

Н. Д. Носенко

## Особливості стресової реакції гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи у пренатально стресованих щурів за умов застосування дексаметазону

*Исследовано протекторное действие синтетического агониста глюкокортикоидов дексаметазона, вводимого в пренатальном периоде, на показатели функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС) у взрослых потомков обоего пола, матери которых в последнюю треть беременности подвергались иммобилизационному стрессу. Введение дексаметазона перед стрессированием беременных крыс препятствовало проявлению повреждающего воздействия пренатального стресса на активность ГГАС у взрослых потомков-самцов. У них наблюдались характерные для нормальных животных постстрессорные изменения содержания норадреналина в гипоталамусе и кортикостерона в плазме крови, а также сохранялась способность ГАМК<sub>A</sub>- и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов к стрессорной активации. У пренатально стрессированных самок превентивный эффект дексаметазона не выявлен. Результаты исследований свидетельствуют о патогенетической роли повышенной продукции глюкокортикоидных гормонов в механизмах, опосредующих эффекты пренатального стресса в отношении зависимых от пола функциональных расстройств ГГАС. Они демонстрируют принципиальную возможность фармакологической профилактики некоторых форм врожденной нейроэндокринной патологии и обосновывают необходимость гендерного подхода при разработке превентивных мер.*

### ВСТУП

Стрес організму матері впродовж останньої третини гестації суттєво впливає на розвиток плоду, що може бути пов'язано з дією надлишку ендогенних глюкокортикоїдів та інших медіаторів стресу. Порушення гормонального програмування нейроендокринної системи, яке виникає при цьому, призводить до розвитку синдрому пренатального стресу, що характеризується функціональними розладами систем репродукції та адаптації у дорослих нащадків [6]. У цьому зв'язку особливу актуальність набуває пошук можливих шляхів попередження розвитку нейроендокринної патології, зумовленої гормональним дисбалансом у

пренатальному періоді індивідуального розвитку.

За фізіологічних умов у багатьох видів тварин в останній термін вагітності спостерігається підвищення базальної активності гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи (ГГАС), що супроводжується збільшенням вмісту глюкокортикоїдних гормонів у крові матері [8]. Проте ступінь їх проникнення в кровоносну систему плоду досить малий, що є результатом підвищення вмісту кортикостероїдів зв'язувального глобуліну в крові та експресії 11 $\beta$ -гідростероїддегідрогенази плаценти, які захищають плід від ушкоджувального впливу надлишку глюкокортикоїдів материнського походження [7, 10, 13]. За умов стресування

© Н. Д. Носенко

організму вагітної матері ці захисні механізми виявляються недостатніми [16, 20], що й створює передумови для підвищення вмісту кортикостероїдів у крові матері та плоду [18].

Дані літератури, а також результати наших попередніх досліджень свідчать про те, що введення екзогенних глюкокортикоїдів самицям щурів протягом останнього тижня вагітності відтворює ефекти пренатального стресу відносно порушень статевої поведінки [17], стресової реактивності ГГАС [5, 14, 15], стану ГАМК-ергічної системи [2] та щільності розподілу кортикостероїдних рецепторів у дорослих тварин [19]. Визначення провідної ролі глюкокортикоїдів у патогенезі синдрому пренатального стресу визначило напрямок пошуку можливих шляхів фармакологічної корекції порушень балансу глюкокортикоїдних гормонів в період внутрішньоутробного розвитку.

Раніше було показано, що введення синтетичного агоніста глюкокортикоїдів дексаметазону стресованим вагітним щурам попереджає прояв деяких ранніх ефектів пренатального стресу [6]. Натомість нез'ясованим залишається питання щодо визначення превентивної дії зазначеного препарату відносно віддалених наслідків пренатального стресу, зокрема порушень стресової активності ГГАС. Відомо, що функціональний стан ГГАС за умов пренатального стресу зазнає секс-специфічних модифікацій [4]. Тому метою нашої роботи було дослідити протекторні властивості дексаметазону, застосованого в пренатальному періоді, відносно порушень стресової реактивності ГГАС у дорослих нащадків обох статей, матері яких впродовж останньої третини вагітності зазнали дії іммобілізації.

## МЕТОДИКА

Дослідження виконано з урахуванням Міжнародних принципів Європейської

конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Досліди проведено на самцях ( $n = 57$ ) і самицях ( $n = 51$ ) щурів лінії Вістар віком 6 міс масою 200–220 г, яких було поділено на три групи відповідно статі тварин. Першу групу (контроль) склали щури, народжені інтактними самицями; другу – щури, народжені самицями, яких протягом останнього тижня вагітності (з 15-ї по 21-шу добу) щодобово піддавали дії одногодинного іммобілізаційного стресу; третю – щури, народжені самицями, яким у той самий термін вагітності за 30 хв до початку іммобілізації щодобово внутрішньом'язово вводили дексаметазон ("Гедеон Ріхтер", Угорщина) в дозі 0,1 мг/кг.

Для наступних досліджень кожен групу тварин відповідної статі ділили на три підгрупи: 1-шу підгрупу склали тварини в стані фізіологічного спокою; 2-гу – тварини, яких піддавали гострому стресу (стандартній тест-процедурі – жорсткій іммобілізації протягом однієї години); 3-тю – тварини, яким за 30 хв до початку гострого стресу одноразово внутрішньоочеревинно вводили агоніст ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів баклофен ("Sigma", США) в дозі 10 мг/кг. Окрему підгрупу тварин склали самці щурів відповідних груп, яким за 30 хв до початку іммобілізації одноразово внутрішньоочеревинно вводили агоніст ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів мусцимол ("Sigma", США) в дозі 0,1 мг/кг.

Тварин швидко декапітували відразу після закінчення іммобілізації під легким ефіром. Взяття біологічного матеріалу у статевозрілих самиць щурів проводили в стадії дієструсу, яку визначали за мікроскопічним дослідженням вагінальних мазків. На холоді (4°C) швидко виймали мозок, видаляли гіпоталамус. Кров, що відтікала з судин шиї, збирали у гепаринізовані пробірки. Вміст норадреналіну та дофаміну в гіпоталамусі, а також кортикостерону в плазмі крові визначали відповідними

спектрофлюориметричними методами [1, 12]. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших попередніх роботах при відтворенні синдрому пренатального стресу за допомогою іммобілізації самиць шурів упродовж останнього тижня вагітності ми спостерігали зміни стресової реактивності ГГАС у дорослих нащадків, які мали чіткі статеві відмінності [4, 6]. У самців шурів знижувалася гормональна реакція кори надниркових залоз на стресовий чинник, порушувався процес постстресового вивільнення норадреналіну в гіпоталамусі. У самиць, навпаки, спостерігалось помірне посилення адренокортикальної реакції на тлі збереження адекватних стресорних змін вмісту норадреналіну в гіпоталамусі.

Проведені дослідження показали, що введення дексаметазону вагітним самицям перед їх стресуванням запобігало прояву зазначених порушень ГГАС у дорослих нащадків чоловічої статі. У цих тварин зберігалася характерна для інтактних шурів стресова реакція з боку норадреналіну гіпоталамуса на одногодинну іммобілізацію. Вміст моноаміну зменшувався на 21 % і був на рівні контролю (25 %). У інтактних самців базальний рівень норадреналіну –  $(7,2 \pm 0,3)$  нмоль/г тканини, після гострого стресу –  $(5,4 \pm 0,4)$  нмоль/г тканини ( $P < 0,01$ ); у пренатально стресованих самців на тлі введення дексаметазону базальний рівень –  $(6,8 \pm 0,5)$  нмоль/г тканини, після гострого стресу –  $(5,4 \pm 0,3)$  нмоль/г тканини ( $P < 0,05$ ). За цих умов вміст дофаміну в гіпоталамусі залишався без змін. У інтактних самців базальний рівень становив  $(4,8 \pm 0,4)$  нмоль/г тканини, після гострого стресу –  $(4,4 \pm 0,4)$  нмоль/г тканини; у пренатально стресованих самців на тлі введення дексаметазону базальний рівень –  $(4,7 \pm 0,3)$  нмоль/г тканини, після гострого стресу –  $(4,9 \pm 0,2)$  нмоль/л тканини.

Про протекторні властивості пренатального застосування дексаметазону свідчить однакова з контролем спрямованість і виразність гормональної реакції кори надниркових залоз на стресову стимуляцію (рисунок, б, III). На тлі зниження базального вмісту кортикостерону в плазмі крові ( $P < 0,05$ ), амплітуда індукованого гострим стресом підвищення вмісту гормону була навіть вища, ніж у контролі (2,7 раза щодо 1, 9 раза в контролі).

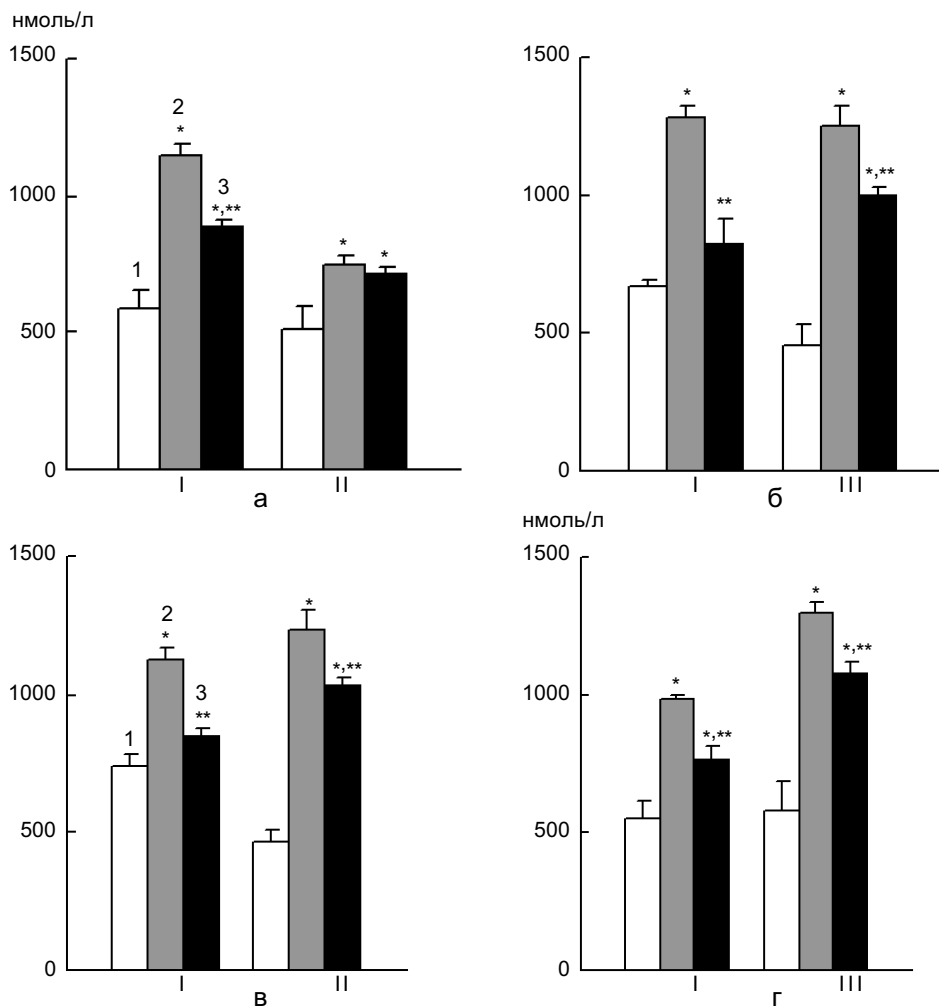
Відомо, що у механізмах регуляції стресових реакцій ГГАС важливу роль відіграє ГАМК-ергічна система мозку, яка справляє гальмівний вплив на ГГАС за механізмом негативного зворотного зв'язку через ГАМК<sub>A</sub>- і ГАМК<sub>B</sub>-рецептори. В наших дослідженнях аналіз функціонального стану ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів показав, що в нормі у самців шурів достресове введення агоніста ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів баклофену обмежувало гормональну реакцію кори надниркових залоз на гострий стрес (див. рисунок, а, б, I). У пренатально стресованих самців за умов послаблення стресової адренокортикальної реакції гальмівний ефект баклофену не виявлявся (див. рисунок, а, II). Вміст кортикостерону в плазмі крові після його введення залишався на тому ж рівні, що й після гострого стресу. Отже, під впливом пренатального стресу ГАМК<sub>B</sub>-рецептори втрачають здатність до стресової активації. Введення дексаметазону у пренатальному періоді попереджало розвиток цих порушень. У пренатально стресованих на тлі застосування дексаметазону самців достресове введення баклофену обмежувало адренокортикальну реакцію на гострий стрес подібно до того, що спостерігалось у інтактних тварин, хоча амплітуда зниження вмісту кортикостерону в плазмі крові у цих тварин була меншою, ніж у контролі (див. рисунок, б, III).

Пренатальний стрес супроводжується порушеннями функціональної активності ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у дорослих самців шурів [3]. У наших дослідах встановлено протек-

торний ефект дексаметазону відносно зазначених змін. У пренатально стресованих самців щурів на тлі введення дексаметазону, як і у інтактних тварин, достресова стимуляція ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів мусцимолом спричиняла практично однакове зменшення (на 17,4 і 15,3 % відповідно) індукованого гострим стресом вмісту кортикостерону в плазмі крові. У інтактних самців за умов гострого стресу цей показник становив (1126,9 ± 22,4) нмоль/л, а при введенні ще й мусцимолу – (955,2 ± 60,7) нмоль/л (P<0,05). У пренатально стресованих

самців на тлі введення дексаметазону вміст кортикостерону при гострому стресі становив (1243,8 ± 27,4) нмоль/л, а у разі стресу та введення мусцимолу – (1027,9 ± 36,0) нмоль/л. При цьому вміст гормону у тварин обох груп залишався достовірно підвищеним порівняно з вихідними значеннями: у інтактних і пренатально стресованих самців на тлі введення дексаметазону базальний рівень був 587,4 ± 73,3 і (409,7 ± 30,9) нмоль/л відповідно.

У пренатально стресованих самиць щурів на відміну від самців протекторну дію



Вміст кортикостерону в плазмі крові інтактних (I), пренатально стресованих (II) і пренатально стресованих на тлі введення дексаметазону (III) самців (а, б) і самиць (в, г) щурів статевозрілого віку за умов фізіологічного спокою (1), гострого стресу (2) та достресового введення баклофену (3). \*P<0,05 порівняно з базальним рівнем. \*\*P<0,05 порівняно з вмістом гормону після гострого стресу

дексаметазону щодо змін стресової активності адренокортикальної ланки ГГАС не виявлено. У цих тварин спостерігалось помірне посилення гормональної реакції кори надниркових залоз на стресовий стимул, що притаманне ефекту пренатального стресу (див. рисунок, в, г). Індукований іммобілізаційним стресом вміст кортикостерону в плазмі крові підвищувався відповідно в 2, 2 рази щодо 1,7 рази в контролі. Крім того, у цих тварин за умов збереження здатності ГАМК<sub>B</sub>-рецепторів до стресової активації гальмівний вплив баклофену був менш виражений, ніж у контрольних самиць щурів (див. рисунок, г, III). Подібний ефект баклофену відносно змін вмісту кортикостерону в плазмі крові спостерігали у пренатально стресованих щурів (див. рисунок, в, II).

Таким чином, на основі результатів проведеного дослідження, можна зробити висновок, що введення дексаметазону перед стресуванням вагітних щурів перешкоджає прояву ушкоджувального впливу пренатального стресу на активність ГГАС лише у дорослих нащадків чоловічої статі.

Відомо, що синтетичний агоніст глюкокортикоїдних гормонів дексаметазон має високу гормональну активність, яка зумовлена, з одного боку, підвищеною спорідненістю до клітинних рецепторів глюкокортикоїдів, з іншого, досить низьким зв'язуванням з кортикостероїдзв'язувальним глобуліном та іншими зв'язувальними білками плазми крові [11]. Завдяки цим властивостям дексаметазон інгібує секрецію АКТГ та ендогенних кортикостероїдів за механізмом негативного зворотного зв'язку. Крім того, дексаметазон взаємодіє з глюкокортикоїдними рецепторами гіпокампа [14] і частково або повністю блокує реакцію ГГАС на стрес. Очевидно, що за умов стресування вагітних самиць на тлі введення дексаметазону спрацьовує механізм дексаметазонової блокади стресорної активації ГГАС організму матері, що

призводить до нормалізації балансу глюкокортикоїдних гормонів. На тлі цих міркувань превентивний ефект дексаметазону щодо індукованих пренатальним стресом змін активності ГГАС у нащадків чоловічої статі є цілком можливим.

Грунтуючись також на отриманих нами результатах про відсутність протекторного впливу дексаметазону у пренатально стресованих самиць щурів, не можна не враховувати й роль інших медіаторів стресу, які залучені до порушень ГГАС, наприклад опіоїдів. Показано, що посилення продукції ендогенних опіоїдів, зокрема  $\beta$ -ендорфіну, асоційовано зі стресовою активацією секреції АКТГ [9]. Проте ці припущення потребують експериментального підтвердження.

Результати досліджень підтверджують положення про патогенетичну роль підвищеної продукції глюкокортикоїдів у механізмах опосередкування ефектів пренатального стресу відносно залежних від статі функціональних розладів ГГАС. Крім того, вони демонструють принципову можливість фармакологічної профілактики деяких форм вродженої нейроендокринної патології і обґрунтовують доцільність гендерного підходу до розробки превентивних заходів.

**N. D. Nosenko**

#### **PECULIARITIES OF STRESS-REACTIVITY OF HYPOTHALAMO-PITUITARY-ADRENAL SYSTEM IN PRENATALLY STRESSED RATS EXPOSED OF DEXAMETHASONE IN PRENATAL PERIOD**

The protective effect of dexamethasone, a synthetic agonist of glucocorticoids, on the functional activity of hypothalamo-pituitary-adrenal system (HPAS) in adult offspring in both genders whose mothers were subject to immobilization stress in last trimester of pregnancy, has been studied. Dexamethasone treatment prior to stressing pregnant rats prevented the manifestations of injuring effect of prenatal stress on HPAS activity in adult male offspring. The post-stressor changes in hypothalamic noradrenaline content and corticosterone level in blood plasma, as well as GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors activity, did not differ from normal indices. In prenatally stressed female rats no preventive effect of dexamethasone has been reported. The results of investigations suggest the pathogenetic role of increased production of glucocorticoids in

mediating the mechanisms of prenatal stress effects in gender-related functional disorders of HPAS. They demonstrate the possibility of pharmacological prevention of some congenital forms of neuroendocrine pathology and determine the necessity of a gender approach when developing preventive strategies.

*V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Kiev, Ukraine*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостерона: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – **76**, № 2. – С. 280–283.
2. Носенко Н.Д., Мишунина Т.М. Пренатальная глюкокортикоидная модификация ГАМК-эргической регуляции стресс-реактивности гипоталамо-гипофизарно-адренортикальной системы у взрослых крыс // Нейрофизиология. – 2005. – **37**, № 3. – С. 244–249.
3. Пішак В.П., Ткачук С.С., Мислицький В.Ф. Роль ГАМК-ергічної системи мозку в механізмах обмеження стрес-реакції у інтактних та пренатально стресованих самців шурів // Буковин. мед. вісн. – 1998. – № 4. – С.157–161.
4. Резников О.Г., Носенко Н.Д. Перинатальна стресова модифікація реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, № 2. – С.146–159
5. Резников А.Г., Носенко Н.Д., Тарасенко Л.В. и др. Половые особенности нейроэндокринных эффектов пренатального воздействия экзогенных глюкокортикоидов // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2006. – **92**, № 2. – С. 238–248.
6. Резников А.Г., Пішак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мислицький В.Ф. Пренатальний стресс и нейроэндокринная патология. – Чернівці: Медакадемія, 2004. – 320 с.
7. Burton P. J., Waddell B. J. Dual function of 11-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action // Biol. Reprod. – 1999. – **60**. – P. 234–240.
8. Challis J.R.G., Matthews S.G., Gibb W., Lye S.J. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm // Endocrine Rev. – 2000. – **21**. – P.514–550.
9. Douglas A.J., Johnstone H.A., Wigger A. et al. The role of endogenous opioids in neurohypophysial and hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretory responses to stress in pregnant rats // J. Endocrinol. – 1998. – **158**. – P.285–293.
10. Edwards C.R.W., Benediktsson R., Lindsay R.S., Seckl J.R. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: key enzymes in determining tissue-specific glucocorticoid effects // Steroids. – 1996. – **61**. – P. 263–269.
11. Felszeghy K., Bagdy G., Nyakas C. Blunted pituitary-adrenocortical stress response in adult rats following neonatal dexamethasone treatment // J. Neuroendocrinol. – 2000. – **12**. – P.1014–1021.
12. Jacobowitz D., Richardson J. Method for the rapid determination of norepinephrine, dopamine and serotonin in the same brain region // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1978. – **8**. – P. 515–519.
13. Kalabis G.M., Kostaki A., Andrews M.H. et al. Multidrug resistance phosphoglycoprotein (ABCB1) in the mouse placenta: fetal protection // Biol. Reprod. – 2005. – **73**, № 4. – P. 591–597.
14. Kapoor A., Dunn E., Kostaki A. et al. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids // J. Physiol. – 2006. – **572**. – P. 31–44.
15. Liu L., Li A., Matthews S.G. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects // Amer. J. Physiol. Endocrinol. and Metabol. – 2001. – **280**. – P. 729-739.
16. Mairesse J., Lesage J., Breton C. et al. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats // Ibid. – 2007. – **292**, № 6. – E1526–1533.
17. Pereira O.C., Arena A.C., Yasuhara F., Kempinas W.G. Effects of prenatal hydrocortisone acetate exposure on fertility and sexual behavior in male rats // Regul. Toxicol. Pharmacol. – 2003. – **38**, № 1. – P. 36–42.
18. Ward I.L., Weisz J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers // Endocrinology. – 1984. – **114**, № 5. – P. 1635–1643.
19. Welberg L.A., Seckl J.R., Holmes M.C. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotropin-releasing hormone: possible implications for behaviour // Neuroscience. – 2001. – **104**. – P. 71-79.
20. Welberg L.A., Thiruvikraman K.V., Plotsky P.M. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity // J. Endocrinol. – 2005. – **186**. – R7–R12.

*Ин-т ендокринології та обміну речовин  
ім. В.П. Комісаренка АМН України*

*Матеріал надійшов до  
редакції 29.11.2007*