
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 612.822.1

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СТРЕССА МАТЕРИ
НА СОСТОЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ РЕДОКС-СИСТЕМЫ
МОЗГА У САМЦОВ И САМОК КРЫС НА 20-Й ДЕНЬ
ЭМБРИОНАЛЬНОГО ПЕРИОДА РАЗВИТИЯ**

© 2024 г. А. В. Вьюшина¹, А. В. Притворова¹, *, С. Г. Пивина¹, В. К. Акулова¹, Н. Э. Ордян¹

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

*E-mail: pritvorovaav@infran.ru

Поступила в редакцию 27.06.2024 г.

После доработки 31.07.2024 г.

Принята к публикации 02.08.2024 г.

Исследовали влияние пренатального стресса, посттравматического стрессового расстройства, а также их сочетанного действия у крыс матерей на состояние гипоталамо-адреналовой системы и окислительно-восстановительного баланса мозга у 20-дневных эмбрионов. Пренатальный стресс матерей приводил к повышению уровня кортикостерона в крови и снижению уровня восстановленного глутатиона в мозге у самцов эмбрионов. У самок эмбрионов повышался уровень продуктов Фентон-индуцированной окислительной модификации белков и снижался уровень восстановленного глутатиона в мозге. Моделирование посттравматического стрессового расстройства у матерей приводило к повышению уровня кортикостерона в крови, а также к снижению уровня продуктов Фентон-индуцированной окислительной модификации белков в мозге у самцов эмбрионов. У самок эмбрионов повышались уровни продуктов спонтанной и Фентон-индуцированной окислительных модификаций белков в мозге. Сочетанное действие двух видов стресса у матерей приводило к повышению уровня кортикостерона в крови, снижению уровня продуктов спонтанной и повышению Фентон-индуцированной окислительных модификаций белков, а также к снижению уровня восстановленного глутатиона в мозге у самцов эмбрионов. У самок повышались все исследованные показатели уровня продуктов окислительной модификации белков в мозге. Таким образом все три исследованных вида стресса у матери вызывают изменения в гипоталамо-гипофиз-адреналовой системе и в окислительно-восстановительном балансе мозга у 20-дневных эмбрионов. Эти изменения у самцов и самок эмбрионов различны, и у большинства исследованных показателей паттерн различий инвертирован по отношению к контрольной группе. Подобные трансформации у эмбрионов могут привести к негативным изменениям в нейроэндокринной системе у взрослых потомков стрессированных крыс матерей.

Ключевые слова: стресс матери, мозг, эмбриональный период, кортикостерон, окислительная модификация белков, глутатион

DOI: 10.31857/S1027813324040077, **EDN:** EGPU TH

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональное развитие — период, в котором генетические факторы и факторы внешней среды могут взаимодействовать и усугублять риски патологий в развитии потомства. Факторы окружающей среды воздействуют на эмбриональный мозг иначе, чем на мозг в постнатальном периоде. Пренатальный стресс (ПС) влияет на регуляцию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС) плода и может передаваться следующему поколению различным образом в зависимости от пола, что согласуется с различиями в динамике развития

мужского и женского мозга [1]. Изменение уровня глюкокортикоидов в процессе эмбрионального развития является ключевым сигнальным путем, через который реализуются долгосрочные фенотипические эффекты, связанные с неблагоприятными условиями в раннем онтогенезе [2–4]. Многочисленные исследования показали, что одним из возможных последствий изменения уровня глюкокортикоидов являются эпигенетические процессы, которые могут приводить к долгосрочным модификациям, в том числе трансгенерационным [5, 6].

В настоящее время установлено, что повышение уровня глюкокортикоидов приводит

к окислительному стрессу [7]. В результате происходит трансформация нормальных процессов развития, вызванная нарушением межклеточного сигналинга продуктами окисления биомолекул. Окислительный стресс является одной из главных причин изменения эпигенетического профиля у пренатально стрессированного потомства [8]. Генерация активных форм кислорода (АФК) под контролем нормально сбалансированных механизмов антиоксидантной защиты клетки имеет важное физиологическое значение у эмбриона [9]. АФК, генерируемые различными внутриутробными состояниями, могут быть одним из ключевых нисходящих медиаторов, инициирующих эпигенетические процессы [10].

Продукты взаимодействия АФК с белками и липидами являются как маркерами патологии, так и одновременно мессенджерами в биохимических процессах в организме [11]. Одно из центральных мест в работе этих сигнальных систем принадлежит продуктам свободно радикального окисления белков, показателем которых является уровень окислительной модификации белков (ОМБ) [12]. В норме ОМБ играет важную роль в таких процессах, как фолдинг, протеолиз, внутриклеточный и межклеточный сигналинг. При патологических состояниях ОМБ участвует в дезорганизации протеолиза, активации апоптоза, канцерогенезе, и является маркером патологических процессов окислительного стресса [11]. Также ОМБ участвует в процессах метилирования, ацетилования и деацетилования, которые и приводят к эпигенетическим изменениям [13].

Глутатион является низкомолекулярным антиоксидантом и в то же время субстратом для антиоксидантных ферментов. Однако, глутатион не только защищает клетку от токсичных свободных радикалов, но и в целом определяет окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды. Он играет множество ролей в детоксикации, окислительно-восстановительной регуляции и передаче сигналов клетками. Многие процессы, которые могут регулироваться с помощью глутатиона, имеют решающее значение для развивающихся эмбрионов и включают клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [14]. Глутатион связан с редокс-регуляцией в эмбриогенезе, органогенезе и дисморфогенезе. Таким образом, глутатионовая регуляция редокс-чувствительных событий является одной из главных во время эмбрионального развития [15].

В настоящее время известно, что ПС оказывает трансконгенерационное влияние на процессы свободнорадикального окисления биомолекул в различных тканях, затрагивая, в том числе, и различные отделы мозга, связанные с нейроэндокринной системой и когнитивными способностями [16]. Однако состояние системы про- и антиоксидантов

при посттравматическом стрессовом расстройстве (ПТСР) только начинают анализировать [17]. Имеются работы, указывающие на то, что ПТСР у родителей может способствовать предрасположенности к тревожным расстройствам и депрессии, задерживать физическое и поведенческое развитие потомков, способствовать изменениям в рецепции нейромедиаторов и экспрессии генов из-за нарушения регуляции метилирования [18, 19]. Однако исследования, посвященные влиянию ПТСР у родителей на окислительно-восстановительные процессы потомства немногочисленны. Кроме того, изучение влияния комбинированных стрессов, ведущих к трансконгенерационным изменениям, таких как ПТСР родителей и ПС родителей, сейчас представляется весьма актуальным. В связи с этим в данной работе нами было исследовано влияние различных видов стресса у матери на уровень кортикостерона в крови, показатели ОМБ и восстановленного глутатиона в мозге у эмбрионов самцов и самок в позднем эмбриональном периоде (20-й день беременности).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на крысах Вистар из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург), с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Схема опыта представлена на рис. 1.

Животных весом 250–300 г содержали в условиях нормального цикла свет/темнота (12/12 ч.) при температуре 22°C в клетках для лабораторных мышей и крыс М-6 (“Профлаб”, Россия), свободном доступе к воде и комбикорму для лабораторных животных марки ЛБК-120 Тосненского комбикормового завода. В эксперименте все самцы F0 и F1 были интактными, не подвергавшимися никаким воздействиям.

Этап 1. При спаривании самок крыс с самцами подтверждали оплодотворение обнаружением сперматозоидов во влагалищном мазке и обозначали как нулевой день беременности. Беременные самки были случайным образом разделены на две группы: контрольные беременные крысы (n=12) и беременные крысы, подвергавшиеся иммобилизационному стрессу (n=12) для получения контрольного потомства F1 и пренатально стрессированного потомства F1 соответственно. Полученное потомство каждой крысы выравнивалось по полу и количеству.

Этап 2. Далее из потомков F1 в возрасте 3 месяца создавались 4 группы животных: интактные беременные крысы (контроль), пренатально стрессированные беременные крысы (ПС), беременные

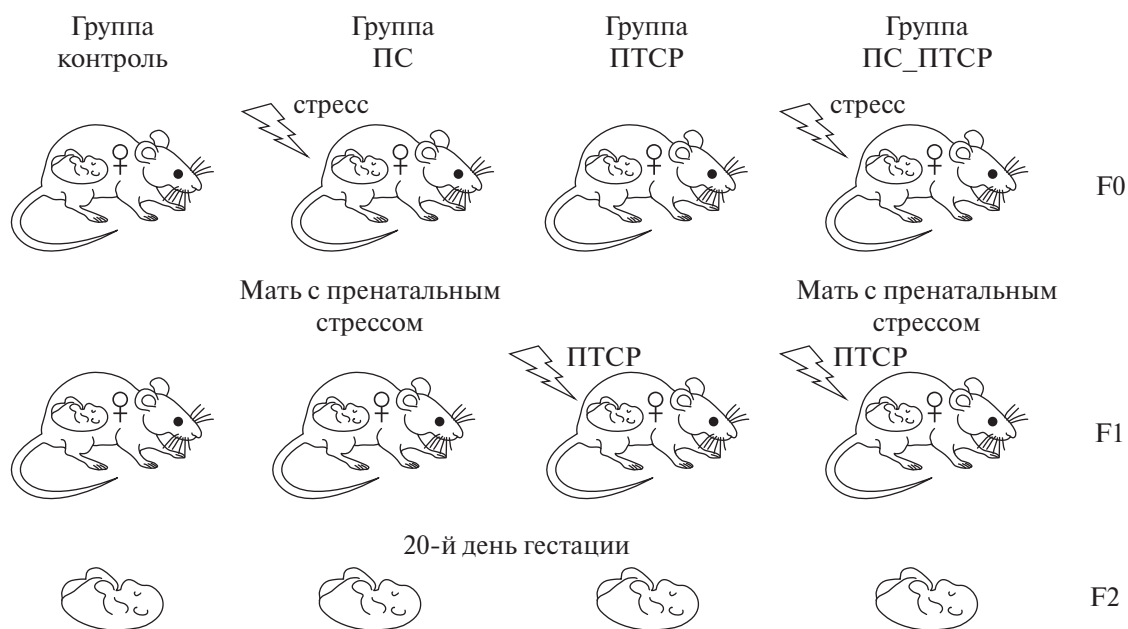


Рис. 1. Схема опыта.

Примечание: группа контроль — потомство F2 от родителей, не подвергавшихся никаким воздействиям; группа ПС — потомство F2 от пренатально стрессированной матери; группа ПТСР — потомство F2 от матери, перенесшей ПТСР; группа ПС_ПТСР — потомство F2 от пренатально стрессированной матери, перенесшей ПТСР.

крысы, у которых моделировалось ПТСР в период подсадки и покрытия (ПТСР), пренатально стрессированные беременные крысы у которых моделировалось ПТСР в период подсадки и покрытия (ПС_ПТСР).

Подсадку осуществляли в течение 1 эстрального цикла (3–4 дня). На 20-й день гестации самок крыс декапитировали и отбирали туловищную кровь для определения количества кортикостерона.

В работу отбирались пометы, где число плодов составляло от 8 до 12 эмбрионов и было приблизительно равное число самцов и самок (от 4 до 6). Пол эмбрионов определялся по аногенитальному расстоянию. На льду из черепной коробки извлекали мозг. Далее, готовили из ткани 10% гомогенат в 0.1 М фосфатном буфере (pH=7.4), гомогенат центрифугировали при 200 g, $t=4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса [20]. Из готовой пробы часть отбирали для определения уровня ОМБ, часть для определения восстановленного глутатиона *ex tempore*, часть для определения концентрации общего белка. Кровь центрифугировали (1000 g, 20 мин, 4°C) и далее сыворотку хранили при температуре -20°C до момента определения содержания в ней кортикостерона.

Моделирование пренатального стресса. Для получения пренатально стрессированного потомства F1 беременных самок F0 подвергали однократному иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности с 15-го по 19-й день

гестации [3]. Процедуру стрессирования проводили в одно и то же время суток с 14.00 и до 15.00 ч.

Моделирование ПТСР. ПТСР-подобное состояние вырабатывали у самок крыс, используя модель “стресс/рестресс”. В такой модели крыс подвергали комбинированному стрессорному воздействию, состоящему из двухчасовой иммобилизации в узких пластиковых пеналах, двадцатиминутного плавания в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, и после небольшой паузы эфирный стресс в течение 1 мин. Все типы стрессорных воздействий применяли последовательно. На 7-е сутки после комбинированного стресса производили 30-минутную иммобилизацию — рестресс. Далее через 10 дней в момент формирования у животного ПТСР-подобного состояния [21] к группе из 2–3 самок подсаживали 1 самца для покрытия. Таким образом, мы старались сделать так, чтобы зачатие происходило в период формирования у матери ПТСР-подобного состояния, в течение 1 эстрального цикла, то есть 3–4 дней.

Определение уровня продуктов окислительной модификации белков. Содержание карбонильных групп белков как продуктов окислительной модификации белков измерялось спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Biotek power wave HT (USA) по методу Арутюнян и соавт. (2000) [22]. После центрифугирования гомогената 20 мкл супернатанта отбирали в отдельные пробирки для определения содержания белка

по методу Lowry. Определяли продукты спонтанной (СОМБ) и Фентон-индуцированной (ФОМБ) окислительных модификаций белков. Индуцировали ОМБ реактивом Фентона, представляющим собой смесь ионов металла переменной валентности и H_2O_2 , генерирующей АФК. Спонтанная ОМБ является показателем, характеризующим базальный уровень окисления белков, общее физиологическое состояние организма. Фентон-индуцированная ОМБ рассматривается как показатель способности к приращению окисления, характеризует уровень синтеза белка и устойчивость ткани к перекислению [23].

Измерение продуктов производили на двух длинах волн 270 нм и 363 нм, что соответствовало карбонильным производным белков с разными аминокислотными остатками [24], образовавшимися на стадии инициации свободнорадикального окисления (первичные продукты) и элонгации (вторичные продукты) соответственно.

Количество продуктов ОМБ выражали в единицах оптической плотности, рассчитанной на 1 мг белка (Е/мг белка). Для оценки Фентон-индуцированного окисления белков использовали величину приращения ОМБ, вычитая из значений оптической плотности, полученной в пробе после индукции реактивом Фентона, значения оптической плотности спонтанного ОМБ.

Определение восстановленного глутатиона. Концентрацию восстановленного глутатиона определяли по способу, основанному на взаимодействии тиоловых групп с реактивом Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) – ДТНБ) [25]. После получения материалов для исследования к 0.3 мл гомогената мозга добавляли 0.1 мл 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 2000g при температуре +4°C. Отбирали 0.05 мл полученного супернатанта и переносили в пробирки, содержащие 2.55 мл 0.1 М трис-НСl буфера с 0.01% ЭДТА и 0.003% ДТНБ (рН=8.5). Через 30 мин пробы фотометрировали на спектрофотометре Biotek power wave HT (USA) на волне 412 нм против холостой пробы, содержащей тот же объем супернатанта и буфера без ДТНБ. Результаты представляли в мкмоль/мг белка.

Определение уровня кортикостерона. При определении количества кортикостерона в сыворотке крови эмбрионов и их матерей был использован набор для ИФА ХЕМА-кортикостерон (Россия) и анализатор Thermo Scientific Multiskan FS (USA). Результаты выражали в нмоль/л.

Все реагенты, используемые при биохимических анализах, приобретены в фирме “Вектон”, Россия, за исключением стрептомицина (аптечный препарат, производство ОАО “Биохимик”, Россия) и ДТНБ (Merck, Germany).

Статистика. Статистическая обработка полученных результатов производилась с использованием пакета программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.). Оценка нормальности распределения значений в выборках была проведена с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные анализировали с применением Factorial ANOVA. Анализировали влияние факторов “ПС”, “ПТСР” и “ПОЛ”. Сравнение уровня кортикостерона у матерей в четырех исследованных группах проводили с использованием Two-way ANOVA. При post-hoc анализе использовали критерий Тьюки. Сравнение уровня кортикостерона матерей с эмбрионами-самцами и с эмбрионами-самками проводили с использованием t-теста. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень кортикостерона (рис. 2) у матерей ниже, чем у 20-дневных плодов во всех исследованных группах ($p < 0.05$). Статистический анализ выявил влияние факторов “ПС” ($F_{1,20} = 360.18$, $p=0.000$) и “ПТСР” ($F_{1,20} = 169.42$, $p=0.000$), а также их взаимодействие ($F_{1,20} = 5.30$, $p=0.032$) на содержание кортикостерона в крови у матерей. Post-hoc анализ показал достоверное увеличение содержания кортикостерона у матерей в экспериментальных группах по сравнению с контролем. У эмбрионов при применении Factorial ANOVA обнаружено влияние фактора “ПТСР” ($F_{1,56} = 4.99$, $p=0.029$) и фактора “ПОЛ” ($F_{1,56} = 6.04$, $p=0.017$), а также совместное влияние факторов “ПС”, “ПТСР” и “ПОЛ” на уровень кортикостерона ($F_{1,56} = 5.65$, $p=0.021$). У самцов-плодов в экспериментальных группах также как и у матерей уровень кортикостерона увеличивается по сравнению с контролем ($p < 0.05$ post-hoc). У самок достоверных изменений уровня кортикостерона по сравнению с контролем не наблюдается. Межполовые различия имеются во всех группах, кроме группы с пренатально стрессированными матерями, причем в контрольной группе у самок уровень кортикостерона выше, а в группах ПТСР и ПС_ПТСР ниже по сравнению с самцами ($p < 0.05$ post-hoc).

При анализе с помощью Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено (рис. 3) влияние факторов “ПС” ($F_{1,40} = 4.93$, $p=0.032$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 20.09$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 67.18$, $p = 0.000$), а также совместное влияние трех вышеуказанных факторов на уровень первичных продуктов СОМБ ($F_{1,40} = 24.92$, $p = 0.000$). Уровень первичных продуктов СОМБ у самок не отличается во всех группах от контроля, а у самок увеличивается в группе ПС_ПТСР по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые

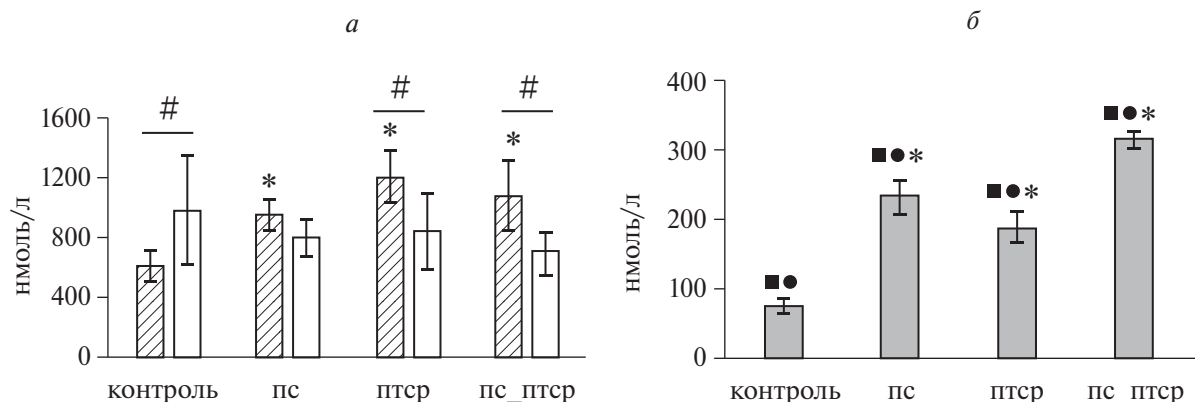


Рис. 2. Уровень кортикостерона в сыворотке крови у эмбрионов (самцы – заштрихованные столбики, самки – светлые столбики) и их матерей (серые столбики) в контроле и экспериментальных группах. *a* – эмбрионы; *b* – матери, * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.05$; # – статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; ■ – статистически значимые отличия от самцов-эмбрионов, $p < 0.05$; ● – статистически значимые отличия от самок-эмбрионов, $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

различия имеются во всех группах, кроме группы ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc).

На уровень первичных продуктов ФОМБ у эмбрионов (рис. 4) влияют факторы “ПС” ($F_{1,40} = 8.96$, $p = 0.004$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 76.06$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 154.97$, $p = 0.000$), а также выявлено совместное влияние факторов “ПС” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 4.39$, $p = 0.042$) и “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 161.47$, $p = 0.000$). Уровень первичных продуктов ФОМБ у самцов снижается до следовых количеств в группах с моделированием ПТСР у матерей и с сочетанным стрессом (ПС_ПТСР), у самок исследуемый показатель повышается во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые различия имеются во всех 4 группах ($p < 0.05$

post-hoc), но в экспериментальных группах отличия инвертированы по сравнению с контрольными животными.

При применении Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено влияние фактора “ПС” ($F_{1,40} = 11.70$, $p = 0.001$ и совместное влияние факторов “ПС” и “ПТСР” ($F_{1,40} = 9.14$, $p = 0.004$), а также совместное влияние факторов “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 47.24$, $p = 0.000$) на уровень вторичных продуктов СОМБ (рис. 5). Уровень вторичных продуктов СОМБ у самцов снижается в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc), а у самок увеличивается в группах с моделированием ПТСР у матерей и с сочетанным стрессом (ПС_ПТСР) по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые различия имеются во всех группах ($p < 0.05$ post-hoc),

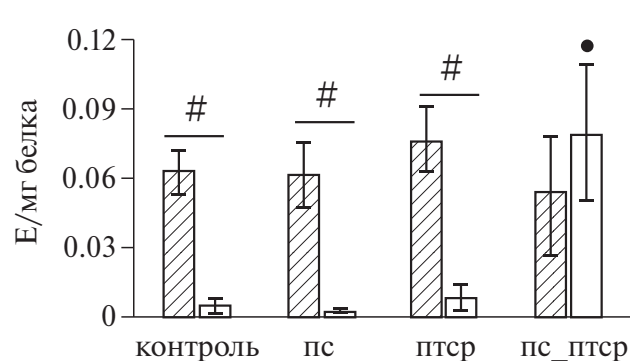


Рис. 3. Уровень СОМБ первичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы – заштрихованные столбики, самки – светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. ● – статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # – статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

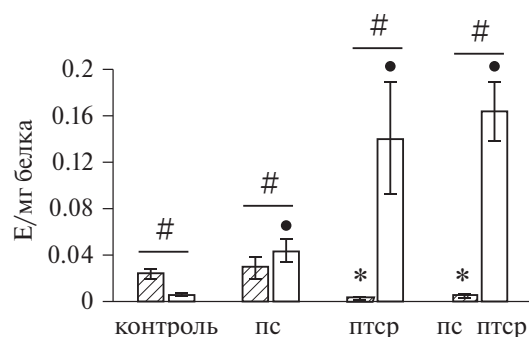


Рис. 4. Уровень ФОМБ первичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы – заштрихованные столбики, самки – светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * – статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; ● – статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # – статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

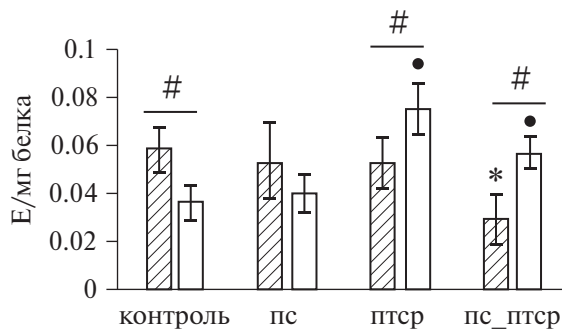


Рис. 5. Уровень СОМБ вторичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы — заштрихованные столбики, самки — светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; • — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # — статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

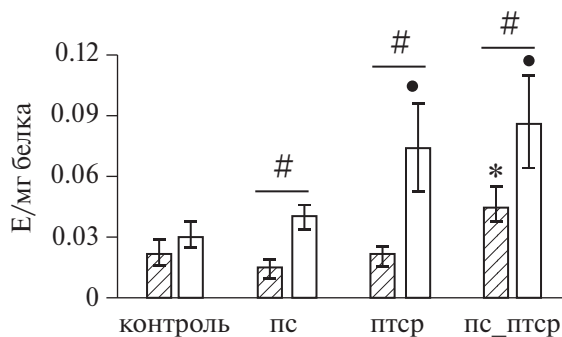


Рис. 6. Уровень ФОМБ вторичных продуктов в мозге у эмбрионов (самцы — заштрихованные столбики, самки — светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; • — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # — статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

кроме группы с ПС у матерей. В экспериментальных группах межполовые различия инвертированы по сравнению с контрольными животными.

На уровень вторичных продуктов ФОМБ (рис. 6) при применении Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено влияние факторов “ПС” ($F_{1,40} = 7.55$, $p = 0.008$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 66.02$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 69.20$, $p = 0.000$), а также совместное влияние факторов “ПС” и “ПТСР” ($F_{1,40} = 7.14$, $p = 0.011$) и “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 16.09$, $p = 0.000$). Уровень вторичных продуктов ФОМБ у самцов повышается в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc), у самок повышается в группах ПТСР и ПС_ПТСР по сравнению с контрольной

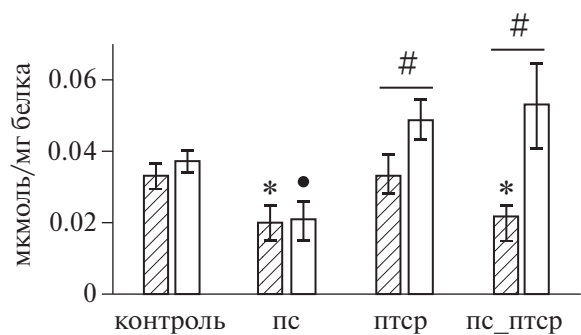


Рис. 7. Содержание восстановленного глутатиона в мозге у эмбрионов (самцы — заштрихованные столбики, самки — светлые столбики) в контроле и экспериментальных группах. * — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самцов $p < 0.05$; • — статистически значимые отличия от контроля у эмбрионов-самок; $p < 0.05$; # — статистически значимые межполовые различия, $p < 0.05$; данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.

группой ($p < 0.05$ post-hoc). Межполовые различия имеются во всех экспериментальных группах ($p < 0.05$ post-hoc), но у контрольных животных отсутствуют.

При анализе Factorial ANOVA у эмбрионов обнаружено влияние факторов “ПС” ($F_{1,40} = 22.29$, $p = 0.000$), “ПТСР” ($F_{1,40} = 33.65$, $p = 0.000$) и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 42.79$, $p = 0.000$), а также совместное влияние факторов “ПС”, “ПТСР” и “ПОЛ” ($F_{1,40} = 5.28$, $p = 0.026$) на содержание восстановленного глутатиона в мозге у эмбрионов (рис. 7). Количество восстановленного глутатиона в гомогенате мозга у самцов снижается в группе ПС и в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc), а у самок только в группе ПС ($p < 0.05$ post-hoc) по сравнению с контрольной группой. Межполовые различия имеются в группе ПТСР а также в группе ПС_ПТСР ($p < 0.05$ post-hoc).

ОБСУЖДЕНИЕ

Однократное неблагоприятное воздействие способно оставить след в поведении потомков последующих двух поколений и важная роль в передаче эффекта может принадлежать глюкокортикоидам матери [5, 6].

Уровень глюкокортикоидов у ПС животных и людей остается повышенным на протяжении всей жизни. Данные для людей, перенесших ПТСР демонстрируют снижение этого показателя [26], тогда как у беременных крыс с моделированием ПТСР этот показатель относительно контроля повышен [19]. В работе нашей лаборатории через 1 сутки после комбинированного стресса и рестресса у ПС самок уровень кортикостерона в крови повышается,

но к 10 и 30 сут. становится более низким, чем у контрольных животных [27]. Авторы Louvart et al. [28] также демонстрируют более резкую реакцию на стресс у ПС самок с более значительным снижением уровня кортикостерона после стресса. Учитывая схему опыта и состояние беременности, наши данные об уровне кортикостерона у крыс матерей совпадают с данными литературы. Обращает на себя внимание усиление активации ГГАС при сочетанном стрессе беременных крыс.

Отсутствие реакции ГГАС у плодов самок и увеличение уровня кортикостерона у плодов самцов может быть объяснено тем, что ГГАС плода способна реагировать на материнский стресс на поздних сроках беременности, однако, у самцов наблюдается значительное увеличение уровня АКТГ в ответ на материнский стресс с 18-го дня, тогда как у самок этого не наблюдается до 20-го дня внутриутробного развития [29].

Одним из последствий ПС, как известно, является нарушение функционирования ГГАС у потомков обоего пола [30]. В нашем эксперименте в группе с ПС у матерей отсутствуют межполовые различия у плодов самцов и самок за счет повышения уровня кортикостерона у плодов мужского пола. Можно предположить, что на позднем сроке эмбрионального развития у самцов, родившихся от пренатально стрессированных матерей, наблюдаются изменения функционирования ГГАС. Компонент моделирования ПТСР у матери оказывает усиливающее воздействие на уровень кортикостерона у плодов самцов и межполовая разница в экспериментальных группах становится инвертированной относительно контроля.

Важнейшим звеном, осуществляющим реализацию генетической программы развития, являются гормоны. В ответ на стресс глюкокортикоиды непосредственно воздействуют на геном развивающегося плода, вызывая нарушения гетерохронии в развитии [31]. Следствием этого могут быть изменения функций ЦНС, и, как следствие, физиологические или психические нарушения. ОМБ можно рассматривать как систему внутренней модуляции и передачи информации как от внешней среды к внутриклеточным системам, так и наоборот. В тоже время в соответствии с двойственной ролью АФК, ОМБ можно рассматривать как маркер патологии [32, 33]. В нашем исследовании на 20-й день эмбрионального развития у плодов мужского пола в мозге уровень первичных продуктов ОМБ во всех исследованных группах демонстрирует сходную картину — сравнительно высокий уровень спонтанного окисления и низкий — Фентон-индуцированного, так же как уровень вторичных продуктов в трех исследованных группах. Однако в группе с сочетанным стрессом наблюдается обратное соотношение вторичных продуктов ОМБ — снижение спонтанного и повышение

Фентон-индуцированного ОМБ. Соотношение спонтанного и Фентон-индуцированного ОМБ в мозге плодов на 20-й день эмбрионального развития возможно свидетельствует о несформировавшейся системе окислительного метаболизма белков. Можно заключить, что потомство мужского пола на данном сроке эмбрионального развития не демонстрирует изменений в ОМБ, за исключением групп с моделированием ПТСР у матери. По-видимому, фактор ПТСР у матери оказывает влияние на процессы в мозге, связанные с Фентон-индуцированным ОМБ, что может свидетельствовать о нарушении белкового синтеза.

На 20-й день эмбрионального развития у плодов женского пола в мозге уровень первичных продуктов СОМБ в трех исследованных группах очень низкий по сравнению с этим показателем у плодов мужского пола. Однако в группе с сочетанным стрессом этот показатель значительно повышен по сравнению с контролем. Уровень ФОМБ в контрольной группе также низкий, повышается в группе с ПС у матерей, а в группах с моделированием ПТСР у матерей этот показатель повышается в 2–3 раза по сравнению с уровнем ФОМБ в группе с ПС у матерей. Уровень вторичных продуктов СОМБ и ФОМБ не отличается в группах контроля и ПС у матерей, тогда как в группах с моделированием ПТСР у матерей этот показатель почти в два раза превышает уровень группы контроля. Можно заключить, что потомство женского пола на данном сроке эмбрионального развития в группах с моделированием ПТСР у матерей демонстрирует усиление как процессов свободнорадикального окисления в мозге, так и усиление процессов белкового синтеза.

В целом, процессы ОМБ у плодов женского пола контрольной группы на 20-й день эмбрионального развития сходны с картиной плодов мужского пола — относительно высокий уровень СОМБ и крайне низкий уровень ФОМБ, что может свидетельствовать о несформированности системы окислительного метаболизма белков. Однако реакция мозга плодов-самок на стресс матери кардинальным образом отличается от этих же процессов у плодов мужского пола. У плодов женского пола на данном сроке эмбрионального развития представленные в исследовании группы с различными стрессами у матерей демонстрируют более драматическое влияние исследованных стрессов на процессы ОМБ. Возможно, это связано с разницей в процессах дифференцировки и созревании мозга у эмбрионов мужского и женского пола [34]. По-видимому, у самцов наиболее чувствительной к влиянию стресса матери оказывается система ГГАС, а у самок — более чувствительны окислительно-восстановительная система и процессы синтеза белка в мозге.

Эмбриональное развитие включает в себя точно организованные события и процессы, в том числе изменения клеточной пролиферации, дифференцировки и лево-правой асимметрии, которые зависят от сигнальной трансдукции при участии АФК и внутриклеточных редокс-потенциалов, ключевую роль в этих процессах регуляции эмбриогенеза играет глутатион [9].

В контрольной группе и группе с ПС у матерей уровень восстановленного глутатиона у плодов-самок и у плодов-самцов не различается, однако в группе с ПС у матерей значительно снижается у плодов обоего пола (по сравнению с контролем). В группе с моделированием ПТСР у матерей уровень глутатиона у плодов обоего пола не отличается от показателей контрольной группы, при этом появляется межполовая разница по этому показателю. В группе сочетанного стресса у матерей уровень восстановленного глутатиона у плодов-самок снижается по сравнению с контрольными значениями, тогда как у самок этот показатель остается без изменений, формируя межполовые различия. Можно заключить, что ПС у матери связан со снижением уровня восстановленного глутатиона у плодов-самцов в обеих группах с влиянием такого стрессирующего фактора как ПС. В то же время у плодов-самок уровень восстановленного глутатиона снижается только в группе с ПС у матерей, тогда как моделирование ПТСР у матерей не оказывает влияния на этот показатель, а в группе сочетанного стресса возможно снимает влияние ПС у матери. В ранее проведенных в нашей лаборатории исследованиях обнаружено, что ПС в первом поколении изменяет динамику показателей окислительного стресса в постнатальном онтогенезе [32], что возможно связано с изменением сроков дифференцировки и морфогенеза на ранних этапах пренатального развития. Однако изменение свободнорадикального окисления биомолекул, вызванное ПС, прослеживается и во втором поколении уже у потомства ПС матерей [16, 35]. По-видимому, снижение уровня глутатиона, наблюдаемое у группы ПС в нашем исследовании свидетельствует об изменении окислительно-восстановительного баланса, который поддерживается системой окислительно-восстановительного буфера, создаваемого в эмбриогенезе глутатионом [15]. Возможно процессы дифференцировки, контролируемые глутатионом [14] не зависят от пола, однако изменения в редокс-балансе секс-детерминированы, и это отражается на глутатионовой системе регуляции эмбриогенеза. Кроме того, можно предположить, что стрессорные воздействия, испытанные матерями, уменьшают интенсивность окислительно-восстановительных процессов у плодов-самцов и усиливают у самок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влияние ПС у матерей и моделирования ПТСР у матерей на редокс систему мозга плодов в позднем эмбриональном периоде различается, эти различия секс-детерминированы. По-видимому, у самцов наиболее чувствительной к влиянию стресса матери оказывается система ГГАС, а у самок — окислительно-восстановительные процессы и процессы синтеза белка в мозге. Не исключено, что выявленные нами изменения показателей свободнорадикального окисления и уровня восстановленного глутатиона могут свидетельствовать об изменении сроков дифференцировки и морфогенеза у потомства как во втором поколении пренатально стрессированных животных, так и у потомства крыс-матерей, подверженных ПТСР.

Изменения в редокс-системе мозга в эмбриональном развитии могут привести к негативным последствиям в функционировании ЦНС и ГГАС у взрослых потомков стрессированных крыс-матерей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mattern F., Post A., Solger F., O'Leary A., Slattery D.A., Rief A., Haaf Th. // Behav. Brain Res. 2019. V. 359. № 1. P. 143–148. doi: 10.1016/j.bbr.2018.10.037.
2. Дыгало Н.Н., Науменко Е.В. // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 2. С. 215–218.
3. Ордян Н.Э., Пивина С.Г. // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 1. С. 52–59. doi: 10.1023/b:neab.0000028286.83083.73.
4. Krontira A.C., Cruceanu C., Binder E.B. // Trends. Neurosci. 2020. V. 43. № 6. P. 394–405. doi: 10.1016/j.tins.2020.03.008.
5. Дыгало Н.Н. // Журн. высш. нерв. Деят. 1999. Т. 49. Вып. 3. С. 489–494.
6. Yao S., Lopes-Tello J., Sferruzzi-Perri A.N. // Biology of Reproduction. 2021. V. 104. № 4. P. 745–770. doi: 10.1093/biolre/ioaa232.

7. Signorello M.G., Ravera S., Leoncini G. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. № 7. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms25073776>
8. Mikhed Y., Gorlach A., Knaus U.S., Daiber A. // Red. Biol. 2015. V. 5. P. 275–289. doi: 10.1016/j.redox.2015.05.008.
9. Timme-Laragy A.R., Goldstone J.V., Imhoff B.R., Stegeman J.J., Hahn M.E., Hansen J.M. // Free rad. Biol. Med. 2013. V. 61. P. 1–30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.011.
10. Thompson L.P., Al-Hasan Y. // J. Pregnancy. 2012. V. 2012. P.1–8. doi: 10.1155/2012/582748.
11. Schieber M., Chandel N.C. // Curr. Biol. V. 24. № 10. P. 453–462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
12. Луцк В.И. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 995–1016.
13. Cao-Lei L., Rooij S.R., King S., Matthews S.G., Metz G.A.S., Roseboom T.J., Szyf M. // Neurosci. Biobehav. 2020. V. 117. P. 198–210. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.05.016.
14. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Биомедицинская химия. 2010. Т. 56. № 6. С. 675–662. doi: 10.18097/PBMC20105606657.
15. Hansen J.M., Harris C. // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1850. № 8. P. 1527–42. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.12.001.
16. Huerta-Cervantes M., Peña-Montes D.J., López-Vázquez M.A., Montoya-Pérez R., Cortés-Rojo C., Olvera-Cortés M.E., Saavedra-Molina A. Nutrients. 2021. V. 13. № 5. P. 1–15. doi: 10.3390/nu13051575.
17. Karanikas E., Daskalakis N.P., Agorastos A. // Brain Sci. 2021. V. 11. № 6. P. 1–28. doi: 10.3390/brainsci11060723.
18. Zhang X.G., Zhang H., Liang X.L., Liu Q., Wang H.Y., Cao B., Cao J., Liu S., Long Y.J., Xie W.Y., Peng D.Z. // Genet. Mol. Res. 2016. V. 15. № 3. P. 1–17. doi: 10.4238/gmr.15039009.
19. Chagas L.A., Batista T.H., Ribeiro A.C.A.F., Ferrari M.S., Vieira J.S., Rojas V.C.T., Kalil-Cutti B., Elias L.L.K., Giusti-Paiva A., Vilela F.C. // Behav. Brain Res. 2021. V. 399. P. 1–9. doi: 10.1016/j.bbr.2020.113026.
20. Кострова Т.А. Биохимические и поведенческие показатели в отдаленный период после острых отравлений нейротоксикантами и их фармакологическая коррекция. Дисс... канд. мед. Наук. СПб: Институт токсикологии ФМБА, 2019. 188 с.
21. Ордян Н.Э., Смоленский И.В., Пивина С.Г., Акулова В.К. // Журн.высш.нервн.деят. 2013. Т. 63. № 2. С. 280–289. doi: 10.7868/S0044467713020068.
22. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб: ИКФ “Фолиант”. 2000. 104 с.
23. Кузьменко Д.И., Лаптев Б.И. // Вопр. мед. химии. 1999. Т. 45. № 1. С. 47–54. PMID: 10205828.
24. Назаров И.Н., Казичина Л.А., Зарецкая И.И. // Журн. общ. химии. 1956. Т. 27. № 3. С. 606–623.
25. Lovlin V.N., Vinichenko E.L., Sevostianov I.A. // The Journal of scientific articles “Health and Education Millennium”. 2017. V. 19. № 7. P.113–115.
26. Yehuda R., Bierer L.M. // Prog. Brain Res. 2008. V. 167. P. 121–135. doi: 10.1016/S0079-6123(07)67009-5.
27. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Миронова В.И., Ракицкая В.В., Акулова В.К. // Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 12. С. 1409–1420.
28. Louvart H., Maccari S., Vaiva G., Darnaudery M. // Psychoneuroendocrinology. 2009. V. 34. P. 786–790. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.12.002.
29. Sze Y., Brunton P.J. // Eur. J. Neuroscience. 2019. V. 52. P. 2487–2515. doi: 10.1111/ejn.14615.
30. Soares-Cunha C., Coimbra B., Borges S., Domingues A.V., Silva D., Sousa N., Rodrigues A.J. // Front. Behav. Neurosci. 2018. V. 12. P. 1–15. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00129.
31. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э. // Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. СПб.: “Десятка”, 2007. 240 с.
32. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А. // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 3. С. 240–246.
33. Reed E.C., Case A.J. // Front. Physiol. 2023. P. 1–13. doi: 10.3389/fphys.2023.1130861.
34. Mora S., Dussaubat N., Diaz-Veliz G. // Psychoneuroendocrinology. 1996. V. 21. № 7. P. 609–620. doi: 10.1016/S0306-4530(96)00015-7.
35. Aiken C.E., Tarry-Adkins J.L., Spiroski A., Nuzzo A.M., Ashmore T.J., Rolfo A., Sutherland M.J., Camm E.J., Giussani D.A., Ozanne S.E. // The FASEB Journ. 2019. V. 33. № 6. P. 7758–7766. doi: 10.1096/fj.201802772R.

The Effect of Various Types of Mother Stress on the Some Components of the Brain Redox System in Male and Female Rats on the 20th Day of the Embryonic Development Period

A. V. Vyushina¹, A. V. Pritvorova¹, S. G. Pivina¹, V. K. Akulova¹, and N. E. Ordyan¹

¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

The effect of prenatal stress, post-traumatic stress disorder, and their combined effect in rat mothers on the condition of the pituitary-adrenal system and the brain redox balance in 20-day-old embryos was studied. Mother's prenatal stress result in increase the level's corticosterone in the blood and decrease the level of reduced glutathione in the brain of male embryos. In female embryos, the level of Fenton-induced products of proteins oxidative modification increased and the reduced glutathione level in the brain decreased. Modeling of post-traumatic stress disorder in mother result in an increase in the corticosterone level in the blood, and a decrease in the level of Fenton-induced products of proteins oxidative modification in the brain of male embryos. In female embryos, the levels of products of spontaneous and Fenton-induced oxidative modifications of proteins in the brain increased. The combined effect of two types of stress in mother result in an increase in levels corticosterone in the blood, a decrease in the spontaneous products level and an increase in Fenton-induced products level of proteins oxidative modifications, and a decrease in the reduced glutathione level in the male embryos brain. In female embryos, all the studied indicators of proteins oxidative modification products in the brain increased. Thus, all three studied types of stress in the mother cause changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal system and in the brain redox balance in 20-day-old embryos. These changes are different in male and female embryos, and in most of the studied indicators, the pattern of differences is inverted in relation to the control group. Such changes at embryos can result in negative changes in the neuronal organization in adult offspring of stressed rat mothers.

Keywords: mother stress, brain, embryonic period, corticosterone, protein oxidative modification, glutathione