т. 30. № 2. С. 93–102.
24. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Ордян Н.Э. // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 2. С. 148–152.
25. Reis M.E.M.D., de Araújo L.T.F., de Andrade W.M.G., Resende N. da S., de Lima R.R.M., do Nascimento Jr. E.S., de O. Costa M.S.M., Cavalcante J.C. // Brain Res. 2018. V. 1685. № 15. P. 60–78.

The Effect of Prenatal Stress on the Level of NO-Metabolites in the Central Nervous System

O. N. Kuleshova¹, D. D. Teply¹, and E. D. Bazhanova^{2,3}

¹Astrakhan State University, Astrakhan, Russia

²The Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

³Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Nitric oxide performs a number of essential functions in the central nervous system. This neurotransmitter regulates apoptotic processes, differentiation and proliferation of neurons, synaptic activity, plasticity. Prenatal stress may be a factor affecting the NO level in different parts of the central nervous system (CNS). The aim of the work was to study the level of NO metabolites in phylogenetically different parts of the central nervous system in prenatally stressed mature male and female rats, depending on the stage of the estrous cycle. Pregnant female rats ($n = 12$) were subjected to stress from the 16th to the 19th days of pregnancy for 3 hours in the morning. The NO level was assessed in adult (4-month-old) offspring of both sexes. In males, there was a decrease in the level of NO metabolites in the cerebellum and hypothalamus and an increase in the spinal cord. The level of NO metabolites within the studied parts of the CNS of females in the control was higher, after undergoing prenatal stress it changed less compared to males: significant changes were noted in the spinal cord regardless of the estrus cycle stage and in the cerebellum at the stage of estrus. Thus, regardless of gender, the phylogenetically younger structure, the cerebral cortex, turned out to be the most resistant to prenatal stress; the most pronounced changes were noted in the phylogenetically ancient part of the CNS, the spinal cord. Given the importance of NO in the CNS as a key signaling molecule, any changes in its level under the influence of prenatal stress can both have a significant adaptive value and have negative consequences for the functional state of the tissue.

Keywords: prenatal stress, nitric oxide, female rats, male rats, estrous cycle, ontogenesis