

И.В. Николаева, Д.С. Белолобская, В.А. Аргунов

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА В ПОЗДНЕМ ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ РАЗВИТИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА, НАДПОЧЕЧНИКОВ И ГОНАД КРЫС В 40-ДНЕВНОМ ВОЗРАСТЕ

УДК 61:57.086

С целью изучения влияния стресса в позднем пренатальном онтогенезе на показатели развития головного мозга, надпочечников и гонад крыс изучалось 40-дневное потомство самок-крыс, подвергнутых воздействию стресса иммобилизацией в условиях повышенной освещенности в узких пластиковых пеналах, ограничивающих их подвижность.

Выявлено, что потомство самок, подвергнутых стрессорному воздействию, отличалось от контрольного по таким важным характеристикам состояния нейронов мозга, как гравиметрические и морфометрические показатели, характеризующие неокортекс и гиппокамп, а также их надпочечников и гонад.

Ключевые слова: стресс, световое загрязнение, иммобилизация, неокортекс, гиппокамп, приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ).

Studying of stress effect in the late prenatal ontogeny on morphometrical indexes of development of brain, adrenals and gonads of rats at 40-day age, subjected to stress influence by immobilization in the conditions of the high illumination in the narrow plastic cases limiting their motility is made.

Changes of both gravimetric and morphometric indexes of neocortex and hippocampus, and also adrenals and gonads at posterity of female rat subjected to stress influence are established.

Keywords: stress, light pollution, immobilization, neocortex, hippocampus.

Введение. Среди стрессов различной природы, с которыми часто сталкивается современный человек, важная роль принадлежит эмоциональному стрессу [1]. Среди факторов, приводящих к его развитию, воздействие на человека света в ночное время и малоподвижный образ жизни рассматриваются как одни из ведущих стрессовых экологических факторов, приводящих к нарушению гомеостаза и ускоренному развитию целого ряда заболеваний. «Световое загрязнение» является на сегодняшний день распространенным явлением, ставшим частью современного образа жизни. Также у значительного числа людей режим работы и проживание в условиях длительных «белых ночей» нарушают нормальный циркадный ритм [6,8,10].

В настоящее время установлено, что воздействие стресса во время беременности приводит к гормональным перестройкам, приводящим к многочисленным поведенческим отклонениям у потомства [2]. Особую актуальность при этом приобретает изучение влияний различных стрессовых воздействий на развитие головного мозга. Одним из возможных причин такого влияния могут быть постстрессорные морфологические изменения различных структур мозга и, прежде всего,

гиппокампа [2]. Надо сказать, что морфологические последствия пренатальных стрессовых воздействий в литературе освещены слабо и представляют собой большой интерес.

Цель исследования. Изучение влияния стресса в позднем пренатальном онтогенезе на показатели развития головного мозга, надпочечников и гонад крыс в 40-дневном возрасте.

Материалы и методы. В работе исследовались животные 2 групп. 1-я группа – потомство интактной самки (n=10); 2-я – потомство стрессированной во время беременности самки (n=23). Моделирование эмоционального стресса самки проводили в течение 3 дней, с 14-го по 17-го дни беременности, в одно и то же время суток (с 14 до 15ч): подвергали иммобилизации в прозрачном узком пластиковом пенале в условиях повышенной освещенности лампой мощностью 60 Вт, расположенной на высоте 50 см. После этого животные переводились в естественный световой режим вивария. Все животные содержались в равных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище *ad libitum* и были получены от спаривания 4-5-месячных самцов и самок. Работа выполнена в учебной лаборатории курса гистологии Медицинского института Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова.

Забой контрольных и экспериментальных животных проводили одновременно, декапитацией, на 40-й день жизни, в утренние часы. Во всех группах определяли гравиметрические показатели: массу тела, головного мозга,

полушария, надпочечника, гонад. Левое полушарие головного мозга разрезалось во фронтальной плоскости, строго перпендикулярно длиннику и верхней поверхности по схемам Светухиной. Материал фиксировали в жидкости Карнуа в течение 1 часа и затем заливали в парафин для изготовления срезов толщиной 7 мкм, которые окрашивали 1% метиленовым синим и гематоксилин-эозином. Морфометрическое исследование проводилось на сериях срезов препаратов передне-теменной (ПТД) и собственно теменной долей (СТД), надпочечников и гонад при помощи окуляр-микрометра МОВ-15 и компьютерной морфометрии. Для определения толщины коры головного мозга и ее I слоя проводилось измерение в 3 участках, относящихся к ПТД, при помощи окуляр-микрометра МОВ-15, при увеличении объектива x3,7. Для определения плотности расположения нейронов во II, V слоях неокортекса СТД и гиппокампе производили подсчет количества клеток в 5 стандартных полях зрения каждого слоя при помощи окуляра x10, при увеличении объектива x40. Измерение площади сечения ядер и цитоплазмы нейронов II, V слоев коры и гиппокампа проводили с помощью компьютерной программы «Photoshop CS3 Extended». Для этого в каждом случае измеряли не менее 25 клеток в каждом слое неокортекса. На препаратах надпочечников, яичников и семенников измеряли соответственно толщину коры, диаметр наибольшего полостного фолликула и семенного канальца. В надпочечниках измерение толщины коры проводили

НИКОЛАЕВА Ирина Васильевна – к.б.н., ст. препод. МИ СВФУ им. М.К. Аммосова, ysu-gistology@mail.ru; **БЕЛОЛОБСКАЯ Дария Степановна** – к.м.н., ст. препод. МИ СВФУ, ysu-gistology@mail.ru; **АРГУНОВ Валерий Архипович** – д.м.н., проф. МИ СВФУ.

в 3 участках, диаметры 5 полостных фолликулов без признаков атрезии и семенных канальцев при помощи окуляр-микрометра МОВ-15.

В 30-дневном возрасте потомство было подвергнуто исследованию в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Показатели ВНД оценивались по параметрам регистрации поведения 30-дневных крысят в ПКЛ в оригинальной компьютерной программе Rat Test Version 1.0 [9].

Статистический анализ данных проведен на ПК с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Гравиметрические данные интактной и экспериментальной групп показали, что масса головного мозга и полушария потомства стрессированной самки (2-я группа) достоверно не отличалась от таковых контроля (1-я группа). При этом отмечается достоверное снижение массы тела в экспериментальной группе – $93 \pm 4,1$ г против $83 \pm 1,6$ г. Морфометрическое исследование головного мозга, надпочечников и гонад экспериментальных крыс показало ряд отклонений от нормы. Так, достоверно уменьшилась толщина неокортекса в ПТД ($1434 \pm 26,7$ мкм) и СТД ($1235 \pm 15,0$ мкм), наряду с этим было выявлено уменьшение численной плотности нейронов в поле зрения V слоя неокортекса СТД и гиппокампа (табл.1). Данный факт может расцениваться как следствие большей объемной доли, приходящейся на глиocyты и нейропилль, а с учетом меньшей толщины коры – и как свидетельство меньшего суммарного количества нейронов в СТД мозга крыс экспериментальной группы. Компьютерная морфометрия выявила статистически достоверное уменьшение площади ядер нейронов V слоя и гиппокампа СТД.

Имеющиеся в литературе данные [4,7] свидетельствуют о том, что развитие мозга в пренатальном периоде, а также на ранних этапах постнатального онтогенеза является гормонозависимым процессом. Этот факт подтвержден как клиническими наблюдениями, в которых исследовались последствия нарушений концентрации гормонов в системе «мать-плацента-плод», так и в работах экспериментаторов. Последние изучали эффекты введения различных гормонов, удаления эндокринных желез, а также – ситуаций, приводящих к изменениям функционирования эндокринных желез беременной, плода, гормонопродуцирующих функций [3,6,11].

Гравиметрические и морфометрические показатели развития головного мозга, надпочечников и гонад пренатально стрессированных 40-дневных крыс

Показатель	Интактные 1-я группа	Влияние стресса 2-я группа
	(n=10)	(n=23)
Масса тела, г	$93 \pm 4,1$	$83 \pm 1,6^*$
Масса головного мозга, мг	$1558 \pm 29,9$	$1511 \pm 15,3$
Масса полушария, мг	$559 \pm 12,5$	$557 \pm 4,9$
Масса надпочечника, мг	$12 \pm 0,9$	$12 \pm 0,7$
Масса семенника, мг	294 ± 101	403 ± 22
Масса яичника, мг	$21 \pm 1,8$	$20 \pm 1,2$
Толщина коры мозга ПТД, мкм	$1568 \pm 20,7$	$1434 \pm 26,7^*$
Толщина I слоя ПТД, мкм	$153 \pm 3,6$	$144 \pm 2,9$
Число нейронов в поле зрения ПТД:		
-II слоя	$19,3 \pm 0,43$	$18,7 \pm 0,29$
-V слоя	$6,5 \pm 0,14$	$6,4 \pm 0,11$
Толщина коры мозга СТД, мкм	$1392 \pm 15,9$	$1235 \pm 15,0^*$
Толщина I слоя СТД, мкм	$140 \pm 3,8$	$136 \pm 3,4$
Число нейронов в поле зрения СТД:		
-II слоя	$20,3 \pm 0,32$	$19,7 \pm 0,38$
-V слоя	$6,6 \pm 0,18$	$5,4 \pm 0,11^*$
- гиппокампа	$21,9 \pm 0,35$	$19,1 \pm 0,32^*$
Площадь сечения, мкм ² , СТД		
-ядер нейронов II слоя	$53,3 \pm 1,26$	$51,1 \pm 0,79$
-цитоплазмы нейронов II слоя	$42,6 \pm 0,85$	$40,8 \pm 1,24$
-ядер нейронов V слоя	$100 \pm 2,24$	$78,7 \pm 2,43^*$
-цитоплазмы нейронов V слоя	$82,3 \pm 2,2$	$76,7 \pm 2,49$
-ядер нейронов гиппокампа	$71,9 \pm 1,33$	$63,9 \pm 1,69^*$
-цитоплазмы нейронов гиппокампа	$45,8 \pm 1,08$	$47,8 \pm 1,72$
Толщина коры надпочечника, мкм	$805 \pm 20,4$	$678 \pm 10,4^*$
Диаметр фолликулов яичника, мкм	$464 \pm 14,2$	$437 \pm 20,1$
Диаметр извитых канальцев семенника, мкм	247 ± 10	$222 \pm 5,7^*$

*Отличия статистически достоверны по сравнению с 1-й группой ($p < 0,05$).

Стресс в последнюю треть беременности вызывает изменение эндокринного баланса как у самок, так у их потомства. Описано, в частности, изменение уровня кортикостерона, прогестерона и тестостерона у потомков крыс и их матерей на протяжении всего стрессорного периода. В экспериментах выявлено, что хроническое стрессирование с 14-го по 17-й день беременности приводит к стойким изменениям гормонального фона. Эти нарушения сохраняются длительно, и в 30-дневном возрасте пренатально стрессированные крысята отличаются от контрольных животных как по уровню половых гормонов в крови, так и по поведению в ПКЛ [5,7].

По нашему мнению, это может быть объяснено тем, что длительный хронический стресс приводит к большому числу изменений, затрагивающих не только кору надпочечников, но и симпатoadrenalную систему, эпифиз. С другой стороны, известно, что изменения, развивающиеся при хроническом стрессе, медленно подвергаются регрессии, срок которой превосходит срок стрессирующего воздействия. В связи с этим можно полагать, что именно эти, «остаточные», последствия хронического эмоционального стресса в

органах эндокринной и других систем организма беременных крыс обусловили выявленные нами морфологические особенности мозга их 40-дневного потомства.

Приведенные данные, таким образом, свидетельствуют о возможной роли изменений концентрации различных стероидов в конце пренатального периода в развитии изменений показателей развития мозга крыс, испытавших длительный эмоциональный стресс. Как указывалось выше, достаточно обоснованным будет являться предположение, согласно которому некоторые из выявленных последствий стресса самок обусловлены его особенностями, связанными, во-первых, с выраженным влиянием на структуру и функции эпифиза и, во-вторых, с его большой продолжительностью.

Параллельно с изменениями показателей развития мозга у пренатально стрессированных животных имеются отличия надпочечников по сравнению с контролем. Так, подопытным животным была присуща меньшая толщина коры надпочечников и уменьшенный диаметр извитых семенных канальцев. Известно, что одним из важных последствий стрессов являются нарушения фолликулогенеза, уменьшение

Таблица 2

Показатели поведения в ПКЛ 30-дневного потомства стрессированных во время беременности самок

Показатель	1-я группа (Интактные, n=10)	2-я группа (Влияние стресса n=23)
Время, с		
-бездействия	2,9±0,98	8,5±2,87*
-свешиваний	0,8±0,32	0,9±0,48
-стоек	4,3±1,06	5,9±1,08*
-груминга	5±2,33	20,8±5,43*
-принюхиваний	172±2,97	150,7±6,18*
-движения	67,5±6,58	52,2±5,82*
-в открытом рукаве	7,3±2,76	9,6±3,29
-в закрытом рукаве	171±2,73	168,8±3,23
Число		
-свешиваний	1,2±0,41	1,2±0,63
-стоек	4,4±0,67	6,6±0,63*
-груминга	1,5±0,72	3,2±0,71*
-принюхиваний	2,4±0,47	4,3±0,39*
-движения	8,7±0,73	8,8±0,97
-выходов в открытый рукав	0,8±0,20	0,8±0,24
-заходов в закрытый рукав	1,4±0,22	1,5±0,23
- исследовательская активность	0,6±0,33	1,2±0,62
- уровень тревожности	269,1±30,9	267,4±28,7

*Отличия статистически достоверны по сравнению с 1-й группой (p<0,05).

фертильности, ановуляторные циклы у самок, задержка развития семенников у препубертатных самцов крыс, обусловленные изменениями состояния системы гипоталамус – гипофиз – гонады [10,12,13].

Статистический анализ данных регистрации поведения 30-дневных крысят в ПКЛ показал достоверные различия по следующим показателям: достоверно увеличилось время бездействия, время и число стоек, груминга, число принюхиваний, уменьшилось время принюхиваний и движений. Различия показателей времени и числа нахождения в открытых и закрытых рукавах статистически незначимы (табл. 2).

Таким образом, предварительные наши исследования на небольшом количестве животных свидетельствуют, что стрессовые воздействия на самок в период позднего пренатального онтогенеза приводят к многочисленным отклонениям поведения, в частности к снижению общей двигательной активности и повышению продолжительности груминга их потомства в конце молочного периода.

Поздний пренатальный период онтогенеза считается критическим, так как этот период весьма важен для формирования приспособительного поведения, в том числе двигательной активности и уровня тревожности, которые мы изучали. Изменение этих форм поведения у взрослых пренатально стрессированных крыс свидетельствует о сложных перестройках всей приспособительной деятельности организма. Однако наблюдаемые поведенческие сдвиги зачастую не сопоставляются с наблюдаемыми морфологическими и морфометрическими сдвигами в нейронах головного мозга. Вопрос о механизмах возникновения последствий пренатального стресса остается весьма актуальным на сегодняшний день и требует дальнейших исследований в этой области.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что влияние пренатального стресса во время беременности приводит к изменениям морфометрических и физиологических показателей развития головного мозга крыс, а также их надпочечников и гонад. В экспериментальной группе крыс отмечаются: снижение плотности нейронов в поле зрения V слоя неокортекса СТД и гиппокампа, уменьшение толщины коры головного мозга в ПТД и СТД, площади ядер нейронов V слоя неокортекса и гиппокампа СТД, а также изменение поведенческих показателей в сторону снижения общей двигательной активности и увеличение времени и числа груминга как основного показателя уровня тревожности.

Литература

- Ведяев Ф.П. Стресс и организм / Ф.П. Ведяев // Вестник РАМН. – 1992. – №5. – С. 17-21.
- Vedyayev F.P. Stress and organism / F.P. Vedyayev // RAMS Bulletin. – 1992. – Issue 5. P.17 – 21.
- Герштейн Л.М. Морфохимические особенности нейронов гиппокампа у крыс, различающихся по поведению / Л.М. Герштейн, И.М. Корнева, В.И. Рахманова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, №12. – С. 696-698.
- Gershtein L.M. Morphochemical features of rats hippocampus neurons distinguishing by behavior / L.M. Gershtein, I.M. Korneva, V.I. Rakhmanova // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2007. – Vol. 144, Issue 12. – P. 696-698.
- Кириллов О.И. Половой диморфизм постнатального роста надпочечников крыс / О.И. Кириллов // Проблемы эндокринологии. – 1998. – № 5. – С. 45-46.
- Kirillov O.I. Sexual dimorphism of rats adrenals postnatal growth / The Problems of endocrinology. – 1998. – Issue 5. – P. 45-46.
- Мицкевич М.С. Гормональные регуляции в онтогенезе животных. / М.С. Мицкевич // М.: Наука. – 1978. – 224 с.
- Mitskevich M.S. Hormone regulations in animals ontogeny. / M.S. Mitskevich // M., 1978. – P. 224.
- Ордян Н.Э. Уровень тревожности и синтез нейростероидов в мозгу пренатально стрессированных самцов крыс / Н.Э. Ордян, С.Г. Пивина // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2002. – Т. 88, № 7. – С. 900-906.
- Ordyan N.E. Level of uneasiness and neurosteroids synthesis in the brain of prenatal stressed men rats / Russian physiological journal. – 2002. – Vol. 88, Issue 7. – P. 900-906.
- Отеллин В.А. Повреждающие воздействия в критические периоды пренатального онтогенеза как фактор, модифицирующий структурное развитие головного мозга и поведенческие реакции после рождения / В.А. Отеллин, Д.Э. Коржевский, Е.Г. Гилерович [и др.] // Вестник РАМН. – 2002. – №12. – С. 32-35.
- Otellin V.A. Damaging influences in critical periods of prenatal ontogeny as a factor modifying structural brain development and behavior reactions after the birth / V.A. Otellin, D.E. Korzhevskiy, E.G. Gilerovich etc. // RAMS Bulletin. – 2002. – Issue 12. – P. 32-35.
- Павлова И.Г. Влияние измененного гормонального фона в системе мать-плод на развитие нейрона / И.Г. Павлова // Морфология. – 1992. – Т. 102, №4. – С. 25-33.
- Pavlova I.G. The influence of changing hormone background on neurons development in the system "mother – fetus" / I.G. Pavlova // Morphology. – 1992. – Vol. 102, Issue 4. – P. 25-33.
- Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии (продолжение) / М.Г. Пшенникова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2001. – №3. – С. 20-26.
- Pshennikova M.G. Phenomenon of the stress. Emotional stress and its role in pathology (continuing) / M.G. Pshennikova // Pathologic physiology and experimental therapy. – 2001. – Issue 3. – P. 20-26.
- Сапожников Ю.А. Математический и экспериментальный анализ возможности оптимизации оценки высшей нервной деятельности (поведения) крыс / Ю.А. Сапожников, Ю.И. Фельдшер, Б.Я. Рыжковский // Дальневост. мед. журн. – 2002. – №4. – С. 25-28.
- Sapozhnikov Y.A. Mathematical and experimental analysis of optimization's opportunities of rats' higher nervous activity (behavior) evaluation. / Y.A. Sapozhnikov, Y.I. Feldsherov, B.Y. Ryzhavskiy // Far Eastern medical journal. – 2002. – Issue 4. – P. 25-28.
- Bozzo A. Chronic stress effects on the apoptotic index of the adrenal cortex of pregnant rats / A. Bozzo, S.A. Sonez, M.T. Mugnaini [et al.] // Biocell. – 2006. – № 30 (3). – P. 439-445.
- Kempna P. Adrenal gland development and defects / P. Kempna, C.E. Fluck // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2008. – № 22 (1). – P. 77-93.
- Masilamoni J.G. The neuroprotective role of melatonin against amyloid beta peptide injected mice / J.G. Masilamoni, E.P. Jesudason, S. Dhandayuthapani [et al.] // Free Radic Res. – 2008. – № 42 (7). – P. 661-673.
- McEwen B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain / B.S. McEwen // Physiol Rev. – 2007. – № 87 (3). – P. 873-904.