

А. Н. Вернигора, Н. В. Волкова

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССА, ПЕРЕНЕСЕННОГО МАТЕРЯМИ
ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ, НА ПОДВИЖНОСТЬ
ПОТОМСТВА В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ» И АКТИВНОСТЬ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗ В ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-
НАДПОЧЕЧНИКОВО-ГОНАДНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС**

Аннотация. Обнаружено, что стресс, перенесенный матерями во время беременности, вызывает изменение двигательной активности потомства в тесте «открытое поле». Найдены значительные отличия в активности ферментов обмена нейропептидов – карбоксипептидазы E и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы – в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадальной системе пренатально стрессированных животных по сравнению с контрольными. Отличия в активности изучаемых ферментов у самок были более выраженными по сравнению с самцами. Вероятно, одним из механизмов влияния стресса, перенесенного матерями во время беременности, на локомоторную активность потомства может быть изменение скорости протеолитического процессинга предшественников биологически активных пептидов.

Ключевые слова: локомоторная активность, пренатальный стресс, карбоксипептидаза E, ФМСФ-ингибируемая карбоксипептидаза.

A. N. Vernigora, N. V. Volkova

**EFFECT OF PRENATAL STRESS ON THE POSTERITY
LOCOMOTION IN OPEN FIELD TEST AND BASIC
CARBOXYPEPTIDASES ACTIVITIES IN HYPOTALAMO-
PITUITARY-ADRENAL-GONADAL AXIS OF RATES**

Abstract. It was found that prenatal stress changes the locomotion activity of posterity in open field test. Discovered are significant changes of the carboxypeptidase E and PMSF-inhibited carboxypeptidase activities in the hypotalamo-pituitary-adrenal-gonadal axis of prenatal stressed animals. The changing of enzyme activities of female rats was higher than that of males. Prenatal stress may induce changes in locomotion mediated by changes in the rate of proteolytic processing of neuro-peptide precursors.

Key words: locomotory activities, prenatal stress, carboxypeptidase E, PMSF-inhibited carboxypeptidase.

Стресс, перенесенный матерью во время беременности, оказывает сильное влияние на потомство. Он вызывает снижение веса тела [1], длительные изменения в структуре и функциях мозга [2], влияет на поведение потомства [1–3], в том числе в тесте «открытое поле» [4], снижает подвижность и изменяет эмоциональное поведение и способность к обучению [5]. Пренатальный стресс активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему [1, 2, 6, 7], вызывает изменения в структуре гипоталамуса [7], повышает секрецию стресс-гормонов и чувствительность к стрессу в постнатальный период [8, 9]. Влияние пренатального стресса на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему зависит от пола потомства и в значительно боль-

шей степени выражено у самок [10, 11]. При этом у самок, но не у самцов, повышается уровень АКТГ [10], кортикостерона [10, 11], снижается уровень мРНК ПОМК в гипоталамусе [11]. Пренатальный стресс влияет на половое поведение [4], вызывая маскулинизацию у самок и феминизацию у самцов [12, 13]. Таким образом, пренатальный стресс вызывает значительные, зависящие от пола, изменения в функционировании гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадальной системы (ГГНГС), сохраняющиеся в течение всего постнатального периода.

Изучение нейрохимических механизмов влияния стресса во время беременности на потомство представляет значительный интерес для медицины. Поэтому целью нашей работы было изучение влияния пренатального стресса на активность карбоксипептидазы E (КФ 3.4.17.10) и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы – экзопептидаз, участвующих в конечной стадии предшественников биологически активных пептидов [14, 15].

Материал и методика

Опыты проводили на самках, находящихся на стадии диэструс, и самцах белых беспородных крыс в возрасте 120–130 сут. В эксперименте использовали две группы животных: пренатально стрессированную и контрольную. Животные пренатально стрессированной группы являлись потомством самок, которые в течение всего периода беременности раз в сутки в течение 20 мин подвергались воздействию эмоционально-болевого стресса. Для этого животных через каждые 10 с в беспорядочном режиме подвергали действию одного из трех факторов длительностью 1 с: вспышка света (лампа накаливания мощностью 100 Вт, расстояние 0,5 м), звук (90 дБ), электрокожное раздражение (сила тока 2 мА); контрольные животные – потомство интактных самок.

«Открытое поле» представляло собой квадратную площадку (100 × 100 см), ограниченную непрозрачными бортами высотой 30 см и разделенную на 25 одинаковых квадратов. Наблюдение за поведением крыс проводили в течение 5 мин. Регистрировали количество посещений периферических квадратов, центральных квадратов и вертикальную активность (количество стоек).

Животных декапитировали под хлороформным наркозом, извлекали отделы мозга и надпочечники. Активность карбоксипептидазы E определяли методом Frycker и Snyder [16] по высвобождению дансил-Phe-Ala из дансил-Phe-Ala-Arg при pH 5,6 как ингибируемую высокоспецифичным ингибитором фермента гуанидиноэтилмеркаптоантарной кислотой. Активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы определяли по высвобождению дансил-Phe-Leu из дансил-Phe-Leu-Arg при pH 5,6 как ингибируемую фенолметилсульфонилфторидом [15]. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури [17]. Активность ферментов выражали в нмоль продукта (дансил-Phe-Ala в случае карбоксипептидазы H или дансил-Phe-Leu в случае ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы), образовавшегося за 1 мин инкубации в расчете на 1 мг белка.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Стресс, перенесенный матерями во время беременности, вызывал повышение периферической двигательной активности у самцов и вертикальной – у самок в тесте «открытое поле» (табл. 1). Таким образом, влияние пренатального стресса на поведение крыс в тесте «открытое поле» зависело от пола животных.

Таблица 1

Влияние пренатального стресса на подвижность крыс в тесте «открытое поле»

Параметры поведения	Группа животных			
	Самцы		Самки	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Количество посещений периферических квадратов	19,8 ± 3,0	31,8 ± 4,6*	23,7 ± 2,9	30,2 ± 3,4
Количество посещений центральных квадратов	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,6	2,8 ± 0,8	1,3 ± 0,4
Вертикальная активность	14,8 ± 2,0	19,8 ± 1,9	13,5 ± 1,2	17,2 ± 1,4*

Примечание. * $p < 0,05$, $n = 12$.

У пренатально стрессированных самцов активность карбоксипептидазы Е в семенниках была примерно в 4 раза ниже, чем у контрольных животных, в других отделах ГГНГС достоверных отличий между опытной и контрольной группами не обнаружено (рис. 1). Пренатальный стресс не влиял на активность фермента в половых железах самок в отличие от самцов, но вызывал изменения его активности в остальных отделах ГГНГС. При этом активность в гипоталамусе и гипофизе была выше, а в надпочечниках – ниже, чем у контрольных самок.

Пренатальный стресс не влиял на активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы у самцов (рис. 2). У пренатально стрессированных самок активность фермента в яичниках была несколько выше, чем у контрольных животных.

Таким образом, стресс, перенесенный матерями во время беременности, вызывал изменения активности основных карбоксипептидаз у взрослого потомства, зависящие от его пола. Следует отметить, что в случае карбоксипептидазы Е наблюдались более выраженные изменения активности, чем в случае ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы. Обращает внимание, что в гипофизе, гипоталамусе и надпочечниках изменения активности наблюдались только у самок. Повышение активности карбоксипептидазы Е в гипофизе и гипоталамусе может способствовать повышению уровня АКТГ в крови, что хорошо согласуется с имеющимися литературными данными [10]. Вместе с тем отсутствие изменений в активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы согласуется с имеющимися предположениями о различной биологической роли исследуемых карбоксипептидаз [14, 15].

Можно также предположить, что изменение активности карбоксипептидазы Е у пренатально стрессированных животных может приводить к изменению уровня биологически активных пептидов, что в свою очередь может

влиять на двигательную активность животных в тесте «открытое поле». Следовательно, одним из механизмов влияния стресса, перенесенного во время беременности матерями, на локомоторную активность потомства, вероятно, может быть изменение скорости протеолитического процессинга предшественников биологически активных пептидов.

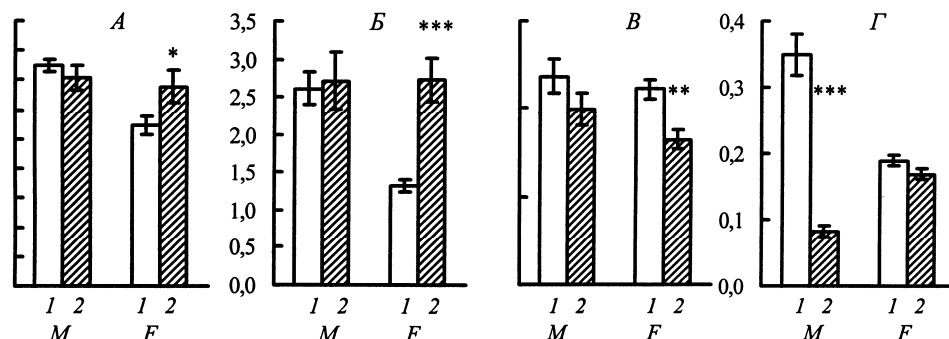


Рис. 1. Влияние пренатального стресса на активность карбоксипептидазы E в отделах мозга и надпочечниках самцов и самок крыс ($n = 6-8$).

По горизонтали: группы животных; по вертикали: активность фермента, нмоль дансил-Phe-Ala, освободившегося за 1 мин инкубации, в расчете на 1 мг белка. A – гипоталамус, B – гипофиз, B – надпочечники, Gamma – половые железы. 1 – контроль, 2 – опыт, M – самцы, F – самки. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по отношению к контролю

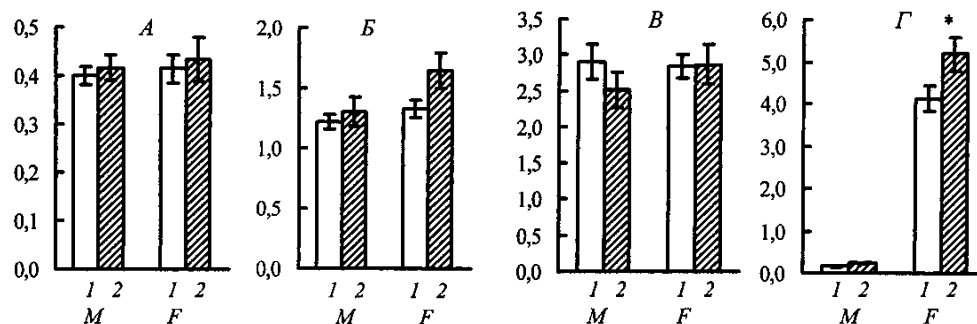


Рис. 2. Влияние пренатального стресса на активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах мозга и надпочечниках самцов и самок крыс ($n = 6-8$).

По горизонтали: группы животных; по вертикали: активность фермента, нмоль дансил-Phe-Leu, освободившегося за 1 мин инкубации, в расчете на 1 мг белка. A – гипоталамус, B – гипофиз, B – надпочечники, Gamma – половые железы. 1 – контроль, 2 – опыт, M – самцы, F – самки. * $p < 0,05$

Список литературы

1. Kapoor, A. Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male guinea pig offspring / A. Kapoor, S. G. Matthews // Journal Physiology. – 2005. – Vol. 566, № 3. – P. 967–977.
2. Green, M. K. Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress / M. K. Green, C. S. Rani, A. Joshi, A. E. Soto-Pina, P. A. Martinez, A. Frazer, R. Strong, D. A. Morilak // Neuroscience. – 2011. – № 192. – P. 438–451.

3. **Clarke, A. S.** Effects of prenatal stress on behavior in adolescent rhesus monkeys / A. S. Clarke, M. L. Schneider // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1997. – № 807. – P. 490–491.
4. **Meisel, R. L.** Effects of prenatal stress on avoidance acquisition, open-field performance and lordotic behavior in male rats / R. L. Meisel, G. P. Dohanich, I. L. Ward // *Physiology & Behavior*. – 1979. – Vol. 22, № 3. – P. 527–530.
5. **Nishio, H.** Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats-sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats / H. Nishio, S. Kasuga, M. Ushijima, Y. Harada // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 2001. – Vol. 19, № 1. – P. 37–45.
6. **Reznikov, A. G.** Early and long-term neuroendocrine effects of prenatal stress in male and female rats / A. G. Reznikov, N. D. Nosenko, L. V. Tarasenko, P. V. Sinitsyn, L. I. Polyakova // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2001. – Vol. 31, № 1. – P. 1–5.
7. **Garcia-Caceres, C.** Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats / C. Garcia-Caceres, N. Lagunas, I. Calmarza-Font., I. Azcoitia, Y. Diz-Chaves, L. M. Garcia-Segura, E. Baquedano, L. M. Frago, J. Argente, J. A. Chowen // *Psychoneuroendocrinology*. – 2010. – Vol. 35, № 10. – P. 1525–1535.
8. **Fride, E.** Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats / E. Fride, Y. Dan, J. Feldon, G. Halevy, M. Weinstock // *Physiology Behavioral*. – 1986. – Vol. 37, № 5. – P. 681–687.
9. **Takahashi, L. K.** Prenatal stress: consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function / L. K. Takahashi // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 1998. – Vol. 16, № 3–4. – P. 199–207.
10. **McCormick, C. M.** Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats / C. M. McCormick, J. W. Smythe, S. Sharma, M. J. Meaney // *Brain Research. Developmental Brain Research*. – 1995. – Vol. 84, № 1. – P. 55–61.
11. **Weinstock, M.** Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat / M. Weinstock, E. Matlina, G. I. Maor, H. Rosen, B. S. McEwen // *Brain Research*. – 1992. – Vol. 595, № 2. – P. 195–200.
12. **Ward, I. L.** Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors / I. L. Ward, O. B. Ward, R. J. Winn, D. Bielawski // *Behavioral Neuroscience*. – 1994. – Vol. 108, № 6. – P. 1188–1195.
13. **Brunton, P. J.** Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects / P. J. Brunton, J. A. Russell // *Journal Neuroendocrinology*. – 2010. – Vol. 22, № 4. – P. 258–271.
14. **Cawley, N. X.** New roles of carboxypeptidase E in endocrine and neural function and cancer / N. X. Cawley, W. C. Wetsel, S. R. Murthy, J. J. Park, K. Pacak, Y. P. Loh // *Endocrine Reviews*. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 216–253.
15. **Вернигора, А. Н.** Выделение, частичная очистка, характеристика и тканевое распределение фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы кошки / А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин // *Биохимия*. – 2003. – Vol. 68, № 1. – С. 96–102.
16. **Fricker, L. D.** Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules / L. D. Fricker, S. H. Snyder // *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – Vol. 79. – P. 3886–3890.
17. **Lowry, O. H.** Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrought, A. G. Farr, R. J. Randall // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

References

1. **Kapoor, A.** Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male guinea pig offspring / A. Kapoor, S. G. Matthews // *Journal Physiology*. – 2005. – Vol. 566, № 3. – P. 967–977.
2. **Green, M. K.** Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress / M. K. Green, C. S. Rani, A. Joshi, A. E. Soto-Pina, P. A. Martinez, A. Frazer, R. Strong, D. A. Morilak // *Neuroscience*. – 2011. – № 192. – P. 438–451.
3. **Clarke, A. S.** Effects of prenatal stress on behavior in adolescent rhesus monkeys / A. S. Clarke, M. L. Schneider // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1997. – № 807. – P. 490–491.
4. **Meisel, R. L.** Effects of prenatal stress on avoidance acquisition, open-field performance and lordotic behavior in male rats / R. L. Meisel, G. P. Dohanich, I. L. Ward // *Physiology & Behavior*. – 1979. – Vol. 22, № 3. – P. 527–530.
5. **Nishio, H.** Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats-sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats / H. Nishio, S. Kasuga, M. Ushijima, Y. Harada // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 2001. – Vol. 19, № 1. – P. 37–45.
6. **Reznikov, A. G.** Early and long-term neuroendocrine effects of prenatal stress in male and female rats / A. G. Reznikov, N. D. Nosenko, L. V. Tarasenko, P. V. Sinitsyn, L. I. Polyakova // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2001. – Vol. 31, № 1. – P. 1–5.
7. **Garcia-Caceres, C.** Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats / C. Garcia-Caceres, N. Lagunas, I. Calmarza-Font, I. Azcoitia, Y. Diz-Chaves, L. M. Garcia-Segura, E. Baquedano, L. M. Frago, J. Argente, J. A. Chowen // *Psychoneuroendocrinology*. – 2010. – Vol. 35, № 10. – P. 1525–1535.
8. **Fride, E.** Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats / E. Fride, Y. Dan, J. Feldon, G. Halevy, M. Weinstock // *Physiology Behavioral*. – 1986. – Vol. 37, № 5. – P. 681–687.
9. **Takahashi, L. K.** Prenatal stress: consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function / L. K. Takahashi // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 1998. – Vol. 16, № 3–4. – P. 199–207.
10. **McCormick, C. M.** Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats / C. M. McCormick, J. W. Smythe, S. Sharma, M. J. Meaney // *Brain Research. Developmental Brain Research*. – 1995. – Vol. 84, № 1. – P. 55–61.
11. **Weinstock, M.** Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat / M. Weinstock, E. Matlina, G. I. Maor, H. Rosen, B. S. McEwen // *Brain Research*. – 1992. – Vol. 595, № 2. – P. 195–200.
12. **Ward, I. L.** Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress, or both factors / I. L. Ward, O. B. Ward, R. J. Winn, D. Bielawski // *Behavioral Neuroscience*. – 1994. – Vol. 108, № 6. – P. 1188–1195.
13. **Brunton, P. J.** Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects / P. J. Brunton, J. A. Russell // *Journal Neuroendocrinology*. – 2010. – Vol. 22, № 4. – P. 258–271.
14. **Cawley, N. X.** New roles of carboxypeptidase E in endocrine and neural function and cancer / N. X. Cawley, W. C. Wetsel, S. R. Murthy, J. J. Park, K. Pacak, Y. P. Loh // *Endocrine Reviews*. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 216–253.
15. **Vernigora, A. N.** Vydelenie, chastichnaya ochistka, kharakteristika i tkanevoe raspredelenie fenilmetilsul'fonilftorid-ingibiruemoy karboksipeptidazy koshki / A. N. Vernigora, M. T. Gengin // *Biokhimiya*. – 2003. – Vol. 68, № 1. – S. 96–102.

16. **Fricker, L. D.** Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenall chromaffin granules / L. D. Fricker, S. H. Snyder // Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1982. – Vol. 79. – P. 3886–3890.
17. **Lowry, O. H.** Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrought, A. G. Farr, R. J. Randall // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

Вернигора Александр Николаевич

кандидат биологических наук, доцент,
кафедра химии и теории и методики
обучения химии, Пензенский
государственный университет
(г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: vanvan7@yandex.ru

Vernigora Aleksandr Nikolaevich

Candidate of biological sciences, associate
professor, sub-department of chemistry
and theory and methods of teaching
chemistry, Penza State University
(Penza, 40 Krasnaya str.)

Волкова Наталия Валентиновна

кандидат биологических наук, доцент,
заведующая кафедрой химии и теории
и методики обучения химии, Пензенский
государственный университет
(г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: balikovan@mail.ru

Volkova Nataliya Valentinovna

Candidate of biological sciences, associate
professor, head of sub-department
of chemistry and theory and methods
of teaching chemistry, Penza State
University
(Penza, 40 Krasnaya str.)

УДК 577.156

Вернигора, А. Н.

Влияние стресса, перенесенного матерями во время беременности, на подвижность потомства в тесте «открытое поле» и активность карбоксипептидаз в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе крыс / А. Н. Вернигора, Н. В. Волкова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2013. – № 1 (1). – С. 144–150.