УДК 612.821.83:591.445:577.171.55

ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЯ ГОРМОНОВ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ И КОГНИТИВНОМ НАПРЯЖЕНИИ У МЫШЕЙ BALB/C

[1]Кондашевская М.В., [1]Мхитаров В.А., [2]Никольская К.А., [2]Серкова В.В., [1]Диатроптов М.Е.

[1]ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва;
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: mariluka@mail.ru

Установлено, что при пищевой депривации у мышей BALB/c наблюдается расширение функциональных зон коркового вещества надпочечников. Энергетический баланс при пищевой депривации поддерживается путем снижения в крови уровня тиреоидных (общий тироксин и трийодтиронин), половых гормонов (тестостерон), а также лептина и нейропептида Y при реципрокном повышении уровня грелина. Когнитивное напряжение, возникающее при выработке сложного пищедобывательного поведения, характеризуется уменьшением ширины функциональных зон коркового вещества, а также еще более значительным снижением уровня лептина и повышением уровня грелина, кроме того, в отличие от пищевой депривации нормализуется уровень тестостерона и повышается уровень кортикостерона. Выявлено отличие от данных других исследователей, полученных на простых поведенческих моделях: несмотря на получение пищи, уровень грелина повышался, а уровень лептина снижался.

Ключевые слова: мыши BALB/c, пищевая депривация, когнитивное напряжение, корковое вещество надпочечников, лептин, грелин, нейропептид Y, тиреоидные гормоны, тестостерон, кортикостерон

CHARACTERISTIC OF THE HORMONES LEVEL AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN ADRENAL CORTEX UNDER FOOD DEPRIVATION AND THE COGNITIVE TENSION IN MICE BALB/C

[1]Kondashevskaya M.V., [1]Mkhitarov V.A., [2]Nikolskaya K.A., [2]Serkova V.V., [1]Diatroptov M.E.

[1]Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Institute of Human Morphology» under Russian Academy of Medical Sciences, Moscow;
[2]Moscow State University of M.V. Lomonosov, Moscow, e-mail: mariluka@mail.ru

It's been defined, that BALB/c mice with food deprivation demonstrate an increase in the functional zones of the adrenal cortex. Energetic balance during food deprivation is supported by means of decreasing thyroid (common thyroxin anв triiodothyronin), sexual (testosterone), leptin and neuropeptid Y hormone levels in blood and by the reciprocal increase of ghrelin level. Cognitive tension, arising during complex foraging behavior is characterized by the decrease of the functional width of the cortical substance, and even more substantial decrease of the leptin level and ghrelin level increase. Besides, as opposed to food deprivation, the level of testosterone is normalized and corticosterone level is increased. It was revealed contrast to the data of other researchers finding's on simple behavioral models: despite getting food, ghrelin levels increased and decreased levels of leptin.

Keywords: BALB/c mice, food deprivation, cognitive load, adrenal cortex, leptin, ghrelin, neuropeptide Y, thyroid hormones, testosterone, corticosteron

Многие исследователи считают, что такие пептидные гормоны, как грелин, лептин и нейропептид Y, секретируемые на периферии и играющие важную роль в регуляции энергетического баланса и углеводного обмена, могут влиять на процессы обучения и памяти [8]. Аналогичными свойствами обладают гормоны надпочечников, щитовидной и половых желез [11]. Используя батарею простых поведенческих тестов (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, Т-лабиринт, лабиринт Морриса) на крысах и мышах показано, что грелин, нейропептид Y и лептин способствуют улучшению обучения, модулированию специфических молекулярных механизмов памяти приобретение/консолидации [6, 14].

Цель работы – исследовать морфофункциональное состояние коркового вещества надпочечников и уровень гормонов в крови мышей линии BALB/c, получавших пищу ad libitum, при пищевой депривации и при когнитивном напряжении в условиях сложной поведенческой модели.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 30 мышах-самцах линии BALB/c, масса тела 20–22 г (питомник «Столбовая»), которых содержали по 10 особей в отдельных клетках. Были сформированы 3 группы: 1 – интактные животные (получение пищи ad libitum); 2 – мыши, подвергаемые пищевой депривации (24 ч, через сут, референтная группа); 3 – животные, испытывающие когнитивное напряжение (обучение) на фоне пищевой депривации. Длительность

эксперимента 30 сут. Мышей выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира сразу после окончания обучения. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с регламентом использования лабораторных животных в ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, принятым и утвержденным комиссией по биоэтике.

Когнитивное напряжение создавалось при информационной нагрузке, возникающей при предъявлении животным сложной пищедобывательной задачи в многоальтернативном лабиринте (обучение), алгоритм решения которой представлял собой 4-звенную последовательность оперантных действий. При индивидуальном помещении в свободное поле животное должно было самопроизвольно войти в лабиринт → посетить одну или две подкрепляемые кормушки из четырех имеющихся (2 ложные) → самопроизвольно выйти в свободное поле через один из двух выходов для того, чтобы вновь, войдя в лабиринт, иметь возможность получить подкрепление в тех же кормушках. Подробное описание поведенческой модели имеется в ряде публикаций [2, 4]. Когнитивное напряжение осуществлялась на фоне пищевой депривации в течение 24 ч – в те же дни, что и у животных референтной группы, длительность опыта составляла 13 мин.

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна, левые надпочечники проводили по спиртам восходящей концентрации, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мк окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи морфометрической программы «AxioVision», на микрофотографиях экваториальных срезов надпочечников, полученных с помощью микроскопа «Axioscope 2», производили на каждом срезе не менее 65 измерений сетчатой, пучковой и клубочковой зон коркового вещества.

Используя микропланшетный иммуноферментный анализатор «ANTHOS 2010» (Австрия), определяли уровень грелина, лептина, нейропептида Y «Cusabio biotech. co., LTD» (Китай), кортикостерона «IBL» (Германия), тестостерона «DBC» (Канада), общего трийодтиронина (T3) и общего тироксина (T4) «Monobind Inc.» (США) в крови.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программного обеспечения Statistica 6.0. (StatSoft Inc., США). Проверка распределения вариационного ряда полученных данных на нормальность (Shapiro-Wilk'S test) позволила применить параметрический метод статистического анализа. Сравнение экспериментальных групп производили при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На качественном уровне общий план строения коркового вещества надпочечников всех групп мышей BALB/c был сходным. По данным морфометрического исследования, у мышей, подвергавшихся пищевой депривации (референтная группа), наблюдалось увеличение ширины клубочковой и сетчатой зон коркового вещества на 6,5 и 9,5% соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными (рис. 1, 2).

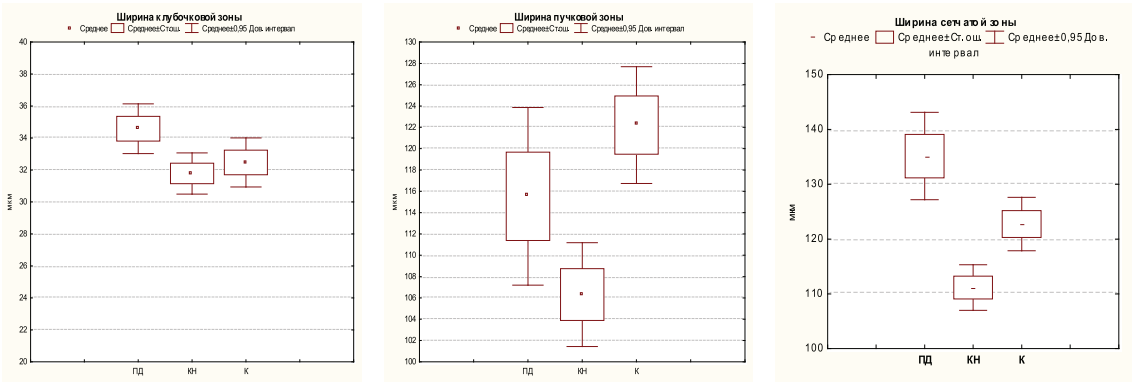

Рис. 1. Показатели ширины клубочковой, пучковой и сетчатой зоны надпочечников интактных мышей («сытый фон», К) BALB/c, при пищевой депривации («голодный фон», ПД) и когнитивном напряжении (КН) в мкм

Реакция на когнитивное напряжение выражалась у мышей в достоверно значимом уменьшении ширины коркового вещества надпочечников на 22,7%, проявлявшемся в снижении ширины всех функциональных зон: клубочковой зоны – на 11,9%, пучковой зоны – на 10,7%, сетчатой зоны – на 21,6% по сравнению с референтной группой (рис. 1, 2). На качественном уровне отличие от референтной группы наблюдалось на границе сетчатой зоны и мозгового вещества, где отмечалось разрыхление соединительнотканных тяжей.

Животные всех 3-х групп не имели статистически значимых различий по массе тела.

Исследование уровня гормонов, характеризующих энергетическое состояние организма мышей BALB/c, позволило выявить ряд особенностей, характерных для каждой группы. По уровню грелина в крови животных, испытавших пищевую депривацию и получавших пищу ad libitum, не выявлено

статистически значимых отличий (рис. 3). В то же время в крови мышей, подвергавшихся когнитивному напряжению, отмечено повышение уровня грелина в 1,5 раза ($p < 0,001$) по сравнению с животными референтной группы (рис. 3).

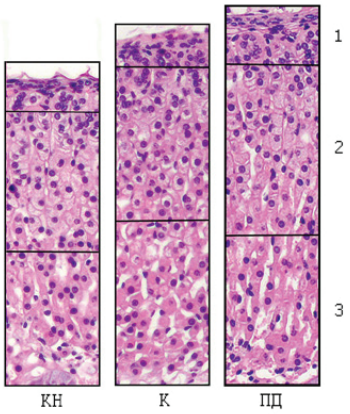

Рис. 2. Корковое вещество надпочечника интактных («сытый фон», К) мышей BALB/c, при пищевой депривации («голодный фон», ПД) и когнитивном напряжении (КН), Ув.х100: 1 – клубочковая зона, 2 – пучковая зона, 3 – сетчатая зона

Достоверно значимое по сравнению с интактными мышами снижение уровня лептина в 1,3 раза и нейропептида Y – в 1,5 раза определено в крови животных после пищевой депривации (рис. 3). По сравнению с референтной группой животных в крови мышей, обучавшихся в многоальтернативном лабиринте, наблюдалось достоверно значимое снижение уровня лептина в 1,5 раза. Между последними двумя группами не наблюдалось статистически значимых различий по уровню нейропептида Y (рис. 3).

Уровень кортикостерона в крови мышей, испытавших пищевую депривацию, статистически значимо не отличался от такового группы, получавшей пищу ad libitum (рис. 3). Тогда как уровень этого гормона в крови мышей, подвергавшихся когнитивному напряжению, был в 1,3 раза выше ($p < 0,05$) по сравнению с животными референтной группы (рис. 3).

По сравнению с интактными мышами после пищевой депривации у животных наблюдалось достоверно значимое снижение уровня тестостерона, в то же время значения этого показателя не отличались от таковых группы мышей, подвергавшихся когнитивному напряжению (рис. 3).

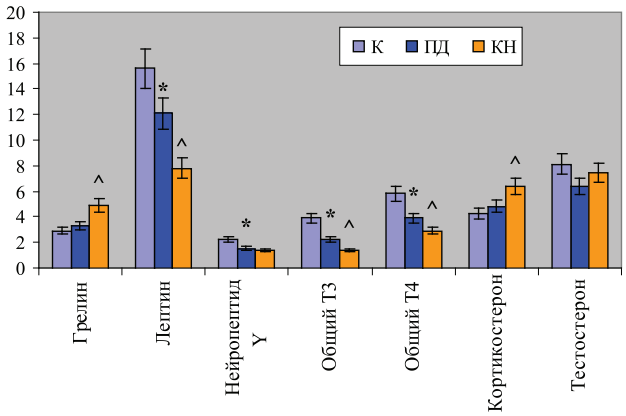

*Рис. 3. Зависимость реакции гормонов от функционального состояния организма: «сытый фон»(интактные мыши, К), «голодный фон» (пищевая депривация, ПД) и когнитивное напряжение (КН) у мышей линии BA1B/c в нмоль/л. Значения грелина, лептина, общего тироксина (Т4) и кортикостерона приведены с коэффициентом 10^{-2}, нейропептида Y – с коэффициентом 10; вертикальная черта – доверительный интервал в соответствие с коэффициентом Стьюдента 0,05; * – ПД в сравнении с К («сытый фон»), ^ – КН в сравнении с ПД («голодный фон»)*

Каждая зона коркового вещества адреналовых желез имеет специфическую структуру и секретирует присущие ей гормоны, что достигается благодаря дифференциальной генной активности [3]. На основании полученных нами данных можно заключить, что воздействие пищевой депривации и когнитивного напряжения отразилось противоположным образом на функциональном состоянии практически всех зон коркового вещества надпочечников: клубочковой зоны, в эндокриноцитах которой вырабатываются минералокортикоиды (преимущественно альдостерон и 11-дезоксикортикостерон); пучковой зоны, где образуются глюкокортикоидные гормоны (кортикостерон, кортизон и гидрокортизон); сетчатой зоны, эндокриноциты которой синтезируют

половые гормоны, преимущественно адреналовые андрогены – дигидроэпиандростерон и его сульфат [3].

После 30-суточного периодического воздействия пищевой депривации отмечено увеличение ширины клубочковой и, в б**о**льшей мере, сетчатой зоны. В наших экспериментах мы не определяли уровень основных минералокортикоидов альдостерона и 11-дезоксикортикостерона, секретируемые адренокортикоцитами клубочковой зоны. Дегидроэпиандростерон и его сульфат, секретируемые адренокортикоцитами сетчатой зоны, являются предшественниками тестостерона, андростендиона, эстрадиола и эстрона [3]. В наших экспериментах наблюдалось снижение уровня тестостерона у мышей, подвергавшихся пищевой депривации.

При когнитивном напряжении происходило уменьшение ширины всех функциональных зон коркового вещества надпочечников, что свидетельствует об интенсификации выделения указанных выше гормонов [12], из которых в наших экспериментах было определено лишь повышение уровня кортикостерона (на 33,4 %) в крови мышей, испытавших информационную нагрузку. Глюкокортикоиды, к которым относится кортикостерон, являются универсальными регуляторами метаболизма, производящими переключение пластических процессов на энергетические. Ускорение глюконеогенеза под влиянием глюкокортикоидов обусловливает значительно меньшую потерю гликогена [3].

Следует отметить, что в работах других авторов при моделировании холодового и иммобилизационного стресса у мышей BALB/c и других видов животных зарегистрировано гораздо более значительное повышение уровня кортикостерона – на 100 и 180 % соответственно, сопровождавшееся стресс-индуцированным снижением уровня тестостерона [1, 5]. В наших экспериментах уровень тестостерона снижался у группы мышей, подвергавшихся пищевой депривации, однако не столь значительно, как при стрессе.

По данным литературы известно, что кроме указанных выше изменений, при стрессе отмечается повышение в крови уровня нейропептида Y и тиреоидных гормонов (T3 и T4) [9, 15]. Однако в наших экспериментах в крови мышей, подвергавшихся пищевой депривации и когнитивному напряжению, зарегистрировано снижение уровня нейропептида Y и тиреоидных гормонов (T3 и T4). Известно, что при ограничении пищи снижение уровня тиреоидных гормонов в крови способствует замедлению потери массы тела [13].

Грелин, лептин и нейропептид Y как у грызунов, так и у человека имеют решающее значение в регуляции уровня глюкозы, служат связующим звеном между периферией и ЦНС. По данным литературы, при насыщении пищей уровень грелина обычно снижается, тогда как уровень лептина возрастает [7]. В наших экспериментах когнитивное напряжение, осуществляющееся на фоне пищевой депривации, усилило энергетические затраты, что привело к снижению уровня лептина и реципрокному возрастанию уровня грелина. Следует отметить, что уровень грелина у этой группы мышей оказался выше, а лептина – ниже, чем у животных после одной только пищевой депривации, несмотря на то, что в лабиринтной среде животные получали немного пищи, что может служить косвенным доказательством причастности этих гормонов к когнитивному процессу. Наши данные совпадают с гипотезой, выдвинутой D.I. Briggs и Z.B. Andrews, считающих, что в поддержании гомеостаза в условиях дефицита энергии наиважнейшую роль играет грелин [10].

Таким образом, установлено, что при пищевой депривации и при когнитивном напряжении, у мышей BALB/c происходит изменение морфофункционального состояния коркового вещества надпочечников и уровня гормонов участвующих в регуляции энергетического баланса. Эффекты когнитивного напряжения, происходящего на фоне пищевой депривации, отличаются от действия только лишь пищевой депривации, а также от стрессорных воздействий. При пищевой депривации наблюдается расширение функциональных зон коркового вещества, энергетический баланс поддерживается путем снижения в крови уровня тиреоидных и половых гормонов, а также лептина и нейропептида Y при реципрокном повышении уровня грелина. Когнитивное напряжение характеризуется уменьшением ширины функциональных зон коркового вещества, еще более значительным снижением уровня лептина и повышением уровня грелина, кроме того, в отличие от пищевой депривации нормализуется уровень тестостерона и повышается уровень кортикостерона.

Список литературы

1. Абдулаева С.О. Морфологическая характеристика слизистой оболочки толстой кишки и микробиоты у мышей Balb/c при адаптации к холодовому воздействию // Морфологич. Ведомости. – 2011. – № 2. – С. 9–13.

2. Костенкова В.Н., Никольская К.А. Психоэмоциональные проявления у гиппокампэктомированных крыс // Росс. физиол. журн. – 2003. – Т. 89, № 7. – С. 868–878.

3. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Колдышева Е.В., Молодых О.П. Надпочечники: Ультраструктурная реорганизация при экстремальных воздействиях и старении. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 336 с.

4. Никольская К.А., Кондашевская М.В. Психостимулирующие эффекты высокомолекулярного гепарина при внутрибрюшинном введении крысам линии Вистар / К.А. Никольская, М.В. Кондашевская // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2001. – Т. 51, № 2. – С. 63–69.

5. Механизмы нейроиммунных взаимодействий при стрессе и подходы к их коррекции / Е.Г. Рыбакина, С.Н. Шанин, Е.Е. Фомичева, Т.А. Филатенкова, Е.В. Дмитриенко, Э.Н. Каплина // Фундамент. исслед. – 2012. – № 2. – С. 120–123.

6. Albarran-Zeckler R.G., Brantley A.F., Smith R.G. Growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) knockout mice exhibit improved spatial memory and deficits in contextual memory // Behav. Brain Res. – 2012. – Vol. 232, № 1. – P. 13–19.

7. Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP. Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats // Endocrinol. – 2002. – Vol. 143, № 2. – P. 726–729.

8. Banks W.A., Tschöp M., Robinson S.M., Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2002. – Vol. 302, № 2. – P. 822–827.

9. Belyakova E.I., Mendzheritskii A.M. Adrenocortical and thyroid systems of rats during the initial period of nociceptive influences // Neurosci. Behav. Physiol. – 2006. – Vol. 36, № 5. – P. 561–564.

10. Briggs D.I., Andrews Z.B. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis // Neuroendocrinol. – 2011. – Vol. 93, № 1. – P. 48–57.

11. Jahagirdar V., McNay E.C. Thyroid hormone's role in regulating brain glucose metabolism and potentially modulating hippocampal cognitive processes // Metab. Brain Dis. – 2012. – Vol. 27, № 2. – P. 101–111.

12. Koko V., Djordjeviae J., Cvijiae G., Davidoviae V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study // J. Exp. Biol. – 2004. – Vol. 207, № Pt 24. – P. 4225–4230.

13. Maglich J.M., Watson J., McMillen P.J., Goodwin B., Willson T.M., Moore J.T. The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, № 19. – P. 19832–19838.

14. Thorsell A., Michalkiewicz M., Dumont Y., Quirion R., Caberlotto L., Rimondini R., Mathé A.A., Heilig M. Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2000. – Vol. 97, № 23. – P. 12852–12857.

15. Zhang K., Rao F., Miramontes-Gonzalez J.P., et al. Neuropeptide Y (NPY): genetic variation in the human promoter alters glucocorticoid signaling, yielding increased NPY secretion and stress responses // J. Am. Coll. Cardiol. – 2012. – Vol. 60, № 17. – P. 1678–1689.

References

1. Abdulaeva S.O. *Morfologich. Vedomosti*, 2011, no. 2, pp. 9–13.

2. Kostenkova V.N., Nikol'skaja K.A. *Ross. fiziol. zhurn.*, 2003, T. 89, no. 7, pp. 868–878.

3. Lushnikova E.L., Nepomnjashhih L.M., Koldysheva E.V., Molodyh O.P. *Nadpochechniki: Ul'trastrukturnaja reorganizacija pri jekstremal'nyh vozdejstvijah i starenii.* Moscow, Izd-vo RAMN, 2009. 336 p.

4. Nikol'skaja K.A., Kondashevskaja M.V. *Zhurn. vyssh. nervn. dejatel'nosti*, 2001, T. 51, no. 2, pp. 63–69.

5. Rybakina E.G., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Filatenkova T.A., Dmitrienko E.V., Kaplina Je.N. *Fundament. issled.,* 2012, no. 2, pp. 120–123.

6. Albarran-Zeckler R.G., Brantley A.F., Smith R.G. *Behav. Brain Res.*, 2012, Vol. 232, no. 1., pp. 13–19.

7. Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP. *Endocrinol.*, 2002, Vol. 143, no. 2, pp. 726–729.

8. Banks W.A., Tschöp M., Robinson S.M., Heiman ML. *Journal Pharmacol. Exp. Ther.,* 2002, Vol. 302, no. 2, pp. 822–827.

9. Belyakova E.I., Mendzheritskii A.M. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2006, Vol. 36, No. 5, pp. 561–564.

10. Briggs D.I., Andrews Z.B. *Neuroendocrinol.,* 2011, Vol. 93, Np. 1, pp. 48–57.

11. Jahagirdar V., McNay E.C. *Metab. Brain Dis.*, 2012, Vol. 27, No. 2, pp. 101–111.

12. Koko V., Djordjeviae J., Cvijiae G., Davidoviae V. *Journal Exp. Biol.*, 2004, Vol. 207, no. Pt 24, pp. 4225–4230.

13. Maglich J.M., Watson J., McMillen P.J., Goodwin B., Willson T.M., Moore J.T. *Journal Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 19, pp. 19832–19838.

14. Thorsell A., Michalkiewicz M., Dumont Y., Quirion R., Caberlotto L., Rimondini R., Mathé A.A., Heilig M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2000, Vol. 97, No. 23, pp. 12852–12857.

15. Zhang K., Rao F., Miramontes-Gonzalez J.P., et al. *Journal Am. Coll. Cardiol.*, 2012, Vol. 60, no. 17, pp. 1678–1689.

Рецензенты:

Яглов В.В., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы, ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, г. Москва;

Гореликов П.Л., д.м.н., заведующий лабораторией нейроморфологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 05.09.2013.