

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им.И.П.ПАВЛОВА**

На правах рукописи

**Притворова
Анастасия Вадимовна**

**«Взаимосвязь индивидуально-типологических особенностей
поведения крыс и окислительной модификации белков головного
мозга в условиях стресса»**

Специальность: 03.03.01 - физиология

**Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

**Научный руководитель –
Доктор биологических наук
Ордян Н.Э.**

**Санкт-Петербург
2018**

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Современные представления об индивидуальных типологических особенностях поведения.....	12
1.2. Современные представления о стрессе и стрессореактивности.....	17
1.3. Нейробиологические корреляты индивидуальных отличий поведения.....	20
1.3.1 Стрессореактивность гипофизарноадреналовой системы и ИТОП.....	20
1.3.2 Стрессореактивность симпатoadреналовой системы и ИТОП.....	22
1.4. Окислительный метаболизм мозга, гипоталамо-гипофизарноадреналовая система и ИТОП.....	25
1.5. Свободнорадикальное окисление и стрессореактивность.....	28
1.5.1. Окислительный стресс и роль АФК.....	28
1.5.2. Антиоксидантная система и ее роль в регуляции редокс-баланса.....	32
1.5.2.1. Супероксиддисмутаза.....	32
1.5.2.2. Глутатион и глутатионовые ферменты антиоксидантной защиты (глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза).....	34
1.6. Свободнорадикальное окисление и головной мозг.....	36
1.6.1. Маркеры окислительного стресса в структурах головного мозга и их связь с ИТОП.....	38
1.6.2. Участие ОМБ и АОС в регуляции стресс-реакции в разных моделях стресса и ИТОП.....	42
1.6.3. Пренатальный стресс, поведение и участие прооксидантной и антиоксидантной систем в стрессореактивности пренатально стрессированных потомков.....	45
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1. Экспериментальные животные.....	48
2.1.1. Крысы, отобранные по поведенческим характеристикам.....	48
2.1.2. Пренатально стрессированные крысы.....	48
2.2. Методы оценки индивидуальных различий поведения.....	49
2.3. Моделирование пренатального стресса.....	51
2.4. Моделирование посттравматического стрессового расстройства.....	51

2.5. Исследование влияния пренатального стресса на динамику стрессореактивности редокс-системы в структурах головного мозга (кора, гипоталамус, гиппокамп, стриатум) и сыворотке крови.....	53
2.6. Отбор и подготовка образцов ткани и крови.....	53
2.7. Определение продуктов окислительной модификации белков (ОМБ).....	54
2.8. Определение активности цитозольной Zn-Cu-супероксиддисмутазы.....	57
2.9. Методы изучения глутатионового звена антиоксидантной системы.....	59
2.9.1. Определение общего количества тиоловых SH- групп белков.....	59
2.9.2. Определение активности глутатионпероксидазы.....	60
2.9.3. Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	61
2.9.4. Определение активности глутатионредуктазы.....	62
2.10. Статистические методы.....	63
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	64
3.1. Поведение и состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в неокортке, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у крыс с различными типологическими характеристиками поведения в норме.....	64
3.1.1. Параметры поведения активных и пассивных крыс в тесте Т-образный лабиринт.....	64
3.1.2. Окислительная модификация белков у крыс с различными характеристиками поведения в неокортке, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме	65
3.1.3. Состояние антиоксидантной системы у крыс с различными характеристиками поведения в неокортке, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме	67
3.1.4. Окислительная модификация белков в сыворотке крови у крыс с различными характеристиками поведения.....	69
3.1.5. Состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови у крыс с различными характеристиками поведения.....	69
3.2. Изменение поведения и состояния прооксидантной и антиоксидантной систем в неокортке, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у крыс с различными типологическими характеристиками поведения в модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).....	70
3.2.1. Параметры поведения у крыс с различными типологическими характеристиками поведения в тесте Т-образный лабиринт после ПТСР-подобного воздействия.....	70
3.2.2. Окислительная модификация белков в неокортке, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме у крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.....	72

3.2.3. Состояние антиоксидантной системы в неокортексе и гиппокампе у крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.....	74
3.2.4. Окислительная модификация белков в сыворотке крови у крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.....	76
3.2.5. Состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови у крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.....	77
3.3. Поведение и состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у пренатально стрессированных (ПС) крыс	78
3.3.1. Параметры поведения ПС крыс в тесте Т-образный лабиринт	78
3.3.2. Показатели временной динамики изменений ОМБ в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у интактных и ПС крыс при воздействии 20-минутного иммобилизационного стресса	79
3.3.3. Показатели временной динамики изменений активности СОД и количества -SH групп в сыворотке крови у интактных и ПС крыс при воздействии 20-минутного иммобилизационного стресса.....	85
3.3.4. Окислительная модификация белков в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови ПС крыс в модели ПТСР	86
3.3.5. Состояние антиоксидантной системы в неокортексе, гиппокампе и сыворотке крови ПС крыс в модели ПТСР.....	88
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	90
5. ВЫВОДЫ.....	109
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ	-адренокортикотропный гормон
АОС	-антиоксидантная система
АФК	-активные формы кислорода
БТШ	-белки теплового шока
ГГАС	-гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система
ИТОП	- индивидуально типологические особенности поведения
ДА	-дофамин
МДА	-малоновый диальдегид
ОМБ	-окислительная модификация белков
ПКЛ	-приподнятый крестообразный лабиринт
ПС	-пренатальный стресс
ПТСР	-посттравматическое стрессовое расстройство
ПОБ	-перекисное окисление белков
СОД	-Zn-Cu-супероксиддисмутаза
САС	-симпато-адреналовая система
ПОЛ	-перекисное окисление липидов
ПНЖК	-полиненасыщенные жирные кислоты
ТБК	-тиобарбитуровая кислота
CRF	-кортиколиберин
GPx	-глутатионпероксидаза
GST	-глутатион-S-трансфераза
GR	-глутатионредуктаза
NOX4	-NADPH-оксидаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Проблема взаимосвязи поведения человека или животного с особенностями их реакции на внешние стрессорные воздействия остается одним из актуальных направлений современной физиологии. Усиление стрессогенности окружающей среды, социальной напряженности, числа природных и гуманитарных катастроф и, как следствие увеличение числа психических расстройств, придают особую значимость изучению нейрохимических процессов, лежащих в основе приспособительного поведения, и факторов, вызывающих его нарушение. Несмотря на то, что физиология и механизмы реализации стресса исследуются на протяжении многих десятков лет, начиная с первой публикации Ганса Селье об общем адаптационном синдроме в 1936 г. (Селье, 1960), индивидуальная детерминированность стрессореактивности и развития постстрессорной психопатологии остается малопрогнозируемой. Препятствием к пониманию этой важнейшей проблемы является недостаточная экспериментальная разработка данной темы.

Большое количество исследований стрессореактивности основывается на той точке зрения, что индивидуальные свойства структур головного мозга и преобладание активности одних структур над другими являются основополагающими для типологических свойств нервной системы и играют определяющую роль в том, как организм будет реагировать на стресс, и как он будет адаптироваться в определенных стрессовых ситуациях (Небылицын, 1968; Eysenck, 1971; Gray, 1972, Симонов, 2004). Изучение нейрохимических свойств структур головного мозга, отвечающих за индивидуально типологические особенности поведения (ИТОП), позволит глубже понять механизмы адаптивных реакций и выявить новые дифференцированные подходы в профилактике и лечении патологических состояний нервной системы.

Хорошо известно, что стресс нарушает не только клеточный гомеостаз, но и окислительно-восстановительный баланс клетки (Halliwell, Gutteridge, 2007, Scandalios, 2002). Нарушение окислительно-восстановительного баланса, известное как окислительный стресс, сопровождает различные патологические состояния, в том числе и расстройства психики, способствует ускоренному старению и подвергает деструктивным изменениям различные системы организма, в том числе нервную систему (Арутюнян, Козина, 2009; Хужахметова, Теплый, 2016; Floyd, Hensley, 2002; Emerit et al., 2004, Korenevky et al., 2017; Schiavone et al., 2013; Novatta et al., 2010; Li et al., 2013;). В то же время известна роль окислительного стресса как участника

адаптивных процессов организма к стрессорным условиям (Halliwell, Gutteridge, 2007; Дубинина, 2006). Окислительный стресс активирует пролиферацию, дифференциацию и апоптоз клеток при адаптации организма. В силу своей функциональной и метаболической активности мозг обладает повышенной чувствительностью к состоянию окислительного стресса. Уже известные молекулярные механизмы, лежащие в основе индивидуальных типологических особенностей поведения позволяют уверенно говорить о вовлечении прооксидантной и антиоксидантной систем в формирование ИТОП (Гуляева, 1989, Степаничев, 1996, Перцов и др., 2011). Несмотря на то, что в аспекте индивидуально-типологических особенностей поведения активно изучаются процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы, исследование окислительной модификации белков (ОМБ) в данной области не предпринималось, хотя ОМБ рассматривается как один из ранних и надежных маркеров окислительного стресса (Дубинина, 2006, Caraceni et al., 1997; Halliwell, 1992; Вьюшина и др., 2012а, Мажитова и др., 2012).

Предполагается что, окислительный стресс играет важную роль в нейродегенеративных психопатологиях и, в частности, в посттравматическом стрессовом расстройстве, ПТСР (Miller, Sadeh, 2014). ПТСР может приводить к ускоренному клеточному старению и ухудшает когнитивные функции (Wolf et al, 2016). ПТСР определяется исследователями как столкновение с непереносимой реальностью (Смулевич, 2001, Волошин, 2005, Тарабрина, 2007). Психотравмирующее событие определенной модальности может привести к аллостатической перегрузке одних индивидуумов, а другим позволит остаться в состоянии гомеостаза. Изучение окислительно-восстановительных процессов у групп с различными типологиями поведения в модели ПТСР является важным для оценки дальнейшего развития патологий и предупреждения нейродегенеративных заболеваний при воздействии психотравмирующих ситуаций.

Индивидуальные особенности поведения и стрессореактивности, являясь генетически детерминированными, тем не менее, подвержены значительной модификации в ранние периоды онтогенеза. Накоплен большой массив данных по проблеме пренатального стресса (ПС), которые свидетельствуют о выраженных изменениях у пренатально стрессированных индивидуумов не только поведенческих реакций в стрессорных условиях, но также изменений адаптивных способностей (Vallee et al., 1997, Shoener et al., 2006, Ордян, Пивина, 2003), увеличивая предрасположенность потомков стрессированных матерей к различным психопатологиям (Darnaudery, Maccari, 2008, Weinstock, 2005, Weinstock 2007). Многими экспериментальными

исследованиями, выполненными на лабораторных животных, подтверждается предположение о том, что ПС приводит к модификации функциональной активности мозга и, как следствие, является причиной разнообразных поведенческих нарушений (Отеллин и др., 2007). В нашей лаборатории исследования, выполненные ранее, убедительно показали, что у пренатально стрессированных крыс при моделировании ПТСР поведенческие и гормональные проявления ПТСР-подобного состояния более глубокие и сохраняются дольше, чем у контрольных животных (Ордян и др., 2013, Ордян и др., 2014). Обнаружено также, что ПС вызывает нарушения процессов окислительной модификации белков в онтогенетическом развитии структур головного мозга, участвующих в формировании поведенческих стресс-ответов (Вьюшина и др., 2012b). В связи с этим представляет интерес изучение процессов ОМБ в головном мозге и состояния антиоксидантной системы пренатально стрессированных животных в норме и в модели ПТСР, а также сопоставление выявленных изменений с группами животных, различающихся индивидуально-типологическими особенностями поведения.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы являлось исследование уровня окислительной модификации белков и активности антиоксидантной системы в различных структурах мозга в норме и при моделировании посттравматического стрессового расстройства у крыс с различными индивидуально-типологическими характеристиками поведения, а также у животных с фенотипом, измененным в результате стрессорного воздействия в пренатальный период развития.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать уровень окислительной модификации белков, активность ферментов антиоксидантной системы и количество тиоловых групп белков в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме у крыс с различными типологическими характеристиками поведения в норме.
2. Изучить изменения уровня окислительной модификации белков, активности ферментов антиоксидантной системы и количество тиоловых групп белков в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме крыс с различными характеристиками поведения при моделировании посттравматического стрессового расстройства.
3. Определить окислительную модификацию белков, активность ферментов антиоксидантной системы и количество тиоловых групп белков в сыворотке крови у

крыс с различными характеристиками поведения в норме и в модели посттравматического стрессового расстройства с целью изучения состояния редокс-системы на уровне организма в целом.

4. Исследовать влияние пренатального стресса на показатели окислительной модификации белка в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме у крыс в динамике стрессорного ответа и в модели посттравматического стрессового расстройства. Провести аналогичные исследования в сыворотке крови.

Положения, выносимые на защиту

1. У крыс, имеющих различия в индивидуально-типологических особенностях поведения в тесте Т-образный лабиринт, уровень окислительной модификации белков и активность антиоксидантных ферментов в структурах мозга и сыворотке крови различаются.

2. Механизмы формирования ПТСР-подобного состояния зависят от индивидуально-типологических особенностей поведения и связаны с процессами окислительных модификаций белков в структурах мозга.

3. Пренатальный стресс оказывает специфическое влияние на формирование стресс-реакции редокс-системы мозга и организма в целом и вызывает характерные изменения уровня окислительных модификаций белков при формировании ПТСР-подобного состояния.

Научная новизна

В данной работе впервые установлено что крысы, имеющие индивидуально-типологические особенности поведения (ИТОП) в тесте Т-образный лабиринт, в норме различаются по показателям уровня окислительной модификации белка и активности антиоксидантных ферментов. Данные показатели имеют различия как в структурах мозга, отвечающих за регуляцию поведения, так и в сыворотке крови. Установлено, что уровень окислительной модификации белков у активных крыс более высокий по сравнению с пассивными крысами. Различия в активности антиоксидантных ферментов имеют в каждой из изученных структур мозга свою специфику.

Впервые проведено исследование изменений показателей окислительной модификации белков у крыс с различными ИТОП в модели посттравматического стрессового расстройства в коре, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови. Показано что у пассивных крыс в неокортексе, гипоталамусе и стриатуме уровень спонтанной окислительной модификации белков растет, а у активных крыс в

неокортексе и гипоталамусе падает. В сыворотке крови у пассивных крыс уровень спонтанной окислительной модификации растет, а у активных крыс снижается.

Впервые показано, что пренатальный стресс оказывает влияние на уровень окислительной модификации белков структур мозга в динамике стрессорного ответа. У пренатально стрессированных крыс повышение уровня окислительной модификации белков в ответ на стрессорное воздействие сдвигается на более поздние сроки по сравнению с контрольными крысами. Кроме того, пренатальный стресс вносит специфические изменения в процессы окислительных модификаций белков в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и сыворотке крови в модели посттравматического стрессового расстройства.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные материалы позволяют расширить представления о влиянии индивидуально-типологических особенностей поведения на конечный результат развития психотравмирующей ситуации в модели ПТСР и о роли окислительно-восстановительных процессов в типологических особенностях нервной системы и всего организма в целом, а также расширить представления о воздействии материнского стресса на поведенческие и нейрохимические характеристики потомства. С практической точки зрения, полученные данные вносят вклад в понимание различных механизмов формирования постстрессовых расстройств и позволяют разрабатывать профилактические и лечебные мероприятия, направленные на нормализацию редокс-баланса нервной системы и всего организма в целом при воздействии стрессорных нагрузок различного генеза у индивидуумов с разными типологическими особенностями поведения.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на конференции: Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург – Колтуши, 2014), Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы Высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем» (Санкт-Петербург-Колтуши, 2015), 13 международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2017), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Стресс: физиологические, патологические последствия и способы их предотвращения» (Санкт-Петербург, 2017)

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке экспериментов, получении, обработке и анализе экспериментальных данных. Интерпретация экспериментальных данных выполнена лично автором, подготовка основных публикаций по результатам работы проводилась при его непосредственном участии.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ: 5 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК и 9 работ в сборниках и материалах научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов, их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, включающих 26 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 313 работ.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Современные представления об индивидуальных типологических особенностях поведения.

Проблема устойчивости к различного рода стрессорным воздействиям является одной из основных проблем современности. Несмотря на то, что большое количество исследований посвящено физиологическим и нейробиологическим механизмам стресса, об индивидуальной детерминированности стрессоустойчивости организмов известно недостаточно. При исследовании постстрессовых расстройств у людей возникает вопрос: почему одна и та же психотравмирующая ситуация у одних вызывает психические расстройства, а у других – нет? Что может являться фактором, предрасполагающим к развитию психопатологий. В литературе указывается на вовлеченность в механизмы формирования этих расстройств генетических, эпигенетических и онтогенетических факторов (Yehuda, 2001; Yehuda, Bierer, 2009; Yehuda et al., 2011). Говорится о роли, которую играет пренатальный стресс в предрасположенности к развитию ПТСР и депрессии (Ордян и др, 2013, Ордян и др. 2014). Как пишет в своих исследованиях П.В.Симонов (2004) «Конечный результат психотравмирующей ситуации определяется индивидуальными (типологическими) особенностями человека».

Современные представления об индивидуальных особенностях поведения заложены И.П.Павловым и его школой. И.П.Павлов в своих работах (Павлов, 1954) на собаках сделал выводы о том, что существуют следующие, общие для всех исследованных животных свойства нервной системы: 1 – сила основных нервных процессов - раздражение и торможение, 2 – равновесие этих процессов и 3 – их подвижность. И.П.Павлов утверждал, что эти свойства «обуславливают высшее приспособление животного организма к окружающим условиям или, иначе говоря, совершенное уравновешение организма как системы с внешней средой, т.е. обеспечивают существование организма». Далее И.П.Павлов связывал различные сочетания свойств нервной системы с таким понятием как темперамент, называя его типом ВНД, и говорил о роли этих типов в «генезисе нервных и так называемых душевных заболеваний» и о том, что определенные типы ВНД имеют характерные изменения при патологических состояниях.

Рассматривая проблемы индивидуальных различий И.П.Павлов, выделял два уровня, которые условно можно представить в виде микроуровня и макроуровня. Микроуровень – это свойства процессов возбуждения и торможения нервных клеток, т.е. их сила, уравновешенность и подвижность. Макроуровень – это взаимодействие

макроструктур, т.е. различных функционально специализированных отделов головного мозга.

Учение И.П.Павлова о типах нервной системы было развито его учениками Б.М.Тепловым (1985) и В.Д.Небылицыным (1976, 1982) применительно к человеку. Б.М.Теплов говорил о двух основных компонентах структуры индивидуальных различий – 1) динамическая природа темперамента и 2) предпосылки способностей и о том, что эти компоненты определяются свойствами нервной системы. Б.М.Теплов предложил трехфакторную структуру темперамента, которая состоит из следующих компонентов: 1) эмоциональная возбудимость, 2) выражение эмоций, 3) общая быстрота движений (Теплов, 1985). Было показано, что представители разных типов нервной системы решают одни и те же задачи в равной степени успешно, только каждый из них использует свою тактику поведения. В этом состояло эволюционное значение разнообразия темпераментов (Симонов, 2004).

Ученик Б.М.Теплова - В.Д.Небылицын предложил понятие общих свойств нервной системы, среди которых выделил активность и эмоциональность. Под активностью индивида он подразумевал как «общую психическую активность», так и «функцию двигательного аппарата», а эмоциональность представляла собой комплекс свойств и качеств, «характеризующих особенности возникновения, протекания и прекращения разнообразных чувств и настроений» (Небылицын, 1982). Ученый считал, что в основе активности лежат индивидуальные особенности взаимодействия активирующей ретикулярной формации мозгового ствола и передних отделов неокортекса, а эмоциональность определяется индивидуальными особенностями взаимодействия передних отделов новой коры и лимбической системой головного мозга (Небылицын, 1976).

К сходным представлениям о морфофизиологических основах типологии человека пришли английские исследователи Г.Айзенк и Д.Грей (Eysenck, 1981; Gray, 1972). Г.Айзенк выделил три основных параметра поведения: экстра-интроверсивность, эмоциональную устойчивость и, противостоящий ей невротизм; психотицизм и противостоящее ему устойчивое следование социальным нормам. В основе экстра- интроверсии по мнению Г.Айзенка лежат индивидуальные особенности взаимодействия активирующей ретикулярной формации и передних отделов новой коры (Eysenck, 1971; Eysenck, 1981). Степень невротизма у Г.Айзенка определяется индивидуальными особенностями взаимоотношений лимбических структур с образованиями новой коры. Ученик Г.Айзенка Дж.Грей также как и его учитель считал, что индивидуальные различия определяются взаимоотношением разных систем мозга.

Грей также полагал, что экстраверты более чувствительны к поощрению, а интроверты – к наказанию (Gray, 1981; Gray, 1982). У интроверта, по мнению Грея, более развита септогиппокампальная система, тормозящая поведение; у экстраверта – латеральный гипоталамус/медиальный пучок переднего мозга – возбуждающая система. Теория Грея о поведенчески подавляющей системе (BIS), поведенчески активирующей системе (BAS) и системе борьба/замирание/бегство (fight/freesing/flight) была подтверждена Греем и МакНотоном (Gray, McNaughton, 2000), и в дальнейшем МакНотоном и Корром (McNaughton & Corr, 2004). Их теория предполагает, что две характеристики тревожности и импульсивности регулируются чувствительностью BIS и BAS. По Грею в основе темперамента лежит взаимодействие трех мозговых структур 1) септо-гиппокампальная система торможения поведения, определяющая параметр тревожности; 2) система, запускающая реакции нападения или бегства – миндалина, медиальный гипоталамус и центральное серое вещество; 3) система импульсивности, направляющая поведение к цели – базальные ганглии, прилегающее ядро, ядра таламуса. Деятельность этих систем координируется префронтальной корой.

Дальнейшее развитие представлений об индивидуально-типологических особенностях поведения было представлено в работах П.В.Симонова. Он выдвинул гипотезу о формировании типологических особенностей, согласно которой в основе типов ВНД лежит индивидуальный характер взаимодействия четырех структур – гиппокамп, миндалина, гипоталамус и фронтальная кора. Существуют две системы по Симонову - информационная (лобная кора/гиппокамп) и мотивационная (гипоталамус/миндалина) - взаимоотношения которых обуславливают параметры экстра- интроверсии, а невротизм определяют взаимоотношения систем кора/гипоталамус и гиппокамп/миндалина. Активность систем гипоталамус-гиппокамп определяет подвижность или инертность животных (Симонов, 2004).

Как можно заметить все вышеперечисленные теории связывают характеристики поведения с различными структурами головного мозга и с тем как эти системы взаимодействуют друг с другом. Все современные работы по разделению человека и животных на группы с индивидуальными особенностями поведения основываются на вышеприведенных теоретических представлениях в этой области исследований.

Индивидуально-типологические особенности поведения это тот фактор, который определяет взаимодействие организма и окружающей среды (Семагин и др., 1988). Поэтому в изучении типологических особенностей поведения обычно

учитываются не только базальные различия нейрохимических и поведенческих коррелятов, но и различия этих характеристик при воздействии стрессоров.

При исследовании животных с различными типами поведения используются два подхода. Исследуются генетически линейные животные и животные, разделенные на группы по различным поведенческим характеристикам. Для выявления различий в индивидуальных характеристиках поведения животным предъявляют биологически значимые раздражители.

Так, например, для селекции крыс по скорости выработки рефлекса активного избегания используются электрические стимулы. Впервые такая селекция была проделана в Италии. Крысы, известные как Roman high avoidance (RHA) и Roman low avoidance (RLA) были получены из крыс линии Wistar (Bignami, 1965). Обучение крыс рефлексу активного избегания осуществляется в челночной камере посредством электрических стимулов. Крыса считается обученной, когда демонстрирует четыре последовательных избежательных ответа в течение первых 10-20 испытаний. Крысы RHA и RLA разделялись и отбирались в течение нескольких поколений и их поведенческие характеристики не отличались от оригинальных животных. Подобным же образом, несмотря на некоторые различия в оборудовании и методах тестирования были образованы и некоторые другие линии. Например, Сиракузские линии (Syracuse high and low avoidance – SHA/Bru и SLA/Bru), выведенные из Long-Evans, селекция которых начата в 1965 году (Brush et al., 1979; Brush, 2003). Австралийские линии (Australian high and low avoidance – АНА и АЛА), впервые селектированные в 1978г. из крыс Sprague-Dawley (Bammer, 1983). Однонаправленная японская линия (Tokai high avoidance (ТНА)), селектированная только на высокую способность к выработке активного избегания и крыс линии Jcl-Wistar (Shigeta et al., 1990).

Крысы линий KLA (Koltushi Low Avoidence) и KHA (Koltushi High Avoidence) были селектированы в Институте физиологии им. И.П.Павлова на основе крыс Крушинского-Молодкиной (происходящих из крыс линии Wistar) по скорости выработки условного рефлекса активного избегания (УРАИ) в двусторонней челночной камере. Линия KHA обладает высокой способностью выработки условного рефлекса и может считаться линией имеющей активную поведенческую стратегию, а линия KLA имеет пассивную поведенческую стратегию (Жуков, 1997).

Крысы линий Tsucuba Low-Emotional (TLE) и Tsucuba High-Emotional (ТНА) были селектированы по эмоциональности, определяемой по реакции на освещенные пространства (Fujita et al., 1976).

Крысы линии ВП и НП с высоким и низким порогом возбудимости большеберцового нерва, селектированные д.б.н. А.И. Вайдо в Институте физиологии им.И.П.Павлова на основе крыс Wistar (Вайдо, Ситдилов, 1979).

Крысы линии Moudsley reactive MR и non-reactive MNR (Broadhurst, 1957,1960,1962,1975) были отобраны по показателям высокой и низкой дефекации в открытом поле.

Как видно достаточно большое количество разнообразных линий крыс с различными поведенческими характеристиками присутствует в современных исследованиях, изучающих адаптивное поведение как результат влияния окружающей среды на генотип. Тем не менее, показано, что внутри одной популяции животные разделяются на группы, отличающиеся устойчивостью к стрессорным воздействиям (Судаков,1998). Вырабатываются различные критерии такой устойчивости, для чего используются методы по разделению крыс на группы с различными поведенческими характеристиками, которые и определяют степень устойчивости к разнообразным стрессорам.

Обычно животных тестируют, используя либо какой-то один тест, либо батарею тестов. В зарубежных работах часто используются так называемые крысы HR (High responder) и LR (Low responder), которые тестируются в течение нескольких дней в замкнутом радиальном туннеле по показателям двигательной активности. Крысы HR имеют более высокие показатели двигательной активности, чем крысы LR, кроме того, пишут о том, что эти крысы быстрее привыкают к амфетаминам (Piazza et all, 1989; Pawlak et all,2008).

В работах российских исследователей тип поведения по показателям психотицизм-невротичизм и экстра- интроверсии изучается в тесте «эмоциональный резонанс» (ЭР), предложенном П.И.Симоновым. Тест основывается на том, что животные способны реагировать на внешние проявления эмоционального состояния другой особи своего вида и посредством такой способности могут вырабатывать инструментальные условные рефлексы (Rice, Gainer,1962; Green, 1969). Обычно крысы предпочитают находиться в тесном, ограниченном пространстве и это свойство также использовалось в данном тесте. Исследуемое животное помещали в просторную часть установки. Из просторного помещения можно перейти в небольшой «домик», пол которого представлял «педаль», которая включала электрический ток в третьем помещении, где находилась «крыса-жертва». Тестируемую крысу помещали в просторную часть на 5мин. И регистрировали время пребывания ее на педали. В течение 10 дней вход в «домик» не сопровождался болевым раздражением крысы-

жертвы, а в последующие 10 дней нахождение исследуемой крысы в «домике» приводило к раздражению крысы электрическим током. Выяснилось, что крысы, вырабатывавшие реакцию избегания крика жертвы, показывали при тестировании в «открытом поле» высокую исследовательскую активность и отсутствие уриаций и дефекаций, а также низкую агрессивность в тесте ЭР.

Достаточно часто используются методически более простые способы разделения крыс по параметрам активность-пассивность и эмоциональность. Обычно для этого используются тест «открытое поле» и тест «вынужденного плавания» (Хоницева и др., 1981; Юматов, Мещерякова, 1990; Коплик, 2002; Чумаков и др., 2005; Судаков и др., 2013). Активность-пассивность определяются по показателям времени латенции первого движения, а также горизонтальной и вертикальной двигательной активности. Для определения уровня эмоциональности используют такие параметры как число дефекаций и уриаций в тесте «открытое поле» и время неподвижности в тесте «вынужденное плавание».

Поскольку индивидуальные типологические особенности поведения отражают, как уже было отмечено выше различия в стресс-реакции на стрессорные воздействия, то обычно разделенных по показателям поведения животных и поведенчески различающихся линейных животных изучают именно в аспекте адаптации к стрессу.

1.2. Современные представления о стрессе и стрессореактивности

Еще в 1914 г в Уолтер Кеннон заметил, что главным проявлением стресса является активация симпато-адреналовой системы (САС) при рефлекторном возбуждении которой гормоны мозгового слоя надпочечников выбрасываются в кровь, тем самым, мобилизуя защитные силы организма для реализации реакции «борьба/бегство» (Cannon, 1914).

В дальнейшем Г.Селье (Селье, 1960) обнаружил, что в ответ на любой стрессор организм реагирует неспецифически – увеличивается размер надпочечников, появляются изъязвления желудка и происходит инволюция вилочковой железы. Исследуя феномен «общего адаптационного синдрома» Г.Селье пришел к выводу о том, что гипофиз-адреналовая система является тем инструментом, который осуществляет стресс-реакцию посредством выделения стресс-гормонов – кортикоидов и АКТГ.

Современные исследователи проблем и теории стресса пишут о том, что под влиянием стрессоров происходит активация как симпато-адреналовой системы (САС) через голубое пятно (locus coeruleus) ствола мозга так и гипофиз-адреналовой системы (ГАС) через паравентрикулярное ядро (ПВЯ) гипоталамуса (Chrousos, Gold, 1992). Голубое пятно является самым крупным скоплением норадренергических нейронов и

основным подкорковым центром регуляции САС (Шаляпина, Шабанов, 2005), а в паравентрикулярное ядро (ПВЯ) гипоталамуса сконцентрировано основное скопление кортиколиберинергических CRF-нейронов, регулирующих гормональную функцию ГАС. В результате можно говорить о двух контурах стресс-активирующей системы – это симпато-адреналовая система и гипофиз-адреналовая система. В последние десятилетия говорят о гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системе (ГГАС), объединяя гипоталамус и ГАС в одну систему. Это связано с тем что - 1) нейрогипофиз представляет собой выпячивание нервной ткани гипоталамуса, 2) в гипоталамусе происходит синтез ряда гормонов, регулирующих гормонпозз в аденогипофизе и 3) у гипоталамуса и гипофиза общее кровоснабжение (Чернышева, 1995). Кортиколиберин (CRF) считается «первым медиатором стресса» и в тоже время интегратором основных адаптационных систем (Шаляпина, Шабанов, 2005), поскольку CRF-продуцирующие нейроны гипоталамуса имеют широкие связи с катехоламинергическими структурами, контролирующими висцеральные функции. Синтезирующийся в нейронах ПВЯ гипоталамуса кортиколиберин стимулирует секрецию АКТГ в кортикотропocyтах аденогипофиза. Секреция АКТГ стимулирует выработку корой надпочечников кортикоидов, а мозговым слоем надпочечников – катехоламинов. Механизм действия глюкокортикоидов и минералкортикоидов состоит в том, что сначала они соединяются со специфическими внутриклеточными рецепторами, далее этот комплекс связывается со специфическими участками ДНК и оказывает регулирующий эффект на экспрессию генов. В результате меняется скорость синтеза некоторых белков, что в свою очередь влияет на различные метаболические процессы, например на глюконеогенез и соотношение ионов натрия и калия (Греннер, 1993). Катехоламины, в свою очередь, - 1) быстро поставляют жирные кислоты, выполняющие роль главного первичного топлива для мышечной активности; 2) мобилизуют глюкозу в качестве источников энергии для мозга путем повышения гликогенолиза и глюконеогенеза в печени и понижения поглощения глюкозы в мышцах и других органах; 3) понижают высвобождение инсулина, что также предотвращает поглощение глюкозы периферическими тканями, сберегая ее, в результате для ЦНС. Из вышесказанного видно, что глюкокортикоидные гормоны способствуют ускоренному метаболизму различных биохимических субстратов (ответственных за выработку энергии клеткой), а повышенная концентрация катехоламинов способствует усиленной трате энергии организмом.

Помимо нейроэндокринного компонента стресс-ответ изучается также и в аспекте формирования поведенческих реакций. Как показали морфологические исследования областей коры головного мозга, гипоталамуса и гиппокампа после

воздействия психоэмоционального стресса в различных областях этих структур обнаруживаются дистрофические изменения нейронов. Наиболее подвержены дистрофическим изменениям поля СА1 и СА3 гиппокампа, зоны двигательных анализаторов коры головного мозга и гипоталамической области, что может говорить о ведущей роли гипоталамуса в формировании стресс-ответа (Писарев и др., 1996).

При исследовании и анализе физиологических механизмов целенаправленного поведения П.В.Симонов разработал схему взаимодействия мозговых структур в организации поведенческого акта в ответ на стимул. Было показано, что в организации поведенческого ответа на стимул участвуют гипоталамус, гиппокамп, стриатум, миндалина и многочисленные отделы коры (см. рис.1).

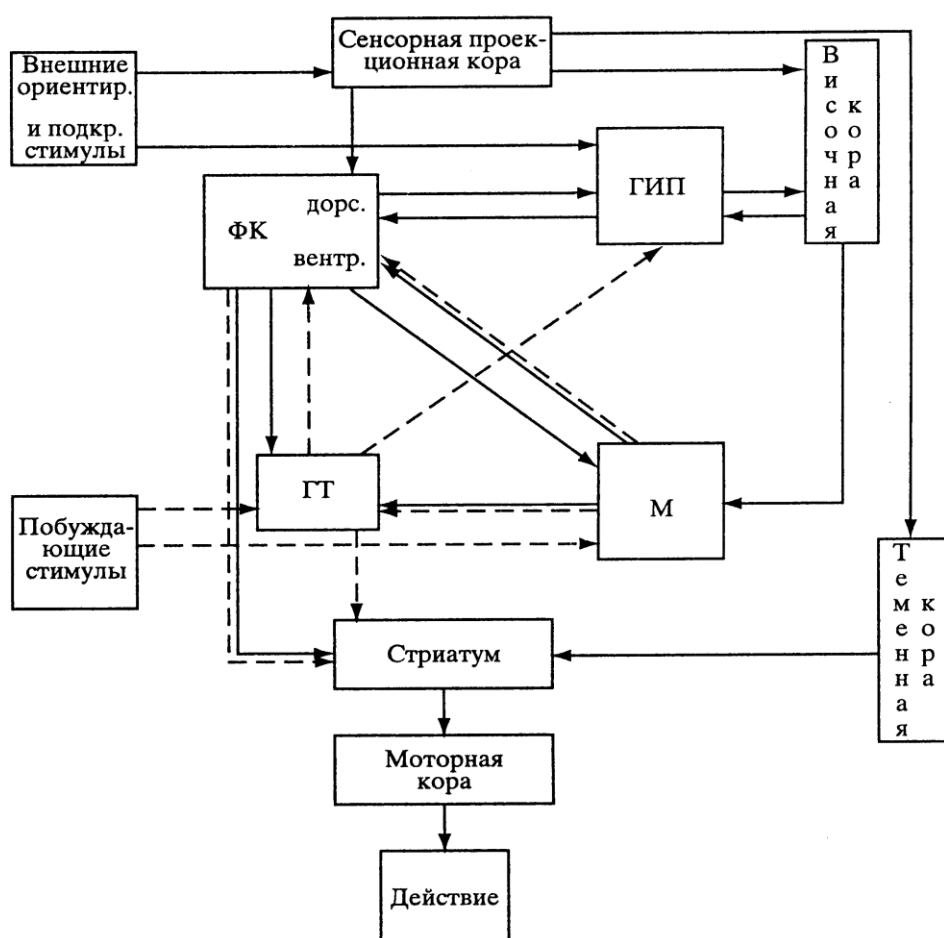


Рис. 1. Схема взаимодействия мозговых структур в процессе организации поведенческого акта (цит. по Симонову П.В., 2004).

Внутренние и внешние побуждающие стимулы активируют гипоталамус (ГТ), который, в свою очередь активирует гиппокамп (ГИП) и передние отделы новой коры. В процессе формирования поведенческого акта задействуется также фронтальная кора. В миндалине (М) формируется эмоциональная окраска происходящих событий. Программа действий, сформированная во фронтальной коре, поступает в базальные

ганглии, где вписывается в пространственные координаты предстоящего действия. И далее через моторную кору возбуждение поступает на эффекторные органы, реализующие целенаправленное поведение. (Сплошные линии – информационная афферентация, прерывистые – мотивационные влияния, двойные – эмоционально окрашенная афферентация).

Таким образом, в работах на животных с различными характеристиками поведения изучаются обычно вышеперечисленные структуры мозга, а также содержание и соотношение морфологических и нейрохимических характеристик именно в этих структурах мозга.

1.3. Нейробиологические корреляты индивидуальных отличий поведения

Несмотря на большое количество работ по вопросу о том, посредством каких нейрохимических процессов формируются реакции, лежащие в основе индивидуальной устойчивости организма к стрессогенным воздействиям окружающей среды, накопленная информация довольно фрагментарна. Нет работ комплексно и подробно исследующих данную проблему. И, тем не менее, имеется достаточно большое количество материала в этой области.

Индивидуальные отличия в поведении человека и в резистентности к разного рода психопатологиям и нейродегенеративным заболеваниям обеспечиваются индивидуальными различиями нейрональных и гормональных стресс-ответов (Zuckerman, 1990; Anisman & Zacharko, 1992; Yehuda et al, 2011). Изучение индивидуально-типологических отличий в поведении на животных моделях позволяет выявлять нейробиологические характеристики, лежащие в основе поведенческих отличий, стрессореактивности и устойчивости к психотравмирующим воздействиям.

1.3.1. Стрессореактивность ГАС и индивидуально типологические особенности поведения

Изучая стресс-реактивность, исследователи, в первую очередь, сравнивают активность ГАС в динамике. Так, в исследованиях на собаках с различными типами ВНД показано, что стрессореактивность ГАС у особей сильного, подвижного, уравновешенного типа характеризовалась более выраженным максимальным подъемом и растянутым во времени завершением. А у слабого, подвижного типа активация гормонального звена была заторможенной, и возврат к базальному уровню активности ГАС происходил быстрее по сравнению с сильным типом ВНД. Таким образом,

соотношение стресс-активирующей и стресс-лимитирующей систем отличалось у собак разных типов ВНД. Кроме того, и в норме у этих животных уровень кортизола был различен (Шалапина и др., 2001).

В нашей лаборатории была изучена реактивность ГГАС при стрессах разной силы и длительности у крыс линий KLA и КНА, селективных по скорости выработки рефлекса активного избегания (Шалапина, Ракицкая 2003). При исследовании базального уровня кортикостерона как показателя состояния ГГАС не обнаружилось линейных различий у данных животных. При стрессе «новизны обстановки» линейные различия в уровне кортикостерона также отсутствовали. Но после 30-минутной иммобилизации уровень кортикостерона у крыс КНА резко увеличивался, тогда как у крыс KLA, оставался на уровне контроля. Различия у крыс KLA и КНА наблюдались и в динамике стрессорного ответа. У крыс линии КНА наблюдался более ранний максимум стрессорного кортикостерона и пролонгированный ответ на сильный стресс. А у крыс KLA кортикостероновый уровень поднимался до максимального значения позднее и быстрее возвращался к уровню нормы. Таким образом, были выявлены четкие линейные различия как в стрессорной реактивности ГГАС в период достижения ее максимума, так и в дезактивации ее функции механизмами «обратной связи».

При изучении влияния кортикотропин-рилизинг гормона (CRH) на вышеупомянутых крыс выяснилось, что CRH у крыс КНА снижает двигательную активность, а у крыс KLA повышает двигательную активность в тесте «открытое поле» (Шалапина, Шабанов, 2005). Также было показано, что CRH может быть как активатором, так и ингибитором поведенческой активности и направление будет выбрано в зависимости от состояния, присущего определенной типологии поведения (Шалапина, Шабанов, 2005).

Стрессореактивность ГГАС различается и у крыс линий НП и ВП. ГГАС крыс линии НП сильнее реагировала на электрокожное раздражение, чем у крыс линии ВП. Достижение максимума гормональной реакции у крыс линии НП происходило через 1 час после начала стимуляции, а у крыс линии ВП – через 3 часа. Через сутки после стрессирования у крыс линии ВП уровень кортикостерона опускался даже несколько ниже исходного значения, а у крыс линии НП оставался повышенным, что говорит о сниженной чувствительности ГГАС линии НП к сигналу обратной связи. Такой вывод подтверждался результатами двухдневного дексаметазонового теста, (Ордян и др., 1998).

В зарубежных исследованиях изучалась кривая стрессореактивности животных с различными типологическими особенностями поведения, например у крыс HR (high responder) и LR (low responder). Изначально, обе подгруппы показали увеличение уровня кортикостерона в крови спустя 30 мин. после длительного стресса новизны. Однако пока концентрация падала до базального уровня у крыс LR, уровень кортикостерона у крыс HR оставался на прежнем уровне даже спустя 2 часа после воздействия стрессора, т.е. стресс-реакция была пролонгированной у крыс HR (Piazza et al., 1991).

Изучение стрессореактивности ГГАС у линий MR (Maudsley reactives) - крысы более тревожноподобного поведения и MNR (Maudsley nonreactives) - крысы с отсутствием признаков тревожноподобного поведения показало следующие результаты. Эти линии сравнивались с крысами Wistar в качестве контроля. Оказалось что АКТГ-ответ на иммобилизационный стресс у крыс MNR более притупленный по сравнению с Wistar, а уровень кортикостерона не отличается, тогда, как крысы MR демонстрировали избыточный АКТГ-ответ на иммобилизационный стресс, но также не было отличий в уровне кортикостерона (Kosti, 2006).

Все вышеприведенные работы демонстрируют различия в стрессореактивности ГГАС у животных с различными характеристиками поведения, причем в норме показатели состояния данной системы могут и не иметь различий.

1.3.2. Стрессореактивность симпато-адреналовой системы и индивидуально типологические особенности поведения.

Изучение стресс-ответа и адаптации не ограничивается исследованием стрессореактивности ГГАС. Как уже было отмечено выше, симпато-адреналовая система является непосредственным участником стресс-реакции организма. Симпатические нейроны мозга активируются в условиях стресса во всех структурах мозга, ответственных за адаптацию организма. Активация адренергических компонентов охватывает гипоталамус, средний мозг, кору головного мозга и гиппокамп (Митюшов и др, 1976; Pani et al., 2000; Keeney et al., 2006; Kavitha et al., 2011; Ahnaou & Drinkenburg, 2016), то есть те структуры мозга, которые участвуют в формировании поведенческой реакции на стрессорные раздражители.

Были также определены моноаминовые пути в мозге и локализация моноаминов в структурах мозга (Bremner et al., 1996). Нейромедиаторная и нейромодуляторная роль моноаминов подтверждается их высоким содержанием в синаптических окончаниях, т.е. в

местах, где осуществляется химическая передача импульса с аксона на воспринимающий рецептор (Исмаилова и др., 2007).

Известно, что активность норадренергической и дофаминергической систем положительно коррелирует с «активным» типом поведения в тестах «открытого поля» и «вынужденного плавания» (Rosario L.A., Abercrombie E.D., 1999; Шаляпина и др., 2002; Чумаков и др., 2005). Следует отметить, что положительная корреляция норадреналина с «активным» типом поведения во многих исследованиях наблюдается только при стрессорном воздействии (Rosario L.A., Abercrombie E.D., 1999). Дофамин участвует в формировании моторно-вегетативного компонента реакции агрессии (Айрапетянц, Вейн., 1982; de Almeida et al., 2005; Yu et al., 2014). Отмечается также участие специфического серотонинергического пула в формировании агрессивного поведения (Takahashi et al., 2012; Niederkofler et al., 2016). Реакции ярости и агрессии характерны для животных «активного» типа поведения в ситуации эмоционального стресса (Starec et al., 1996; Hanstock et al., 2004). Исследована латеральная локализация моноаминов в коре, гиппокампе и стриатуме и выявлены различия в содержании дофамина (ДА), норадреналина (НА) и серотонина (5-ОТ) и их метаболитов в правом и левом полушарии как в норме так и при воздействии стрессоров (Лосева и др., 2015).

При изучении реактивности норадренергической системы в ответ на острый стресс у инбредных линий крыс Lewis и Wistar-Kyoto и аутбредных крыс Sprague-Dawley обнаружена взаимосвязь между поведенческим дефицитом и редукцией норадренергической системы в ответ на стресс у крыс Wistar-Kyoto тогда как у крыс линий Lewis и Sprague-Dawley таких корреляций не выявлено (Pardon et al., 2002).

Типологические особенности нервной системы оказывают влияние на состояние моноаминергических систем мозга при невротизирующих воздействиях (Flores-Serrano et al., 2013). При исследовании моноаминов и их метаболитов в гипоталамусе и гиппокампе у крыс с «активным» и «пассивным» типами поведения после невротизации нивелировались различия в содержании НА, 5-ОТ и гидроксииндолуксусной кислоты (ГИУК), которые присутствовали у интактных животных. И наоборот, появляются различия в содержании ДА и диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), 5-ОТ – в коре, ДОФУК, 5-ОТ, ГИУК – в миндалине и ГИУК – в гиппокампе, которых не было у интактных крыс (Чумаков и др., 2005).

При изучении регуляции серотонина в префронтальной коре и амигдале у инбредных линий мышей, различающихся по поведению в тесте «вынужденное плавание», обнаружили различия не только в регуляторной системе 5-ОТ, но и во

взаимодействии 5-ОТ/ГАМК (гамма-аминомасляная кислота) в префронтальной кортиколимбической системе (Andolina et al., 2014).

Изменение концентрации катехоламинов в крови и структурах мозга может служить объективным показателем эмоционально-стрессовых и депрессивно-подобных состояний (Айрапетянц и др., 1980; Chen et al., 2017). Крысы, разделенные в тесте «эмоционального резонанса» (ЭР), не отличались по уровню катехоламинов в крови, но после невротизации (2 недели электрокожного раздражения, предваряемого звуковым сигналом, чередуемого стохастически с дифференцировочным сигналом) у «пассивных» (не вырабатывавших рефлекс ЭР) животных уровень катехоламинов резко снижался до нулевого значения, тогда как у «активных» (вырабатывавших рефлекс ЭР) животных процесс снижения уровня катехоламинов не был столь драматичен (Айрапетянц и др., 1980).

При исследовании базального уровня моноаминов и их метаболитов у крыс HR и LR в прилежащем ядре и префронтальной коре выявились отличия у данных групп крыс в соотношении ДОФУК/ДА. Данное соотношение было выше в прилежащем ядре и ниже в префронтальной коре у крыс HR. Содержание серотонина и ГИУК в префронтальной коре, nucleus accumbens и дорсальном стриатуме у крыс HR было ниже, чем у крыс LR. Эти группы также демонстрировали отличия в динамике стресс-индуцированной экспрессии ДА (Pawlak et al., 2008; Rouge-Pont et al., 1993).

Было изучено содержание ДА, НА и их метаболитов –ДОФУК, ГВК и 3-метокси-4-оксифенилгликоля в гипоталамусе и стриатуме у крыс линии KLA и КНА (Шаляпина и др., 2002). Линия KLA продемонстрировала более низкую скорость метаболизма дофамина в стриатуме. В гипоталамусе линейных отличий в содержании норадреналина, дофамина и их метаболитов не наблюдалось. Было показано, что ДА в стриатуме активных и пассивных крыс синтезируется с разной скоростью и с разной скоростью выделяется в условиях стресса. Накопление ДА в стриатуме вследствие сниженного его метаболизма у крыс линии KLA вероятно является одной из причин пассивного поведения крыс данной линии (Шаляпина и др., 2002; Rots et al., 1996).

Поскольку дофамин (наряду с норадреналином) является активатором сукцинатдегидрогеназы (Кондрашова и др., 1987), его высокий уровень в стрессовой ситуации может способствовать усилению энергопродукции, обеспечивающей реакции активного поведения и агрессии. Что касается высокого содержания серотонина, то оно по данным ряда авторов (Кулагин и др., 1986; Исмаилова и др., 2007) коррелирует положительно с «пассивным» типом поведения, а у других авторов – с низкоэмоциональным «активным» типом (Бенешова, 1978; Pawlak et al., 2008).

Из всего вышеописанного видно, что как базальный уровень глюкокортикоидных гормонов и моноаминов, так и стресс-ответ САС и ГГАС имеют множество различий коррелирующих с различными типами поведения. Кроме того, глюкокортикоидные гормоны способствуют ускоренному метаболизму различных биохимических субстратов, отмечается связь между уровнем чувствительности животных к кортикостероновому стрессу и метаболическим уровнем в митохондриях (Duclos et al., 2004). В тоже время, повышенная концентрация катехоламинов способствует усиленной трате энергии под воздействием стрессоров. Поэтому следует также учитывать энергетический метаболизм субстратов, связанных с поведением и стрессореактивностью. В последние десятилетия появляются исследования, изучающие связь окислительно-восстановительных процессов в мозге и типологические особенности поведения.

1.4. Окислительный метаболизм мозга, ГГАС и индивидуально типологические особенности поведения

В настоящее время уже является несомненным тот факт, что уровень кортизола влияет на окислительный метаболизм ткани мозга (McIntosh & Sapolsky, 1996; Costantini et al., 2011; Lee et al., 2014). Например, удаление надпочечников приводит в мозге к снижению уровня креатинфосфата, пирувата, цитрата, альфа-кетоглутарата и к снижению коэффициента Р/О при неизменной или слегка повышенной интенсивности клеточного дыхания (Митюшов и др., 1976; Plaschke et al., 1996). Показано что гормоны коры надпочечников повышают адаптивные возможности животных и людей к гипоксическому воздействию (Rock et al., 1989; Tuor, 1997; Lim et al., 2014).

Было установлено, что избыток кортикостероидов приводит к усилению гликолиза в организме и торможению процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях (Кондрашова, 1974). В дальнейшем при исследовании некоторых аспектов влияния глюкокортикоидов на дыхание и фосфорилирование в митохондриях было обнаружено, что кортикостерон регулирует митохондриальное окисление в дозозависимой и времязависимой манере (Du et al, 2009). Было показано в опытах *in vitro*, что добавление кортикостероидов в инкубационную среду вызывает угнетение НАДН-оксидазы митохондрий мозга и, как следствие, происходят сбои в митохондриальном дыхании и энергетическом метаболизме клетки (Martens et al., 1991; Huo et al., 2011; Li et al., 2015).

В последние десятилетия стало уделяться внимание изучению связей между процессами окислительного метаболизма в организме и типологическими характеристиками поведения, как в норме, так и под влиянием стресса.

Исследовалась активность окислительно-восстановительных ферментов у кроликов. Животных разделяли по условнорефлекторной отряхивательной методике (Купалов и др., 1964) на группы со слабым и сильным типами нервной системы. Определяли активность пируватдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), цитохромоксидазы, НАДФН- и НАДН-дегидрогеназ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы в коре больших полушарий, почках и печени кроликов. Было показано, что соотношения активностей ферментов разных метаболических циклов у слабых и сильных типов было приблизительно одинаковым, что говорит о хорошей сбалансированности у них процессов выработки энергии. Далее отмечается, что при почти одинаковой активности НАДН-ДГ и НАДФН-ДГ у особей с разными типами нервной деятельности в мозге и печени, тем не менее, СДГ вдвое выше у кроликов с сильным типом нервной системы. Предполагается, что у сильного типа субстратом для окисления является преимущественно сукцинат, а у слабого типа – в равной степени и сукцинат и НАД-зависимые субстраты и, следовательно, неодинаковой энергетической ценностью таких субстратов вероятно можно объяснить менее низкую способность животных слабого типа противостоять экстремальным воздействиям. В целом же установлено, что у кроликов с сильным типом нервной системы активность окислительно-восстановительных ферментов в коре больших полушарий, печени и почках значительно выше, чем у животных со слабым типом нервной системы (Краковский, 1987).

В настоящее время уже существует довольно обширный ряд работ, связывающий процессы окислительного метаболизма мозга с индивидуально-типологическими особенностями поведения. Так, показана связь между типом поведения животных и сдвигом окислительного метаболизма мозга в ответ на стресс. Обнаружено, что при умеренном стрессорном воздействии (хэндлинг) у крыс с активным типом поведения повышается скорость локального кровотока (СЛК) и уровень напряжения кислорода в мозге, тогда как у пассивных крыс уровень напряжения кислорода снижается вместе с еще более интенсивным увеличением СЛК, т.е. потребление кислорода превышает его доставку (Саркисова, 1997; Саркисова и др., 1994). Показано, что существуют достоверные различия в уровне исходной активности окислительных ферментов мозга у крыс с разным типом поведения. Исследовались

сукцинатдегидрогеназа и НАДН-дегидрогеназа, которые отражают активность сукцинатоксидазного и НАДН-оксидазного путей окисления субстратов соответственно. И оказалось, что у крыс с «активным» типом поведения (в тесте «открытое поле») наблюдается преобладание активности СДГ над активностью НАДН-ДГ и наоборот активность НАДН-ДГ преобладает над активностью СДГ у крыс с «пассивным» типом поведения. А у крыс средней группы с отсутствием доминирования определенного типа поведения отсутствует и преобладание активности одного из ферментов (Саркисова, 1997; Саркисова и др., 1991).

Таким образом, метаболические пути, связанные с окислительно-восстановительными процессами в головном мозге, отличаются у животных с разными индивидуально-типологическими характеристиками поведения и определяют поведенческие характеристики индивидуума и его стрессоустойчивость.

В ряде работ было показано, что уровень активности цитохром С оксидазы (СОХ), отражающий активность окислительного метаболизма, в структурах мозга крыс с разным типом поведения различен. Крысы, характеризующиеся большей тревожностью, имеют более высокий уровень активности СОХ в лимбических структурах мозга (Mallo et al., 2009). У крыс, отличающихся более высокой исследовательской активностью в новой среде (High Exploratory), активность СОХ выше в энториальной коре (Matrov et al., 2007). Активность СОХ в ПВЯ гипоталамуса, фронтальной коре и септуме выше у крыс более восприимчивых к обучению (Sakata, 2005). К сожалению, не обнаружилось работ по изучению активности СОХ у животных с разными типами поведения под воздействием стресса. Тем не менее данные работы позволяют сделать вывод о влиянии активности окислительного фермента цитохром С оксидазы на поведенческие характеристики.

Ясно, что уровень активности окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в клеточном дыхании, влияет на характеристики поведения и, по-видимому, регулируется ГГАС при действии стрессора. Ряд обзоров описывает ГГАС как систему являющуюся модулятором окислительного стресса (Costantini et al., 2011; Miller & Sadeh, 2014) и влияющую на рост свободно-радикального окисления в клетке (McIntosh & Sapolsky, 1996). Современные представления о процессах свободнорадикального окисления и участие их в стрессореактивности организма рассматриваются в следующей главе.

1.5. Свободнорадикальное окисление и стрессореактивность

Кислород является одним из активных метаболических соединений в тканях аэробных организмов. Молекулярный кислород в своем стабильном состоянии является бирадикалом, который имеет два неспаренных электрона с параллельными спинами. Такой кислород термодинамически является потенциальным окислителем (Halliwell., 2006). Основным путем активации молекулярного кислорода в клетке является его восстановление в активных центрах ферментов – оксидаз и оксигеназ (Арчаков, Мохосоев, 1989). Кислород и его реактивные метаболиты (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} и др.) играют важную роль в функционировании клетки в норме и при различных патологиях, в том числе и в формировании стресс-ответа и в регуляции последствий стресса (Dickinson & Chang, 2011; Manda-Handzlik & Demkow, 2015).

1.5.1. Окислительный стресс и роль активных форм кислорода

Любая стрессорная реакция организма сопровождается кратковременным подъемом АФК и развитием окислительного стресса (ОС). Как пишет H.Sies (1985) в своей работе «Oxidative stress. Oxidants and Antioxidants»: «Окислительный стресс это нарушение в прооксидантном и антиоксидантном балансе, которое приводит к потенциальным повреждениям». По мнению других авторов, окислительный стресс это увеличение уровня внутриклеточных АФК (Trachootham et al., 2008). Наконец, есть определение окислительного стресса, включающее в себя макромолекулярные повреждения и повреждения редокс-сигналинга и редокс-контроля, которые осуществляются свободнорадикальными интермедиатами и нерадикальными оксидантами соответственно (Go & Jones, 2010). Можно говорить о явлении окислительного стресса как о нарушении равновесия в состоянии прооксидантной и антиоксидантной систем. При развитии окислительного стресса происходит процесс повреждения клетки в результате действия свободных радикалов или активных форм кислорода (Apel & Hirt, 2004; Дубинина, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007). Реакция клетки на окислительный стресс варьирует в зависимости от силы окислительного стресса (см. рис. 2).



Рис.2. Реакция клетки на окислительный стресс, (модификация из Halliwell & Gutteridge, 2007).

В последние десятилетия в научной периодике кислородные радикалы и нерадикальные окисляющие агенты или соединения, превращающиеся в радикалы, принято называть термином «активные формы кислорода» АФК (в англоязычной литературе «reactive oxygen species» ROS). Образование АФК в тканях в малых количествах связано с нормально протекающими метаболическими процессами и происходит путем 4-х ступенчатого электронного переноса с образованием воды (см.рис.3).

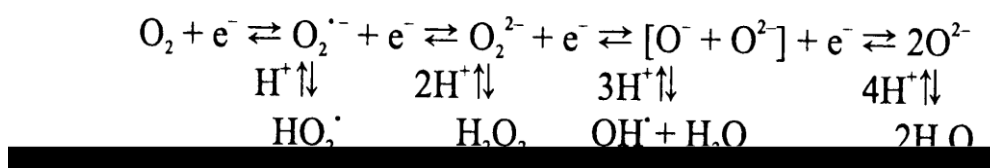
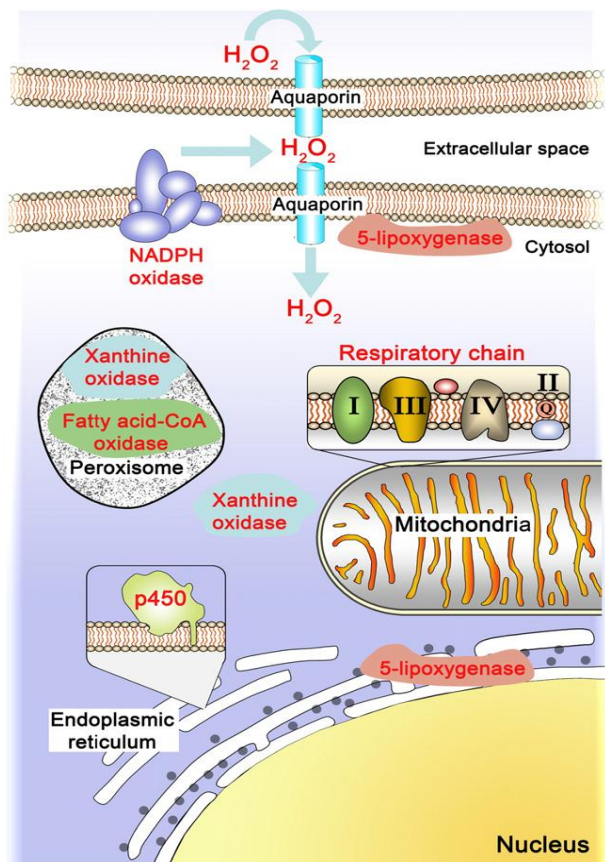


Рис.3. Реакция постепенного восстановления кислорода с образованием АФК.

Такое многоступенчатое восстановление кислорода является энергетически более выгодным.

Основным источником АФК в организме (см.рис. 4) являются комплексы



респираторной цепи митохондрий в аэробных организмах. Здесь генерация АФК связана с коэнзимом Q, а именно: НАДН/убихинон-оксидоредуктазный, сукцинат/убихинон-оксидоредуктазный и убихинон/цитохром-С-редуктазный комплексы. В пероксисомах АФК продуцируются ксантиноксидазой и коэнзим А-оксидазой. В число источников АФК также входят эндоплазматический ретикулум и клеточные мембраны (Covarrubias et al., 2008; Wanders & Waterham, 2006; Chandel & Budinger, 2007).

Рис.4. Источники образования АФК в клетке (цит по Covarrubias et al., 2008.)

Кроме того, многие биологически важные молекулы, такие как адреналин, норадреналин, L-DOPA (дегидроксифенилаланин), дофамин, тиоловые соединения (например, цистеин) окисляются кислородом с производством супероксида. Такие реакции называются реакциями аутоокисления и происходят они при помощи ионов металлов переменной валентности (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Большинство АФК постоянно образуется в клетке – около 5% потребляемого тканями кислорода превращается в свободные радикалы, но их уровень в норме небольшой. Условия для окислительного стресса создаются, когда в клетке накапливается избыточная концентрация АФК, что происходит, когда защитная система клетки не справляется с инактивацией АФК. Активная генерация АФК приводит к разрушению клеточных элементов (Дубинина, 2006) и к токсической окислительной деструкции биомолекул – белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Помимо традиционных представлений об АФК в качестве участников кислородного метаболизма, приводящего к старению и заболеваниям, в последние десятилетия накопленные данные свидетельствуют о роли АФК в обеспечении поддержания физиологических функций в норме. В настоящее время известно, что АФК осуществляют множественные функции посредством редокс-модификаций большого числа молекул, причастных к большинству сигнальных путей в клетках человека, животных, растений (Covarrubias et al.; 2008; Mittler et al., 2011, Сидоров, 2011). Многочисленные биологические ключевые процессы, определяющие функциональную активность клеток, обеспечиваются, в основном, за счет мультикаталитических комплексов, и АФК активно включаются в их регуляцию. Участие АФК в регуляции экспрессии роста и дифференциации клеток, клеточной пролиферации, апоптоза показано во многих исследованиях (Droge, 2002; Hancock et al., 2001; Sauer et al., 2001; Ma, 2010).

Регуляторные процессы и сигнальные пути, в которых участвуют АФК, показаны на рис.5.

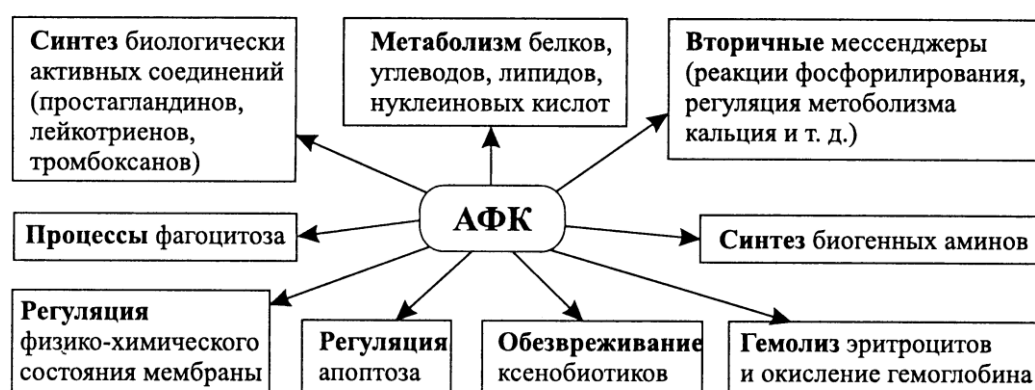


Рис. 5. Участие АФК в метаболических процессах организма (цит., Дубинина, 2006)

Разнообразие макромолекул чувствительных к редокс-модификациям посредством АФК довольно обширно – от молекул внеклеточного матрикса до фосфатаз, киназ и большого числа транскрипционных факторов и регуляторных белков (Trachootham et al., 2008).

В экстремальных условиях окислительного стресса АФК участвуют в передаче сигналов от первичных мессенджеров, направленных на запуск каскада реакций, необходимых для приспособления и выживания организма (Scandalios, 2002; Дубинина, 2006).

Включение механизмов ОС приводит к включению программы апоптоза. Это защитный физиологический ответ организма на состояние ОС, на первых стадиях которого организм за счет апоптоза как бы пытается отбраковать поврежденные клетки. На более глубоких стадиях начинают, наряду с апоптозом включаться механизмы некротического поражения нейронов (Дубинина, 2006). Таким образом, АФК при стрессе действуют в качестве вторичных мессенджеров, в качестве индукторов апоптоза и индукторов распада умирающих нейронов (Болдырев, 1995a; Болдырев, 1995b).

1.5.2. Антиоксидантная система и ее роль в регуляции редокс-баланса.

Высокая реакционная способность АФК требует противовеса для поддержания определенного уровня этих молекул, обеспечивающего важные метаболические процессы в клетках. Таким противовесом является антиоксидантная система (АОС). Компоненты АОС классифицируются различным образом в зависимости от факторов их характеризующих. Учитывая механизм действия АОС можно сказать, что она состоит из специфических и неспецифических компонентов (Дубинина, 2006).

Действие неспецифических компонентов АОС позволяет снизить дополнительную генерацию свободных радикалов. Например, устранение металлов переменной валентности за счет их связывания с высокомолекулярными соединениями, что предотвращает участие этих металлов в свободнорадикальных реакциях (Gutteridge & Quinlan, 1993). Специфические компоненты АОС состоят из ферментативных и неферментативных компонентов. Их действие направлено на прямое разрушение и связывание АФК или образующихся радикалов и далее на обрыв цепей свободнорадикальных реакций. К ферментативным компонентам антиоксидантной системы, которые наиболее часто рассматриваются при изучении проблем связанных с окислительным стрессом, относятся супероксиддисмутаза и глутатионовые ферменты. К неферментативным компонентам АОС относятся, например, глутатион и –SH-содержащие соединения.

1.5.2.1. Супероксиддисмутаза.

Одним из ключевых ферментов АОС является супероксиддисмутаза (СОД), которая ингибирует супероксид на стадии одноэлектронного переноса. В настоящее время известно несколько изоферментных форм СОД.

Cu-Zn-СОД или СОД1 содержится в ядрах, цитоплазматическом матриксе, пероксисомах и межмембранном пространстве митохондрий только клеток эукариот (Fridovich, 1975a; Keller et al., 1991; Wanders & Denis, 1992), за небольшим

исключением. Каждая субъединица содержит один атом Cu^{2+} и один атом Zn^{2+} . Атом цинка необходим для стабилизации молекулы, тогда как медь принимает непосредственное участие в реакции дисмутации. Поверхность фермента несет отрицательный заряд, однако в строении молекулы выявлены положительно заряженные каналы, которые ведут к активным центрам и по всей вероятности служат для захвата отрицательно заряженных молекул супероксида (Halliwell & Gutteridge, 2007). В результате такого избирательного захвата ионов супероксида значительно повышается скорость реакции дисмутации.

Известна также марганцевая форма СОД (СОД2), которая обнаружена в митохондриях и матриксе хлоропластов эукариот, а также у бактерий (Fridovich I., 1995). Характерной особенностью СОД2 является ее резистентность к действию H_2O_2 .

Железосодержащая СОД считается наиболее древней в эволюционном плане, активность ее значительно ниже активности Cu-Zn-СОД. В тканях животных данная форма СОД пока не обнаружена, но найдена в водорослях, дрожжах и высших растениях (Fridovich, 1995).

В организме человека и животных СОД1 и СОД2 являются преимущественно внутриклеточными ферментами, поскольку в межклеточных жидкостях быстро (5-10 мин.) разрушаются (Зенков и др., 2001). Также в 1982 г. выделена экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма СОД (Э-СОД) – Cu-Zn-содержащий гликопротеин (Marclund et al., 1982). Э-СОД является главным изоферментом межклеточных жидкостей (Halliwell & Gutteridge 1990).

Наиболее распространенной и хорошо изученной является Zn-Cu-СОД. СОД обладает не только антиоксидантными свойствами, но также играет роль регулятора, поскольку супероксидные радикалы участвуют в ферментативных реакциях синтеза простагландинов и метаболизма ксенобиотиков, а также клеточной пролиферации, кроме того, СОД является ключевым звеном системы регуляции стабильной концентрации $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Необходимо отметить, что токсичность $\text{O}_2^{\bullet-}$ невысока, поэтому тезис о биологической защитной роли СОД не столь очевиден. Есть данные о том, что $\text{O}_2^{\bullet-}$, совместно с H_2O_2 и OH^{\bullet} участвует в модификации белков для распознавания их протеазами (Арчаков, Мохосоев, 1989). Таким образом, предполагается что СОД1, перехватывая $\text{O}_2^{\bullet-}$, предотвращает протеолиз. Также существует мнение (Munday & Winterbourn, 1989), что удаление $\text{O}_2^{\bullet-}$, необходимо для защиты от окисления внутриклеточного глутатиона, который в восстановленном состоянии выступает эффективной ловушкой радикалов (Halliwell & Gutteridge, 1990).

1.5.2.2. Глутатион и глутатионовые антиоксидантные ферменты (глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза)

Глутатион (GSH) – это низкомолекулярный тиол-содержащий трипептид, состоящий из трех аминокислот цистеина, глицина и глутаминовой кислоты, и играющий значительную роль в защите клетки от АФК. Глутатион участвует во многих метаболических процессах таких как, поддержание клеточных взаимосвязей, защита белковых –SH групп от окисления, (Halliwell & Gutteridge, 2007). Показано, что внутриклеточный глутатион регулирует синтез ДНК и пролиферативную активность клеток (Meister & Anderson 1983; Suthanthiran, 1990; Gmunder et al., 1990 Смирнов, Суховская, 2014). Кроме того, глутатион модулирует активность рецепторов нейротрансмиттеров (Oja et al., 2000) и белков через посттрансляционную модификацию (S-глутатионилирование) (Klatt & Lamas, 2000), регулирует экспрессию генов (Wingate et al, 1988). Тиолы, будучи редокс-чувствительными элементами, играют важную роль в контроле репликации и клеточной пролиферации, починке ДНК, механизмов транскрипционной активации, транспорта белков в ядро и из ядра (Go & Jones, 2010). Окислительная модификация GSH изменяет состояние клеточных мембран, их проницаемость и адгезивные свойства, влияет на активность ферментов и клеточную пролиферацию (Кулинский, Колесниченко, 1990а; Соколовский, 1988).

GSH, как и другие SH-содержащие белки, является ингибитором АФК и стабилизатором мембран (Udupi & Rice-Evans, 1992). Основной антиоксидантный эффект глутатиона реализуется посредством его участия в работе ферментативных антиоксидантов. Будучи субстратом для глутатионпероксидазы (GPx) и глутатионтрансферазы (GST), глутатион выступает донором атомов водорода для H_2O_2 и липидных перекисей (Кулинский, Колесниченко, 1990b). По мнению ряда авторов, взаимодействие GSH с органическими радикалами эффективно только в условиях удаления $O_2^{\cdot-}$, поэтому глутатион образует с СОД своеобразную антиоксидантную систему, так как в противном случае развиваются реакции образования перекиси водорода и реакционных тиольных радикалов (Mundy & Winterbourne, 1989).

В организме человека глутатион присутствует в окисленной (GSSG) и в восстановленной (GSH) форме. Соотношение GSH/GSSG определяет редокс-статус клетки (Go & Jones, 2010). Пара GSH/GSSG является одной из основных редокс-чувствительных систем, и это соотношение является важным критерием неспецифической резистентности организма к окислительному стрессу (Соколовский, 1988; Schafer, & Buettner, 2001). Также редокс-пара GSH/GSSG совместно с белками, содержащими -SH группы, могут участвовать в регуляции клеточного цикла (Sanchez-

Fernandez et al, 1997). Неравновесная тиол-дисульфидная пара в качестве нерадикального механизма участвует в обеспечении сдвига клеточной пролиферации и дифференцировки фенотипа (Go & Jones, 2010). При прохождении клетками животных от пролиферации через дифференцировку до своей гибели, они претерпевают изменения редокс-статуса в направлении более окисленного состояния. Таким образом, соотношение GSH/GSSG играет роль своеобразного «переключателя» от фазы пролиферации к фазе дифференцировки, а впоследствии к запрограммированной клеточной гибели (Schafer & Buettner, 2001).

Глутатион является одним из составляющих элементов глутатионовой антиоксидантной системы. В данную систему включены также ферменты глутатионпероксидаза (GPx), глутатионтрансфераза (GST) и глутатионредуктаза (GR).

Глутатионпероксидаза восстанавливает пероксид водорода до воды, используя глутатион в качестве кофактора (Калинина и др., 2014). Кроме того, GPx катализирует реакцию восстановления глутатионом нестойких органических гидропероксидов, включая гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот, в стабильные соединения - оксикислоты. GPx является Se-содержащим белком, в связи с чем содержание этого фермента в мозге является критичным для состояния нервной системы и наличия или отсутствия нейродегенеративных заболеваний (Pillai et al 2014). Установлено, что инактивация GPx увеличивает чувствительность мозга к нейротоксинам и мозговой ишемии (Schweizer et al, 2004). В тоже время обнаружена связь между сверхэкспрессией GPx и улучшением пространственной памяти и увеличением количества нейронов в гиппокампе (Tsuru-Aoyagi et al, 2009)

Глутатион-S-трансфераза как антиоксидантный фермент защищает клетки от ксенобиотиков и продуктов ПОЛ посредством их восстановления. За счет Se-независимой глутатионпероксидазной активности GST восстанавливает гидроперекиси ПНЖК, фосфолипидов, холестерина (Prabhu et al., 2004; Hiratsuka et al., 1997; Wu & Dong, 2012). Субстратами GST могут быть продукты ПОЛ – акролеин и 4-гидоксиноненьаль, конъюгация которых с глутатионом защищает молекулы белков и ДНК от ковалентной модификации, также субстратом для GST являются продукты окисления катехоламинов (аминохром, допахром, норадренохром, адренохром). Конъюгация таких соединений с глутатионом вносит определенный вклад в систему антиоксидантной защиты клеток, так как в своем составе они содержат хинонную структуру, благодаря которой могут вызывать образование $O_2^{\bullet-}$ а, следовательно, и способствовать развитию окислительного стресса (Hubatsch et al., 1998; Hayes et al., 2005).

Известно, что S-глутатионилирование играет важную роль в механизмах клеточного сигналинга за счет чувствительности остатков цистеина к редокс-модификации. Список протеинов, функции которых модулируются за счет S-глутатионилирования, широк – белки, участвующие в метаболизме, белки, формирующие цитоскелет, ионные каналы, сигнальные белки (фосфатазы и киназы), факторы транскрипции, белки теплового шока (Lindahl et al., 2011). Процесс S-глутатионилирования может протекать при участии ферментов, к числу которых относится и GST. Установлено что в условиях развития окислительного стресса в цитоплазме усиливается процесс фосфорилирования субъединиц GSTA4, что способствует их связыванию с белком БТШ70, быстрой димеризации и последующей транслокации в митохондрии. Если субъединицы не подвергаются гиперфосфорилированию, то они не обладают высокой афинностью к БТШ70.в этом случае образующиеся димеры остаются в цитоплазме (Raza, 2011).

Глутатионредуктаза участвует в восстановлении глутатиона, а глутатионпероксидаза и глутатионтрансфераза восстанавливают гидропероксиды и, таким образом, предупреждают развитие пероксидации и появление ее вторичных метаболитов (Толпыгина, 2012). Значительный ряд работ показывает важную функцию GR в различных заболеваниях. Уровень экспрессии и активности GR и GPx снижался у пациентов с глиобластомой и менингиомой, атеросклеротическими заболеваниями (Go & Jones, 2010). Таким образом, глутатионовые ферменты обладают не только антиоксидантными свойствами, но и участвуют в разнообразных сигналинговых механизмах.

Все составляющие антиоксидантной системы необходимо рассматривать интегрально. Описанные элементы АОС и их соотношение следует учитывать, рассматривая стрессоустойчивость мозга в норме и при стрессе.

1.6. Свободнорадикальное окисление и головной мозг

Особенностью метаболизма мозга является интенсивный окислительный обмен (Ещенко Н.Д., 1996). 90% энергетической потребности мозга обеспечивается за счет аэробных процессов и 10% за счет аэробного гликолиза (Зенков и др., 2001).

Замечено, что мозг является более чувствительным к свободнорадикальному окислению и окислительному стрессу. Назовем основные причины, способствующие такой особенности мозга.

- Мембраны нервной ткани головного мозга содержат высокие концентрации полиненасыщенных жирных кислот, которые могут очень быстро подвергаться перекисидации, в свою очередь, образуя липидные гидроперекиси.

- Некоторые нейротрансмиттеры (например, норадреналин, дофамин или серотонин) обладают способностью к аутоокислению, в результате чего образуются цитотоксические продукты – 6-гидроксидофамин и дофаминсемихинон (Javoy-Agid, 1992).. Чрезмерное окисление дофамина (например, при болезни Паркинсона) приводит к образованию H_2O_2 , которая в результате реакции со свободным железом генерирует OH^\bullet , что сопровождается окислением белков и липидов на фоне низкой активности АОС (Rabinovic et al., 2000; De la Torre et al., 1996).

- Ткань мозга богата ионами металлов переменной валентности. Например, железо в «активной форме», необходимо для взаимодействия определенных нейротрансмиттеров (серотонин, дофамин) со своими рецепторами, таким образом, участвуя в процессах обучения, памяти, поведенческих реакциях (Youdim et al., 1989; Beard, 2003). Такие отделы мозга как, например, substantia nigra, caudate nucleus, putamen, содержат высокий уровень железа. Присутствие в тканях металлов переменной валентности способствует усилению аутоокисления нейротрансмиттеров.

- Митохондрии генерируют $O_2^{\bullet -}$ - главным образом через комплекс I.

- Нарушения в электрон-транспортной цепи митохондрий дофаминэргических нейронов также способствуют росту АФК.

Таким образом, благодаря вышеперечисленным фактам в головном мозге повышено содержание активных форм кислорода, а также и продуктов их взаимодействия с биомолекулами.

Для мозга показано низкое содержание основных компонентов антиоксидантной защиты и практически полное отсутствие каталазы. Однако активность СОД в головном мозге достаточно высока, но сильно варьирует в зависимости от локализации в той или иной области мозга (Halliwell & Gutteridge, 2007). На основании литературных данных можно заключить, что активность разных видов СОД в головном мозге при различных воздействиях изменяется незначительно, при этом резкие изменения активности СОД, связанные с ее модификацией или наследственными мутациями всегда неблагоприятны для деятельности нервной системы (Thomson et al., 2002; Liu et al., 2002). Увеличение активности СОД в мозговой ткани сопровождается повышением количества H_2O_2 и вызывает прооксидантные эффекты (Offer et al., 2000).

Присутствие такого элемента как селен, требуется мозгу постоянно. В связи с чем, присутствие GPx и тиоредоксин редуктазы, содержащих селен, сохраняется в мозге постоянным даже в присутствии дефицита потребления организмом этого элемента, (Pillai et al., 2014). Присутствие глутатиона в головном мозге также необходимо. При снижении уровня глутатиона у мышей выявлялись нейрональные повреждения и дегенерация митохондрий. В тоже время, чрезмерно повышенный уровень цистеина также может быть нейротоксичным (Wong et al., 2006)

Отмечается также, что ферментативные антиоксиданты снижают свою активность под воздействием стероидных гормонов, способствуя развитию окислительного стресса (Briehl et al., 1995). Снижение активности СОД и уменьшение количества GSH в мозге крыс наблюдается как при длительном введении кортикостерона, так и при хроническом стрессе (Zafir & Banu, 2009).

Мозг является АФК-сенситивным органом, который и сам по себе может продуцировать АФК в больших количествах. Поддержание редокс-баланса одна из важнейших функций мозга в условиях окислительного стресса.

1.6.1. Маркёры окислительного стресса в структурах головного мозга, ответственных за регуляцию адаптивного поведения и их связь с индивидуально типологическими особенностями поведения.

Как уже было сказано выше окислительный стресс это состояние сдвига баланса прооксидантной и антиоксидантной систем (редокс-баланса) в ту или иную сторону. Изменением редокс-баланса клетки, органа и организма в целом сопровождаются воспалительные, токсические, нейродегенеративные и пр. заболевания. В связи с чем, показатели состояния прооксидантной и антиоксидантной систем представляют интерес, как в клинических, так и в фундаментальных исследованиях. В настоящее время уже нет сомнений в том, что окислительный стресс связан также со стресс-реакцией при самых разнообразных воздействиях от физических нагрузок до эмоциональных стрессоров. Существует уже довольно большой объем данных посвященных исследованию изменений показателей прооксидантной и антиоксидантной активности под влиянием стрессоров. Изучаются показатели перекисного окисления липидов, антиоксидантных ферментов. Также в последние десятилетия уделяется много внимания изучению процессов перекисного окисления белков при различных стрессорных воздействиях. Существует множество методик позволяющих измерять как состояние прооксидантов, так и антиоксидантов (Halliwell & Whiteman, 2004; Арутюнян и др., 2000).

Наиболее подробно исследован такой показатель окислительного стресса как перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клеточных культурах, различных тканях, и крови. Это связано с тем, что изучение перекисного окисления липидов началось еще в 1820г. с опыта де Соссюра, в котором он демонстрировал абсорбцию воздуха масляной пленкой на поверхности воды. С тех пор в основном исследования по перекисидации липидов касались пищевой промышленности. Но в дальнейшем этой проблеме стали уделять много внимания биологи в связи с исследованиями в области радиационных поражений клеточных мембран (Прайор, 1979). Перекисидация мембранных ПНЖК может влиять на многие функциональные параметры такие как, текучесть мембран, их проницаемость и электрический потенциал, а также способность мембран контролировать транспорт метаболитов (Mattson, 1998).

В настоящее время накоплено большое количество данных о перекисном окислении липидов в структурах головного мозга животных в ответ на различные стрессорные воздействия. Показано, что динамика процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате головного мозга, синапсосамах и фракциях, обогащенных нейронами и глией, у крыс в ответ на острый стресс имеет две стадии. Первая стадия – снижение интенсивности ПОЛ в инициальный период стресса за счет усиленной секреции кортикостероидов, катехоламинов, пептидных гормонов, которые повышают супероксидперехватывающую активность и за счет роста активности СОД (Гуляева и др., 1989). Вторая стадия процессов ПОЛ в ответ на стресс – это активация процессов ПОЛ за счет усиленного радикалообразования и истощения буферной емкости антиоксидантной защиты (Гуляева и др., 1989).

В работах Толстухиной и Флерова при изучении эффектов предварительного введения кортизола перед воздействием стрессора на гипоталамус, гиппокамп и стриатум, отмечается интенсивное снижение продуктов ПОЛ, что связывается с вовлечением кортизола в антиоксидантную стресс-лимитирующую систему, тормозящую образование свободных радикалов и снижающую уровень ПОЛ при стрессе (Толстухина и др., 1999; Флеров и др., 2002; Флеров, Вьюшина, 2011). Отмечается, что стадия ингибирования ТБК-реактивных (промежуточных) продуктов ПОЛ при остром стрессе является отражением стадии срочной адаптации (Меерсон, 1981).

При исследовании ТБК-реактивных продуктов в гипоталамусе, париетоокипитальной, лимбической и сенсомоторной коре установлено, что именно гипоталамус реагирует ростом промежуточных продуктов ПОЛ после часового иммобилизационного стресса. Предполагается, что такое повышение продуктов ПОЛ в

гипоталамусе может быть обусловлено той ролью, которую играет эта структура в организации отрицательных эмоций. (Сосновский, Козлов, 1992).

Известно, что нейроны гиппокампа обладают чувствительностью к нейротоксическому действию глутамата, оксида азота (Ohmori T., 1996) и кортикостероидов (McEwen et al., 1995). К тому же гиппокамп считается ключевой структурой лимбической системы (Виноградова, 1973). Естественно, что показатели ПОЛ после стресса изучались и в этой структуре мозга. При исследовании первичных продуктов ПОЛ (диеновых и триеновых конъюгатов) и вторичных продуктов ПОЛ (Шиффовых оснований) после электрокожного раздражения было обнаружено снижение накопления первых и усиленное накопление вторых (Толстухина и др., 1999). Такая же динамика накопления продуктов ПОЛ в гиппокампе наблюдалась и при длительном иммобилизационном стрессе (Бояринова и др., 2009). По мнению авторов, такая картина характерна для первичной стресс-реакции («аварийной» стадии стресса), связанной с включением реакций, реализующих стресс и одновременно с включением реакций лимитирующих стресс (Барабой и др., 1992; Кожевников, 1989; Меерсон, 1981).

Стриатум - это структура мозга, имеющая отношения к двигательным, ассоциативным и психическим функциям. Известно, что в стриатуме производится отбор информации, поступающей из лимбических структур, сенсорных ядер и коры, что создает условия для выбора и запуска соответствующей поведенческой программы, как в обычных условиях, так и при действии различных стрессоров (Суворов, 1980; Суворов и др., 1995). При этом стриатум формирует афферентные потоки к нейросекреторным гипоталамическим центрам, делая любой гормональный ответ, в том числе и стрессорный, более пластичным и индивидуализированным (Рыбникова, 1999). При изучении в стриатуме первичных продуктов ПОЛ (диеновых и триеновых конъюгатов) и вторичных продуктов ПОЛ (Шиффовых оснований) после электрокожного раздражения паттерн изменений был аналогичен изменениям в гиппокампе (Флеров и др., 2002). Литературные данные по изучению перекисных процессов в стриатуме минимальны, вероятно, в связи с трудностью трактовки результатов из-за обогащенности этой структуры дофамином

Изучение показателей ПОЛ и активности антиоксидантов при стрессе в структурах ГМ крыс с различными характеристиками поведения также ведется не одно десятилетие. Так, например, показано, что у беспородных самцов-крыс, разделенных в тесте ЭР, в базальном состоянии содержание продуктов ПОЛ в гомогенате мозга было выше у крыс, проявлявших феномен эмоционального резонанса. А стресс вызывал

ингибирование ПОЛ у обеих групп. Исследование содержания продуктов ПОЛ у крыс линий Трайона (TMD и TMB) (Mowrer, 1940) показало, что у крыс неспособных к обучению, но устойчивых к стрессу (TMD) базальный уровень ПОЛ в гомогенате мозга и крови был ниже, чем у крыс (TMB) (Гуляева, 1989).

У эмоциональных и неэмоциональных групп крыс из беспородной популяции, которые разделялись в ПКЛ, было показано более интенсивное накопление продуктов ПОЛ в гомогенате мозга у эмоциональной группы по сравнению с неэмоциональной группой. После хронического воздействия недельной депривацией быстрого сна усиливались процессы ПОЛ у обеих групп крыс, но, как и в контроле у эмоциональных крыс накопление продуктов ПОЛ было выше, чем у неэмоциональных крыс (Бондаренко и др., 1985).

При разделении крыс на «активных» и «пассивных» в тесте «открытое поле» уровни ТБК-реактивных продуктов в гипоталамусе, как базальный, так и после иммобилизационного стресса не отличались ни между группами, ни после стрессирования. Хотя антиоксидантная активность GРх и СОД была различна у данных групп крыс в базальном состоянии и также отличалась разнонаправленностью после стресса (Перцов и др., 2011). Влияние длительной физической нагрузки на крыс, разделенных в тесте «открытое поле» по методу Холла (Ведяев, Чернобай, 1981) выявило различия в показателях ПОЛ (накопление МДА) в гипоталамусе. В группе «возбудимых» крыс накопление МДА росло более интенсивно, чем у группы «заторможенных» животных. Увеличение интенсификации ПОЛ у крыс возбудимого типа сопровождалось одновременным снижением активности СОД, а у «заторможенных» крыс активность СОД под влиянием физической нагрузки не менялась. (Девяткина и др., 1989).

Гиппокамп характеризуется выраженными протеомными особенностями после острой стрессорной нагрузки у крыс с различными характеристиками поведения при тестировании в открытом поле. Например, экспрессия СОД1 снижена у активных животных после стрессорной нагрузки (Шаранова и др., 2013).

Исследование экспрессии глутатионредуктазы в гиппокампе у высокотрещовных мышей (HAB-M) и низкотрещовных мышей (LAB-M) из аутбредной популяции SWISS CD1 показало отличия у этих групп животных в сторону сверхэкспрессии у трещовой группы (Salim, 2011).

Таким образом, несмотря на некоторую хаотичность и отсутствие системных исследований прооксидантной и антиоксидантной систем, можно говорить о том устойчивость организма не только к эмоциональному стрессу, но и к физическому

напряжению определяется состоянием ПОЛ и антиоксидантных ферментов, зависящим от типологических особенностей поведения.

1.6.2. Участие окислительной модификации белков и антиоксидантной системы в регуляции стресс-реакции у животных с различными типологическими особенностями поведения

Уже говорилось, что при стрессе создаются условия для интенсивной выработки свободнорадикальных продуктов. Именно они могут выполнять ключевую роль в развитии нарушений со стороны ГГАС и симпатoadреналовой системы. Причиной этих изменений может быть окислительная деструкция компонентов клеточных мембран и соответственно рецепторного аппарата или нарушение метаболизма самих гормонов и нейротрансмиттеров, вызванное усилением свободнорадикальных процессов.

Учитывая большую и очень разнообразную функциональную нагрузку белков в тканях, их окислительная модификация может носить, в отличие от перекисного окисления липидов, более избирательный и специфический характер при различных патологических состояниях.

Одно из центральных мест в работе сигнальных систем клетки принадлежит белкам и продуктам их метаболизма, в частности продуктам свободнорадикального окисления белков. Свободнорадикальное окисление белков можно рассматривать как систему внутренней модуляции и передачи информации как от внешней среды к внутриклеточным системам, так и наоборот (Вьюшина и др., 2012а; Дубинина, 2006). Имеются многочисленные исследования, подтверждающие, что при большинстве патологических состояний именно белки в большей степени, чем липиды и нуклеиновые кислоты, являются эффективными ловушками АФК, и их окислительная модификация рассматривается как один из ранних и надежных маркеров окислительного стресса (Дубинина и др., 2000; Davies, 1987; Winterbourn et al., 2000). Этот факт находит подтверждение в работах, в которых доказано, что продукты окисления белков при окислительных повреждениях в тканях проявляются раньше, и они более стабильны, по сравнению с продуктами ПОЛ (Grune et al., 1997; Reinheckel et al., 1998).

Белки плазмы, подвергшиеся окислительной деструкции, имеют довольно большой период полураспада. Известно, что окисленные белки могут находиться в клетках в течение многих часов. А продукты ПОЛ подвергаются детоксикации через несколько минут (Grune et al., 1994; Siu & Draper, 1982). В связи с чем, изменение

уровня карбонильных групп окисленных белков является наиболее перспективным маркером интенсивности свободнорадикальных процессов при ряде патологических состояний и воздействии неблагоприятных факторов (Davies, 1991; Davies et al., 1999).

Первые исследования по изучению уровня карбонильных производных окисленных белков проводились на модельных системах – эритроциты человека, культивируемые фибробласты кожи человека и ткани животных (крыс) разного возраста. Сейчас довольно много исследуются окислительные модификации белка (ОМБ) при старении, воспалительных и нейродегенеративных заболеваниях, а также при различных нервно-психических патологиях.

В состоянии окислительного стресса окислению подвергаются в первую очередь белки плазматических мембран, что приводит к их деполимеризации и лизису клетки (Dean et al., 1991).

Установлена взаимосвязь восстановления неврологического дефицита с регрессом степени выраженности окислительного стресса при разных типах ишемического инсульта. Это позволяет использовать динамические показатели ОМБ в диапазоне альдегидо- и кетонпроизводных динитрофенилгидразонов основного характера (430 и 530нм) в качестве маркера прогноза различных вариантов ишемического инсульта и оптимизации лечения больных (Кравцова и др., 2011).

Наиболее распространенный и легко обнаруживаемый тип повреждения белков – образование карбонильных групп при окислении аминокислот (лизина, аргинина и пролина) (Муравлева и др., 2010). Накопление окисленных белков рассматривается как один из факторов регуляции синтеза и распада белков, активации протеаз.

Интересно, что показатели ОМБ используют при исследовании вопросов эволюционного характера (например, филогенетические аспекты) (Гидулянов, 2014).

Исследовались такие продукты окисления белков как алифатические альдегид- и кетон- динитрофенилгидразоны основного (430 и 530нм или гидрофобные аминокислотные остатки), так и алифатические альдегид- и кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального (356 и 370нм или гидрофильные аминокислотные остатки) характера при метаболическом синдроме в сыворотке крови. Полученные данные показали, что как спонтанное, так и Фентон-индуцированное окисление при метаболическом синдроме растет, причем спонтанное увеличивается в большей степени, чем индуцированное, по сравнению с контролем (Ведунова и др., 2010).

Показатели ОМБ изучены в структурах головного мозга пренатально стрессированных крыс в онтогенезе (Вьюшина и др., 2012b). Обнаружено, что

онтогенетический профиль свободнорадикального окисления в структурах головного мозга изменяется после пренатального стресса.

Показатели ОМБ изучались также в аспекте ИТОП и стрессореактивности.

В нашей лаборатории исследования ОМБ проводились, в том числе, и на крысах линий KLA и KHA. Так, в сыворотке крови были обнаружены линейные различия. У крыс линии KHA уровень ОМБ был достоверно выше, чем у крыс KLA. При изучении окислительного стресса в ответ на иммобилизацию (1 час), эти две линии также продемонстрировали различную динамику. Рост процессов спонтанного окисления белков у крыс KHA и отсутствие достоверных изменений у крыс KLA. Кроме того, при исследовании Фентон-индуцированного окисления белков обнаружилось отсутствие межлинейных различий и различий внутри линий между контролем и опытом. Такой результат говорит о равных физиологических возможностях крыс каждой линии и отсутствии патологического истощения при данном виде стресса.

Изучение отличий в процессах ОМБ в сыворотке крови у беременных крыс линий ВП и НП после электрокожного раздражения не обнаружило межлинейных различий в базальном состоянии (Вьюшина и др., 2002). Однако после стрессорного воздействия выясняется, что у крыс линии ВП более интенсивно снижается спонтанное окисление белков, при этом Фентон-индуцированное окисление белков (показатель резервных физиологических возможностей организма) у данной линии крыс имеет более высокий уровень, чем у крыс линии НП.

Поскольку исследования у линейных крыс, различающихся по поведению при различных стрессорных воздействиях, выявили также и линейные различия в исследуемых показателях ОМБ, то было также проведено исследование уровня ОМБ в сыворотке крови у крыс линии Вистар, разделенных по показателям поведения в тесте Т-лабиринт (Вьюшина и др., 2011). В качестве стрессорного воздействия здесь была взята модель посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) по методу Takagi в модификации Шаляпиной (Шаляпина и др., 2006b). В этой работе также не были выявлены базальные межгрупповые различия у активной и пассивной групп крыс по показателям ОМБ. Но после ПТСР-подобного воздействия у активной группы крыс показатели ОМБ снижались, а у пассивной группы крыс увеличивались, что в очередной раз подтверждает мысль о том, что различия в поведенческих характеристиках определяют в каком направлении пойдет стресс-реакция.

Несмотря на значительные количества данных по изменению ОМБ после воздействия разнообразных стрессоров, данные эти несистемны и фрагментарны.

Данные об отличиях в содержании ОМБ в мозге и постстрессорных изменений этих показателей у представителей различных типов поведения фактически отсутствуют.

1.6.3. Особенности участия прооксидантной и антиоксидантной систем в стрессореактивности у пренатально стрессированных крыс.

В последние десятилетия большое внимание уделяется проблеме воздействия стресса, переживаемого матерью, на потомков. В публикациях, исследующих эту проблему, рассматриваются разнообразные стрессорные воздействия испытываемые беременными. Отмечается, что увеличение кортикостерона в крови у беременных вызывает поведенческие изменения у потомков (Diaz et al., 1995; Weinstock, 2005). Обнаружена связь между ростом тревожного поведения и аффективных расстройств у людей, чьи матери подвергались стрессу в течение беременности (Davis & Sandman, 2012). Большое количество исследований на животных моделях пренатального стресса подтверждают такие поведенческие изменения у потомков (Zohar & Weinstock, 2011). Показано, что депрессии и депрессивноподобные состояния ассоциируются с пренатальным стрессом (Van Lieshout & Boylan, 2010). По мнению M. Weinstock (2017) в число факторов влияющих на поведенческие сдвиги у пренатально стрессированных потомков входят изменения уровней серотонина и норадреналина, нарушения в ГАМК-системе. Эти факторы влияют на способности к обучению, повышают риск возникновения депрессивноподобного поведения и шизофрении. В последнее время выдвигаются предположения о том, что долговременные изменения в поведении пренатально стрессированных потомков обеспечиваются эпигенетическими механизмами, которые регулируются редокс-системой (Mikhed et al., 2015) и в частности процессами окислительной модификации белков. Повышение уровня материнских нейромедиаторов и кортикостерона вследствие стресса обеспечивает длительные нейрохимические и поведенческие эффекты у потомков посредством эпигенетических модификаций (Darnaudery & Maccari, 2008)

Ряд авторов рассматривает гормон-нейромедиаторный импринтинг развивающегося мозга как одну из причин нарушения эндокринных механизмов устойчивости к стрессу (Резников и др., 2004). В многочисленных публикациях сотрудников нашего института показано что «гормональные перестройки в пренатальном онтогенезе являются «программирующими» факторами, вносящими определенную коррекцию в генетическую программу формирования приспособительной деятельности» (Отеллин и др., 2007).

Как уже было отмечено выше, в нашей лаборатории проводились исследования по изучению показателей ОМБ и антиоксидантной системы у пренатально стрессированных крыс.

Было изучено влияние пренатального стресса на содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) у самцов и самок линии Вистар в неокортексе, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе (Герасимова и др., 2005). В этой работе было показано что, во-первых, ПС по-разному действует на показатели ПОЛ у самцов и самок, и во-вторых отмечалось, что уровень показателей ПОЛ в структурах мозга (за исключением неокортекса, где изменения отсутствовали), ответственных за адаптивное поведение снижается. Отмечалось, что такое снижение интенсивности ПОЛ может лежать в основе формирования специфического типа адаптивного поведения, свойственного ПС крысам.

Поскольку в неокортексе отсутствовали различия в уровнях показателей ПОЛ у контрольных и ПС крыс, то в дальнейшем были изучены показатели про- и антиоксидантной активности в нейронах и нейроглии данной структуры (Флеров и др., 2008). Причем исследовались крысы-самцы линии Вистар в возрасте 20 дней – период наиболее интенсивной миелинизации и в возрасте 90 дней – когда формирование нервной, эндокринной и половой систем фактически завершено (Rice & Baron, 2000). Обнаружилось, что ПС оказывает наибольшее влияние на свободнорадикальное окисление липидов и белков в нейронах и нейроглии у 20-дневных животных, а активность СОД снижается под действием ПС и у 20-дневных и у взрослых животных в нейронах, но не в нейроглии. На основании полученных данных было сделано предположение о том, что изменения показателей ПОЛ, ОМБ и активности СОД в онтогенезе могут свидетельствовать не о патологических процессах в неокортексе, а об адаптации ткани, вынужденной развиваться в условиях многочисленных десинхронозов. Об успешности адаптации говорит почти полное отсутствие патологических изменений показателей ПОЛ и ОМБ в нейронах неокортекса у взрослых ПС крыс.

Дальнейшее изучение влияния ПС на показатели ОМБ показало, что ПС изменяет онтогенетический профиль свободнорадикального окисления белков в стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе – структурах мозга, осуществляющих нейроэндокринный контроль высших интегративных функций (Вьюшина, 2006).

В лаборатории было также исследовано влияние позднего пренатального стресса (ППС) на показатели ОМБ и антиоксидантную систему (АОС) у взрослых самцов крыс линии Спрег-Дули (Вьюшина и др., 2012а). Исследовались как

структуры мозга, так и сыворотка крови. Было показано, что у крыс данной линии наиболее драматичные изменения показателей ОМБ наблюдаются в гипоталамусе, тогда как в гиппокампе наблюдалось некоторое улучшение оксидативных процессов у ПС животных по сравнению с контролем. Эти данные, а также исследование поведенческих показателей в тестах «открытое поле» и «Т-образный лабиринт» позволили предположить, что улучшение показателей поведения в условиях «Т-образного лабиринта» ПС крыс связано с сохранением процессов окислительной модификации белков в коре и с улучшением показателей ОМБ в гиппокампе. Тогда как ухудшение показателей ОМБ в гипоталамусе приводит к неспособности ПС животных адекватно реагировать на стрессогенные условия «открытого поля». Изучение же показателей ОМБ, активности СОД и количества –SH групп в сыворотке крови также продемонстрировало влияние ППС на адаптивные способности на общеорганизменном уровне.

В целом можно отметить, что вышеприведенные исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали существенное влияние пренатального стресса на про- и антиоксидантную системы структур мозга, ответственных за формирование адаптивного поведения. Кроме того, полученные данные являются уникальными и не имеют аналогий, как в российских, так и в зарубежных публикациях.

Все вышесказанное позволяет с определенной долей уверенности предположить, что пренатально стрессированные потомки представляют собой особую группу, обладающую определенными фенотипическими особенностями поведения. Одним из механизмов, формирующих такие особенности, могут являться процессы окислительной модификации белков. В связи с этим представляет особый интерес исследовать изменения в процессах окислительной модификации белков у пренатально стрессированных крыс в модели ПТСР как у особой группы, имеющей специфические поведенческие и нейроэндокринные свойства.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2.1 Экспериментальные животные.

Работа проведена на животных из ЦП Биокolleкция ИФ РАН, поддерживаемой Программой ФАНО России по сохранению и развитию биоресурсных коллекций. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 1986(2010/63/ЕЕС) об использовании лабораторных животных. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П.Павлова РАН.

2.1.1. Крысы, отобранные по поведенческим характеристикам.

Эксперименты проводились на взрослых половозрелых крысах-самцах линии Вистар в количестве 200 штук с массой тела 200-250г. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях по 6 особей в клетке при $t^{\circ}\text{C} +18+22$, свободном доступе к пище и воде и с 12-часовым световым режимом. После доставки в лабораторию крысы в течение 7 дней проходили адаптацию к лабораторным условиям и были приучены к ежедневному хендлингу. Далее из данной популяции крыс путем поведенческого тестирования в Т-лабиринте отбирались группы активных (А) и пассивных (П) животных, которые и использовались в дальнейших исследованиях.

2.1.2. Пренатально стрессированные крысы.

Также объектом исследования служили пренатально стрессированные (ПС) животные, выращенные из крыс линии Вистар. Данные животные содержались в тех же лабораторных условиях, как было описано выше. ПС крысы длительное время изучаются в нашей лаборатории и представляли интерес для данного исследования как группа, обладающая специфическими фенотипическими особенностями: что по данным экспериментов нашей лаборатории и многочисленным литературным данным выражается в изменении поведенческих характеристик (по сравнению с контрольными животными) и связано с изменением стрессореактивности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС). ПС группа крыс также состояла из половозрелых самцов с массой тела 200-250г.

В один экспериментальный цикл входило 15-20 животных одновременно из «активной», «пассивной» и ПС групп контрольных и подвергнутых стрессорным воздействиям.

2.2. Метод оценки индивидуальных различий поведения.

В настоящее время существует достаточно большое количество методик, позволяющее дифференцировать животных, отличающихся типологическими характеристиками поведения. В исследованиях, использующих крыс как экспериментальный материал, предлагается, например, использование батареи тестов для разделения животных как по двигательнo-исследовательским, так и по эмоциональным показателям, для чего обычно используются тесты «открытое поле», «вынужденное плавание», тест Фогеля, «приподнятый крестообразный лабиринт» и «темная-светлая камеры» в разных сочетаниях (Kabbaj et al., 2000; Мельников и др., 2004; Чумаков и др., 2005; Судаков и др., 2013). Иногда исследователи предпочитают использовать какой-либо один тест, например, только тест «открытое поле» или тест «эмоциональный резонанс» (Юматов, Мещерякова, 1990; Сергутина, 2010, Перцов и др., 2011).

В предыдущих работах нами было обнаружено, что поведенческие характеристики и показатели окислительной модификации белков в структурах головного мозга крыс отражают стрессогенную реакцию животных в условиях теста «открытое поле», тогда как показатели поведения и ОМБ после тестирования в Т-образном лабиринте свидетельствуют об отсутствии стрессорных факторов в данном тесте (Вьюшина и др., 2012a). Поэтому, чтобы исключить девиации поведенческих характеристик и показателей ОМБ в структурах мозга крыс, связанные со стрессогенным характером теста «открытое поле» в нашей лаборатории был разработан и используется метод разделения крыс на группы, отличающиеся активной и пассивной стратегией поведения при помощи теста «Т-образный лабиринт» (Шаляпина и др., 2006a). Также была разработана статистико-вероятностная модель, в которой поведенческие активность и пассивность рассматривались как функции времени. Были предложены нормированные индексы поведенческой активности и поведенческой пассивности, которые определялись у каждого животного после проведения тестирования (Шаляпина и др., 2006a). Далее индексы нормировались и на их основании рассчитывались границы групп. В качестве границ групп были взяты 25%-ные квантили и среднее, которые делили распределение на части: $X1=M-0,67SD$, $X2=M \pm SD$, $X3=M+0,67SD$, где M -среднее значение, SD -стандартное отклонение (Великжанин, 2004). Но в дальнейшем при разделении массивов крыс на группы по поведенческим характеристикам мы также использовали метод кластеризации k -средними (как более удобный и универсальный), при помощи статистической программы «IBM SPSS Statistics 21». Для того, чтобы не было сомнений в

правильности выбранного метода, был проведен корреляционный анализ активных и пассивных групп животных, разделенных посредством статистико-вероятностной модели и кластерным анализом k-средних по показателям поведения. Была выявлена статистически достоверная корреляция по показателям горизонтальной и вертикальной двигательной активности, латентному периоду входа, времени неподвижности, индексу поведенческой пассивности, индексу поведенческой активности, средней скорости движения (см. таблицу 1). Коэффициент корреляции соответствия групп, выявленных двумя разными вышеупомянутыми способами $r=0,72$ при $p<0,05$. Таким образом, использование кластерного анализа в программе «IBM SPSS Statistics 21» для разделения крыс на группы с разными поведенческими характеристиками представлялось достоверным и целесообразным.

Таблица 1. Результаты корреляционного анализа показателей поведения и поведенческих индексов (латенция – латентный период входа в лабиринт, ГДА – горизонтальная двигательная активность, ВДА – вертикальная двигательная активность, НЕПОДВ – время неподвижности, ССД – средняя скорость движения, ИПП – индекс поведенческой пассивности, ИПА – индекс поведенческой активности).

Коэффициент корреляции Спирмана

	латенция	ГДА	ВДА	НЕПОДВ	ССД	ИПП	ИПА
латенция	1,000	-,002	-,346*	,114	-,002	,378*	-,378*
ГДА	-,002	1,000	,675**	-,746**	1,000**	-,675**	,675**
ВДА	-,346*	,675**	1,000	-,758**	,675**	-,819**	,819**
НЕПОДВ	,114	-,746**	-,758**	1,000	-,746**	,915**	-,915**
ССД	-,002	1,000**	,675**	-,746**	1,000	-,675**	,675**
ИПП	,378*	-,675**	-,819**	,915**	-,675**	1,000	-
ИПА	-,378**	,675**	,819**	-,915**	,675**	-1,000**	1,000**

*. Корреляция значима на уровне 0.05 (2-сторонняя).

**. Корреляция значима на уровне 0.01 (2-сторонняя).

Как уже было сказано выше, для определения индивидуально-типологических характеристик поведения крыс использовали Т-образный лабиринт, который состоит из трех рукавов. Один рукав длиной 19см шириной и высотой 4см располагается в центре между правым и левым рукавами и является норкообразным входом в лабиринт. Боковые рукава лабиринта образуют общий коридор длиной 150см. В течение 5мин у

крыс измеряли следующие показатели: период латенции входа, горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность, время неподвижности. В зависимости от величины данных показателей крысы были распределены на три группы активная (А), пассивная (П) и средняя. В дальнейшем крысы, входящие в среднюю группу в исследованиях не использовались.

2.3. Моделирование пренатального стресса.

Для работы использовали половозрелых самок крыс линии Вистар массой 220-250 г, выращенных в виварии Института физиологии имени И.П.Павлова РАН. День наступления беременности регистрировали в случае обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке самок в стадии эструс. Для моделирования пренатального стресса беременных самок с 15-го по 19-й день беременности подвергали ежедневной 60-минутной иммобилизации в пластиковых пеналах размером 20х6х6 см. Дни беременности, в которые проходило стрессирование были выбраны в связи с тем, что именно в это время идут интенсивные процессы созревания структур головного мозга (Rice & Baron, 2000). Полученное от самок потомство в количестве 50 самцов, содержали совместно с матерью до 30-дневного возраста и далее по 6 особей в клетке при свободном доступе к пище и воде.

2.4. Моделирование посттравматического стрессового расстройства

По литературным данным в экспериментальных исследованиях используется несколько моделей ПТСР, но отмечается, что все используемые и разрабатываемые модели должны соответствовать критериями, описанными Yehuda и Antelman (1993). Большинство этих моделей имеет общую идеологию, основанную на предъявлении животному того или иного травматического стресса и в последующем через некоторое, порой продолжительное время (от 7 до 14 дней), повторного стрессирующего воздействия, которое может быть той же модальности, что и травматическое, но менее сильное. Подобный подход считается наиболее отвечающим этиологии развития ПТСР у людей, поскольку это заболевание возникает как результат сильного психотравмирующего события и сопровождается «репереживанием» этой травмы. Причем само заболевание непосредственно после травматизации может и не проявляться, а развиваться и сохраняться в течение длительного времени. Поэтому те экспериментальные модели, которые учитывают описанные выше особенности ПТСР, считаются наиболее адекватными для изучения механизмов развития болезни в эксперименте (Yehuda & Antelman, 1993).

К таким моделям относится парадигма «стресс-рестресс». Суть этой парадигмы заключается в создании первоначального психотравмирующего стресса, который приводит к развитию реактивного состояния, и в дальнейшем применении более слабого рестресса, который запускает механизм острого реактивного тревожно-депрессивного состояния (Yehuda & Antelman, 1993; Волошин, 2005; Ордян и др., 2013). В лаборатории нейроэндокринологии для исследования механизмов развития ПТСР-подобного состояния у крыс используется две модели в рамках парадигмы «стресс-рестресс». В первой модели постстрессорная психопатология создавалась путем двукратного водно-иммерсионного воздействия с иммобилизацией (Шаляпина и др., 2006а). Модель создает ситуацию тяжелого комбинированного эмоционального и физического стресса, включающего иммобилизационный и холодовой стрессоры.

Крыс фиксировали в железных пеналах, закрепленных на общей платформе, и погружали на один час в воду с температурой 16°C в положении на спине. По окончании процедуры их тщательно обсушивали и помещали в жилые клетки. Затем, спустя 10 дней, воздействие повторяли в течение 30 мин. В предварительных экспериментах было показано, что максимальные изменения поведения, связанные с развитием постстрессорной психопатологии, у животных с различными поведенческими характеристиками наблюдаются в данной модели через 20 дней после первого воздействия (Шаляпина и др., 2006б). А максимальные изменения уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) после неизбежного стресса в отделах головного мозга (ГМ), связанных с нейроэндокринной регуляцией, наблюдается на 21-й день после стресса (Флеров, Герасимова, 2006). Вследствие чего животных изучаемых в данной модели брали на биохимические исследования через 20 дней после первого стрессирования.

Вторая модель ПТСР, которая была использована в данной работе, также является «стресс-рестресс» парадигмой (Liberzon et al., 1997). Крыс первоначально подвергали тяжелому комбинированному стрессу, состоящему из последовательно применяемых воздействий: 2-часовой иммобилизации, 20-минутного вынужденного плавания и после 15-минутного перерыва эфирного стресса до потери сознания. Триггером для развития ПТСР-подобного состояния в данной модели являлся рестресс, заключавшийся в 30-минутной иммобилизации животных на 7-е сутки после комбинированного стресса. Исследования, выполненные в нашей лаборатории ранее, показали, что в данной парадигме наиболее выраженные изменения в тревожно-депрессивном состоянии животных, в их гормональном и нейрогормональном статусе наблюдаются через 10 дней после рестресса (Mironova et al, 2013), При этом у ПС

животных поведенческие и гормональные проявления ПТСР-подобного состояния сохраняются длительно вплоть до 20 дней после рестресса (Пивина и др., 2014; Ордян и др., 2013). В связи с этим данная модель ПТСР была использована для анализа изменений ОМБ в ходе формирования ПТСР-подобного состояния у ПС самцов с учетом длительности его течения (10 и 20 дней после рестресса). Животных исследуемых групп в определенные дни развития ПТСР-подобного состояния декапитировали и отбирали образцы тканей мозговых структур и крови.

2.5. Исследование влияния пренатального стресса на динамику стрессореактивности редокс-системы в структурах головного мозга и сыворотке крови.

В работе использовались 2 группы взрослых крыс самцов Вистар. Группа 1 состояла из крыс, не подвергавшихся воздействиям стресса. Группа 2 состояла из пренатально стрессированных животных. В качестве стрессорного воздействия использовался 20-минутный иммобилизационный стресс в узком пластиковом пенале. Для определения динамики стрессореактивности редокс-системы в структурах головного мозга и в сыворотке крови крыс декапитировали в заданный момент времени после начала стресса. Поскольку в лаборатории уже исследовалась стрессореактивность ГГАС и было установлено, что значимыми временными промежутками от начала стрессирования являются 20 минут, 1 час, 3 часа и сутки от начала стрессирования (Ордян, Пивина, 2003), то в данном эксперименте были взяты именно эти временные промежутки для проведения корректного анализа полученных результатов. Кроме того, образцы тканей и крови отбирались у крыс, не подвергавшихся иммобилизации и использовавшихся для сравнения в качестве контрольной группы. Каждая серия опытов состояла из 5 крыс группы 1 и 5 крыс группы 2 (в каждой группе была 1 контрольная крыса и 4 крысы, подвергавшиеся иммобилизационному стрессу и декапитированные в разные промежутки времени от начала стресса).

2.6. Отбор и подготовка образцов.

Туловищную кровь собирали в пробирки, центрифугировали при 2500 об/мин и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин.. Из черепной коробки извлекали мозг, из которого на льду выделяли неокортекс, стриатум, гиппокамп и гипоталамус. Далее готовили из ткани 10% гомогенат в 0.1М фосфатном буфере ($\text{pH}=7.4$), гомогенат центрифугировали при 10 000g, $t=+4^{\circ}\text{C}$ в течение 40мин для удаления клеточного дебриса. Из готовой пробы

часть отбирали для определения спонтанной и индуцированной реактивом Фентона окислительной модификации белка и количества –SH групп белков ex temporo. Оставшуюся часть пробы хранили при $t=-70^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего определения активности антиоксидантных ферментов.

2.7. Определение продуктов окислительной модификации белков (ОМБ).

Для количественного определения продуктов перекисного окисления белков (ПОБ) был применен метод, основанный на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков и 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрируют спектрофотометрически (рис.6).

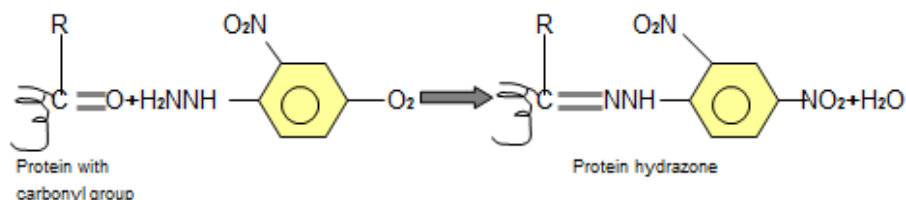


Рис.6. Реакция окрашивания карбонильных групп ДНФГ с образованием динитрофенилгидразонов (цит. по R.Sultana, 2011).

Реактивы:

1. Na-K-фосфатный буфер 0.01M, pH=7.4
2. Стрептомицина сульфат (ICN), 10% раствор в 50мМ HEPES (Sigma), pH=7.2
3. FeSO₄ 10мМ
4. ЭДТА 10мМ
5. H₂O₂ 0,1M
6. Трихлоруксусная кислота (ТХУ) 20%
7. HCl 2M
8. 2,4-ДНФГ 0.1 M на 2M HCl
9. Этилацетат
10. Этанол 96%
11. Мочевина 8M
12. Реактив Фентона: смесь FeSO₄ 10мМ, ЭДТА 10мМ и H₂O₂ 0,1M (1:1:2)

Степень чистоты всех реактивов – ЧДА.

- Растворы для реактива Фентона готовились на деионизированной воде ex temp.

- Поскольку ДНФГ плохо растворяется во всех растворителях, кроме этилацетата, то при приготовлении раствора на 2М HCl необходима фильтрация.

Определение содержания продуктов ОМБ в тканях

Перед определением продуктов ОМБ из проб производят удаление нуклеиновых кислот, которые могут повышать уровень карбонильных соединений, реагирующих с ДНФГ. Для этого используют предварительную обработку гомогената стрептомицином (Levin et al., 1990).

После центрифугирования 20мкл супернатанта отбирали в отдельные пробирки для определения содержания белка по методу Lowry. К оставшемуся супернатанту прибавляли раствор стрептомицина в соотношении 1:9 (стрептомицин:супернатант) и оставляли на 15минут при комнатной температуре для осаждения нуклеиновых кислот. После этого смесь центрифугировали в течение 20мин. в центрифуге К-26 при 200g для удаления осадка нуклеиновых кислот и надосадочную жидкость использовали для определения продуктов ОМБ.

Определяли продукты **спонтанного** (СОМБ) и **Фентон-индуцированного** (ФОМБ) окисления белков. Индуцировали ОМБ реактивом Фентона, представляющим собой смесь ионов металла переменной валентности и H₂O₂, генерирующей активные форма кислорода (АФК). Спонтанная окислительная модификация белков характеризует базальный уровень окисления белков в образце. Индуцированная окислительная модификация является показателем приращения продуктов окисления, рассматривается как показатель наличия субстрата для свободнорадикальных процессов, и в целом, как показатель устойчивости системы к переоксислению (Кузьменко Д.И., Лаптев Б.И., 1999).

Для исследования уровня спонтанного ОМБ брали две параллельные пробы по 100-200мкл надосадочной жидкости, содержащей 0,5-0,7 мг белка, и доводили объем пробы до 0,5 мл Na-K-фосфатным буфером. Одна проба использовалась в качестве опытной, вторая – представляла собой контроль.

Для исследования уровня Фентон-индуцированного окисления белков брали такие же две параллельные пробы, но перед доведением объема проб Na-K-фосфатным буфером до 0,5 мл в них добавляли в качестве стимулирующей системы Фентона 50мкл смеси Fe и ЭДТА и 50мкл H₂O₂.

Контрольные и опытные пробы инкубировали при 37⁰С в течение 15мин. После окончания инкубации в пробы добавляли 0,5мл холодной 20% ТХУ для осаждения белка. Затем в опытные пробы добавляли 0,5мл 2,4-ДНФГ, приготовленного на 2М HCl, для окрашивания продуктов ОМБ, а в контрольные пробы добавляли 0,5мл 2М

HCl. Окрашивание проводили 1 час при комнатной температуре. Окрашенные белки осаждали путем центрифугирования при 200g в течение 20мин. Полученный осадок дважды промывали 2-3мл смеси этанол:этилацетат (1:1) с целью устранения непрореагировавшего 2,4-ДНФГ и примесей липидов, подсушивали и растворяли в 3мл 8М мочевины с добавлением 1 капли 2М HCl.

Продукты реакции регистрировали на двух длинах волн 270нм и 363нм, что соответствует карбонильным производным белков с гидрофильными и гидрофобными аминокислотными остатками (Jones et al., 1956, Назаров и др.,1956). Количество продуктов ОМБ выражали в единицах оптической плотности, рассчитанной на 1мг 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 содержания продуктов ОМБ в сыворотке крови. Сыворотка крови отличается от тканей химическим составом, поэтому определение содержания продуктов ОМБ в ней имеет некоторые особенности. Так, в сыворотке крови нет необходимости осаждать нуклеиновые кислоты, а содержание белка требует других разведений.

Перед началом анализа сыворотку разводили физиологическим раствором в 10 раз (1:10). Содержание белка в сыворотке крови измеряли по методу Lowry. При определении уровня спонтанного ОМБ к 50мкл разведенной сыворотки приливали 0,95мл 0.01М Na-K-фосфатного буфера. Для определения Фентон-индуцированного ОМБ количество буфера уменьшали до 0,75 мл, в качестве индуцирующей системы Фентона в пробу добавлялись 0.1мл смеси Fe и ЭДТА и 0.1мл H₂O₂. Далее также как и для ткани, для проб сыворотки ставили две параллельные пробы, одна из которых служила контролем. Конечный объем проб составлял 1мл. контрольные и опытные пробы инкубировали 15мин при 37°C, затем добавляли в пробы 1мл холодной 20%ТХУ для осаждения белка, затем в опытные пробы добавляли 1мл 0,1М 2,4-динитрофенилгидразина, а в контрольные – 1мл 2М HCl. Окрашивание также продолжалось в течение 1часа при комнатной t°, затем пробы центрифугировали при 200g в течение 10мин. в центрифуге К-26. Осадок дважды промывали 2-3мл смеси этанол:этилацетат, подсушивали и растворяли в 3 мл 8М мочевины с добавлением 1 капли 2М HCl.

Продукты реакции регистрировались также как в тканях, степень окисленной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, рассчитанной на 1 мг белка (Е/мг белка).

2.8. Определение активности цитозольной Zn-Cu-супероксиддисмутазы.

Для определения активности СОД следует создать систему, обеспечивающую постоянную генерацию $O_2^{\bullet-}$. Поскольку по мнению И.Фридовича, открывшего фермент косвенные методы определения активности СОД являются более чувствительными (Фридович, 1979) мы использовали косвенный метод с использованием системы, обеспечивающей восстановление нитросинего тетразолия (Чевари и др., 1985) с дополнениями (Арутюнян и др., 2000). Генерация $O_2^{\bullet-}$ производилась в системе, состоящей из НАД•Н, феназин-метасульфата (ФМС) и нитросинего тетразолия (НСТ). В результате последовательных окислительно-восстановительных реакций происходит вначале восстановление ФМС с образованием $O_2^{\bullet-}$, а затем электроны и протоны от ФМС перебрасываются на НСТ. НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия, окрашенного в синий цвет. СОД конкурирует с НСТ за $O_2^{\bullet-}$, в результате чего процент восстановления НСТ снижается. Основная реакция взаимодействия НАД•Н и ФМС достигает равновесия в течение 10 мин и, соответственно, детерминирует равновесие ферментной реакции.

Реактивы:

1. Na-K-фосфатный буфер 0,15М, pH=7,8; (буфер I);
2. 2мМ трис, содержащий 1мМ ЭДТА, pH=8,0 (pH доводят HCl); (буфер II)
3. Реагент I: буфер I, содержащий 0,17мМ ЭДТА, 0,5мМ НСТ и 0,3мкМ ФМС;
4. Реагент II: 1мМ НАДН, приготовленный на буфере II
5. Этанол 96%
6. Хлороформ
7. KH_2PO_4

Производство реактивов: Трис – «Sigma»;

НАДН, НСТ, ФМС – «ICN»

Остальные реактивы приобретены в фирме «Вектон»

Степень чистоты всех реактивов – ЧДА.

При проведении анализа следует обязательно соблюдать некоторые условия: 1) концентрация ФМС в инкубационной среде должна быть не меньше 0,3 мкМ, концентрация НАДН – не менее 20нМ. В этом случае конечная концентрация НАДН будет 25нМ. 2) НСТ плохо растворяется в воде, в связи с чем, необходимо

профильтровать реагент I после тщательного его перемешивания. 3) реагенты I и II готовятся ex temp. И могут храниться в холодильнике в течение 1 часа. 4) НАДН следует хранить при $t = -20^{\circ}\text{C}$, использовать очень быстро и перед использованием необходимо определять концентрацию неокисленного НАДН в коммерческом препарате. Для этого необходимо измерить экстинкцию буфера II при длине волны 340нм, затем экстинкцию реагента II. Концентрация НАДН в коммерческом препарате рассчитывают по следующей формуле:

$$C = (E_0 - E_k) / 0,311, \text{ где}$$

C – концентрация НАДН в образце, мМ

E_0 – экстинкция буфера II с НАДН (реагента II)

E_k – экстинкция буфера II

0,311 – коэффициент молярной экстинкции для НАДН

Для определения активности СОД в тканях брали 100-250 мг ткани, гомогенизировали в 5-кратном объеме буфера I ($\text{pH} = 7,8$) и центрифугировали 20мин про 13 000g в центрифуге К-24 при $+4^{\circ}\text{C}$ для осаждения клеточного дебриса.

Для определения активности СОД в сыворотке крови ее разводили физиологическим раствором в соотношении 1:4.

Для проведения ферментативной реакции брали 1мл супернатанта, полученного после центрифугирования гомогената ткани или 1мл разведенной сыворотки, прибавляли 0,45 мл смеси хлороформ:этанол (1:2) для экстракции фермента и 300мг KH_2PO_4 для осаждения белковых примесей, размешивали на льду в течение 1мин, центрифугировали при 12 000g в течение 50мин в центрифуге К-24. Образовавшуюся после центрифугирования надосадочную жидкость использовали для определения активности фермента и определения содержания общего белка. Количество белка измеряли по методу Lowry.

Для определения активности фермента к 2 мл реагента I прибавляли 100мкл надосадочной жидкости, затем запускали реакцию прибавлением 50мкл реагента II. Одновременно с опытной пробой ставили контрольную, состоящую только из реагента I и пробу на восстановление НСТ, куда не добавляли аликвоту ферментного препарата. После прибавления реагента II пробы помещали на 10 минут в темноту. Через 10 минут измеряли оптическую плотность опытной и контрольной пробы при $\lambda=540\text{нм}$ относительно контрольной пробы. Далее высчитывали процент блокирования реакции восстановления НСТ. Расчет производили по формуле:

$$\text{процент блокирования} = ((E_0 - E_{\text{пр}}) / E_0) * 100\%, \text{ где}$$

E_0 – оптическая плотность пробы с восстановленным НСТ

$E_{\text{пр}}$ – оптическая плотность пробы с ферментным препаратом

Торможение реакции, равное 50% принимали за 1 условную единицу активности фермента (у.е.). Расчет активности фермента производили на 1 мг белка, учитывая количество супернатанта, внесенного в инкубационную среду, состоящую из реагента I. Результаты выражали в у.е./мг белка.

2.9. Методы изучения глутатионового звена антиоксидантной системы.

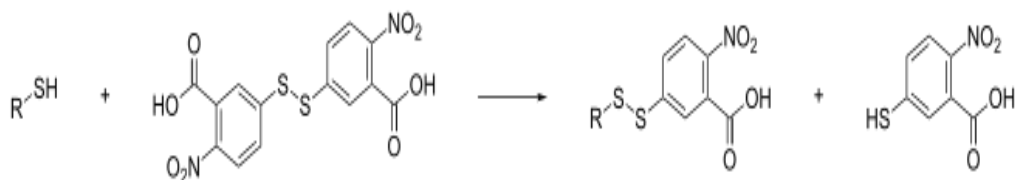
Подготовка тканей структур ГМ осуществлялась следующим образом. Ткань массой 100-150 мг гомогенизировалась в 10-кратном количестве Na-K-фосфатного буфера 0,1M, pH=7,4 и далее центрифугировалась при 14 000g $t=+4^{\circ}\text{C}$ в течении 20 мин для осаждения клеточного дебриса. Полученный супернатант использовался для дальнейших исследований.

2.9.1. Определение общего количества тиоловых SH- групп.

Уровень содержания восстановленного глутатиона выступает в качестве наиболее раннего показателя усиления окислительных процессов (Halliwell & Gutteridge, 1990).

В основе определения общего количества тиолов в тканях и сыворотке крови лежит спектрофотометрический метод, предложенный Элманом (Ellman, 1959) в модификации Соколовского (1997). Преимущества этого метода заключаются в быстрой и хорошей воспроизводимости.

Принцип метода основан на способности низкомолекулярных тиоловых соединений при взаимодействии с 5,5' – дитиобис (2-нитробензойной кислоты) – ДТНБ (реактив Элмана) расщеплять S-S связи ДТНБ и образовывать смешанный дисульфид тионитробензоатпротеина и стехиометрические количества тионитробензоатдианина, имеющих интенсивную желтую окраску и максимальный пик поглощения при $\lambda=412\text{nm}$.



Реактивы:

1. Na-K-фосфатный буфер 0,1M, pH=8,0
2. ДТНБ («ICN»)

Предварительно готовится маточный раствор ДТНБ: 39,6мг ДТНБ растворяют в 10мл фосфатного буфера pH=8.0. Рабочий раствор готовится ex temp., для чего маточный раствор ДТНБ разводится в 150 раз также фосфатным буфером pH=8,0. Для анализа готовятся контрольная и опытная проба. В эти пробы берется 50мкл тканевого гомогената или сыворотки крови, далее в контрольную пробу добавляется фосфатный буфер pH=8,0 в количестве 2,5мл, а в опытную пробу добавляется рабочий раствор с ДТНБ в таком же количестве. Холостая проба для фиксации «0» состоит из фосфатного буфера в количестве 2,55мл. Также для контроля должного качества раствора ДТНБ необходимо еще одна проба, которая состоит из рабочего раствора ДТНБ в количестве 2,55 мл. Подготовленные пробы выдерживаются 30 мин. в темноте при t= 25°C. Далее пробы фотометрируются при $\lambda=412\text{nm}$. Концентрация тиоловых групп высчитывается по формуле:

$$C_{\text{SH}} = A * (E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}) / (B * E), \text{ где}$$

A – общий объем анализируемой пробы в мл

B – количество взятого для анализа образца (мл)

$E_{\text{пр}}$ – оптическая плотность анализируемой пробы

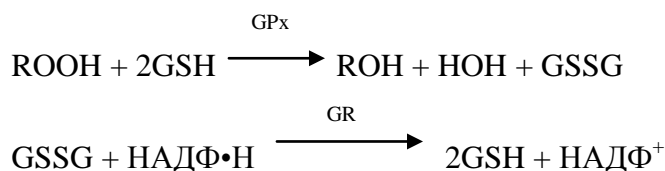
$E_{\text{к}}$ – оптическая плотность контрольной пробы

E – коэффициент молярной экстинкции окрашенного продукта $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Результаты выражаются в мкмоль/л.

2.9.2. Определение активности глутатионпероксидазы.

Активность глутатионпероксидазы определялась по методу (Paglia & Valentine, 1967). Данный метод основан на том, что окисленный глутатион GSSG, возникший в результате пероксидазной реакции восстанавливается добавленной глутатионредуктазой дрожжей при участии НАДФ•Н



Скорость образования GSSG в глутатионпероксидазной реакции эквивалентна окислению НАДФ•Н в сопряженной реакции. О превращении НАДФ•Н следят по убыли экстинкции на волне 340nm.

В качестве органической перекиси – субстрата реакции использовали гидроперекись кумола. Для ингибирования окисления в пробы добавляли азид натрия.

Реактивы:

1. Na-K-фосфатный буфер 50мМ, pH=7,2

2. ЭДТА – 0,5мМ
3. NaN₃ – 4мМ
4. восстановленный глутатион – 5мМ («ICN»)
5. глутатионредуктаза – 0,1 у.е./мл («ICN»)
6. НАДФН – 0,2мМ («ICN»)
7. гидроперекись кумола – 0,073мМ

Реакционная смесь, состоящая из фосфатного буфера, ЭДТА, NaN₃, восстановленного глутатиона, глутатионредуктазы и НАДФН приготавливалась непосредственно перед началом измерений. Образец тканевого гомогената в количестве 100мкл помещался в кювету, далее добавлялась реакционная смесь в количестве 1.8мл и реакция запускалась 100мкл гидроперекиси кумола. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 340нм против воды сразу же после начала реакции и через 3 минуты. Содержание белка в пробе измеряли по методу Lowry.

Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = (\Delta E_{340} \cdot 2 \cdot 1000) / (6,22 \cdot a), \text{ где}$$

ΔE_{340} – изменение оптической плотности при 340нм за 1мин инкубации

2мл – общий объем пробы при инкубации

6,22 мМ*¹см⁻¹ – миллимолярная экстинкция для НАДФ•Н

1000 – коэффициент перевода мкмоль в нмоли

a – содержание белка в пробе.

За единицу активности GPx принимали количество нмолей продукта реакции GSSG, образовавшегося в 1мин в расчете на 1мг белка.

2.9.3. Определение активности глутатион-S-трансферазы.

Определение активности этого фермента основано на оценке скорости ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) согласно методу (Habig, 1974).

Реактивы:

1. Na-K-фосфатный буфер 0,1М, pH=6,6
2. восстановленный глутатион («ICN») 2мМ раствор на фосфатном буфере
3. абсолютный метанол
4. раствор ХДНБ («ICN») 2мМ раствор, приготовленный на абсолютном метаноле

Реакцию проводят в кювете спектрофотометра, в которую добавляют 100мкл образца, 1.8мл фосфатного буфера и 100мкл раствора глутатиона. Реакцию запускают раствором ХДНБ в количестве 10мкл. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 340нм против воды сразу же после начала реакции и через 3 минуты. Содержание белка в пробе измеряли по методу Lowry.

Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = (\Delta E_{340} * 2 * 1000) / (9,6 * a), \text{ где}$$

ΔE_{340} – изменение оптической плотности при 340нм за 1мин инкубации

2мл – общий объем пробы при инкубации

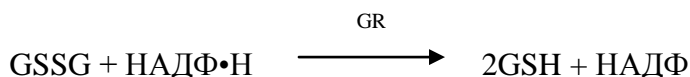
9,6 мМ* 1см^{-1} – экстинкция продукта реакции при 340нм

1000 – коэффициент перевода мкмоль в нмоль

a – содержание белка в пробе.

2.9.4.Определение активности глутатионредуктазы.

В основу определения активности глутатионредуктазы (GR) положены методы, где регистрируется окисление НАДФ•Н в глутатионредуктазной реакции (Carlbeg, Mannervik, 1975):



Активность фермента измеряют по степени окисления НАДФ•Н. За окислением НАДФ•Н₂ можно проследить по убыли экстинкции при 340нм.

Реактивы:

1. Na-K-фосфатный буфер 0,1М, pH=6,6
2. Окисленный глутатион («ICN») 0,033М раствор на фосфатном буфере
3. НАДФ•Н («ICN») 2мМраствор на фосфатном буфере

Реакцию проводят в кювете спектрофотометра, в которую добавляют 100мкл образца, 2.5мл фосфатного буфера и 200мкл раствора глутатиона. Реакцию запускают добавлением 200мкл раствора НАДФ•Н. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 340нм против воды сразу же после начала реакции и через 3 минуты. Содержание белка в пробе измеряли по методу Lowry.

Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = (\Delta E_{340} * 2 * 1000) / (6,22/a) * 2, \text{ где}$$

2' – переводной коэффициент для перевода НАДФ•Н в объеме GSH

ΔE_{340} – изменение оптической плотности при 340нм за 1мин инкубации

2мл – общий объем пробы при инкубации

6,22 мМ*¹см⁻¹ – миллимолярная экстинкция для НАДФ•Н

1000 – коэффициент перевода мкмоль в нмоли

a – содержание белка в пробе.

За единицу активности GR принимали количество нмолей восстановленного продукта - GSH, образовавшегося в 1 мин в расчете на 1 мг белка.

2.10. Статистические методы.

Все полученные результаты были обработаны при помощи статистической программы «IBM SPSS Statistics 21». Расчеты производились при помощи непараметрических критериев сравнения Манна-Уитни, Крускала-Уоллеса, коэффициента корреляции Спирмана.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Поведение и состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови крыс с различными типологическими характеристиками поведения в норме

3.1.1. Параметры поведения крыс с различными типологическими характеристиками поведения в тесте Т-образный лабиринт

Для исследования крыс с различными типологическими характеристиками поведения, не подвергавшихся стрессорным воздействиям, группа животных была протестирована в Т-образном лабиринте и разделена на подгруппы (как указано в гл.2.1.1). Из популяции крыс использованных в работе были отобраны две группы крыс – активные крысы и пассивные крысы. Активные и пассивные крысы достоверно различались по всем исследованным параметрам поведения (см. рис.7). Так, у активных крыс были выше горизонтальная двигательная активность и вертикальная двигательная активность. И наоборот время латенции входа в лабиринт и время неподвижности были ниже, чем у группы пассивных крыс.

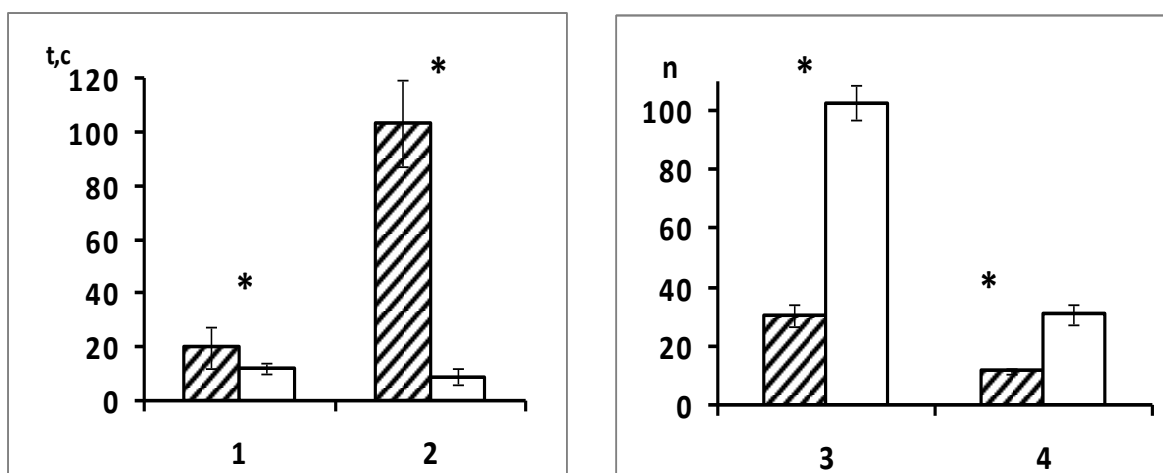


Рис.7. Поведенческие характеристики пассивных и активных крыс в Т-образном лабиринте (1-латентный период входа в лабиринт (сек.), 2- время неподвижности (сек); 3 – горизонтальная двигательная активность (число пересеченных квадратов), 4 – вертикальная двигательная активность (число стоек). Светлые столбики – активные крысы, заштрихованные – пассивные животные. * $p < 0.05$ – достоверные отличия между активной и пассивной группами крыс.

3.1.2. Окислительная модификация белков у крыс с различными характеристиками поведения в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме.

Окислительные модификации белков определялись согласно гл.2 (материалы и методы). Определялись показатели уровня спонтанного (СОМБ) и Фентон-индуцируемого (ФОМБ) окисления гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков при длине волны 270нм и 363нм соответственно.

В *неокортексе* активная и пассивная группы крыс отличаются по показателям перекисного окисления белков (см.табл.2). А именно, у активных крыс уровень СОМБ гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков достоверно выше, в то время как уровень ФОМБ гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков достоверно ниже.

Таблица 2. Уровень ОМБ в неокортексе у активной и пассивной групп крыс, (Е/мг белка), $M \pm SEM$, N - количество проб.

	СОМБ 270нм	ФОМБ270нм	СОМБ363нм	ФОМБ363нм
ПАССИВНЫЕ	0,037 \pm 0,015 N=11	0,111 \pm 0,030 N=11	0,069 \pm 0,012 N=10	0,110 \pm 0,025 N=13
АКТИВНЫЕ	0,089 \pm 0,016* N=14	0,030 \pm 0,011* N=14	0,137 \pm 0,014* N=14	0,047 \pm 0,013* N=12

*-p<0.05 достоверные отличия от пассивной группы крыс

В *гипоталамусе* уровень СОМБ как гидрофильных, так и гидрофобных аминокислотных остатков у активных крыс достоверно выше, чем у пассивных. Уровень ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков был выше у активных крыс, а уровень ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков у пассивных и активных крыс не отличались (см.табл.3).

Таблица 3. Уровень ОМБ в гипоталамусе у активной и пассивной групп крыс, (Е/мг белка), $M \pm SEM$, N - количество проб.

	СОМБ 270нм	ФОМБ270нм	СОМБ363нм	ФОМБ363нм
ПАССИВНЫЕ	0,050 \pm 0,013 N=11	0,063 \pm 0,022 N=13	0,087 \pm 0,011 N=10	0,077 \pm 0,020 N=13
АКТИВНЫЕ	0,120 \pm 0,017* N=12	0,176 \pm 0,035* N=16	0,150 \pm 0,016* N=12	0,093 \pm 0,017 N=10

*-p<0.05 достоверные отличия от пассивной группы крыс

В гиппокампе у активной и пассивной групп крыс не обнаружено достоверных отличий как по показателям СОМБ так и ФОМБ (см.табл.4).

Таблица 4. Уровень ОМБ в гиппокампе у активной и пассивной групп крыс, (Е/мг белка), $M \pm SEM$, N - количество проб.

	СОМБ 270нм	ФОМБ270нм	СОМБ363нм	ФОМБ363нм
ПАССИВНЫЕ	0,056 \pm 0,016 N=11	0,077 \pm 0,022 N=13	0,115 \pm 0,015 N=10	0,083 \pm 0,010 N=13
АКТИВНЫЕ	0,086 \pm 0,012 N=13	0,107 \pm 0,020 N=16	0,102 \pm 0,012 N=13	0,106 \pm 0,011 N=16

*-p<0.05 достоверные отличия от пассивной группы крыс

В стриатуме у активных крыс (табл.5) достоверно более высокое Фентон-индуцируемое окисление (ФОМБ) и гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, т.е. у активных крыс в стриатуме более высокие показатели устойчивости структуры к перекислению. Уровень СОМБ достоверно не отличается у активных и пассивных крыс, но у активных крыс имеет тенденцию к росту.

Таблица 5. Уровень ОМБ в стриатуме у активной и пассивной групп крыс (Е/мг белка), $M \pm SEM$, N - количество проб.

	СОМБ 270нм	ФОМБ270нм	СОМБ363нм	ФОМБ363нм
ПАССИВНЫЕ	0,056 \pm 0,021 N=10	0,121 \pm 0,033 N=12	0,125 \pm 0,018 N=12	0,080 \pm 0,021 N=11
АКТИВНЫЕ	0,083 \pm 0,019 N=16	0,233 \pm 0,044* N=11	0,138 \pm 0,015 N=16	0,156 \pm 0,020* N=12

*-p<0.05 достоверные отличия от пассивной группы крыс

Полученные результаты выявляют различия в уровне ОМБ у активной и пассивной групп крыс в неокортексе, гипоталамусе и стриатуме с преобладанием более высокого уровня ОМБ у активных крыс. В гиппокампе таких различий не обнаружено.

3.1.3. Состояние антиоксидантной системы в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме у крыс с различными характеристиками поведения.

Поскольку при изучении окислительно-восстановительного механизма регуляции поведения помимо прооксидантных процессов необходимо также учитывать участие антиоксидантной системы (АОС), то в данной работе мы исследовали также состояние антиоксидантной системы в исследуемых структурах мозга крыс. А именно: 1) активность Cu-Zn-супероксиддисмутазы (СОД) – фермента, участвующего в устранении избыточного супероксида и 2) активность глутатионового звена АОС – глутатионовое звено поддерживает редокс-баланс через глутатионовое соотношение (восстановленный/окисленный глутатион), устраняет избыток гидроперекисей, ксенобиотиков и других продуктов перекисления.

Данные о состоянии антиоксидантной системы исследованных структур мозга у активной и пассивной групп крыс (см. табл.6) демонстрируют следующее:

- В неокортексе нет достоверных отличий у активных и пассивных групп крыс по показателям состояния антиоксидантной системы за исключением фермента глутатионтрансферазы, которая достоверно выше у пассивных крыс.

- В гипоталамусе наблюдается схожая картина, но только высокая активность отмечается у фермента глутатионредуктазы в группе пассивных крыс.

- Активность всех исследованных антиоксидантных ферментов в гиппокампе достоверно выше в группе активных крыс. И наоборот, общее количество -SH групп достоверно выше у пассивных крыс.

- Показатели антиоксидантной регуляции глутатионовой системы в стриатуме у активной и пассивной групп крыс достоверно различаются. Активность глутатионпероксидазы выше у активной группы крыс, в то время как активность глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы выше у пассивной группы крыс. В тоже время данные группы крыс не отличаются по показателям активности СОД и количеству SH групп в стриатуме

Представленные результаты демонстрируют различия уровней активности антиоксидантных ферментов в исследованных структурах мозга у активной и пассивной групп крыс. Каждая из исследованных структур имеет специфический паттерн таких различий.

Таблица 6. Активность СОД (U/мг белка), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GSTr), глутатионредуктазы (GR) (нМ в мин/мг белка) и количество –SH групп (мкМ/мл) в коре, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме головного мозга у крыс активной и пассивной групп $M \pm SEM$, N - количество проб.

	ПАССИВНЫЕ	АКТИВНЫЕ
НЕОКОРТЕКС		
Zn-Cu-супероксиддисмутаза	33,7 \pm 6,9	46,5 \pm 5,4
Глутатионпероксидаза	19,4 \pm 2,2	27,7 \pm 3,9
Глутатион-S-трансфераза	64,8 \pm 15,9	24,7 \pm 5,9*
Глутатионредуктаза	34,0 \pm 5,6	31,9 \pm 5,5
Количество –SH групп	26,4 \pm 2,0	26,1 \pm 3,0
	N=12	N=11
ГИПОТАЛАМУС		
Zn-Cu-супероксиддисмутаза	97,9 \pm 9,7	84,2 \pm 10,1
Глутатионпероксидаза	28,3 \pm 2,0	32,3 \pm 3,4
Глутатион-S-трансфераза	40,8 \pm 3,7	40,4 \pm 4,5
Глутатионредуктаза	66,8 \pm 10,9	47,5 \pm 6,9*
Количество –SH групп	18,2 \pm 0,5	17,5 \pm 0,4
	N=12	N=11
ГИППОКАМП		
Zn-Cu-супероксиддисмутаза	62,6 \pm 6,1	99,1 \pm 11,4*
Глутатионпероксидаза	29,2 \pm 3,4	52,2 \pm 5,1*
Глутатион-S-трансфераза	27,8 \pm 5,1	37,0 \pm 4,1*
Глутатионредуктаза	41,1 \pm 5,6	65,8 \pm 8,9*
Количество –SH групп	25,3 \pm 1,0	21,2 \pm 1,0*
	N=12	N=11
СТРИАТУМ		
Zn-Cu-супероксиддисмутаза	24,95 \pm 4,09	20,55 \pm 3,0
Глутатионпероксидаза	23,1 \pm 3,0	35,8 \pm 2,9*
Глутатион-S-трансфераза	36,4 \pm 3,6	26,3 \pm 2,7*
Глутатионредуктаза	100,8 \pm 19,8	59,3 \pm 6,7*
Количество –SH групп	26,1 \pm 0,4	26,7 \pm 0,4
	N=11	N=11

*-p<0.05 достоверные отличия от пассивной группы крыс

3.1.4. Окислительная модификация белков в сыворотке крови у крыс с различными характеристиками поведения.

В последнее время в медицине такой показатель как окислительная модификация белков в образцах крови используется достаточно часто при изучении заболеваний непосредственно связанных с изменениями редокс-статуса организма, например, диабет, онкологические заболевания, нейродегенеративные заболевания, связанные с психотравмирующими ситуациями. Множество публикаций подтверждают, что показатели ОМБ могут быть маркерами при диагностировании таких заболеваний (Муравлева и др., 2010; Ведунова и др., 2010; Захарова, 2013; Кравцова, 2014).. В связи с этим в нашей работе мы также исследовали состояние редокс-системы в сыворотке крови у активных и пассивных крыс.

Уровень ОМБ в сыворотке крови был выше у активных крыс при исследовании спонтанного окисления СОМБ и не отличался по показателю ФОМБ (фентон-индуцированного окисления) (см. табл.7).

Таблица 7. Уровень ОМБ в сыворотке крови у крыс активной и пассивной групп, (Е/мг белка), $M \pm mSEM$, N - количество проб.

	СОМБ 270 _{нм}	ФОМБ270 _{нм}	СОМБ363 _{нм}	ФОМБ363 _{нм}
ПАССИВНЫЕ	0,017 \pm 0,008 N=12	0,129 \pm 0,019 N=13	0,024 \pm 0,004 N=12	0,106 \pm 0,012 N=10
АКТИВНЫЕ	0,060 \pm 0,012* N=16	0,129 \pm 0,028 N=13	0,064 \pm 0,019* N=16	0,157 \pm 0,036 N=12

*-p<0.05 достоверные отличия от пассивной группы крыс

Таким образом, на общеорганизменном уровне также демонстрируются различия в уровне ОМБ, который у активных крыс является более высоким, чем у крыс пассивных.

3.1.5. Состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови крыс с различными характеристиками поведения в норме

В сыворотке крови мы также как и в структурах головного мозга исследовали антиоксидантную составляющую системы редокс-баланса.

Как видно из табл.8, количество -SH групп белков в сыворотке крови у пассивных и активных крыс не отличается, тогда как активность СОД выше у активных крыс.

Таблица 8. Активность СОД, (U/мг белка) и количество –SH групп (мкМ/мл) в сыворотке крови у крыс активной и пассивной групп $M \pm SEM$, N - количество проб.

	ПАССИВНЫЕ	АКТИВНЫЕ
Zn-Cu-супероксиддисмутаза	$11,8 \pm 1,9$	$20,96 \pm 2,9^*$
Количество –SH групп	$26,4 \pm 1,1$	$24,7 \pm 1,4$
	N=12	N=16

*- $p < 0.05$ достоверные отличия от пассивной группы крыс

Рассматривая окислительно-восстановительный баланс в сыворотке крови в целом можно заметить, что активные крысы отличаются более высоким уровнем перекисления белков и более высоким уровнем активности СОД.

Из представленных в гл.3.1. результатов можно отметить следующее: 1) у крыс, различающихся индивидуально-типологическими характеристиками поведения, процессы окислительной модификации белка в исследованных структурах мозга и в сыворотке крови идут различными путями 2) у крыс, различающихся индивидуально-типологическими характеристиками поведения, антиоксидантные ферменты (СОД и глутатионовые ферменты) в исследованных структурах мозга и в сыворотке крови в разной степени вовлечены в процессы редокс-регуляции; 3) редокс-регуляция, осуществляемая посредством тиоловых –SH групп в исследованных структурах мозга, отличается у крыс с активными и пассивными характеристиками поведения; 4) более высокие поведенческие показатели двигательной и исследовательской активности возможно связаны с более высоким уровнем белкового окисления, как в структурах мозга, так и в сыворотке крови активной группы крыс.

3.2. Изменение поведения и состояния прооксидантной и антиоксидантной систем в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у крыс с различными типологическими характеристиками поведения в модели посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).

3.2.1. Параметры поведения активных пассивных крыс в тесте Т-образный лабиринт после ПТСР-подобного воздействия

При исследовании изменений поведения и состояния редокс-системы у крыс с различными типологическими характеристиками поведения в модели ПТСР для

сравнения были взяты группы крыс, отличающиеся по поведению и не подвергавшиеся каким-либо стрессорным воздействиям (см. гл.3.1). Эти группы далее обозначены как контрольные.

В процессе развития посттравматического стрессового расстройства активные и пассивные группы крыс по-разному реагируют изменением поведенческих характеристик (рис.8). Так, у пассивной группы крыс изменяется только показатель «время неподвижности», который увеличивается в 3 раза; остальные показатели поведения не изменяются по сравнению с показателями поведения у крыс в норме. В то же время у активной группы крыс увеличивается время латенции входа в Т-лабиринт и время неподвижности, снижаются горизонтальная и вертикальная двигательная активность.

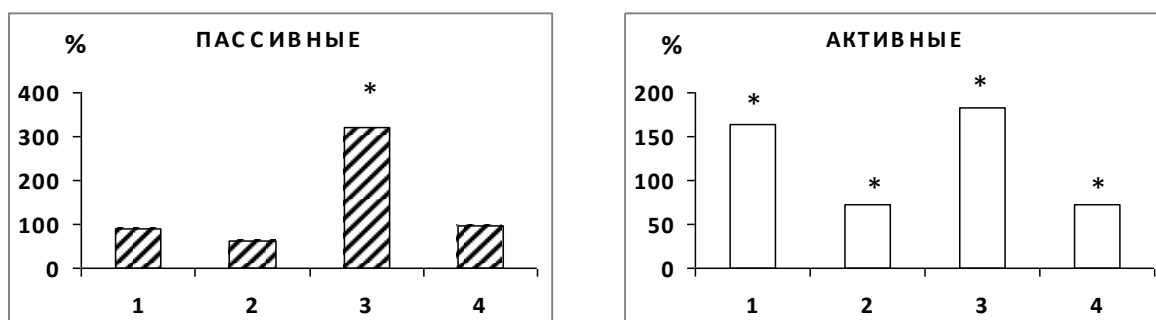


Рис.8. Изменение поведенческих характеристик пассивных (заштрихованные столбики) и активных (белые столбики) крыс в модели ПТСР; % по отношению к контролю, 1 – латентный период входа в лабиринт, 2 – горизонтальная двигательная активность, 3 – время неподвижности, 4 – вертикальная двигательная активность, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля.

Таким образом, при анализе изменений поведенческих характеристик у пассивной и активной групп крыс в модели ПТСР выясняется, что активные крысы изменяют характеристики поведения в сторону увеличения пассивности. В тоже время пассивные крысы становятся еще менее подвижными при неизменном времени латенции входа и неизменной локомоторной и исследовательской активности, которые, впрочем, уже были достаточно низкими в контроле.

3.2.2. Уровень окислительной модификации белков в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме у крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.

В неокортексе в модели ПТСР у пассивных и активных крыс наблюдаются разнонаправленные изменения уровня ОМБ (см. рис.9). У пассивных крыс повышается в 2 раза уровень СОМБ гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, а уровень ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков имеет тенденцию к снижению ($p=0,054$), тогда как у активных крыс достоверно снижается уровень СОМБ гидрофобных аминокислотных остатков и повышается уровень ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков.

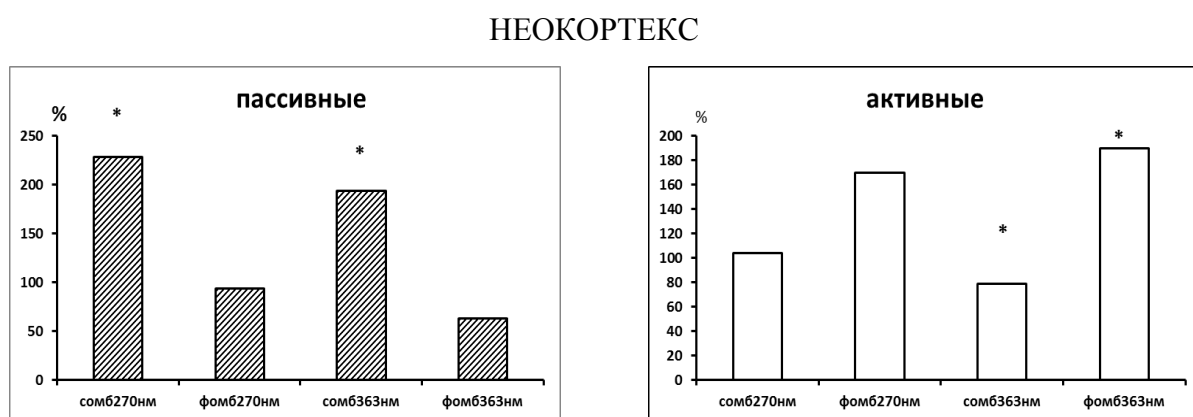


Рисунок 9. Изменение уровня ОМБ в неокортексе пассивных и активных крыс (% от контроля) в модели ПТСР, * $p<0.05$ достоверные отличия от контрольных животных.

В гипоталамусе у пассивных крыс происходят изменения в сторону увеличения СОМБ и ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков, тогда как у активных крыс снижается уровень СОМБ гидрофобных аминокислотных остатков, а уровень ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков повышается в модели ПТСР по сравнению с интактными животными (см. рис.10). Таким образом, можно говорить что в модели ПТСР гипоталамус по-разному отвечает на данное стрессорное воздействие, а именно – в изменении уровня ОМБ задействованы различные группы аминокислотных остатков (у пассивных крыс – гидрофильные, у активных крыс – гидрофобные); кроме того, процессы изменения уровня спонтанной ОМБ разнонаправлены (у пассивных - в

сторону повышения, у активных – в сторону снижения уровня окислительных процессов).

ГИПОТАЛАМУС

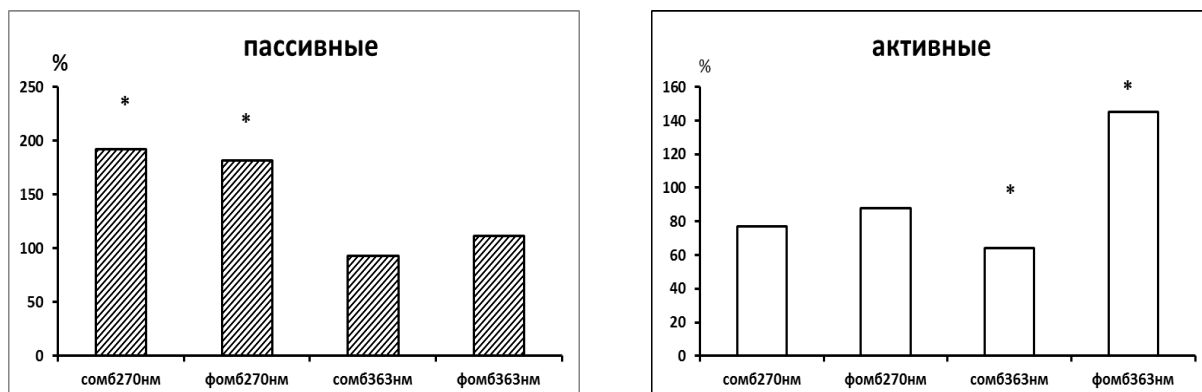


Рис. 10. Изменение уровня ОМБ в гипоталамусе пассивных и активных крыс (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контрольных животных.

В гиппокампе (рис.11) у пассивных крыс изменений в окислительных модификациях белка в модели ПТСР не выявлено. У активных крыс достоверно увеличиваются ФОМБ как гидрофильных, так и гидрофобных аминокислотных остатков, что можно считать адаптивной реакцией гиппокампа на стрессорные воздействия.

ГИППОКАМП

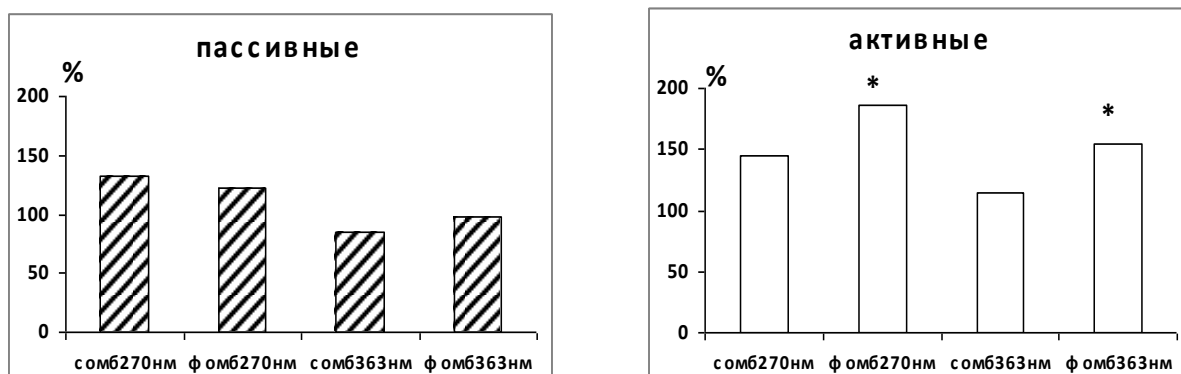


Рис.11. Изменение уровня ОМБ в гиппокампе пассивных и активных крыс (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контрольных животных.

В стриатуме (рис.12) и у пассивных и у активных крыс увеличивается уровень СОМБ гидрофильных аминокислотных остатков в модели ПТСР по сравнению

с контрольными крысами. Но у активных крыс достоверно снижается уровень ФОМБ как гидрофильных, так и гидрофобных аминокислотных остатков. Таким образом, стриатум наиболее ярко демонстрирует патологические изменения у активной группы крыс в данной модели ПТСР.

СТРИАТУМ

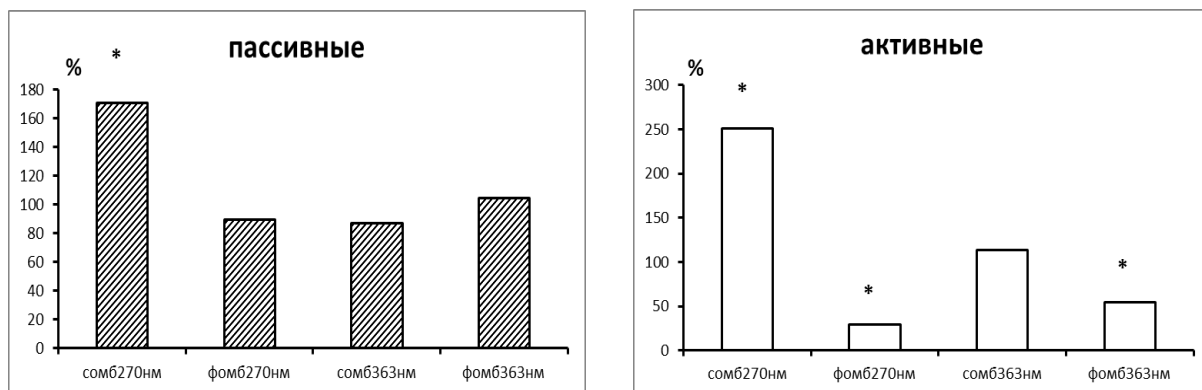


Рис.12. Изменение уровня ОМБ в стриатуме пассивных и активных крыс (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля

Полученные данные показывают различные изменения показателей уровня ОМБ у пассивных и активных групп крыс в исследованных структурах мозга после ПТСР-подобного воздействия по сравнению с контрольными пассивными и активными группами крыс. Причем каждая из исследованных структур имеет свою специфику изменений уровня ОМБ.

3.2.3. Состояние антиоксидантной системы в неокортексе и гиппокампе у крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.

Для лучшего понимания редокс-регуляции в модели ПТСР у крыс, различающихся типологическими характеристиками поведения, была исследована реакция антиоксидантной защиты в неокортексе и гиппокампе.

В неокортексе (рис.13) после ПТСР-подобного воздействия активность Zn-Cu-супероксиддисмутазы (СОД) имеет тенденцию к снижению ($p=0.583$) у пассивных крыс и достоверно снижается у активных крыс. Глутатионовые ферменты АОС у пассивных и активных крыс реагируют различными путями. Так у пассивных крыс активность GPx и GR не изменяется и тем самым косвенно участвует в росте ОМБ, также этому процессу способствует снижение активности GST. В тоже время у активных крыс растет активность глутатионпероксидазы (GPx), что может влиять на

снижение уровня ОМБ в неокортексе, уровень активности глутатионредуктазы (GR) также стремится к росту и отсутствует изменение активности глутатионтрансферазы (GST). Причем снижение количества общих тиоловых групп происходит как у активных так и у пассивных крыс, что можно считать признаком негативного воздействия ПТСР на обе группы крыс в целом.

НЕОКОРТЕКС

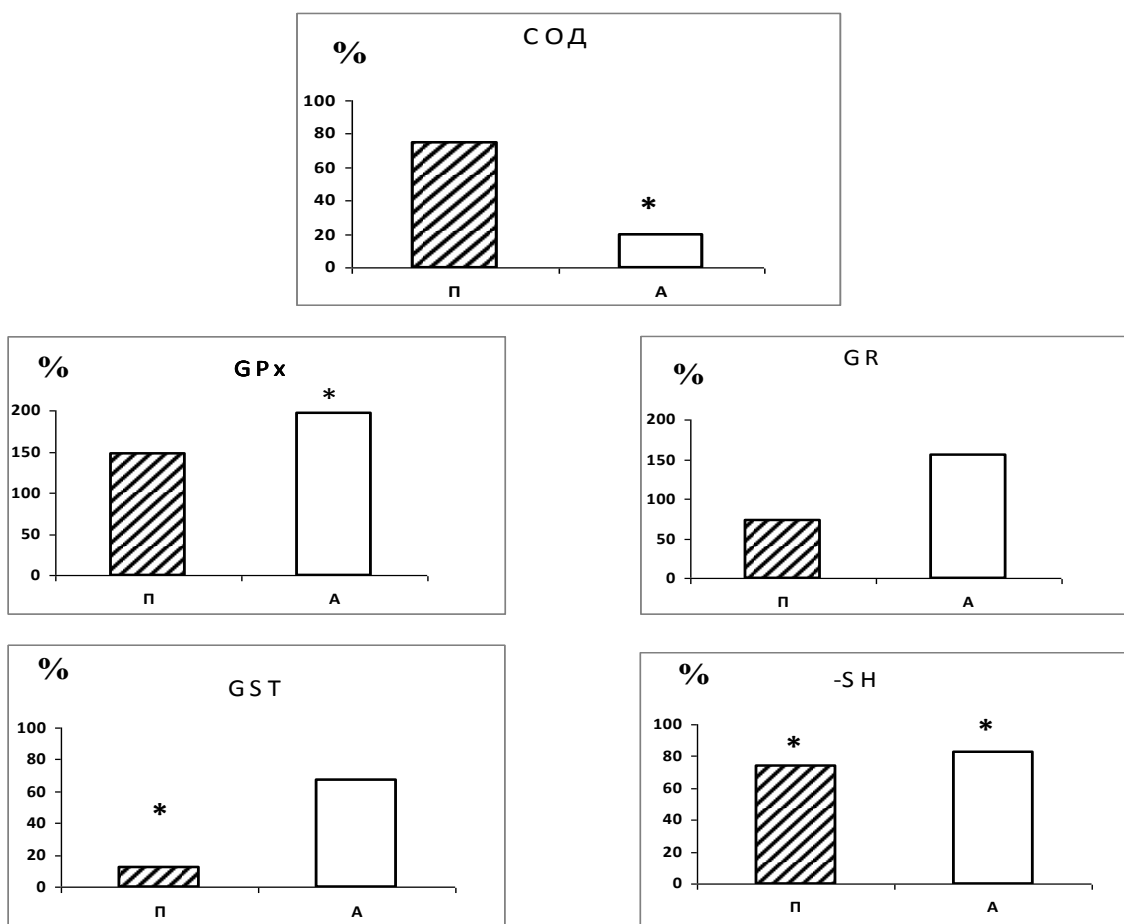


Рис.13. Изменение активности Zn-Cu-супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GSTr), глутатионредуктазы (GR) и количества –SH групп в неокортексе у крыс пассивной и активной групп (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля

В гиппокампе (рис.14) активность СОД снижается в 5 раз и у пассивной и у активной групп крыс после ПТСР-подобного воздействия. Активность глутатионовых ферментов гиппокампа в модели ПТСР остается без изменений, как у пассивных, так и у активных крыс по сравнению с контрольными группами. Количество общих тиоловых групп снижается у пассивных крыс в модели ПТСР, а у активных крыс не меняется.

ГИППОКАМП

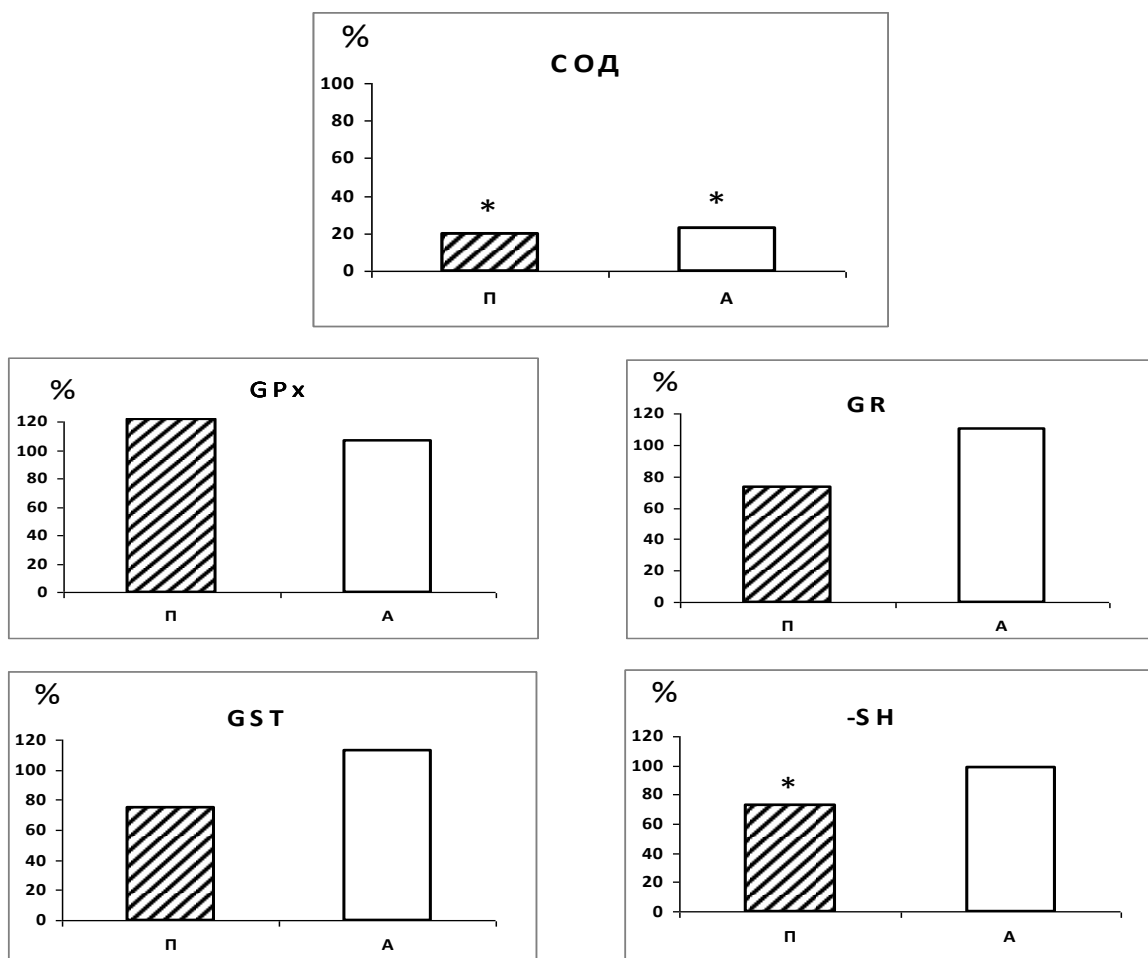


Рис.14 Изменение активности Zn-Cu-супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GSTr), глутатионредуктазы (GR), и количества –SH групп в гиппокампе у крыс пассивной и активной групп (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля

Данные, полученные при исследовании АОС в неокортексе у пассивных и активных крыс в модели ПТСР, выявили различия в изменениях уровня активности, изученных ферментов у разных групп крыс в ответ на ПТСР-подобное воздействие и отсутствие различий в изменении количества –SH групп. В гиппокампе наоборот - нет различия в изменениях уровня активности, изученных ферментов у разных групп крыс в ответ на ПТСР-подобное воздействие, но выявлены различия в изменении количества –SH групп у активных и пассивных крыс по сравнению с контрольными группами.

3.2.4 Окислительная модификация белков в сыворотке крови крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР.

В модели ПТСР у пассивных и активных крыс в сыворотке крови (рис.15) наблюдаются достоверные разнонаправленные изменения. Так уровень СОМБ

гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков у пассивных крыс растёт, а у активных крыс снижается. Показатели уровня ФОМБ гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков остаются неизменными и у пассивных и у активных крыс.

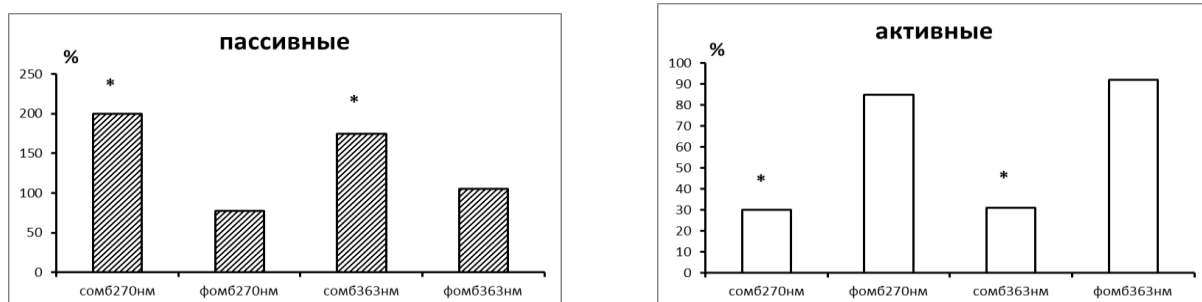


Рис.15. Изменение уровня ОМБ в сыворотке крови пассивных и активных крыс (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля

Полученные результаты показывают разнонаправленные изменения показателя СОМБ у пассивных и активных крыс в сыворотке крови при ПТСР-подобном воздействии.

3.2.5. Состояние антиоксидантной системы в сыворотке крови крыс с различными характеристиками поведения в модели ПТСР

Общее количество тиоловых групп в сыворотке крови у пассивной и у активной групп крыс не меняется в модели ПТСР (рис.16). Вместе с тем активность Zn-Cu-СОД снижается у обеих исследуемых поведенческих групп крыс почти в 3 раза.

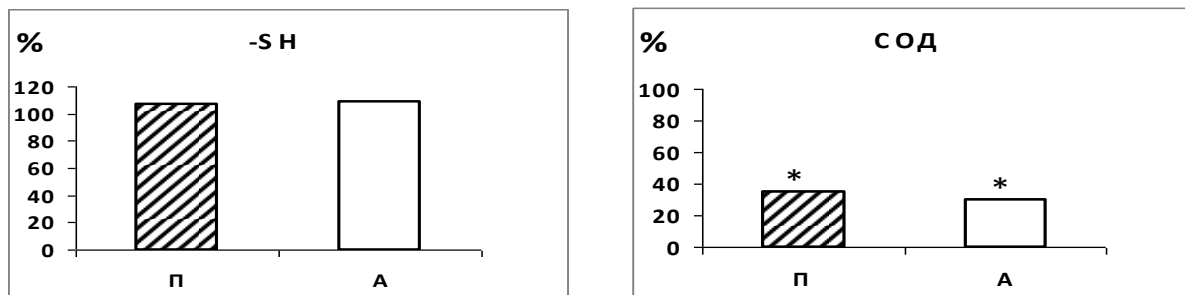


Рис.16. Изменение активности Zn-Cu-супероксиддисмутазы (СОД) и количества –SH групп в сыворотке крови у крыс пассивной и активной групп (% от контроля) в модели ПТСР, * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля

Полученные данные показывают отсутствие различий в изменении активности СОД и количества –SH групп между пассивной и активной группами крыс в сыворотке крови после ПТСР-подобного воздействия.

3.3. Поведение и состояние прооксидантной и антиоксидантной систем в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у пренатально стрессированных (ПС) крыс.

В данной работе помимо изучения крыс, разделенных на группы отличные по параметрам поведения в Т-лабиринте, была исследована также группа ПС-крыс. Хорошо известно, что ПС вызывает изменения в половом поведении потомков, искажает возрастные изменения в поведении крыс, увеличивает стрессореактивность в новой среде у крыс-самцов (Резников и др., 2004, Отеллин и др., 2007). Показано, что у ПС крыс-самцов изменяется онтогенетический профиль ОМБ и активности СОД (Вьюшина и др, 2012b, Вьюшина, 2006). При изучении проблемы ПС у людей также отмечаются фенотипические изменения у пренатально стрессированных взрослых потомков: толерантность к инсулину, метаболический синдром, повышенный уровень АКТГ и пониженный уровень кортизола при фармакологических и психологических нагрузках (Entringer et al, 2015). В связи с этим ПС крысы представляют интерес как группа, обладающая специфическими фенотипическими особенностями в поведении и стрессореактивности.

3.3.1 Показатели поведения пренатально стрессированных крыс в тесте Т-образный лабиринт

В нашей работе были исследованы параметры поведения при тестировании в тесте Т-образный лабиринт пренатально стрессированных (ПС) и контрольных крыс. ПС крысы в тесте Т-образный лабиринт не продемонстрировали отличий от контрольных крыс по исследованным характеристикам поведения (табл.9).

Таблица 9. Сравнение параметров поведения всей популяции контрольных крыс и ПС крыс в тесте Т-образный лабиринт.

Группа Крыс	ЛАТ,сек M±SEM	ГДА,n	ВДА,n	Неподв.,сек
КОНТРОЛЬ N=	16,1±2,2	101,6±8,6	22,9±2,4	49,8±10,2
ПС N=34	23,7±4,9	104,0±7,8*#	22,6±1,7*#	42,5±7,7*#
АКТИВНЫЕ N=,	14,9±3,1	144,3±5,7	30,9±3,5	8,9±2,1
ПАССИВНЫЕ N=	19,8±3,9	49,9±7,9	11,5±1,2	103,3±16,1

*-p<0.05 достоверные отличия между активной и ПС группами крыс,

#-p<0.05 достоверные отличия между пассивной и ПС группами крыс

В предыдущих работах, проведенных в нашей лаборатории, ПС крысы также не отличались от контрольных по показателям горизонтальной и вертикальной двигательной активности и времени неподвижности, но только в тесте «открытое поле» (Ордян, Пивина, 2003). При сравнении показателей поведения в тесте Т-образный лабиринт пренатально стрессированных крыс-самцов с активной и пассивной группами крыс выяснилось, что группа ПС крыс достоверно отличается от активной и пассивной групп. Таким образом, можно сказать, что группа ПС не может быть отнесена ни к активной группе, ни к пассивной группе по показателям поведения в тесте Т-образный лабиринт. Такой параметр как время латенции входа в лабиринт имеет довольно большую дисперсию во всех исследованных группах и не дает достоверных отличий при сравнительном анализе.

Представленные результаты не дают основания отнести ПС крыс ни к активной, ни к пассивной группам крыс по параметрам поведения, изученным в тесте Т-образный лабиринт.

3.3.2. Показатели временной динамики изменений уровня ОМБ в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и в сыворотке крови у потомков стрессированных и не стрессированных крыс при воздействии 20-минутного иммобилизационного стресса

В ряде работ, выполненных в нашей лаборатории, было установлено, что пренатальный стресс изменяет постстрессорную динамику уровня кортикостерона у крыс-самцов (Ордян, Пивина, 2003), а именно - происходит нарушение регуляции ГГАС по механизму обратной связи. Поскольку реактивность ГГАС связана с окислительными процессами (Miller & Sadeh, 2014), нами была исследована стрессорная временная динамика изменения уровня окислительной модификации белков и показателей антиоксидантной системы в структурах головного мозга и в сыворотке крови при воздействии иммобилизационного стресса. Исследовались пренатально стрессированные (ПС) крысы, матери которых подвергались стрессу в последнюю треть беременности (группа 2) и животные, рожденные от матерей, не подвергавшихся стрессорному воздействию в период беременности (группа 1) (см гл 2.5). В качестве контроля были взяты крысы из группы 1 и 2, не подвергавшиеся 20-минутному иммобилизационному стрессу. Были выбраны временные точки, соответствующие таковым при изучении уровня кортикостерона в процессе стресс-реакции (см.гл 2.5).

При рассмотрении динамики спонтанной ОМБ в неокортексе (см. рис.17) при иммобилизационном стрессе уровень СОМБ на волне 270нм у крыс группы 1

увеличивается через 20мин после начала стресса, далее через 1час снижается, и в дальнейшем остается на уровне контроля. На волне 363нм достоверных отличий у крыс группы 1 от контроля не обнаружено. У группы 2 совершенно другой профиль временной динамики при иммобилизационном стрессе – уровень СОМБ на обеих длинах волн не изменяется с началом стрессирования и только через сутки наблюдается достоверный рост этого показателя.

НЕОКОРТЕКС

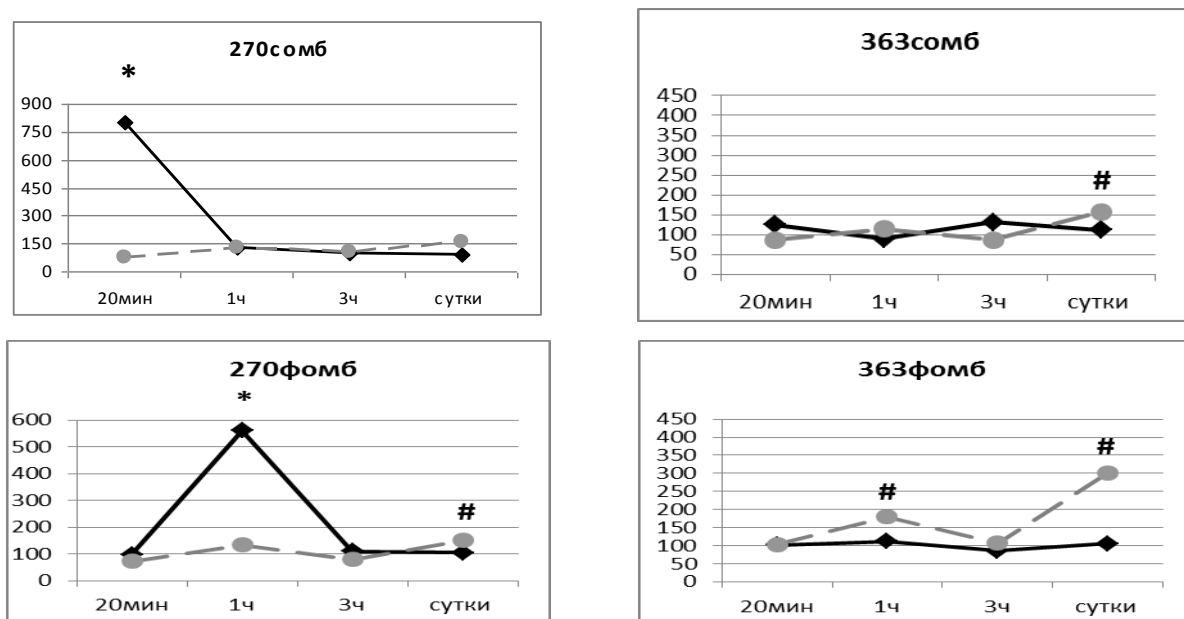


Рис.17. Временная динамика уровня ОМБ неокортекса в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Результаты указаны в %. За 100% взят уровень ОМБ к крыс групп 1 и 2 не подвергавшихся иммобилизационному стрессу. Группа 1 – черная сплошная линия, группа 2 – серая пунктирная линия. По оси абсцисс – время от начала стрессирования. * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у группы 1; # $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у группы 2

Динамика Фентон-индуцированной ОМБ при стрессе у крыс группы 1 имеет пик уровня ФОМБ через 1 час (увеличение почти в 5 раз) после стресса на волне 270нм, через 3 часа снижается до уровня контроля и далее не меняется через сутки. У крыс группы 2 через 1 час наблюдается небольшой (в 1,5 раза) но достоверный рост уровня ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков, через 3 часа уровень ФОМБ опускается до уровня контроля и резко увеличивается (в 2,5 раза) через сутки после стресса.

В неокортексе у крыс группы 1 на протяжении 1 часа после иммобилизационного стресса успешно идут адаптивные процессы и далее на протяжении суток уровень ОМБ в неокортексе возвращается к контрольному. У крыс

группы 2, адаптивная реакция неокортекса запаздывает и начинается через сутки после стресса.

Динамика спонтанной ОМБ в гипоталамусе при иммобилизационном стрессе (см. рис.18) показывает, что уровень СОМБ у крыс группы 1 после начала стресса остается на уровне контроля на протяжении суток на двух исследованных длинах волн. У крыс группы 2 уровень СОМБ на волне 270нм снижается в 2 раза через час после начала стресса, через 3 часа возвращается к контрольному уровню. На волне 363нм уровень СОМБ у крыс группы 1 и группы 2 не изменяется во всех временных точках.

ГИПОТАЛАМУС

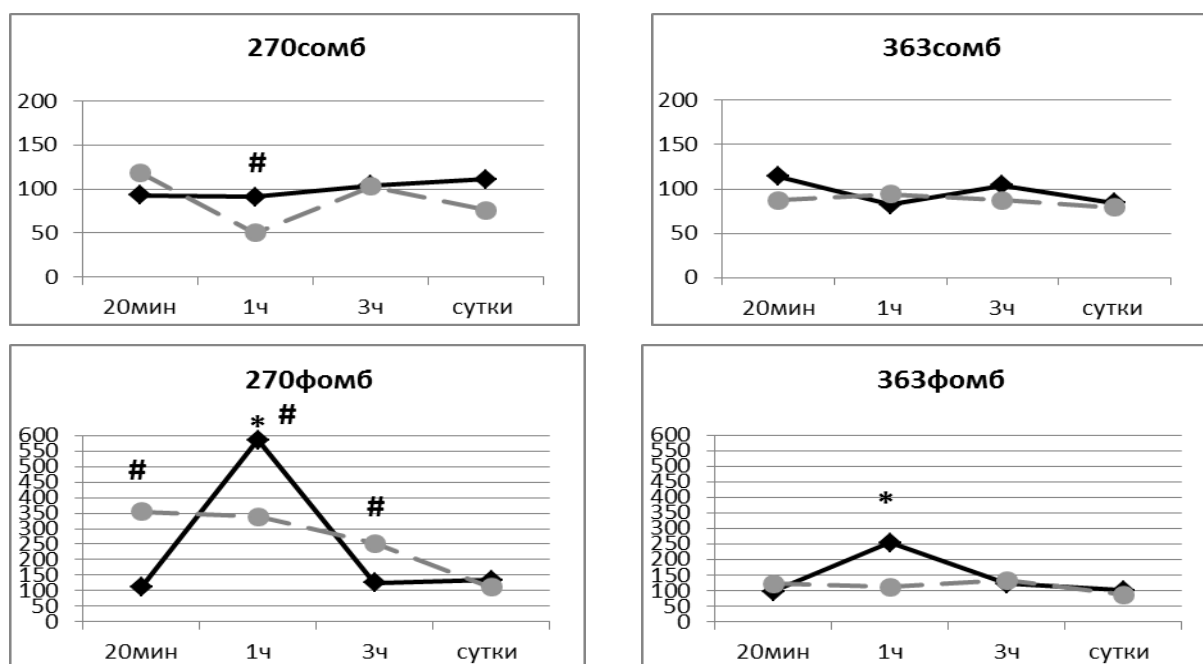


Рис.18. Временная динамика уровня ОМБ в гипоталамусе в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Результаты указаны в %. За 100% взят уровень ОМБ крыс групп 1 и 2 не подвергавшихся иммобилизационному стрессу. Группа 1 – черная сплошная линия, группа 2 – серая пунктирная линия. По оси абсцисс – время от начала стрессирования. * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у группы 1; # $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у группы 2.

Динамика Фентон-индуцированной ОМБ в гипоталамусе при стрессе у группы 1 имеет тот же профиль что и в неокортексе, а именно - пик уровня ФОМБ через 1 час после стресса, через 3 часа снижение до уровня контроля и далее отсутствие изменений через сутки на обеих длинах волн. У группы 2 уровень ФОМБ растет через 20 мин после начала стресса, остается высоким на протяжении 3 часов и снижается до уровня контроля через сутки после стресса на волне 270нм, а на волне 363нм никаких изменений уровня ФОМБ по сравнению с контролем у группы 2 не происходит.

Из представленных данных можно заключить, что в гипоталамусе крыс группы 1 ОМБ при стрессе идут другим путем, нежели в коре. Вероятно, для успешной адаптации к стрессу в гипоталамусе необходима блокировка окислительных процессов и увеличение субстрата для белкового окисления через 1 час после начала стресса. У крыс группы 2 инактивация процессов окисления белков более выражена, и имеется высокий уровень резервного белкового субстрата с гидрофильными аминокислотными остатками, снижающийся до уровня контроля только через сутки после стресса.

В гиппокампе (см. рис.19) при иммобилизационном стрессе у крыс группы 1 на волне 270нм изменений в динамике уровня СОМБ не наблюдается. На волне 363нм уровень СОМБ повышается через 20мин после начала стрессирования и через 1 час снижается до уровня контрольных животных. У крыс группы 2 уровень СОМБ на волне 270нм начинает повышаться через 1час после начала стрессирования и становится достоверно выше через 3часа, далее через сутки снижается почти до исходного уровня. На волне 363нм у крыс группы 2 изменений в уровне СОМБ не выявлено.

ГИППОКАМП

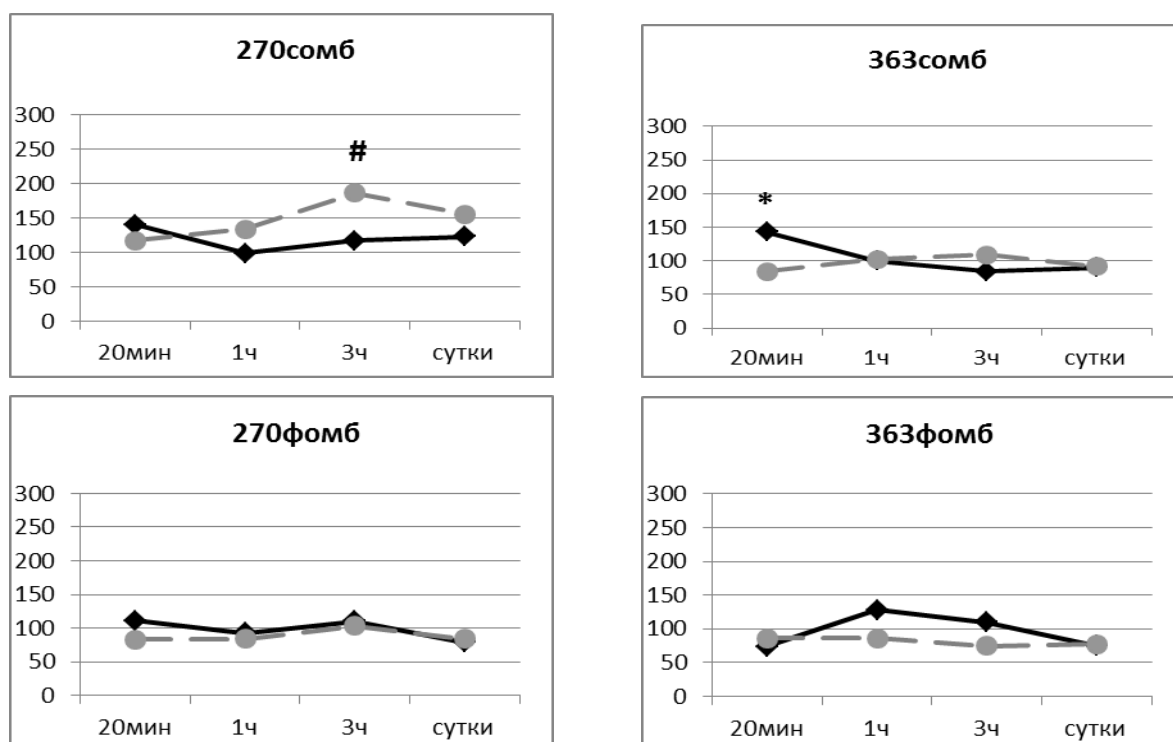


Рис.19. Временная динамика уровня ОМБ в гиппокампе в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Результаты указаны в %. За 100% взят уровень ОМБ интактных и ПС крыс не подвергавшихся иммобилизационному стрессу. Группа 1 – черная сплошная линия, группа 2 – серая пунктирная линия.. По оси абсцисс – время от начала стрессирования. * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 1; # $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 2.

Фентон-индуцированная ОМБ в гиппокампе при стрессе у крыс группы 1 и группы 2 не имеет достоверных отличий от контрольных значений.

В гиппокампе ПС сдвигает во времени адаптивное повышение уровня СОМБ, а динамический профиль уровня ФОМБ остается стабильным.

В стриатуме (см.рис.20) при иммобилизационном стрессе у крыс группы 1 уровень СОМБ на волне 270нм увеличивается в 3 раза через 3 часа и через сутки несколько снижается, но все еще достоверно повышен по сравнению с уровнем контроля. На волне 363нм уровень СОМБ также через 3 часа вырастает в 1,5 раза, но затем через сутки снижается. У крыс группы 2 уровень СОМБ на волне 270нм не изменяется, на волне 363нм уровень СОМБ повышается через 3 часа и становится еще выше через сутки после начала стрессирования.

СТРИАТУМ

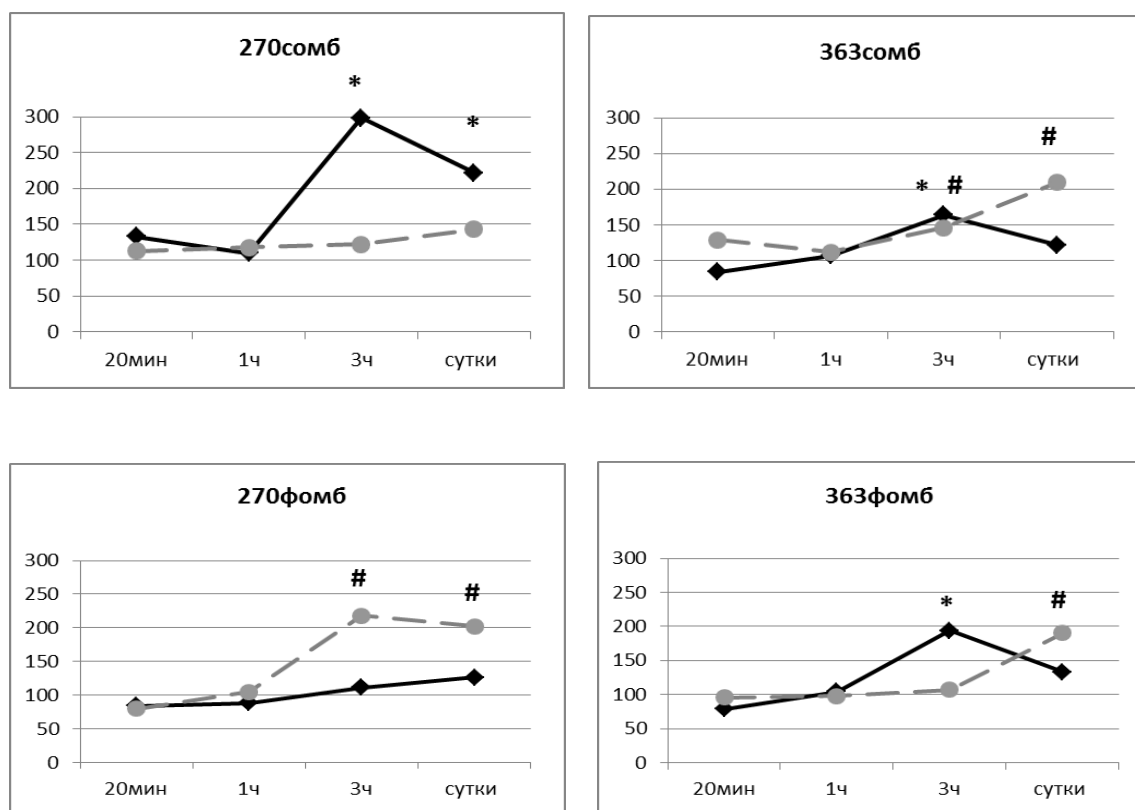


Рис.20. Временная динамика уровня ОМБ в стриатуме в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Результаты указаны в %. За 100% взят уровень ОМБ интактных и ПС крыс не подвергавшихся иммобилизационному стрессу. Группа 1 – черная сплошная линия, группа 2 – серая пунктирная линия.. По оси абсцисс – время от начала стрессирования. * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 1; # $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 2.

Фентон-индуцированная ОМБ на волне 270нм в стриатуме у крыс группы 1 не имеет достоверных отличий от исходного значения. На волне 363нм уровень ФОМБ у группы 1 растет через 3 часа после стресса и снижается через сутки. У крыс группы 2 уровень ФОМБ на волне 270нм повышается через 3 часа после начала стрессирования в 2 раза и продолжает оставаться достоверно высоким через сутки. На волне 363нм уровень ФОМБ у группы 2 повышается через сутки после начала стрессорного воздействия.

Как видно из данных о временной динамике ОМБ в стриатуме несколько иная картина, чем в других исследованных структурах. У крыс группы 1 процессы ОМБ интенсифицируются через 3 часа, а не через 1 час как в неокортексе, гиппокаме и гипоталамусе. Тем не менее, через сутки рост ОМБ снижается или приходит к контрольному уровню. У крыс группы 2 наблюдается рост уровня процессов ОМБ через 3 часа, но через сутки не снижается как у группы 1, а продолжает расти.

Динамика спонтанной ОМБ *в сыворотке крови* (см. рис.21) при иммобилизационном стрессе не выявила достоверных изменений уровня СОМБ на волне 270нм и 363нм у крыс группы 1. У крыс группы 2 уровень СОМБ повысился через 1 час после начала стрессирования и через 3 часа снизился до исходных значений на волне 270нм. На волне 363нм у группы 2 различий с уровнем контроля не выявлено.

СЫВ. КРОВИ

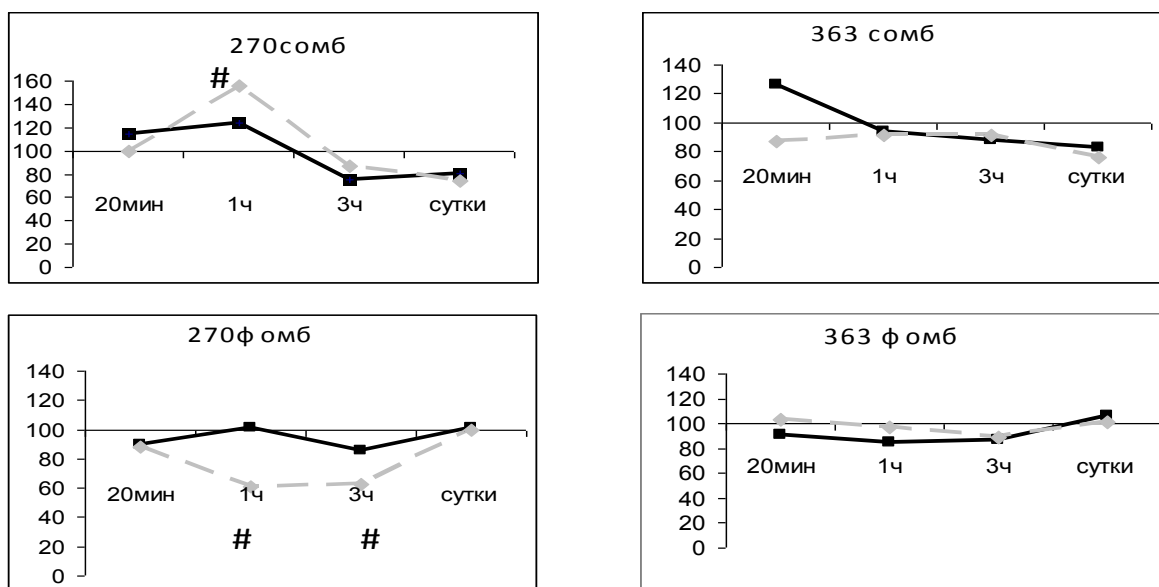


Рис.21. Временная динамика уровня ОМБ в сыворотке крови в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Результаты указаны в %. За 100% взят уровень ОМБ интактных и ПС крыс, не подвергавшихся иммобилизационному стрессу. Группа 1 – черная сплошная линия, группа 2 – серая пунктирная линия. По оси абсцисс – время от начала стрессирования. * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 1; # $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 2.

ФОМБ на волне 270нм и 363нм в сыворотке крови у группы 1 также не показала достоверных отличий от уровня контроля. У группы 2 уровень ФОМБ на волне 270нм был снижен через 1 час и через 3 часа после начала стрессирования. На волне 363нм уровень ФОМБ у группы 2 не изменялся.

Влияние ПС на постстрессорную динамику ОМБ в сыворотке крови реализуется иным образом, нежели в структурах головного мозга. Повышение СОМБ на фоне снижения ФОМБ в сыворотке крови крыс группы 2 свидетельствует о том, что на уровне организма фиксируются деструктивные изменения под влиянием стресса у данной группы, тогда как у крыс группы 1 практически отсутствует реакция на стресс прооксидантной системы.

Полученные данные показывают, что ПС сдвигает во времени на более поздние сроки повышение уровня СОМБ и ФОМБ в структурах мозга в ответ на стрессорное воздействие. Также ПС кардинальным образом изменяет постстрессорную динамику уровня СОМБ и ФОМБ в сыворотке крови.

3.3.3 Показатели временной динамики изменений активности СОД и количества –SH групп в сыворотке крови у потомков стрессированных и нестрессированных крыс при воздействии 20-мин иммобилизационного стресса

Для более ясной картины постстрессорной временной динамики редокс-статуса у крыс группы 1 и группы 2 (см. гл.2.5.) на уровне организма в целом, была исследована постстрессорная динамика активности СОД и общего количества –SH групп белков в сыворотке крови.

Активность СОД в сыворотке крови у крыс группы 1 (см.рис. 22) резко растет через 20 мин после начала стрессирования, через 1 час начинает снижаться, все еще оставаясь выше исходного уровня, а к 3 часам и через сутки не отличается от контрольных значений. Общее количество тиоловых групп у крыс группы 1 достоверно растет только через 3 часа. Крысы группы 2 демонстрируют совсем иную картину изменения активности СОД. Активность СОД достоверно снижена во всех временных точках. В тоже время паттерн временной динамики количества тиолов сходен с таковым у группы 2, но рост количества тиолов не имеет значимого отличия от контроля.

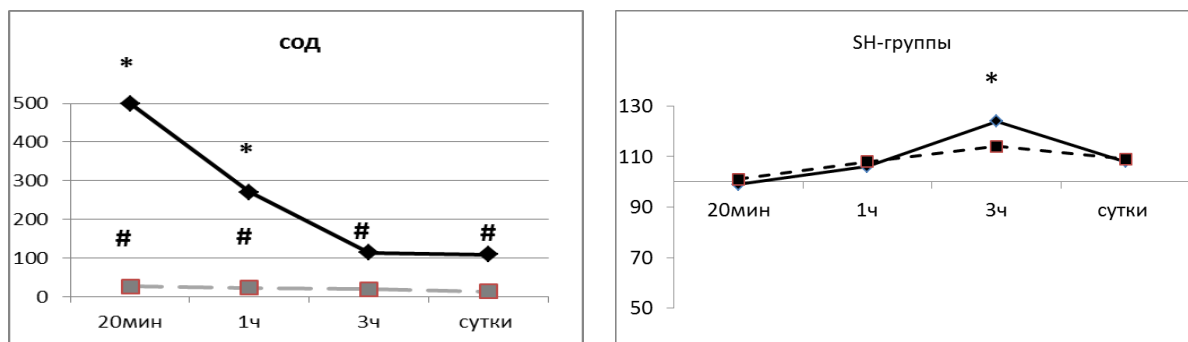


Рис.22. Временная динамика изменения активности Zn-Cu-супероксиддисмутаза (СОД) и количества –SH групп в сыворотке крови в ответ на 20-минутную иммобилизацию. Результаты указаны в % от контроля. За 100% взят уровень активности СОД и количества –SH групп интактных и ПС крыс, не подвергавшихся иммобилизационному стрессу. Группа 1 – сплошная линия, группа 2 – пунктирная линия. По оси абсцисс – время от начала стрессирования. * $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 1; # $p < 0.05$ достоверные отличия от контроля у крыс группы 2.

Таким образом, мы видим, что ПС нарушает динамику постстрессорной антиоксидантной активности СОД и сдвигает динамику изменений количества –SH групп в ответ на иммобилизационный стресс.

3.3.4 Окислительная модификация белков в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и сыворотке крови ПС крыс в модели ПТСР

Уровень ОМБ как спонтанной (СОМБ) так и индуцированной (ФОМБ) у ПС крыс уже исследовался в нашей лаборатории, и было показано, что ПС изменяет процессы окисления белков в сторону увеличения и снижает уровень фентон-индуцированной ОМБ, что говорит о снижении резервных возможностей организма в процессе адаптации к стрессорным воздействиям. В данной работе было предпринято исследование влияния ПС на состояние редокс-системы в структурах головного мозга и сыворотке крови в модели ПТСР.

На рис.23 представлены изменения уровня ОМБ у ПС крыс при моделировании ПТСР. В *неокортексе* головного мозга уровень СОМБ гидрофильных аминокислотных остатков снижается, а уровень ФОМБ увеличивается в 2 раза. Количество ОМБ гидрофобных аминокислотных остатков достоверно не изменяется.

В гипоталамусе уровень спонтанной ОМБ гидрофильных аминокислотных остатков снижается, уровень Фентон-индуцированной ОМБ гидрофобных аминокислотных остатков в 1,5 раза увеличивается.

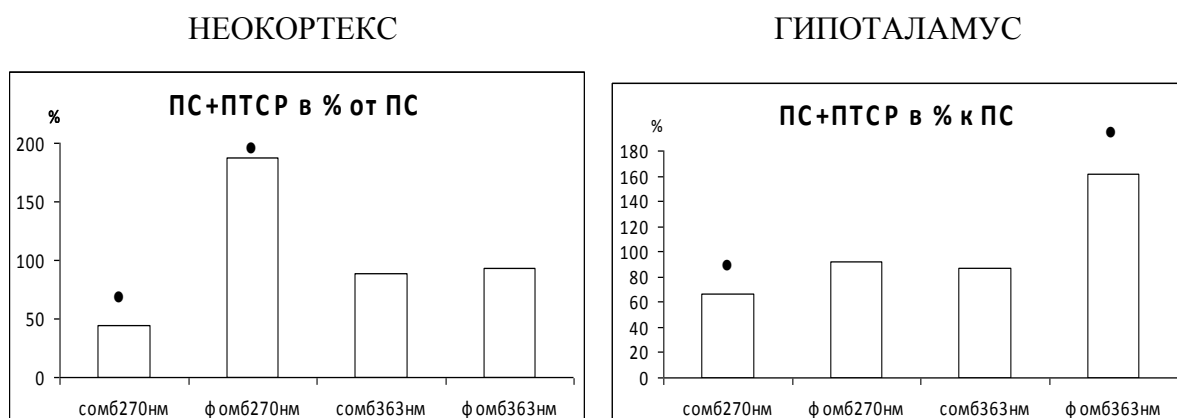


Рис. 23. Изменение уровня ОМБ в коре головного мозга и гипоталамусе у ПС крыс в модели ПТСР. Результаты указаны в % от контроля. За контроль приняты значения показателей ОМБ у ПС крыс, не подвергавшихся стрессорным воздействиям. • $p < 0.05$ достоверные отличия от группы ПС крыс

В гиппокампе (рис.24) наблюдается увеличение в 2 раза уровня ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков. В стриатуме растет уровень ФОМБ гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков в почти в 2 раза.

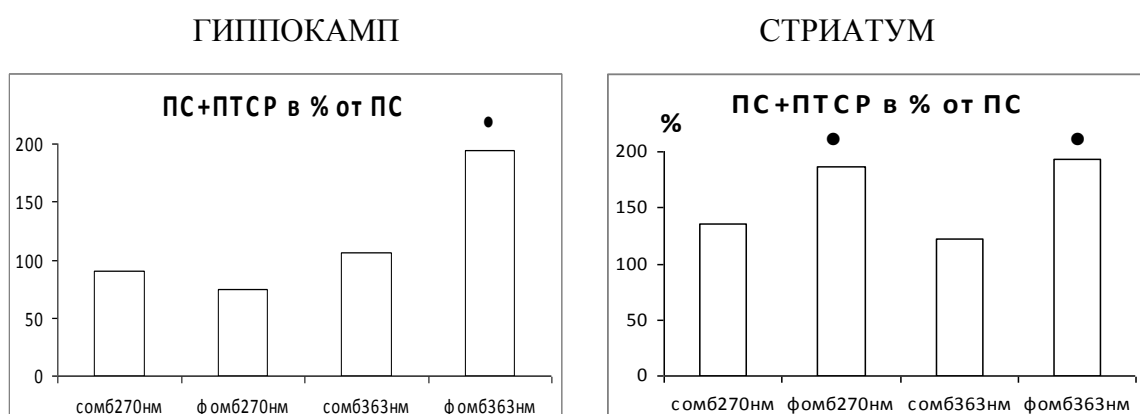


Рис. 24. Изменение уровня ОМБ в гиппокампе и стриатуме у ПС крыс в модели ПТСР. Результаты указаны в % от контроля. За контроль приняты значения показателей ОМБ у ПС крыс • $p < 0.05$ достоверные отличия от группы ПС крыс

Таким образом, можно отметить, что в модели ПТСР исследуемые структуры у ПС крыс реагируют интенсивным ростом ФОМБ, причем кора и гипоталамус имеют сниженный уровень СОМБ, в гиппокампе уровень СОМБ не меняется, а в стриатуме растет.

В сыворотке крови у ПС крыс после моделирования ПТСР снижается уровень ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков (см. рис.25). Это говорит о снижении уровня резервных возможностей организма.

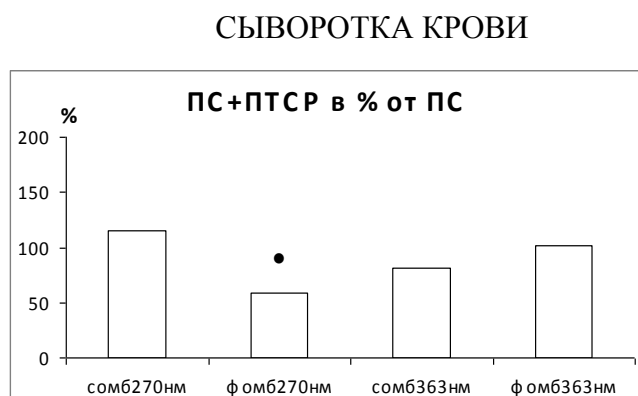


Рис. 25. Изменение уровня ОМБ в сыворотке крови у ПС крыс в модели ПТСР. Результаты указаны в % от контроля. За контроль приняты значения показателей ОМБ у ПС крыс. • $p < 0.05$ достоверные отличия от группы ПС крыс

У ПС крыс в исследованной модели ПТСР растет уровень ФОМБ во всех исследованных структурах головного мозга. При этом уровень СОМБ снижается в неокортексе и гипоталамусе, но растет в стриатуме. В сыворотке крови у ПС крыс в модели ПТСР снижается уровень СОМБ.

3.3.5. Состояние антиоксидантной системы в коре, гиппокампе и сыворотке крови ПС крыс в модели ПТСР

В *неокортексе* у ПС крыс после развития ПТСР-подобного состояния (см. рис.26) активность СОД снижается в 2 раза, а количество тиоловых групп увеличивается почти в 2 раза. В *гиппокампе* у ПС крыс в модели ПТСР нет изменений

в исследованных показателях антиоксидантной системы. В сыворотке крови снижаются и активность СОД и количество восстановленных тиоловых групп белков.

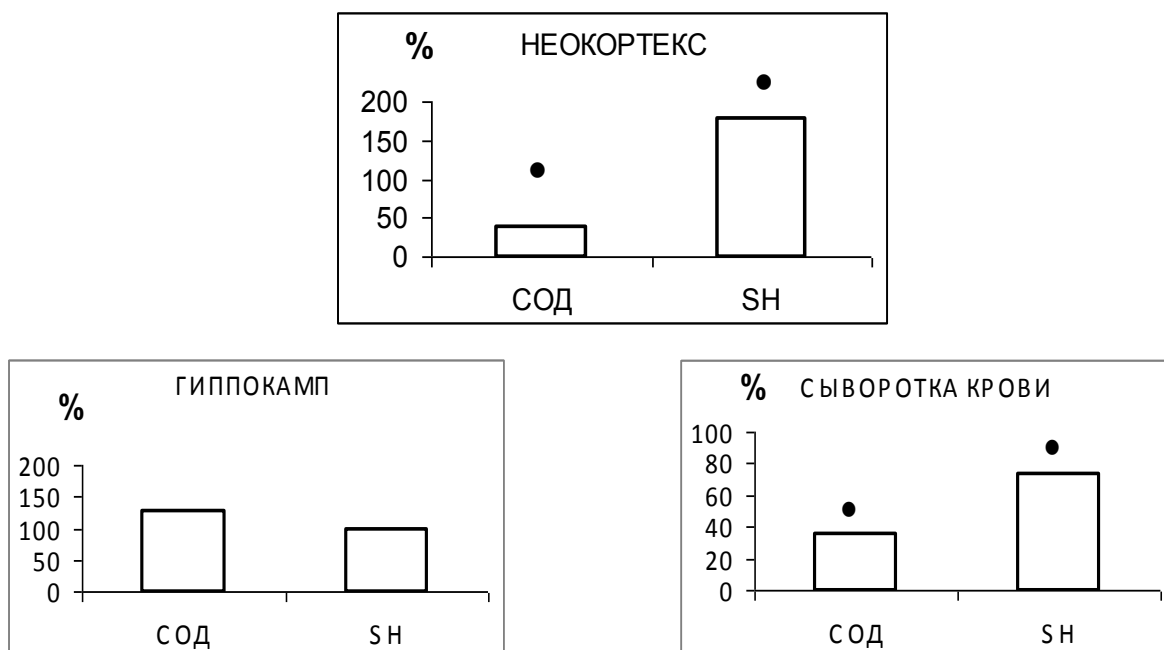


Рис.26. Изменение активности Zn-Cu-супероксиддисмутазы (СОД) и количества –SH групп в сыворотке крови у ПС крыс в модели ПТСР. Результаты указаны в % от контроля. За контроль приняты значения показателей у ПС крыс. ● $p < 0.05$ достоверные отличия от группы ПС крыс.

Из представленных результатов видно, что в неокортексе идут адаптивные перестройки редокс-системы при моделировании ПТСР, гиппокамп почти не реагирует на развитие ПТСР-подобного состояния, а на общеорганизменном уровне (в сыворотке крови) идет угнетение адаптивных реакций редокс-системы.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе исследовались возможные причины индивидуальной предрасположенности к заболеваниям, связанным с психотравмирующими ситуациями. Взаимосвязи типологических особенностей поведения с характером реакции на внешние воздействия являются важными для предупреждения и лечения заболеваний, связанных с нервной системой. Увеличение информационного потока, большое количество чрезвычайных ситуаций техногенного и природного характера ведут к нагрузкам на ЦНС и, как следствие, к возрастанию количества таких заболеваний как депрессии и посттравматические стрессовые расстройства.

На протяжении нескольких десятилетий изучались предположения о том, что в основе разделения на классические Павловские типы ВНД лежат межструктурные соотношения различных отделов головного мозга и их индивидуально-конституциональные особенности (Eysenck, 1971). Например, П.В.Симонов (2004) предположил, что в основе типов ВНД лежат взаимоотношения информационной (лобная кора/гиппокамп) и мотивационной (миндалины/гипоталамус) систем.

К настоящему времени накопилось множество фактов, позволяющих утверждать, что индивидуальные свойства ЦНС определяют многообразие форм отношения организма к окружающей среде, в том числе и поведение. Предполагается, что в основе поведенческих различий лежат отличия в уровне активности нейромедиаторных систем мозга, морфофункциональной составляющей, нейрохимических и биохимических процессах. Исследователями установлено, что животные, имеющие различия в индивидуально-типологических характеристиках нервной системы, отличаются по ряду биохимических параметров, таких как энергетический и белковый метаболизм в мозге, уровень свободнорадикального окисления липидов, активность антиоксидантных ферментов (Вьюшина и др., 2002, Гуляева 1989, Саркисова 1997, Перцов и др., 2011). При этом разница в изучаемых показателях демонстрировалась наиболее ярко после воздействий на животных различными стрессорами.

Согласно последним данным, именно степень свободно-радикального окисления биомолекул в клетке играет роль сигнала и является одним из тех стимулов, которые помогают включить адаптацию организма на клеточном уровне (Trachootham et al., 2008, Go & Jones, 2010, Кнорре и др., 2009, Муравлева и др., 2010). Многочисленные исследования подтверждают, что при большинстве патологических состояний белки в большей степени, чем липиды и нуклеиновые кислоты, являются эффективными ловушками АФК. А окислительная модификация белков

рассматривается как один из ранних и надежных маркеров стресса (Дубинина и др., 2000, Butterfield & Kanski, 2001, Wong et al., 2008). Этот факт находит подтверждение в работах, в которых доказано, что продукты окисления белков при окислительных повреждениях в тканях появляются раньше, и они более стабильны, по сравнению с продуктами ПОЛ (Grune et al., 1997, Reinheckel et al., 1998). Тем не менее, имеющиеся в литературе данные в области изучения про- и антиоксидантов у индивидов с различными типологическими характеристиками поведения достаточно бессистемны. А работ по исследованию ОМБ у крыс с различным типом поведения в литературе не обнаружено. Поэтому, нами была предпринята попытка обнаружить взаимосвязи между процессами ОМБ у крыс с различными ИТОП в норме и при моделировании ПТСР, и попутно рассмотреть некоторые показатели АОС.

Важным фактором различия типологических особенностей поведения является вклад отдельных структур головного мозга в их формирование. Рассмотрим характер про- и антиоксидантных систем в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе и стриатуме у активных и пассивных групп крыс, не подвергавшихся каким-либо стрессорам.

Неокортекс генерализованно участвует в регуляции поведенческих импульсов, которые распространяются посредством различных областей коры в другие структуры мозга, ответственные за поведенческие характеристики и их реализацию. В нашей работе было показано, что уровень СОМБ в неокортексе выше у активной группы крыс, причем высокий уровень переокисления белков отмечен на уровне как гидрофильных, так и гидрофобных аминокислотных остатков. Это свидетельствует о повышенной степени гидрофобности белков и соответственно большей способности к протеолизу (Муравлева и др., 2010) у активных крыс. В тоже время уровень показателя ФОМБ у активных крыс более низкий, чем у пассивных, то есть резервы для белкового окисления у активных крыс меньше. Такие данные позволяют предположить, что именно у активных крыс происходит интенсивный белковый метаболизм в неокортексе, что совпадает с исследованиями о характере энергетического метаболизма мозга у крыс с различными ИТОП (Ливанова и др., 1991; Саркисова и др., 1991; Саркисова, 1997). Исследование активности антиоксидантных ферментов в неокортексе у активных и пассивных крыс показало более высокую активность GST (глутатионтрансферазы) у пассивных крыс. Вполне вероятно, что высокий уровень активности данного фермента должен обеспечить низкий уровень переокисления белков посредством нейтрализации продуктов пероксидации липидов в неокортексе.

Гипоталамус организует поведение на начальной стадии поведенческого реагирования на раздражители и на поздней стадии, когда окончательно формируется

поведенческий ответ. У активных крыс в норме также как и в неокортексе, в гипоталамусе уровень СОМБ выше, чем у пассивных крыс и, соответственно, выше степень протеолиза белковых молекул. При этом в гипоталамусе уровень ФОМБ достоверно выше для гидрофильных аминокислотных остатков белков у активных крыс, а показатель ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков у активных и пассивных крыс не различается. То есть в гипоталамусе активным крысам требуется больше резервного белкового субстрата для переокисления, чем у пассивных крыс. По количеству тиоловых групп белков и по активности исследованных антиоксидантных ферментов в гипоталамусе активные и пассивные группы крыс не отличаются, за исключением фермента GR (глутатионредуктазы). Активность данного фермента у пассивных крыс достоверно выше и вероятно низкий уровень ОМБ пассивных крыс в гипоталамусе обеспечивается через глутатион и восстанавливающий его фермент GR.

Функция *гиппокампа* заключается в организации мыслительной деятельности, памяти (Шаляпина, Шабанов, 2005) и прогнозировании вероятности удовлетворения потребностей. Гиппокамп также оказывает регулирующее влияние на эмоциогенные структуры гипоталамуса и различные области коры головного мозга. В нашей работе не обнаружено отличий в уровне ОМБ между активными и пассивными группами крыс в данной структуре. В тоже время активность антиоксидантных ферментов в гиппокампе достоверно выше у активной группы крыс. Вполне возможно, что более высокий уровень активности антиоксидантной системы в гиппокампе способствует отсутствию более высокого уровня показателей ОМБ у активных крыс и таким образом нивелирует отличия в этих показателях у крыс с разными поведенческими характеристиками. Но количество тиоловых групп достоверно выше у пассивных крыс. Таким образом, антиоксидантная регуляция редокс-баланса у крыс разных поведенческих групп в гиппокампе осуществляется разными путями. Вероятно в гиппокампе, как структуре отвечающей за память и пространственно-временное ориентирование, не должен быть превышен определенный минимум белкового переокисления и должен поддерживаться уровень протеолиза в определенных пределах. Возможно, обработка и запоминание информации нуждаются в поддержании определенного уровня окислительных модификаций белка в условиях нормы.

Стриатум не отличается по показателям СОМБ у разных групп крыс, но при этом активные крысы имеют более высокий уровень ФОМБ как гидрофильных, так и гидрофобных аминокислотных остатков. Стриатум является структурой, ответственной за все виды движения и, по-видимому, для активных крыс необходим более высокий уровень белкового субстрата для окисления при реализации двигательного компонента.

Механизм антиоксидантной регуляции в стриатуме отличается от других исследованных структур. По уровню активности СОД и общему количеству тиоловых групп в стриатуме активные и пассивные группы крыс не отличаются. Но исследованные глутатионовые ферменты антиоксидантной защиты отличаются активностью у разных групп крыс. Так, у активных крыс преобладает активность GPx, тогда как у пассивных крыс выше активность GR и GST.

Вероятно, в формировании исследованных нами типологических характеристик поведения играют роль окислительные модификации белка именно в неокортексе и гипоталамусе. Именно в этих структурах демонстрируются наиболее полно различия в показателях СОМБ и ФОМБ у активных и пассивных крыс. Повышенный уровень стимулированной реактивом Фентона ОМБ в стриатуме у активных крыс является вполне логичным, поскольку именно стриатум является связующим звеном между корой и подкорковыми структурами и играет важнейшую роль в двигательном компоненте поведенческой программы, как уже было сказано выше. Также при наличии более интенсивного окислительного метаболизма, который присущ активным крысам, стриатум нуждается в усиленной нейтрализации большого количества перекисей, образующихся при аутоокислении дофамина, с чем и может быть связана более высокая активность GPx (глутатионпероксидазы) у активных крыс в данной структуре.

Таким образом, после исследования редокс-статуса активных и пассивных крыс видно, что вклад в различие поведенческих характеристик вносят как процессы ОМБ в исследованных структурах, так и глутатионовое звено АОС структур мозга, причем в каждой из исследованных структур регуляция про- и антиоксидантных систем имеет свои особенности.

Следующим этапом нашего исследования взаимосвязей типологических особенностей поведения и процессов ОМБ было изучение перекисного окисления белков и антиоксидантов в сыворотке крови. В предыдущих работах было показано что, уровень базального кортикостерона в *сыворотке крови* у активных и пассивных групп крыс, как и у линейных крыс (например, ВП и НП или KLA и KHA) достоверно не отличался (Шаляпина, Ракицкая 2003; Ордян и др., 1998). Тем не менее, исследование уровня ОМБ и активности Zn-Cu-СОД в сыворотке крови демонстрирует более высокие значения этих показателей у активных крыс. Такие данные позволяют нам предположить, что исследование процессов ОМБ и активности фермента Zn-Cu-СОД в сыворотке крови дает возможность делать выводы о поведенческих особенностях индивида.

Как уже было сказано выше, значительную роль в типологических особенностях поведения играет не только вклад каждой изученной структуры в отдельности, но соотношение комплексов таких структур головного мозга. Мы попробовали рассмотреть соотношения окислительных процессов в таких структурных комплексах с точки зрения предположения П.В.Симонова о том, что индивидуальные особенности соотношения систем кора-гипоталамус/гиппокамп определяют целенаправленное поведение.

Пассивная группа крыс, имеет более низкие соотношения показателей СОМБ в системе кора-гипоталамус/гиппокамп (табл.10) и в тоже время более высокие соотношения показателей ФОМБ по сравнению с активными крысами. Можно предположить, что соотношение показателей как СОМБ, так и ФОМБ при рассмотрении их в системе кора-гипоталамус/гиппокамп имеют значение при формировании акта целенаправленного поведения, в связи с чем и возникают различия в поведенческих характеристиках.

Таблица 10. Соотношение уровней ОМБ в системе кора-гипоталамус/гиппокамп

	СОМБ 270нм	ФОМБ270нм	СОМБ363нм	ФОМБ363нм
ПАССИВНЫЕ	1,5	2,3	1,4	2,3
АКТИВНЫЕ	2,4*	1,2*	2,8*	1,2*

*- $p < 0,05$ –по сравнению с пассивными крысами

При рассмотрении антиоксидантной активности СОД, глутатионовых ферментов и количества тиоловых групп белков (табл.11) в системе соотношения структур кора-гипоталамус/гиппокамп, пассивная группа крыс демонстрирует более высокие значения такого соотношения в активности всех изученных ферментов за исключением GPx, тогда как соотношение количества –SH групп не имеет отличий у разных групп крыс. Такая картина может также свидетельствовать о вовлечении в формирование целенаправленного поведения АОС.

Таблица 11. Соотношение активностей антиоксидантных ферментов и количества –SH групп в системе кора-гипоталамус/гиппокамп.

	СОД	GPx	GST	GR	-SH группы
ПАССИВНЫЕ	2,1	1,6	3,8	2,4	1,8
АКТИВНЫЕ	1,3	1,2	1,7	1,2	2,1

*- $p < 0,05$ –по сравнению с пассивными крысами

Таким образом, полученные нами данные показывают, что состояние редокс-баланса в структурах мозга и в сыворотке крови является тем фактором, который может отражать ИТОП. Причем процессы ОМБ и активность АОС в различных структурах проявляются по-разному и также отличаются в сыворотке крови. При этом наблюдается общая тенденция к более интенсивному уровню как СОМБ, так и ФОМБ у активных крыс.

Литературные данные о влиянии индивидуальных типологических характеристик поведения на развитие тех или иных психотравмирующих расстройств имеются в небольших количествах. Тем не менее, отмечается положительная корреляция нейротицизма и интроверсии с ПТСР (Yehuda, McFarlane, 1998; Yehuda et al, 1998; Ogle et al., 2017; Clark et al, 1994; Uliaszek et al, 2010). Есть ряд работ по исследованию поведения HR и LR крыс в модели SPS стресса, которая является одной из моделей ПТСР (Yamamoto et al, 2009). Было показано что поведенческая сенситизация у LR крыс более длительная по сравнению с HR крысами (Toledano et al, 2013). Изучался уровень экспрессии пептида галанина в амигдале, латеральном гипоталамусе, надпочечниках у HR & LR крыс. Уровень мРНК галанина выше LR крыс в надпочечниках. Уровень мРНК галанина выше у HR крыс в амигдале и гипоталамусе, что, вероятно, определяет повышенную тревожность и склонность к развитию ПТСР у HR крыс. (Barnabas et al, 2016). Также отмечалось что функциональное состояние адренергических структур мозга и их длительная активация могут выступать в качестве фактора риска развития ПТСР (Смулевич, 2001). В нашей лаборатории изучалось поведение в модели ПТСР (стресс/рестресс) у крыс линий КНА и KLA. Было показано что активные (КНА) и пассивные (KLA) крысы демонстрируют развитие постстрессорного расстройства при помощи различных механизмов. Так активные крысы демонстрируют поведенческий дефицит через 5 суток и к 20 суточному периоду снижение исследовательской и двигательной активности начинает ослабевать, тогда как у пассивных крыс поведенческий дефицит достигает максимума только через 20 дней. При анализе ряда поведенческих маркеров было сделано предположение о том

что активные крысы формируют психопатологию по типу тревожного состояния, а у пассивных животных развивается поведенческая депрессия (Шалапина и др., 2006а, Семенова и др., 2006). Также было обнаружено что постстрессорная окислительная модификация нейрональных мембран в структурах мозга активных и пассивных крыс различна. Патологические изменения в процессах ПОЛ у активных крыс преобладают в гиппокампе, а у пассивных в гипоталамусе (Флеров, Герасимова, 2006).

В нашей работе было проведено исследование поведенческих характеристик в тесте Т-лабиринт, уровня ОМБ и активности антиоксидантных ферментов у активной и пассивной групп крыс в модели ПТСР.

Механизмы стресс-реакции, развивающейся в модели ПТСР у активной и пассивной групп крыс, отличаются, если судить по изменившимся показателям поведения и уровню кортизола после процедуры стресс/рестресс. Это соответствует данным, полученным при работе с крысами линий КНА и КЛА.

У активных крыс поведенческие характеристики сдвигаются в сторону пассивности. При этом как уже было показано (Шалапина, Шабанов, 2005) содержание кортикостерона в крови активных крыс после ПТСР не отличается от такового у контрольных. А у пассивных крыс после ПТСР уровень кортикостерона снижается в два раза по сравнению с контролем. Такое изменение уровня кортикостерона и поведенческих характеристик еще раз подтверждает предположение о том, что механизмы реакции на данный вид стрессора идут разными путями, проявляясь в различных клинических картинах у разных групп крыс.

При сравнении процессов ОМБ и активности антиоксидантов в модели ПТСР и в контрольных группах у активных и пассивных крыс были обнаружены следующие изменения.. В *неокортексе* активных крыс уровень ФОМБ растет, что может косвенным образом свидетельствовать об усилении трансляционных процессов для обеспечения резерва субстрата для белкового перекисления. Одновременно спонтанное окисление белков (СОМБ) снижается, и, вероятно, это может быть связано с необходимостью снижения протеолитических процессов. Увеличение в 2 раза активности GPx способствует усиленной инаktivации H_2O_2 в неокортексе. Как известно, H_2O_2 блокирует передачу сигнала в синаптических контактах тормозного типа (Сидоров, 2011) и рост активности GPx может способствовать усилению тормозных процессов синаптической передачи и тем самым приводить к подавлению исследовательской и двигательной активности у активной группы крыс. Снижение активности Zn-Cu-СОД и количества тиоловых групп у активных и пассивных крыс свидетельствует о гиперпродукции свободных радикалов. Кроме того, снижение

общего количества тиоловых групп косвенным образом свидетельствует об усилении окисления глутатиона, что может негативно сказываться на организме, на уровне генома, поскольку глутатион участвует в регуляции транскрипции и трансляции через NF- κ B и другие транскрипционные факторы (Trachootham et al, 2008). Полученные данные демонстрируют нам, что сдвиг поведенческих показателей у активных крыс в сторону пассивности, возможно определяется изменениями в показателях редокс-баланса в неокортексе через блокирование спонтанной ОМБ и тем самым подавление метаболических процессов, а также через торможение сигнальной трансдукции и синаптической передачи.

У пассивной группы крыс резервные возможности белкового окисления имеют тенденцию к снижению, но статистическая обработка достоверных отличий от контроля не дает ($p=0,089$). Спонтанное же окисление увеличивается в два раза, способствуя росту степени гидрофобности белковых молекул и, как следствие, росту протеолиза. Активность СОД у пассивных крыс несколько снижается, но снижение это не имеет статистической значимости. Вместе с тем после ПТСР у пассивных крыс идет блокировка активности GST которая была повышена в норме по сравнению с активными крысами. Кроме того уменьшается количество тиоловых групп. Все эти события должны негативным образом сказываться на адаптивных способностях пассивных крыс. Таким образом можно отметить, что в исследованной модели ПТСР в неокортексе у активных и пассивных крыс процессы ОМБ и антиоксидантная защита идут разными путями, что находит свое отражение и в поведенческих показателях. Следует отметить что в неокортексе при ПТСР-подобном воздействии наблюдается большее напряжение прооксидантной системы и снижение активности антиоксидантной системы именно у пассивных крыс.

Процессы ОМБ в *гипоталамусе* активных крыс при ПТСР-подобном воздействии имеют динамику изменений сходную с неокортексом. В этой структуре тоже снижается СОМБ и растет ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков. Таким образом, в гипоталамусе активных крыс процессы ОМБ направлены в сторону усиления фолдинга с одной стороны и в сторону увеличения синтеза белков с другой стороны, то есть идут процессы, способствующие, по-видимому, более успешной адаптации на клеточном уровне в данной структуре.

У пассивных крыс изменения в процессах ОМБ в модели ПТСР отличаются от таковых у активных крыс. В данном случае растет уровень как СОМБ, так и ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков. Можно предположить, что гипоталамус пассивных крыс реагирует на ПТСР-подобное воздействие усилением

митохондриального дыхания и трансляционных процессов. Мы видим, что в такой структуре как гипоталамус, которая является центральным звеном стрессорного ответа, требуются различные механизмы процессов ОМБ для поддержания гомеостаза. Кроме того у активных крыс процессы ОМБ происходят с гидрофобными аминокислотными остатками, тогда как у пассивных крыс усиливается окисление гидрофильных аминокислотных остатков. У пассивных крыс в гипоталамусе процессы ОМБ идут более благоприятным путем по сравнению с неокортексом, поскольку показатель устойчивости системы к переокислению (ФОМБ) растет в гипоталамусе, а не в коре.

К сожалению, в данной работе не рассматривались антиоксидантные ферменты в гипоталамусе после ПТСР. Но, судя по опубликованным работам сходной тематики, в гипоталамусе активных крыс растет активность СОД (Перцов и др., 2011) при воздействии стрессора, за счет чего может происходить снижение уровня СОМБ, а у пассивных крыс активность СОД снижается, что может обеспечивать рост СОМБ почти в 2 раза. Правда, следует отметить, что в качестве стрессора в упомянутой работе использовался часовой иммобилизационный стресс с одновременным стохастическим электрокожным раздражением. Также часовой иммобилизационный стресс приводил к повышению ТБК-реактивных продуктов в гипоталамусе крыс линии Август в отличие от линии Вистар (Сосновский, Козлов, 1992).

Гиппокамп проявил себя как структура достаточно устойчивая к окислению белковому в данной модели ПТСР. Учитывая отсутствие отличий у пассивных и активных групп крыс в контроле, отсутствие изменений у пассивных крыс после ПТСР, а также увеличение уровня фентон-индуцированного окисления у активных крыс можно сказать, что процессы ОМБ в гиппокампе в меньшей степени, чем в других структурах задействованы в редокс-регуляции поведенческих различий в ответ на ПТСР-подобное воздействие. Но, тем не менее, гиппокамп реагирует усилением синтеза белка в активной группе крыс (что можно считать адаптивной, но не патологической реакцией). И, кроме того, в гиппокампе активность СОД интенсивно снижается после ПТСР у активных и пассивных крыс, а у пассивных крыс снижается еще и количество тиоловых групп белков. Вероятно, сохранение редокс-гомеостаза обеспечивается усиленным окислением тиоловых групп белков у пассивных крыс. Похоже, что редокс-система в гиппокампе крыс регулируется различными механизмами у пассивной и активной группами крыс после ПТСР. Пассивным крысам требуется большое напряжение АОС, а у активных крыс при усилении синтеза белка требуются большие энергозатраты для поддержания процессов ОМБ на уровне контроля. В силу того, что гиппокамп несет большую информационную нагрузку, в

данной структуре требуется поддерживать процессы клеточного сигналинга, трансляции, транскрипции, дифференцировки и др. в состоянии равновесия (Вьюшина, 2006). Возможно, именно с этим связаны выявленные изменения в процессах ОМБ и активности глутатионовых ферментов в данной структуре у крыс разных групп.





























Процессы ОМБ *в стриатуме* активных крыс как отмечалось в гл.3 взаимосвязаны с изменениями поведения у данной группы после ПТСР. Поведение активных крыс сдвигается в сторону увеличения пассивности и одновременно наблюдается снижение белкового синтеза в стриатуме (отвечающем за двигательную и ориентировочную активность индивида) при усилении протеолитических процессов и блокировке транскрипционных процессов. У пассивных крыс резко возрастает время неподвижности после ПТСР и одновременно после ПТСР стриатум реагирует усилением протеолиза на начальном этапе окисления белков. В стриатуме у активной группы крыс процессы ОМБ имеют негативную тенденцию, тогда как у пассивных крыс они проходят более успешно. И хотя анализ антиоксидантных ферментов в стриатуме не был проделан, тем не менее изменение показателей ОМБ у активных и пассивных групп крыс коррелирует с поведенческими изменениями в модели ПТСР и по видимому вносит вклад в индивидуальную стресс-реакцию у разных групп крыс.

Вышеописанные события в регуляции редокс-баланса исследованных структур мозга подтверждают предположение о различных механизмах течения стресс-реакции в модели ПТСР у активных и пассивных крыс и, следовательно, формирования постстрессорных патологий различного характера. Таким образом, вероятно, необходимо учитывать фактор исходного типа поведения (или исходной поведенческой стратегии) у индивида и при лечении заболеваний, возникающих в ходе психотравмирующих ситуаций, а также учитывать при этом процессы посттрансляционных окислительных модификаций белка и состояние антиоксидантной системы у определенных поведенческих типов в процессе лечения постстрессовой патологии.

Исследование изменений прооксидантных и антиоксидантных свойств *сыворотки крови* в модели ПТСР показывает, что на общеорганизменном уровне у пассивных крыс идет адаптивная реакция, свойственная организму при небольшом окислительном стрессе (Halliwell, Gutteridge, 2007). А снижение уровня ОМБ у активных крыс может свидетельствовать об ухудшении состояния животного, подавлении энергопродукции и нарушениях в процессах фолдинга-рефолдинга. В тоже время в крови у активных и пассивных крыс ингибируется активность СОД, при неизменном количестве –SH групп белков.

Суммарная картина изменений уровня показателей ОМБ и антиоксидантной защиты представлена в таблице 12. При анализе таблицы прослеживаются явные отличия изменений показателей про-и антиоксидантной систем у активной и пассивной групп крыс.

Таблица 12. Изменения уровня показателей ОМБ и активности антиоксидантных ферментов в неокортексе, гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме и сыворотке крови у активных и пассивных крыс при ПТСР-подобном воздействии. N - уровень контроля, стрелочки – достоверные изменения, «--» - нет данных. К- неокортекс, ГТ-гипоталамус, ГК-гиппокамп, СТР-стриатум, СК-сыворотка крови

		СОМБ 270нм	ФОМБ 270нм	СОМБ 363нм	ФОМБ 363нм	СОД	-SH	GPx	GST	GR
АКТИВНЫЕ	К	N	N						N	N
	ГТ	N	N			--	--	--	--	--
	ГК	N		N			N	N	N	N
	СТР			N		--	--	--	--	--
	СК		N		N		N	--	--	--
ПАССИВНЫЕ	К		N		N	N		N		N
	ГТ			N	N	--	--	--	--	--
	ГК	N	N	N	N			N	N	N
	СТР		N	N	N	--	--	--	--	--
	СК		N		N		N	--	--	--

У активных крыс наблюдается стремление к снижению уровня показателей ОМБ и активности АОС в структурах мозга. И на общеорганизменном уровне эта тенденция подтверждается снижением тех же показателей в сыворотке крови. У

пассивных крыс мы видим увеличение показателей ОМБ и снижение активности АОС, похожую картину мы видим при рассмотрении изменений данных показателей в сыворотке крови. Такая картина говорит о том, что пассивные крысы реагируют на ПТСР-подобное воздействие большим напряжением редокс-системы чем активные крысы, поскольку в норме процессы ОМБ у пассивных крыс идут с меньшей интенсивностью.

Полученные данные позволяют сделать выводы 1) о разных механизмах вовлеченности изученных структур мозга в формирование ПТСР; 2) о разных механизмах процессов ОМБ у активных и пассивных групп крыс в изученных структурах; 3) о различиях в степени активности АОС у активных и пассивных крыс в коре и гиппокампе; 4) о возможности использования показателей уровня ОМБ как предиктов механизмов развития ПТСР и соответственно успешного подбора лекарственной терапии.

Следующим этапом нашей работы было изучение такой группы крыс как пренатально стрессированные (ПС) крысы, которая представляет особый интерес при исследовании взаимосвязей поведения и биохимических и нейрохимических коррелятов.

Обнаружено, что в течение беременности (от раннего органогенеза до ускоренного роста плода) изменяется фетальный уровень кислорода и антиоксидантов. В период третьего триместра беременности их уровень очень сильно растет. Такое изменение уровня кислорода наблюдается как у плода, так и в плаценте. Последствием аэробного дыхания является генерирование АФК. И если уровень АФК по каким-то причинам резко возрастает, то следствием такого роста является активация сигнальных путей, что может отрицательно сказаться на развитии плода и в дальнейшем потомства (Dennerly, 2010). У взрослых пациентов, матери которых перенесли стресс, наблюдались такие заболевания как резистентность к инсулину и метаболический синдром, сдвиги в иммунных функциях, способствующие развитию аутоиммунных заболеваний, изменения эндокринной функции с ростом АКТГ и снижением уровня кортизола (Entringer et al., 2015). Пренатально стрессированное потомство крыс имеет высокую смертность, более низкую массу тела, пониженную локомоторную активность и низкую исследовательскую активность в новой обстановке, более высокий уровень эмоциональности по сравнению с контролем (Cabrera et al., 1999; Vallee et al., 1997).

Показано что ПС значительно увеличивает содержание 8-ОН-dG у самок и самцов крыс в гиппокампе. Такие данные предполагают, что ПС может оказывать

долговременное воздействие на митохондриальные ДНК гиппокампа у ПС потомства. Мутации и делеции митДНК возникающие из-за роста АФК приводят к большому количеству заболеваний (Song et al., 2009). ПС снижает уровень антиоксидантов (GSH, GR, СОД) в головном мозге. Рост фетальных глюкокортикоидов может приводить к росту активации возбуждающих рецепторов и неконтролируемому росту концентрации межклеточного Ca^{++} , и, следовательно, росту прооксидантов и окислительных повреждений в мозге. Мозг является наиболее чувствительным к повреждениям АФК чем другие органы, поскольку мозг насыщен ПНЖК, редокс-активными Me и имеет низкий уровень антиоксидантов (Sahu et al., 2011). Отдельные нарушения редокс-равновесия в пренатальном периоде онтогенеза могут сохраняться в течение всей жизни (Boersma et al., 2014; Panetta et al., 2017). Кроме того, было отмечено что ПС изменяет редокс-баланс в критические периоды онтогенетического развития, что также может негативно сказаться во взрослой жизни (Вьюшина, 2006, Вьюшина и др., 2012b).

Таким образом, группа пренатально стрессированных крыс является специфической группой с фенотипическими особенностями и с изменениями на эпигенетическом уровне, поскольку окислительный стресс влияет на эпигенетическую регуляцию генов через изменение функций гистонов и ДНК модифицирующих энзимов (Mikhed et al., 2015; Wolf et al., 2016; Cao-Lei et al., 2017).

Кроме того, подобные изменения, связанные с пренатальным стрессом, позволяют говорить о ПС крысах как об особой группе имеющей специфические свойства, выражающиеся в склонности к определенным заболеваниям и характерным изменениям в поведении при адаптации к стрессорным событиям (Hougaard et al., 2005, Ostlund et al., 2016). Одним из источников таких изменений является вклад окислительно-восстановительных процессов, происходящих в клетке. Окислительная модификация белков должна играть здесь важную роль, поскольку стресс-реакция клетки в сторону либо выживания либо адаптации во многом зависит от того до какой степени гидрофобности будут модифицироваться белки (Муравлева и др., 2010, Dennerly, 2010).

Большинство обзоров, рассматривающих проблему пренатального стресса, отмечают нарушение регуляции ГГАС по механизму обратной связи (Darnaudery et al., 2008), которая выражается, в том числе, в пролонгированности стрессорного ответа на иммобилизационный стресс (Ордян, Пивина, 2003). Исходя из этого, мы предположили, что возможны изменения в постстрессорной динамике уровня ОМБ и активности антиоксидантной системы у ПС крыс-самцов. Исследование постстрессорной динамики ОМБ в структурах мозга показало:

1. каждая из исследованных структур у крыс, не подвергавшихся пренатальному стрессу, имела свой динамический профиль стресс-реакции
2. несмотря на имеющиеся отличия кора, гипоталамус и гиппокамп реагировали подъемом уровня спонтанной и Фентон-индуцированной ОМБ в течение 1 часа после начала стрессорного воздействия
3. стриатум стоит отдельно в ряду исследованных структур, поскольку подъем уровня показателей ОМБ наблюдался через 3 часа после иммобилизации
4. ПС крысы также продемонстрировали в каждой структуре свой паттерн динамики стресс-реакции
5. во всех изученных структурах, кроме гипоталамуса, у ПС крыс наблюдалась более замедленная реакция на стресс (по сравнению с контролем) по показателям ОМБ.
6. в гипоталамусе у ПС крыс наблюдалась патологическая картина снижения СОМБ и резкого и длительного повышения ФОМБ.

Кроме того в нашей лаборатории исследовался вопрос о роли ПС как фактора риска развития у потомков ПТСР (Ордян Н.Э. и др, 2013, Ордян Н.Э. и др., 2014). Данное предположение было подтверждено экспериментальными данными. Выяснилось, что у ПС потомков был снижен базальный уровень кортикостерона в крови и наблюдались более длительные поведенческие и гормональные проявления постстрессорной патологии по сравнению с контрольными крысами (Ордян Н.Э. и др., 2013). В связи с чем, мы также исследовали изменения уровня ОМБ и антиоксидантную активность в структурах головного мозга и сыворотки крови у ПС крыс в модели ПТСР.

В *неокортексе* крыс без пренатального стресса наблюдаемое резкое увеличение уровня СОМБ через 20 мин. и ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков через 1 час после начала иммобилизации свидетельствует о нормально проходящей адаптивной реакции структуры. Неокортекс, как интегративный орган, регулирующий подкорковые структуры, ответственные за поведение и получающий ответные сигналы от подкорковых структур, несет на себе большую нагрузку. В тоже время устойчивость этой структуры к стрессорным влияниям обеспечивается системой «нейроны-глия». Кроме того, нельзя не учитывать морфологические особенности неокортекса, который имеет множественные функциональные области и сложную цитоархитектонику. Большая функциональная и регуляторная нагрузка данной структуры требует устойчивости к стрессу, которая, по-видимому, регулируется и через ОМБ. Рост спонтанной ОМБ в неокортексе, вероятно, запускает контроль качества

фолдинга белков, усиливает протеолиз, а увеличение уровня фентон-индуцированной ОМБ усиливает синтез белка. У ПС крыс после иммобилизации растут показатели СОМБ и ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков, то есть окислительным модификациям подвергаются другого рода аминокислотные остатки, нежели у крыс без ПС. Степень гидрофобности белков такова, что, по всей видимости, могут включиться механизмы запуска апоптоза, кроме того, процессы увеличения уровня ОМБ сдвигаются во времени (запаздывают по сравнению с таковыми у крыс без ПС).

Процессы ОМБ в неокортексе ПС крыс после ПТСР-подобного воздействия идут следующим образом: снижается уровень СОМБ и увеличивается уровень ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков. Можно сказать, что идет ингибирование клеточного сигналинга при усиленном белковом синтезе. Одновременно в неокортексе ПС крыс после ПТСР снижается активность СОД и растет количество тиоловых групп. Снижение уровня СОМБ может быть связано с избыточным ростом тиолов. Возможно с помощью увеличения общего количества $-SH$ групп в структуре происходит снижение энергозатрат, поскольку адаптивные способности ПС крыс снижены по сравнению с контролем. В тоже время подавление активности СОД говорит нам об усилении продукции супероксида, переизбыток которого негативно сказывается на функциональных способностях нейронов коры (Zambrzycka et al., 2003). Кроме того, переизбыток супероксида провоцирует апоптоз нейронов (Lim et al., 2002). Такое развитие событий говорит о большой напряженности структуры в попытке сохранения редокс-баланса у ПС крыс после ПТСР. Хотя, как уже было отмечено, кора среди других исследованных структур ГМ у ПС крыс является наиболее устойчивой и сбалансированной структурой с точки зрения окислительно-восстановительных процессов. При сравнении ПС, активных и пассивных крыс после ПТСР можно отметить, что в коре реакция редокс-системы по исследованным показателям ближе к активной группе крыс, но нельзя сказать, что такое сходство является полным.

При исследовании временной динамики стрессореактивности в *гипоталамусе* крыс, не подвергавшихся пренатальному стрессу, растет показатель фентон-индуцированной ОМБ как гидрофильных, так и гидрофобных аминокислотных остатков через 1 час после начала стрессирования, то есть ответ на стресс начинается в тот же промежуток времени, что и у коры и выражается этот ответ в усилении белкового синтеза и повышении резервных возможностей данной структуры. У ПС крыс показатели ОМБ в динамике иммобилизации представляют картину более напряженной адаптивной реакции. При более длительном повышении уровня ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков, показатель СОМБ снижается в 2 раза через

1 час после начала иммобилизации. Такой динамический профиль говорит о том, что при адаптивном процессе усиления резервных возможностей для белкового окисления, сами процессы окисления белков снижаются, что ведет к снижению процессов протеолиза, дезорганизации процессов фолдинга-рефолдинга и тем самым к нарушению клеточного сигналинга. Учитывая, что ПС снижает показатели резервных возможностей гипоталамуса по сравнению с контролем, адаптация к стрессорной нагрузке в данной структуре идет с большим напряжением по сравнению с корой, что может быть связано с долговременной нагрузкой, которую несет гипоталамус, организуя поведенческие паттерны и на ранней стадии стресс-реакции и на более поздних стадиях, где окончательно формируется поведенческий ответ (Симонов, 2004). Нельзя также забывать о том, что гипоталамус участвует в организации стресс-ответа ГГАС. Видимо сдвиги в регуляции ГГАС также играют свою неблагоприятную роль в дисрегуляции редокс-системы гипоталамуса после ПС. Тем не менее, также как и в неокортексе, мы видим, что в гипоталамусе после ПТСР показатели ОМБ стремятся к контрольным значениям, что, казалось бы, формально говорит нам о положительном действии ПТСР на ПС крыс. Но надо учитывать тот факт, что ПС потомки имеют фенотипические изменения, и у них уже нарушены процессы ОМБ, и любые изменения этого контура клеточной регуляции могут быть деструктивными. Поэтому увеличение синтеза белков, которое фиксируется в области спектра, где определяются гидрофобные аминокислотные остатки, и снижение окисления гидрофильных аминокислотных остатков белков можно трактовать как стремление данной системы к подавлению транскрипционных факторов и к развитию процессов апоптоза. Сравнивая процессы ОМБ в гипоталамусе ПС, активных и пассивных крыс можно увидеть, что ПС крысы по изменению уровня ОМБ после ПТСР стоят ближе к группе активных крыс, хотя также как и в коре, такое сходство неполно.

Временная динамика уровня ОМБ *гиппокампа* на иммобилизационный стресс у крыс, не подвергавшихся пренатальному стрессу, показала следующую картину. Растет уровень СОМБ гидрофобных аминокислотных остатков через 20 мин после начала иммобилизации, в остальных временных точках и по всем оставшимся показателям ОМБ гиппокамп остается инертным к стрессу. У *ПС крыс в гиппокампе* наблюдается более отдаленное время роста уровня СОМБ после начала стресса (через 3 часа), и окисляются гидрофильные аминокислотные остатки белков. Таким образом, качественный состав белкового субстрата для ОМБ сходен с таковым у гипоталамуса, но временной сдвиг индивидуален для этой структуры. В силу своих функциональных задач по управлению процессами памяти, хранению информации и вовлеченности в

организацию поведенческого ответа, как уже отмечалось ранее, гиппокамп нуждается в наиболее стабильном состоянии. Вероятно, поэтому процессы ОМБ в этой структуре и у крыс без ПС и у ПС крыс носят менее интенсивный характер, нежели в коре и гипоталамусе. Кроме того, изменения уровня ОМБ в гиппокампе носят адаптивный характер, хотя пренатальный стресс и задерживает время адаптивных изменений ОМБ. В модели ПТСР у ПС крыс уровень ФОМБ растет, приближаясь к значениям контроля. То есть в гиппокампе ПС крыс в модели ПТСР мы видим такую же картину, как в коре и гипоталамусе – ПТСР нивелирует изменения уровня ОМБ ПС крыс, приближая этот уровень к контрольному. Активность СОД и количество тиоловых групп в гиппокампе у ПС крыс после ПТСР не изменяется. В целом же гиппокамп является структурой проявляющей минимальные изменения, по сравнению с другими структурами, при различных стрессорных воздействиях. ПС сдвигает эти изменения во времени и снижает уровень ОМБ. Высказывалось предположение, что столь небольшие изменения в уровне ОМБ определяются генетическими механизмами, связанными с интенсивностью кислородного обмена (Вьюшина, 2006). Также низкий уровень АФК в гиппокампе связывают с улучшением способности к обучению (Hu et al., 2006; Thiels & Klann, 2002), кроме того, с низким уровнем перекиси связывают снижение процессов возбуждения нейронов за счет блокады передачи сигнала в контактах тормозного типа (Frantseva et al., 1998). Гиппокамп, являясь стероидсенситивной структурой, требует минимальных отклонений в редокс-статусе как в норме, так и при стрессе. Кроме того, группа ПС крыс в отношении этой структуры не может быть хотя бы приблизительно отнесена ни к активной ни к пассивной группам крыс по показателям изменений ОМБ в стресс-реакции на ПТСР.

Стриатум у крыс, не подвергавшихся ПС, реагирует на иммобилизационный стресс (при изучении постстрессорной динамики показателей ОМБ) ростом уровня СОМБ в более отдаленные временные сроки (3 часа), чем другие изученные структуры. Показатели ФОМБ гидрофильных аминокислотных остатков не меняются по отношению к контролю во всех временных точках. А уровень ФОМБ гидрофобных аминокислотных остатков увеличивается через 3 часа после стресса и далее снижается до уровня контроля. Такую картину постстрессорной динамики можно трактовать как адаптивную. Сверхпродукция АФК в стриатуме приводит к гибели дофаминергических нейронов мозга, а сам дофамин может выступать в качестве индуктора нейродегенеративных процессов (Cadet et al., 2000). Кроме того, дофаминергические нейроны являются нейронами чувствительными к окислительному стрессу, что делает их более подверженными клеточной смерти (Wang & Michaelis, 2010).

Поэтому белки могут выступать здесь в качестве ловушек для АФК, тем самым, способствовать снижению уровня АФК, предотвращению процессов аутоокисления дофамина и повреждению нейронов. *ПС в стриатуме* крыс изменяет постстрессорную динамику процессов ОМБ. Гидрофильные аминокислотные остатки начинают окисляться через 3 часа после начала иммобилизации, а гидрофобные через сутки. Рост спонтанного ОМБ и ФОМБ как показателя резервных возможностей структуры к окислению говорит о том, что ПС сдвигает сигналинговые пути в стриатуме. Имеются работы, показывающие, что ПС изменяет метаболизм дофамина в стриатуме (Diaz et al., 1995), увеличивает экспрессию транспортеров серотонина (SERT) и белков предшественников c-FOS (Bielas et al., 2014), снижает экспрессию NMDA-рецепторов (Sun et al., 2013) в стриатуме. Все эти события связывают со склонностью ПС крыс к тревожно-депрессивным расстройствам.

У ПС крыс после ПТСР-подобного воздействия *в стриатуме* растет уровень ФОМБ гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков, что на первый взгляд является адаптивным процессом. Причем здесь, также как и в других структурах, уровень показателей ОМБ стремится к уровню ОМБ у крыс без ПС (контрольных). Складывается впечатление, что ПТСР для ПС крыс является «лекарством», которое возвращает прооксидантную систему к уровню контроля. Но такой парадокс нельзя трактовать так однозначно, поскольку система окислительных модификаций белка встроена в огромное число сигналинговых путей. ПС крысы уже несут определенную нагрузку в системе редокс-баланса во всех исследованных нами структурах. И изменения в уровне ОМБ у ПС крыс после ПТСР только усугубляют напряжение прооксидантной системы на фоне сдвигов активности ГГАС, изменений в транскрипции, трансляции белков, ингибирования рецепторного связывания и разбалансировке системы возбуждения-торможения.

Такое негативное влияние ПС на структуры головного мозга очень ярко проявляется на общеорганизменном уровне, при исследовании процессов ОМБ в сыворотке крови после ПТСР. При исследовании изменений показателей ОМБ и состояния антиоксидантной системы в *сыворотке крови* в динамике стресс-реакции и в модели ПТСР, мы видим следующую картинку. У крыс, не подвергавшихся пренатальному стрессу, не обнаружено отклонений в динамике ОМБ после иммобилизационного стресса. Отсутствие изменений в показателях ОМБ можно объяснить ростом активности СОД через 20 мин после начала иммобилизации. А через 3 часа, когда активность СОД снижается до уровня контроля, в регуляцию редокс-баланса вступают тиоловые группы белков. Антиоксидантная система наивных крыс

при стрессорном воздействии успешно регулирует процессы ОМБ в сыворотке крови. Но у ПС крыс емкости антиоксидантной системы недостаточно для успешной адаптации организма. Активность СОД у ПС крыс после стресса остается сниженной в 2 раза на протяжении суток, а тенденции к росту ($p=0,12$) количества тиоловых групп недостаточно. А увеличение уровня СОМБ в сыворотке крови у ПС крыс и снижение показателя резервной мощности организма (ФОМБ), являются деструктивными. Усиленное окисление белков и снижение белкового синтеза ведут к нарушению процессов фолдинга-рефолдинга, могут включить запуск апоптоза и в сочетании с пролонгированным повышением кортикостерона негативно скажутся в дальнейшем на здоровье и эмоциональном состоянии ПС крыс. Как видим, ПС крысы более подвержены так называемой аллостатической перегрузке на общеорганизменном уровне. Такой анализ может в дальнейшем позволить судить о степени предрасположенности индивида к разного рода стрессам. Такую же негативную картину мы обнаружили при анализе показателей ОМБ и компонентов АОС при ПТСР–подобном воздействии на ПС крыс. Пренатальный стресс снижал показатели ОМБ в сыворотке крови у крыс по сравнению с контролем. И, в отличие от паттерна, наблюдаемого в структурах ГМ, в сыворотке крови после ПТСР показатели не возвращаются к уровню контроля у крыс без ПС. Здесь не создается картина ложного улучшения процессов ОМБ. Наоборот наблюдается снижение показателя резервной мощности ФОМБ в области гидрофильных аминокислотных остатков. Блокируется синтез белков, снижается активность СОД и уменьшается общее количество тиоловых групп белков – все эти события очень неблагоприятны, нарушают клеточный сигналинг, и способствуют повышению вероятности неблагоприятных событий для жизни и здоровья индивида.

На основании полученных данных можно заключить, что процессы ОМБ и состояние АОС вносят свой вклад в формирование типологических характеристик поведения и влияют на стрессореактивность. ПС крысы образуют специфическую группу, характеризующуюся фенотипическими особенностями поведения и реакции на стрессорные события. Существенный вклад сюда вносят процессы ОМБ, активность СОД, глутатионовые ферменты и тиоловые группы белков. Кроме того, ОМБ и антиоксиданты вносят существенный вклад и в патологические проявления ПТСР, имеющие определенную специфику как у крыс с различными индивидуально-типологическими характеристиками, так и у пренатально стрессированных животных.

ВЫВОДЫ

1. Крысы, разделенные на активную и пассивную группы в тесте Т-образный лабиринт, демонстрируют различия в уровне ОМБ исследованных структур мозга. Уровень спонтанной ОМБ у активных крыс повышен в неокортексе и гипоталамусе по сравнению с пассивными животными. Уровень Фентон-индуцированной ОМБ выше у активных крыс в гипоталамусе и стриатуме, а у пассивных крыс ниже в неокортексе. В гиппокампе различий в уровне ОМБ между активными и пассивными крысами не обнаружено.

2. Активность антиоксидантных ферментов в исследованных структурах мозга у активной и пассивной групп крыс различается. Каждая из исследованных структур имеет специфический паттерн таких различий. В неокортексе активность GSTr, в гипоталамусе активность GR понижена у активных крыс. А в гиппокампе активности СОД, GPx, GSTr, GR повышены у активных крыс. В стриатуме активность GPx повышена, а активность GSTr и GR снижена у активных крыс. Кроме того, в гиппокампе у активных крыс количество –SH групп меньше, по сравнению с пассивной группой, а в остальных структурах, такие различия отсутствуют.

3. В сыворотке крови у активных крыс уровень спонтанной ОМБ и активности СОД являются более высокими, чем у пассивных крыс.

4. В парадигме «стресс-рестресс» процессы ОМБ у активных крыс в каждой из структур имеют свой паттерн различий. У пассивных крыс выявлен общий для всех структур рост показателей ОМБ. Активность антиоксидантных ферментов в неокортексе у активных и пассивных крыс в модели ПТСР изменяется по-разному, количество –SH групп снижается и у активных и у пассивных крыс. В гиппокампе различий в уровне активности антиоксидантных ферментов у активных и пассивных крыс при формировании ПТСР-подобного состояния не выявлено, а количество –SH групп снижается у пассивных и не меняется у активных крыс.

5. В сыворотке крови наблюдаются разнонаправленные изменения в уровне СОМБ у активных и пассивных крыс и отсутствие различий в изменении активности СОД и количества –SH групп при выработке ПТСР-подобного состояния. Уровень СОМБ у активных крыс снижается, а у пассивных крыс растет, при одновременном снижении количества –SH групп у обеих групп крыс.

6. Пренатальный стресс сдвигает во времени на более поздние сроки повышение уровня СОМБ и ФОМБ в структурах мозга в ответ на стрессорное воздействие. В сыворотке крови у пренатально стрессированных крыс изменяется постстрессорная динамика процессов перекисного окисления белков, а также существенно снижается активность СОД.

7. При моделировании ПТСР у пренатально стрессированных крыс уровень ФОМБ увеличивается во всех исследованных структурах мозга. При этом уровень СОМБ снижается в неокортексе и гипоталамусе, но растет в стриатуме. В сыворотке крови у пренатально стрессированных животных в модели ПТСР снижается уровень СОМБ. Кроме того снижается активность СОД в неокортексе и сыворотке крови, а количество –SH групп увеличивается в неокортексе и снижается в сыворотке крови

8. Более высокие поведенческие показатели двигательной и исследовательской активности активных крыс коррелируют с повышенным уровнем процессов ОМБ как в структурах головного мозга, так и в сыворотке крови. Пренатально стрессированные крысы по показателям перекисного окисления белков, как в контроле, так и при моделировании ПТСР, являются уникальной группой, которая не может быть отнесена ни к активным, ни к пассивным крысам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айрапетянц М.Г., Вейн А.М. Неврозы в эксперименте и клинике. -М.: Наука. -1982. -271с.
2. Айрапетянц М.Г.Хоничева И.М., Мехедова А.Я., Ильяна Вельяр Х. Реакции на умеренные функциональные нагрузки у крыс с индивидуальными особенностями поведения. // Журн. высш. нервн. деят. -1980. -Т. 30. -С. 994-1002.
3. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. -СПб.: ИКФ «Фолиант». -2000. -104с.
4. Арутюнян А.В., Козина Л.С. Механизмы свободнорадикального окисления и его роль в старении// Успехи геронтологии. 2009. Т. 22. № 1. С. 104-116.
5. Арчаков А.И., Мохосоев И.М. Модификация белков активным кислородом и их распад. // Биохимия. -1989. -Т.54. №2. -С.179-186.
6. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука. -1992. -149с.
7. Бенешова О. Генетически обусловленная изменчивость поведения у крыс и ее биохимические препараты. //Журн. высш. нервн. деят. -1978. -Т. 28. Вып. 2. -С. 314-321.
8. Болдырев А.А. Парадоксы окислительного метаболизма мозга. // Биохимия. -1995а. -Т.60. №9. С.1536-1542.
9. Болдырев А.А. Двойственная роль свободнорадикальных форм кислорода в ишемическом мозге. // Нейрохимия. -1995b. -Т.12. №3. -С.3-13.
10. Бондаренко Н.А., Девяткина Т.А., Воскресенский О.Н., Вальдман. Влияние хронического эмоционального стресса на состояние перекисного окисления липидов в тканях и крови эмоциональных и неэмоциональных крыс. // БЭБиМ. -1985. №7. -С.12-14.
11. Бояринова Н.В., Давыдович М.Г., Цейликман В.Э. Влияние непродолжительной гипокинезии на глюкокортикоидзависимые изменения уровня свободнорадикального окисления в гиппокампе и показателя тревожности у крыс. // Эксперим.Медицина и Биол. -2009. -С.59-62.
12. Вайдо А.И., Ситдилов М.Х. Селекция линий крыс по долгосрочному порогу возбудимости нервно-мышечного аппарата. // Генетика. -1979. -Т.15. №1. -С.144-147.

13. Ведунова М.В., Сазанов А.И., Конторщикова К.Н. Влияние низких терапевтических доз озона на уровень окислительной модификации белков при метаболическом синдроме. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. -2010. - №2. С.504-507.
14. Ведяев Ф.П., Чернобай В., К. К вопросу о коррелятивных связях между этологическими и электрокардиографическими показателями теста «открытое поле». // Проблемы физиологии гипоталамуса. -Киев: Вища школа. -1981. -Вып.15. - С.22–29.
15. Великжанин В.И. Генетика поведения сельскохозяйственных животных (этология, темперамент, продуктивность). –СПб.: ВМИИ. -2004. -204с.
16. Виноградова О.С. Структурно-функциональные представления об организации процесса регистрации информации лимбической системой. // В сб.: Лимбическая система мозга. Пушкино-на-Оке. Наука. -1973. -С.7-13.
17. Волошин В.М. Посттравматическое стрессовое расстройство (феноменология, клиника, систематика, динамика и современные подходы к психофармакотерапии). -М.: Анахарсис. -2005. -С.200.
18. Вьюшина А.В., Вайдо А.И., Герасимова И.А., Ширяева Н.П., Флеров М.А. Различия в процессах перекисного окисления белков у беременных крыс, селективных по порогу возбудимости нервной системы // БЭБиМ. -2002. –Т.133. №3. –С.292-294.
19. Вьюшина А.В., Герасимова И.Г., Флеров М.А. Перекисное окисление белков сыворотки крови у крыс селективных по скорости выработки условного рефлекса активного избегания, в норме и при стрессе. // БЭБиМ. -2002. -Т.133. №3. - С.286-288.
20. Вьюшина А.В. Влияние пренатального стресса на процессы окислительной модификации белков и активность Zn-Cu-супероксиддисмутазы в головном мозге крыс. // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. -Санкт-Петербург. -2006. -18с.
21. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Шаляпина В.Г., Флеров М.А. Взаимосвязь окислительной модификации белка и антиоксидантной системы с индивидуально-типологическими особенностями поведения у крыс в норме и при постстрессорной психопатологии. // Нейрохимия. -2011. -Т.28. № 4. -С.1-7.
22. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А. Окислительная модификация белков в структурах мозга крыс линии Спрэг-Дули и некоторые показатели поведения после пренатального стресса. // Рос. физиол. журн.им. И.М.Сеченова. -2012а. -Т.98. №8. -С. 962-969.

23. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А. Влияние пренатального стресса на окислительную модификацию белков головного мозга крыс в онтогенезе. // Нейрохимия. -2012b. -Т.29. № 2. -С.1-7.
24. Герасимова И.А., Флеров М.А., Вьюшина В. Влияние пренатального стресса на перекисное окисление липидов в некоторых отделах головного мозга самцов и самок взрослых крыс. // Нейрохимия. -Т.22. №4. -С.273-278.
25. Гидулянов А.А. Исследование тканеспецифичных различий в уровне продуктов окислительной модификации белков в тканях отдельных представителей позвоночных и беспозвоночных животных. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского. Серия «Биология,химия». -2014. -Т.27(66). №2. -С.41-47.
26. Греннер Д. В кн.: Биохимия человека. -М.: Мир. -1993. -Т.2. -416с.
27. Гуляева Н.В. Перекисное окисление липидов в мозге при адаптации к стрессу // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. -Москва. -1989. -30с.
28. Гуляева Н.В., Левшина И.П., Обидин А.Б. Стадия ингибирования свободнорадикального окисления липидов предшествует его активации при стрессе. // Докл. АН СССР. -1989. -Т.300. №3. -С.748-752.
29. Девяткина Т.А., Тарасенко Л.М. Обусловленность перекисного окисления липидов типологическими особенностями нервной системы и их связь с устойчивостью организма к физической нагрузке. // Физиол. журн. -1989. -Т.35. №1. С.55-59.
30. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. // -СПб.: Медицинская пресса. -2006. -400с.
31. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В., Гампер Н.Л., Солитернова И.Б., Нуллер Ю.Л., Бутома Г.Б., Ковругина С.В. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация). // Вопр. Мед. Хим. -2000. -Т.46. №4. -С.398-409.
32. Ещенко Н.Д. Энергетический обмен головного мозга // в кн. «Нейрохимия». -СПб.: Изд-во СПбГУ. -1996. -С.496.
33. Жуков Д.А. Психогенетика стресса. Поведенческие и эндокринные корреляты генетических детерминант стресс-реактивности при неконтролируемой ситуации. – СПб. -1997. -176с.
34. Захарова А.Н. Роль окислительной модификации белков в диагностике депрессивной симптоматики при аффективных, невротических, соматоформных и

- ассоциированных со стрессом психических расстройствах. // Медицинская психология. -2013. -№1. -С.111-113.
35. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. -М.:МАИК «Наука/Интерпериодика». -2001. -343с.
36. Исмаилова Х.Ю., Агаев Т.М., Семенова Т.П. Индивидуальные особенности поведения. -Баку: «Нурлан». -2007. -228с.
37. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. // Успехи.биол.хим. -2014. -Т.54. -С. 299-348.
38. Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Годовикова Т.С. Химические и функциональные аспекты посттрансляционной модификации белков. // -АСТА NATURAE. №3. - 2009. -С.32-56.
39. Кожевников Ю.Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии // Вопр. Мед. химии. -1989. -Т.30. №5. -С.2-7.
40. Кондрашова М.Н. Участие митохондрий в развитии адаптационного синдрома // Пушино-на-Оке. -1974. -20с.
41. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.Д., Бабский А.М. и др. Гомеостазирование физиологических функций на уровне митохондрий // Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза. -Новосибирск: Наука. -1987. -С.40-66.
42. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу. // Вестн. Нов. Мед. технол. -2002, -Т.9. №1. -С.16-18.
43. Кравцова Е.Ю., Мартынова Г.А., Кравцов Ю.И. Корреляция клинических показателей и окислительной модификации белков при ишемическом инсульте у лиц трудоспособного возраста. // Международный неврологический журнал. -2011. № 8(46). С.27-32.
44. Краковский М.Э. Активность узловых окислительно-восстановительных ферментов у кроликов с разными типологическими особенностями. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -1987. -Т.37. -С. 457-461.
45. Кузьменко Д.И., Лаптев Б.И. Оценка резерва липидов сыворотки крови для перекисного окисления в динамике окислительного стресса у крыс. // Вопр. мед. химии. -1999. -Т.45. №1. -С.47-54.
46. Кулагин Д.А., Болондинский В.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке. // Успехи физиол. наук. -1986. -Т.17. №1. -С.92-109.

47. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона. // Успехи соврем. биол. -1990а. -Т.110. -С. 20-30.
48. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Обмен глутатиона. // Успехи биол. химии. - 1990б. -Т.31. -С.157-179.
49. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Система глутатиона и другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции. // Биомедицинская химия. -2009. Т.55. №4. -С.365-37.
50. Купалов П.С., Воеводина О.Н., Волкова В.Д., Малюкова И.В., Селиванова А.Т., Сыренский В.И., Хананашвили М.М., Шичко Г.А. Ситуационные условные рефлексы у собак в норме и патологии. -Л.: «Медицина». -1964. -304с.
51. Ливанова Л.М., Саркисова К.Ю., Лукьянова Л.Д., Коломейцева И.А. Дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий мозга крыс с разным типом поведения. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -1991. -Т.41. №5. -С.973.
52. Лосева Е.В., Саркисова К.Ю., Логинова Н.А., Кудрин В.С. Депрессивное поведение и содержание моноаминов в структурах мозга у крыс при хронической скученности. // Бюл. Экспер. Биол. -2015. -Т.159. №3. -С.304-307.
53. Мажитова М.В., Теплый Д.Л., Горст Н.А., Нестеров Ю.В., Тризно Н.Н. Функциональный подход к оценке степени выраженности стрессорных реакций по состоянию свободнорадикальных процессов а разных уровнях центральной нервной системы. // Вестн.Дагестанского гос.ун-та. -2012. -Сер.1.№1. С.123-127.
54. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. -М.:Наука. -1981. -280с.
55. Мельников А.В., Куликов М.А., Новикова М.Р., Шарова Е.В. Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -2004. -Т.54. №5. -С.712-717.
56. Митюшов М.И., Богданова Т.С., Гарина И.А., Емельянов Н.А., Подвигина Т.Т., Соколова Е.В., Ракицкая В.В.,Филаретов А.А., ШаляпинаВ.Г. Гипофизарно-адреналовая система и мозг. -Л.:Изд-во «Наука». -1976. С.208.
57. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Бакенова Р.А., Култанов Б.Ж., Танкибаева Н.А., Койков В.В., Омарова Г.А. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования. // Фундаментальные исследования. -2010. №1. -С.74-78.
58. Назаров И.Н., Казицина Л.А., Зарецкая И.И. Исследование спектров поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов карбонильных соединений. // Журн. общ. химии. - 1956. -№27(3). С.606-623.

59. Небылицын В.Д. К вопросу об общих и частных свойствах нервной системы. // Вопр. Психологии. -1968. -№4. -С.29-43.
60. Небылицын В.Д. Психофизиологические исследования индивидуальных различий. - М.:Наука. -1976. -336с.
61. Небылицын В.Д. Психология индивидуальных различий. -М.:Изд-во МГУ. -1982. - С.153-159.
62. Ордян Н.Э., Вайдо А.И., Ракицкая В.В., Промина Ф.И., Ширяева Н.И., Лопатин Н.Г., Шаляпина В.Г. Функционирование гипофизарно-адренкортикальной системы у крыс, селектированных по порогу чувствительности к электрическому току. // БЭБиМ. -1998. -Т.124. №4. -С.443.
63. Ордян Н.Э. Гормональные механизмы фенотипической модификации стрессорной реактивности в онтогенезе крыс // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. -2003. -35с.
64. Ордян Н.Э., Пивина С.Г. Характеристика поведения и стрессореактивности гипофизарно-адреналовой системы пренатально стрессированных крыс. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2003. -Т.89. №1. -С.52-59.
65. Ордян Н.Э. Смоленский И.В., Пивина С.Г., Акулова В.К. Особенности формирования тревожно-депрессивного состояния в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства у пренатально стрессированных самцов крыс. // Журн.высш.нервн.деят. -2013. -Т.63. №2. -С.280-289.
66. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Миронова В.И., Ракицкая В.В., Акулова В.К. Активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы пренатально стрессированных самок крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2014. -Т.100. №12. -С.1409-1420.
67. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э. Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. –СПб.: «Десятка». -2007.
68. Павлов И.П. О типах высшей нервной деятельности и экспериментальных неврозах. -М.:Медгиз. -1954. -191с.
69. Перцов С.С., Коплик Е.В., Калиниченко Л.С. Интенсивность окислительных и антиоксидантных процессов в головном мозге крыс с разными параметрами поведения при острой стрессорной нагрузке. // БЭБиМ. -2011 -Т.152. №7. -С.4-7.
70. Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Смоленский И.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Модификация экспрессии нейrogормонов в гипоталамусе пренатально

- стрессированных самцов крыс в модели посттравматического стрессового расстройства. // Журн. эвол. биохим. физиол. -2014. -Т.50. №4. С.305—311.
71. Писарев В.Б., Туманов В.П., Ерофеев А.Ю., Потанин М.Б. Роль различных иерархических структур головного мозга при психоэмоциональном напряжении. // БЭБиМ. -1996. -Т.121. №5. -С. 578-582.
72. ПрайорУ. Свободные радикалы в биологии. –М.:Мир. -1979. -Т.1. -С.320.
73. Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мыслицкий В.Ф. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. -Черновцы:Медакадемия. - 2004. -361с.
74. Рыбникова Е.А., Ракицкая В.В., Шаляпина В.Г. Участие стриатума в центральной регуляции гормональной функции гонад. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 1999. -Т. 85. №4. -С.295-297.
75. Саркисова К.Ю., Ноздрачева Л.В., Куликов М.А. Взаимосвязь между индивидуальными особенностями поведения и показателями энергетического метаболизма мозга у крыс. // Журн.высш.нервн.деят. -1991. -Т.41. №5. -С.963.
76. Саркисова К.Ю., Два типа сдвигов окислительного метаболизма мозга, коррелирующих с типом поведения в стрессовой ситуации, как возможный нейрофизиологический механизм устойчивости к стрессу // Усп. физиол. наук, 1994, Т.25. №4, с.53
77. Саркисова К.Ю. Связь между типом поведения, особенностями окислительного метаболизма мозга и устойчивостью к патогенным воздействиям. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. -1997. -36с.
78. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. -М.:Медгиз. -1960. -256с.
79. Семагин В.Н., Зухарь А.В., Куликов М.А. Тип нервной системы, стрессоустойчивость и репродуктивная функция. -М.:Наука. -1988. -135с.
80. Семенова О.Г., Ракицкая В.В., Шаляпина В.Г. Блокада рецепторов кортиколиберина предотвращает развитие постстрессорной психопатологии у крыс с активной стратегией приспособительного поведения. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2006. -Т.92. №11. С.1345-1350.
81. Сергутина А.В. Влияние L-ДОФА на активность глутаматдегидрогеназы в нейронах мозга крыс с различной двигательной активностью. // Нейрохимия. -2010. -Т.27. №1. -С.31-35.
82. Сидоров А. В. Активные формы кислорода и регуляция нейронных функций. // Новости медико-биологических наук. -2011. -Т.4. № 4. -С.224-231.
83. Симонов П.В. Избранные труды. -Т.1,2. –М.:Наука. -2004. -С.437, -С.308.

84. Смирнов Л.П., Суховская И.В. Роль глутатиона в функционировании систем антиоксидантной защиты и биотрансформации. // Учен. Зап. Петрозаводского Гос. Ун-та. -2014. №6. -С.34-40.
85. Смулевич А.Б. Депрессии в общей медицине. –М.: МИА. -2001. -С.256.
86. Соколовский В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие. // Вопр.мед.химии. -1988. №6. -С.2-11.
87. Соколовский В.В., Кузьмина В.С., Москадынова Г.А., Петрова Н.Н. Спектрофотометрическое определение тиолов в сыворотке крови. // Клин.лаб.диагностика. -1997. -№11. С.20-21.
88. Сосновский А.С., Козлов А.В. Повышение перекисного окисления липидов в гипоталамусе крыс после кратковременного эмоционального стресса. // БЭБиМ. -1992. №5. -С.486-488.
89. Степаничев М.Ю. Нейрохимические корреляты индивидуально-типологических особенностей поведения у крыс. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. -1996. -22с.
90. Суворов Н.Ф. Стриарная система и поведение. -Л.:Наука. -1980. -280с.
91. Суворов Н.Ф., Шуваев В.Т., Войлокова Н.А., Чивилева О.Г., Шеффер В.И. Кортикостриарные механизмы поведения. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 1995. -Т.81. №12. -С.1-12.
92. Судаков К.В. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу. - М.:Горизонт. -1998. -263с.
93. Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г. Определение уровня тревожности у крыс: Расхождение результатов в тестах «Открытое поле», «Крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля. // БЭБиМ. -2013. -Т.155. №3. -С.268-270.
94. Тарабрина Н.В. и соавт. Практическое руководство по психологии посттравматического стресса. Ч.1. -М.:Когито-Центр. -2007. -208с.
95. Теплов Б.М. Избранные труды. Т.2. -М.:Педагогика. -1985. -360с.
96. Толстухина Т.И., Ракицкая В.В., Флеров М.А. Перекисное окисление липидов в гиппокампе крыс после введения кортизола в условиях стресса. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -1999. -Т.85. №3. -С.436-441.
97. Толпыгина О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. -2012. №2(84). -С.178-180.

98. Флеров М.А., Герасимова И.А., Ракицкая В.В. Перекисное окисление липидов в стриатуме крыс после введения кортизола. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2002. -Т.88. №7. -С.881-885.
99. Флеров М.А., Герасимова И.А. Перекисное окисление липидов некоторых отделов головного мозга в развитии постстрессорных депрессивных состояний у крыс с разной стратегией адаптивного поведения. // Нейрохимия. -2006. -Т.23. №4. -С.307-312.
100. Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В., Притворова А.В. Влияние пренатального стресса на свободнорадикальное окисление липидов и белков и активность супероксиддисмутазы в нейронах и нейроглии коры больших полушарий головного мозга крыс. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 2008. -Т.94. №4. -С.406-413.
101. Флеров М.А., Вьюшина А.В. Свободнорадикальное окисление липидов в гипоталамус крыс при стрессе после введения кортизола. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2011. -Т.97. №9. -С. 10-14.
102. Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода. // Свободные радикалы в биологии // по ред. У.Прайора. -М.:Мир. -1979. -Т.2. -328с.
103. Хоничева Н.М., Ильяна Вилья Р.Х. Характер поведения в ситуации избегания как критерий оценки типологических особенностей крыс. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -1981. Т.31. №5. -С.975-983.
104. Хужахметова Л.К., Теплый Д.Л. Фармакологическая коррекция перекисного окисления липидов и перекисного гемолиза эритроцитов у половозрелых крыс при иммобилизационном стрессе. // Естественные науки. -2016. №2 (55). -С.66-71.
105. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль СОД в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. // Лаб. дело. -1985. № 11. -С. 678–681.
106. Чернышова М.П. Гормоны животных. -1995. -СПб.: Глаголь. 296с.
107. Чумаков В.Н., Ливанова Л.М., Крылин В.В., Дугин С.Ф., Айрапетянц М.Г., Чазов Е.И. Влияние хронической невротизации на моноаминергические системы различных структур мозга крыс с различными типологическими характеристиками. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -2005. -Т.55. №3. -С. 410-417.
108. Шаляпина В.Г., Войлокова Н.Л., Суворов Н.Ф., Ракицкая В.В. Индивидуально-типологические особенности гормональных реакций у собак при психоэмоциональном стрессе. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2001. -Т.87. №7. -С.926-932.

109. Шаляпина В.Г., Ракицкая В.В., Родионов Г.Г. Участие дофаминэргических процессов в стриатуме в действии кортиколиберина на поведение активных и пассивных крыс. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2002. -Т.88. №2. -С.213-219.
110. Шаляпина В.Г., Ракицкая В.В. Реактивность гипофизарно-адренкортикальной системы на стресс у крыс с активной и пассивной стратегиями поведения. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2003. -Т.89. №5. -С.585-590.
111. Шаляпина В.Г., Шабанов П.Д. Основы нейроэндокринологии. -2005. -СПб.:Элби-С-Пб. 472с.
112. Шаляпина В.Г., Вершинина Е.А., Ракицкая В.В., Рыжова Л.Ю., Семенова М.Г., Семенова О.Г. Изменение приспособительного поведения активных и пассивных крыс Вистар в водно-иммерсионной модели депрессии. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -2006а. -Т.56. №4, -С.543-547.
113. Шаляпина В.Г., Ракицкая В.В., Семенова М.Г., Семенова О.Г. Гормональная функция гипофизарно-адренкортикальной системы в патогенетической гетерогенности постстрессорных депрессий. // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. -2006б. -Т.92. №4. -С.480-487.
114. Шаранова Н.Э., Перцов С.С., Кирбаева Н.В., Торопыгин И.Ю., Калиниченко Л.С., Гаппаров М.М. Протеомное исследование гиппокампа крыс в условиях эмоционального стресса. // Бюл. Экспер. Биол.и Медицины. -2013. -Т.156. №11. -С.532-535.
115. Юматов Е.А., Мещерякова О.А. Прогнозирование устойчивости к эмоциональному стрессу на основе индивидуального тестирования поведения. // Журн. Высш. Нервн. Деят. -1990. -Т.40. №3. -С.575-579.
116. Ahnaou A, Drinkenburg WH. Simultaneous Changes in Sleep, qEEG, Physiology, Behaviour and Neurochemistry in Rats Exposed to Repeated Social Defeat Stress. // Neuropsychobiology. -2016. -V.73. № 4. -P.209-223.
117. de Almeida RM, Ferrari PF, Parmigiani S, Miczek KA. Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. // Eur J Pharmacol. -2005. -V.526. -P.51-64.
118. Andolina D, Maran D, Viscomi MT, Puglisi-Allegra S. Strain-dependent variations in stress coping behavior are mediated by a 5-HT/GABA interaction within the prefrontal corticolimbic system. // Int J Neuropsychopharmacol. -2015. -V.18. №3. -P.1-12.
119. Anisman H. & Zacharko R.M. Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. // Br. J. Psychiatry [Suppl]. -1992. -V.15. -P.36-43.

120. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. // *Annu Rev Plant Biol.* -2004. -V.55. -P.373-399.
121. Bammer G. the Australian high and low avoidance rat strains: differential effects of ethanol and альфа-methyl-бета-tyrosine. // *Behavioral Brain Research.* -1983. -V.8. -P.317-333.
122. Barnabas K, Zhang L, Wang H, Kirouac G, Vrontakis M. Changes in Galanin Systems in a Rat Model of Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD). // *PLoS One.* -2016. -V.11. -P.1-11.
123. Beard J. Iron deficiency alters brain development and functioning. // *J Nutr.* -2003. -V.133. -P.1468-1472.
124. Bielas H, Arck P, Bruenahl CA, Walitza S, Grünblatt E. Prenatal stress increases the striatal and hippocampal expression of correlating c-FOS and serotonin transporters in murine offspring. // *Int J Dev Neurosci.* -2014. -V.38. -P.30-35.
125. Bignami G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. // *Animal Behaviour.* -1965. -V.13. -P.221-227.
126. Boersma GJ., Moghadam A.A., Cordner Z.A., Tamashiro K.L. Prenatal Stress and Stress Coping Style Interact to Predict Metabolic Risk in Male Rats. // *Endocrinology.* -2014. -V.155. №4. -P.1302–1312.
127. Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. // *Synapse.* -1996. -V.23. №1. -P.28-38.
128. Briehl MM, Cotgreave IA, Powis G. Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis. // *Cell Death Differ.* -1995. -V.2. №1. -P.41-46.
129. Broadhurst P.L. Determinants of emotionality in the rat. // *British Journal of Psychology.* -1957. -V.48. -P.1-12.
130. Broadhurst P.L. ,Experiments in psychogenetics. In:Eysenck H.J. (Ed.), *Experiments in Personality, Psychogenetics and Psychopharmacology.* -1960. -V.1. -P.3-102.
131. Broadhurst P.L. A note on further progress in a psychogenetic selection experiment. // *Psychological Reports.* -1962. -V.10. -P.65-66.
132. Broadhurst P.L. The Moudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. // *Behavior Genetics.* -1975. -V.5. -P.299-319.
133. Brush F.R. Selection for differences in avoidance learning: the Syracuse strains differ in anxiety, not learning ability. // *Behavior Genetics.* -2003. -V.33. -P.677-696.
134. Brush F.R., Froehlich J.C., Sakellaris P.C. Genetic selection for avoidance behavior in the rat. // *Behavior Genetics.* -1979. -V.9. -P.309-316.

135. Butterfield D.D., Kanski J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins? // *Mech.Ageing & Dev.* -2001. -V.122. -P.945-962.
136. Cabrera RJ, Rodríguez-Echandía EL, Jatuff AS, Fóscolo M. Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. // *Braz J Med Biol Res.* -1999. -V.32(10). -P.1229-1237.
137. Cadet JL, Harrington B. Ordonez S. Bcl-2 overexpression attenuates dopamine-induced apoptosis in an immortalized neural cell line by suppressing the production of reactive oxygen species. // *Synapse.* -2000. -V.35. №3. -P.228-233.
138. Cannon W.B. The emergency function of the adrenal medulla in pain and major emotion. // *Amer. J. Psychiat.* -1914. -V.33. -P.356-372.
139. Cao-Lei L, de Rooij S.R., King S., et al. Prenatal stress and epigenetics. // *Neurosci.Biobehav.Rev.* -2017. -V.16. -P.726-739
140. Caraceni P, De Maria N, Ryu HS, Colantoni A, Roberts L, Maidt ML, Pye Q, Bernardi M, Van Thiel DH, Floyd RA. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes. // *Free Radic Biol Med.* -1997. -V.23. № 2. -P.339-44.
141. Carlbeg I., Mannervik B. Purification and Characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. // *J.Biol.Chem.* -1975. -V.250. №14. -P.5475-5480.
142. Chandel N., Budinger G.R.S. The cellular basis for diverse responses to oxygen. // *Free Rad.Biol.& Med.* -2007. -№42. -P.165-174.
143. Chrousos G.P., Gold P.W. The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. // *JAMA.* -1992. -V.267. -P.1244-1252.
144. Costantini D., Marasco V., Moller A.P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. // *J Comp Physiol.* -2011. -V.181. -P.447-456.
145. Covarrubias L., Hernandez-Garcia D., Schnabel D., Salas-Vidal E., Castro-Obregon S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? // *Dev. Biol.* -2008. -V.320. -P.1-11.
146. Darnaudery M., Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. // *Brain Res Rev.* -2008. -V.57. -P.571-585.
147. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects // *J Biol Chem.* -1987. -V.262. №20. -P.9895-9901.
148. Davies M.J. Identification of a globin free radical in equine myoglobin treated with peroxides. // *Biochim. Biophys. Acta.* -1991. -V.1077. №1. P.86-90.

149. Davies M.J., Fu S., Wang Y., Dean R.T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. // *Free Rad. Biol. Med.* -1999. -V.27. №11/12. -P.1151-1163.
150. Davis E.P. & Sandman C.A. Prenatal psychobiological predictors of anxiety risk in preadolescent children. // *Psychoneuroendocrinology*. -2012. -V.37. №8. -P.1224-1233.
151. Dean R.T., Hunt J.V., Grant A.J. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. // *Free Rad. Biol. Med.* -1991. -V.11. №12. -P.161-165.
152. Dennery P.A. Oxidative stress in development: nature or nurture? // *Free Rad. Biol. & Med.* -2010. -V.49. -P.1147-1151.
153. Diaz R, Ogren SO, Blum M, Fuxe K. Prenatal corticosterone increases spontaneous and d-amphetamine induced locomotor activity and brain dopamine metabolism in prepubertal male and female rats. // *Neuroscience*. -1995.-V.66. -P.467-73.
154. Dickinson BC & Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. // *Nat Chem Biol.* -2011. -V.7. №8. -P.504-511.
155. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. // *Physiol Rev.* -2002. -V.82. №1. -P.47-95.
156. Du J., Wang Y., Hunter R., Wei Y., Blumenthal R., Falke C., Khairova R., Zhou R., Yuan P., Machado-Vieira R., McEwen B.S., Manji H.K. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. // *PNAS*. -2009. -V.106. № 9. -P.3543-3548.
157. Duclos M., Gouarne C., Martin C., Rocher C., Mormede P., Letellier T. Effects of corticosterone on muscle mitochondria identifying different sensitivity to glucocorticoids in Lewis and Fischer rats. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* -2004. -V.286. №2. -P.159-67.
158. Ellmann G.L. Tissue sulfhydryl groups. // *Arch.Biochem.Biophys.* -1959. -V.82. -P.70-71.
159. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. // *Biomed Pharmacother.* -2004. -V.58. №1. -P.39-46.
160. Entringer S., Buss C., Wadhwa P.D. Prenatal stress, development, health and disease risk: a psychobiological perspective – 2015 Curt Richter award paper. // *Psychoneuroendocrinology*. -2015. -V.62. -P.366-375.
161. Eysenck H. The structure of human personality. London:Methuen. -1971. -350p.
162. Eysenck H. Personality and psychosomatic diseases. // *Acta nerv. super.* -1981. -V.23. № 2. -P.112-129.
163. Flores-Serrano AG, Vila-Luna ML, Álvarez-Cervera FJ, Heredia-López FJ, Góngora-Alfaro JL, Pineda JC. Clinical doses of citalopram or reboxetine differentially modulate

- passive and active behaviors of female Wistar rats with high or low immobility time in the forced swimming test. // *Pharmacol Biochem Behav.* -2013. -V.110. -P.89-97.
164. Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. // *Neurobiol Aging.* -2002. -V.23. № 5. -P.795-807.
 165. Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Carlen PL. Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. // *J Neurophysiol.* -1998. -V.80. -P.1317-26.
 166. Fridovich I. Superoxide dismutases. // *Annu Rev Biochem.* -1975. -V.44. -P.147-59.
 167. Fridovich I. Superoxide radical and SODs. // *Ann. Rev. BioChem.* -1995. -V.64. -P.97-112.
 168. Fujita O., Abe L., Nakamura N. Selection for high and low emotionality based on the runway test in the rat: The first seven generations of selection. // *Hiroshima Forum Psychol.* -1976. -V.3. P.57-62.
 169. Gmünder H, Roth S, Eck HP, Gallas H, Mihm S, Dröge W. Interleukin-2 mRNA expression, lymphokine production and DNA synthesis in glutathione-depleted T cells. // *Cell Immunol.* -1990. -V.130. №2. -P.520-528.
 170. Go Y.-M., Jones D.P. Redox control systems in the nucleus: mechanisms and functions. // *Antioxidant & Redox Signaling.* -2010. -V.13. №4 -P.489-509.
 171. Gray J. The psychophysiological nature of introversion-extraversion: a modification of Eysenck's theory. // *Biological bases of Individual Behaviour.* -N.Y. L.: Acad. press. -1972. -P.182-205.
 172. Gray J. A critique of Eysenck's theory of personality. // In: Eysenck H.J. (Ed.). *A Model for Personality.* -Berlin:Springer, -1981. -P.246-276.
 173. Gray J. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.* 1st ed. -Oxford:Oxford University Press. -1982.
 174. Gray J., McNaughton N. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.* 2nd ed. -Oxford:Oxford University Press. -2000.
 175. Green J., Altruistic behavior in the albino rat. // *Psychonom. Sci.* -1969. -V.14. №1. -P.47-48.
 176. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. // *FASEB J.* -1997. -V.11. № 7. -P.526-534.
 177. Grune T., Schonheit K., Blasig I, Siems W. Reduced 4-hydroxynonenal degradation in hearts of spontaneously hypertensive rats during normoxia and postischemic reperfusion. // *Cell Biochim. Funct.* -1994. -V.12. N.2. -P.143-147.

178. Gutteridge J.M. & Quinlan. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. // *Biochim Biophys Acta*. -1993. -V.1156. №2. -P.144-150.
179. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. // *J Biol Chem*. -1974. -V.249. №22. -P.7130-7139.
180. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. // *Arch Biochem Biophys*. -1990. -V.280. №1. -P.1-8.
181. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. // *J Neurochem*. -1992. -V.59. №5. -P.1609-1623.
182. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture how should you do it and what do the results mean? // *Brit. J. Pharmacol*. -2004. -V.142. -P.231-255.
183. Halliwell B. Reactive species & antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. // *Plant Phys*. -2006. -V.141. -P.312-322.
184. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology & Medicine*. - Oxford:Oxford University Press. -2007. -851p.
185. Hancock JT, Desikan R., Neill S.J. Hydrogen peroxide and nitric oxide in plant defence: revealing potential targets for oxidative stress tolerance? // *Biofactors*. -2001. -V.15. -P.99-101.
186. Hanstock TL, Clayton EH, Li KM, Mallet PE. Anxiety and aggression associated with the fermentation of carbohydrates in the hindgut of rats. // *Physiol Behav*. -2004. -V.82. -P.357-368.
187. Hougaard KS, Andersen MB, Kjaer SL, Hansen AM, Werge T, Lund SP. Prenatal stress may increase vulnerability to life events: comparison with the effects of prenatal dexamethasone. // *Brain Res Dev Brain Res*. -2005. -V.159. №1. -P.55-63.
188. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. Glutathione transferases. // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. -2005. -V.45. -P.51-88.
189. Hiratsuka, A., Yamane, H., Yamazaki, S., Ozawa, N., and Watabe, T. Subunit Ya-specific glutathione peroxidase activity toward cholesterol 7-hydroperoxides of glutathione S-transferases in cytosols from rat liver and skin. // *J. Biol. Chem*. -1997. -V.272. -P.4763-4769.
190. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. // *Neurosci Res*. -2010. -V.68. № 4. -P.261-75.

191. Hu D, Serrano F, Oury TD, Klann E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. // *J Neurosci.* -2006. -V.26. -P.3933-3941.
192. Hubatsch I, Ridderström M, Mannervik B. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. // *Biochem J.* -1998. -V.15. -P.175-179.
193. Huo Y, Rangarajan P, Ling EA, Dheen ST. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. // *BMC Neurosci.* -2011. -V.12. -P.49.
194. Javoy-Agid F. Dopaminergic cell death in Parkinson's disease. In free radicals in the brain. Aging, neurological and mental disorders. Packer L., Prilipko L., Christein Y. Eds. Springer-Verlag. Berlin. N. Y. London, 1992, p.99-108.
195. Jones L.A., Holmes J.C., Seligman R.B. Spectrophotometric studies of some 2,4-dinitrophenylhydrazones. // *Anal.Chem.* -1956. -V.28. N.2. -P.191-198.
196. Kabbaj M., Devine D.P., Savage V.R., Akil H. Neurobiological correlates of Individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. // *J. Neurosci.* -2000. -V.20. -P.6983-6988.
197. Kavitha N, Babu SM, Rao ME. Influence of Momordica charantia on oxidative stress-induced perturbations in brain monoamines and plasma corticosterone in albino rats. // *Indian J Pharmacol.* -2011. -V.43. №4. -P.424-428.
198. Keeney A, Jessop DS, Harbuz MS, Marsden CA, Hogg S, Blackburn-Munro RE. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. // *J Neuroendocrinol.* -2006. -V.18. №5. -P.330-338.
199. Keller GA, Krisans S, Gould SJ, Sommer JM, Wang CC, Schliebs W, Kunau W, Brody S, Subramani S. Evolutionary conservation of a microbody targeting signal that targets proteins to peroxisomes, glyoxysomes, and glycosomes. // *J Cell Biol.* -1991. -V.114. -P.893-904.
200. Klatt P., Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. // *Eur.J.Biochem.*, -2000. -V.267. -P.4928-4944.
201. Kosti O. Intra-adrenal mechanisms in the response to chronic stress: investigation in a rat model of emotionality. // *J Neuroendocrinol.* -2006. -V.189. -P.211-218.
202. Lee WY, Jang SW, Lee JS, Kim YH, Kim HG, Han JM, Kim DW, Yi MH, Choi MK, Son CG. Uwhangchungsimwon, a traditional herbal medicine, protects brain against

- oxidative injury via modulation of hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) response in a chronic restraint mice model. // *J Ethnopharmacol.* -2014. -V.151. №1. –P.461-469.
203. Levin R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz AG., Ahn B.W., Shaltien S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. // *Methods Enzymol.* -1990. -V.186. -P.464-478.
 204. Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. // *Int J Mol Sci.* -2013. -V.14. № 12. -P.24438-75.
 205. Li J, He C, Tong W, Zou Y, Li D, Zhang C, Xu W. Tanshinone IIA blocks dexamethasone-induced apoptosis in osteoblasts through inhibiting Nox4-derived ROS production. // *Int J Clin Exp Pathol.* -2015. -V.8. №10. –P.13695-13706.
 206. Liberzon I., Krstov M., Young E.A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. // *Psychoneuroendocrinology.* -1997. -V.22. –P.443–453.
 207. Lim W, Park C, Shim MK, Lee YH, Lee YM, Lee Y. Glucocorticoids suppress hypoxia-induced COX-2 and hypoxia inducible factor-1 α expression through the induction of glucocorticoid-induced leucine zipper. // *Br J Pharmacol.* -2014. -V.171. №3. –P.735-745.
 208. Lim CS, Lee JC, Kim SD, Chang DJ, Kaang BK. Hydrogen peroxide-induced cell death in cultured Aplysia sensory neurons. // *Brain Res.* -2002. -V.941. -P.137-145.
 209. Lindahl M, Mata-Cabana A, Kieselbach T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. // *Antioxid Redox Signal.* -2011. -V.14. №12. -P.2581-642.
 210. Liu R, Li B, Flanagan SW, Oberley LW, Gozal D, Qiu M. Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. // *J Neurochem.* -2002. -V.80. №3. -P.488-500.
 211. Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J.Biol. Chem.* -1951. -V.193. -P.265-275.
 212. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological & toxicological implications. // *Pharm. & Therapeutics.* -2010. –V.125. –P.376-393.
 213. Mallo T, Matrov D, Koiv K, Harro J. Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. // *J. Neurosci.* -2009. -V.164. –P.963-974.
 214. Manda-Handzlik A, Demkow U. Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. // *Adv Exp Med Biol.* -2015. -V.857. –P.51-60.

215. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. // Clin Chim Acta. -1982. -V.126. №1. -P.41-51.
216. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. // Biochem J. -1984. -V.222. №3. – P.649-655.
217. Martens ME, Peterson PL, Lee CP. In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism. // Biochim Biophys Acta. -1991. -V.1058. –P.152-160.
218. Matrov D, Kolts I, Harro J. Cerebral oxidative metabolism in rats high & low exploratory activity. // Neurosci Lett. -2007. -V.413. –P.154-158.
219. Mattson MP. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. // Trends Neurosci. -1998. -V.21. №2. -P.53-57.
220. McEwen B.S., Albeck D., Cameron H., Chao H.M. Stress and brain: a paradoxical role for adrenal steroids. // In: Vitamins and Hormones. -1995. -V.51. -P.371-402.
221. McIntosh LJ, Sapolsky RM. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. // Neurotoxicology. -1996. -V.17. –P.873-82.
222. McNaughton N., Corr P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. -2004. - V.28. -P.285-305.
223. Meister A, Anderson ME. Glutathione. // Annu Rev Biochem. -1983. -V.52. -P.711-760.
224. Mikhed Y., Gorlach A., Knaus U.S., Daiber A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. // Red. Biol. -2015. -V.5. -P.275-289.
225. Miller MW & Sadeh N. Traumatic stress, oxidative & posttraumatic stress disorder: neurodegeneration & the accelerated-aging hypothesis. // Mol Psychiatry. -2014. -№19. – P.1156-1162.
226. Mironova V., Rybnikova E., Pivina S. Effect of inescapable stress in rodent models of depression and posttraumatic stress disorder on CRH and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus. // Acta Physiol. Hung. -2013. V.100. –P.395-410.
227. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Breusegem FV. ROS signaling: the new wave? // Trends in Plant Science. -2011. -V.16. №6. –P.300-309.
228. Mowrer O.H. Animal studies in the genesis of personality. // Transactions of Sciences. -1940. -V.3. -P.8-19.

229. Munday R, Winterbourn CC. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. // *Biochem Pharmacol.* -1989. -V.38. №24. -P.4349-4352.
230. Niederkofler V, Asher TE, Okaty BW, Rood BD, Narayan A, Hwa LS, Beck SG, Miczek KA, Dymecki SM. Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior. // *Cell Rep.* -2016. -V.17. -P.1934-1949.
231. Offer T, Russo A, Samuni A. The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. // *FASEB J.* -2000. -V.14. №9. -P.1215-1223.
232. Ogle CM, Siegler IC, Beckham JC, Rubin DC. Neuroticism Increases PTSD Symptom Severity by Amplifying the Emotionality, Rehearsal, and Centrality of Trauma Memories. // *J Pers.* -2017. -V.85. №5. -P.702-715.
233. Ohmori T., Hirachima Y., Kurimito M., Endo S.A.A. In: vitro hypoxia of cortical and hippocampal CA1 nerons: glutamate, nitric oxid and platelet activation factor participate in mechanism of celective death in CA1 neurons. // *Brain Res.* -1996. -V.743. №1. -P.51-59.
234. Oja S.S., Janaky R., Varga V., Saranasaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. // *Neurochem. Int.* -2000. -V.37. -P. 299-306.
235. Ostlund B.D., Conradt E., Crowell S.E. et al. Prenatal tress, fearfulness and the epigenome: exploratory analysis of sex defference in DNA methylation of the glucocorticoid receptor gene. // *Front.Behav.Neurosci.* -2016. -V.10. -P.1-8.
236. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. // *J.Lab.Clin.Med.* -1967. -V.70. -P.158-169.
237. Panetta P., Berry A., Bellisario V., Capoccia S., Raggi C, Luoni C et al. Long-term sex-dependent vulnerability to metabolic challenges in prenatally stressed rats. // *Front.Behav.Neurosci.* -2017. -V.11. -P.1-14.
238. Pani L, Porcella A, Gessa GL. The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. // *Mol Psychiatry.* -2000. -V.5. №1. -P.14-21.
239. Pardon MC, Gould GG, Garcia A, Phillips L, Cook MC, Miller SA, Mason PA, Morilak DA. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. // *Neuroscience.* -2002. -V.115. -P.229-242.

240. Pawlak C.R., Ho Y-J., Schwarting R.K.W. Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. // *Neurosc. And Biobehav. Rev.* -2008. -V.32. -P.1544-1568
241. Piazza P.V., Deminiere J.M., Le Moal M., Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. // *Science.* -1989. -V.245. -P.1511-1513.
242. Piazza P.V., Maccari S., Deminiere J.M., Le Moal M., Mormede P., Simon H. Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* -1991. -V.88. -P.2088-2092.
243. Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. // *IUBMB Life.* -2014. -V.66. №4. -P.229-39.
244. Plaschke K, Müller D, Hoyer S. Effect of adrenalectomy and corticosterone substitution on glucose and glycogen metabolism in rat brain. // *J Neural Transm.* -1996. -V.103. -P.89-100.
245. Prabhu, K.S., Reddy, P.V., Jones, E.C. Liken, A.D., Reddy, C.C. Characterization of a class alpha glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. // *Arch. Biochem. Biophys.* -2004. -V.424. -P.72-80.
246. Rabinovic A.D., Lewis D.A., Hastings T.G. Role of oxidative changes in the degeneration of dopamine terminals after injection of neurotoxic levels of dopamine. // *Neuroscience.* -2000. -V.101. №1. -P.289-298.
247. Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. // *FEBS J.* -2011. -V.278. №22. -P. 4243-51.
248. Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W. // Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. // *Free Rad. Res.* -1998. -V.29. №4. -P.297-305.
249. Rice G., Geiner P. «Altruism» in the albino rat. // *J. Comp. Physiol. Psychol.* -1962. -V.55. №1. -P.123-125.
250. Rice D., Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. // *Environmental Health Perspectives.* -2000. -V.108. -P.511-533.
251. Rock PB, Johnson TS, Larsen RF, Fulco CS, Trad LA, Cymerman A. Dexamethasone as prophylaxis for acute mountain sickness. Effect of dose level. // *Chest.* -1989. -V.95. -P.568-573.

252. Rosario L.A., Abercrombie E.D. Individual differences in behavioral reactivity: correlation with stress-induced norepinephrine efflux in the hippocampus of Sprague-Dawley rats. // *Brain Res. Bull.* -1999. -V.48. -P.595-602.
253. Rots N.J., Cools A.R., Beron A., Voorn P., Rostene W., De Kloet E.R. Rats bred for enhanced apomorphine susceptibility have elevated tyrosine hydroxylase mRNA Brain and dopamine D2 receptor binding sites in nigrostriatal and tuberoinfundibular dopamine systems. // *Brain Res.* -1996. -V.710. -P.189-196.
254. Rouge-Pont F., Kharouby M., Le Moal M., Simon H. Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. // *Brain Research.* -1993. -V.602. -P.169-174.
255. Sahin E., Gumuslu S. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). // *Clinical & Exp. Pharmacol. & Physiol.* -2007. -V.34. -P.425-431.
256. Sahu BD, Rentam KK, Putcha UK, Kuncha M, Vegi GM, Sistla R. Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. // *Food Chem Toxicol.* -2011. -V.49. №12. -P.3090-3097.
257. Sakata J.T., Crows D. Gonzalez-Lima F. Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity. // *Brain Res.* -2005. -V.48. №1. -P.1-15.
258. Salim S. Oxidative stress in anxiety: implications for pharmacotherapy. // *The AJIM.* -2011. -V.1. №1. -P.11-21.
259. Sánchez-Fernández R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inzé D, May MJ. Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms of redox control. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -1997. -V.94. №6. -P.2745-2750.
260. Sauer SK, Reeh PW, Bove GM. Noxious heat-induced CGRP release from rat sciatic nerve axons in vitro. // *Eur J Neurosci.* -2001. -V.14. №8. -P.1203-1208.
261. Scandalios J.G. Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us? // *Genome Biology.* -2002. -V.3. №7. -P.1-6.
262. Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. // *Free Radical Biology and Medicine.* -2001. -V.30. P.1191–1212.

263. Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause KH. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. // *Antioxid Redox Signal*. -2013. -V.18. № 12. -P.1475-90.
264. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. // *Brain Res Brain Res Rev*. -2004. -V.45. №3. -P.164-178.
265. Shigeta S., Miyake K., Misawa T., Aikawa H., Yoshida T., Katoh H. A new inbred rat strain "THA". // *Rat News Letter*. -1990. -V.23. P.9-11.
266. Shoener J.A., Baig R., Page K.C. Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. -2006. -V.290. -P.1366-1373.
267. Sies H. Oxidative stress. // Academic Press. -1985. -507p.
268. Siu G.M., Draper H.H. Metabolism of malondialdehyd in vivo and in vitro. // *Lipids*. -1982. -V.17. N5. -P. 349-355.
269. Song L, Zheng J, Li H, Jia N, Suo Z, Cai Q, Bai Z, Cheng D, Zhu Z. Prenatal stress causes oxidative damage to mitochondrial DNA in hippocampus of offspring rats. // *Neurochem Res*. -2009. -V.34. №4. -P.739-745.
270. Sultana R., Butterfield DA. Identification of te oxidative stress proteome in the brain. // *Free Rad.Biol. & Med*. -2011. -V.50. -P.487-494.
271. Sun H, Jia N, Guan L, Su Q, Wang D, Li H, Zhu Z. Involvement of NR1, NR2A different expression in brain regions in anxiety-like behavior of prenatally stressed offspring. // *Behav Brain Res*. -2013. -V.15. P.1-7.
272. Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A. Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -1990. -V.87. №9. -P.3343-3347.
273. Starec M, Donát P, Krsiak M, Rasková H, Mráz M. Behavioral characteristics of two rat strains differing in sensitivity to the cardiotoxic effect of isoprenaline. // *Int J Neurosci*. -1996. -V.87. -P.241-248.
274. Tacagi K., Kasuya Y., Watanabe K. Studies on the dug for peptide ulcer, a reliable method for production stress lcer. // *Chem. Pharmacol. Bull*. -1964. -V.12. -P.465-473.
275. Takahashi A, Quadros IM, de Almeida RM, Miczek KA. Behavioral and pharmacogenetics of aggressive behavior. // *Curr Top Behav Neurosci*. -2012. -V.12. -P.73-138.

276. Tew, K.D., and Townsend, D.M. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. // *Antioxidants & Redox Signaling*. -2012. V.17. -P.1728–1737.
277. Thiels E, Klann E. Hippocampal memory and plasticity in superoxide dismutase mutant mice. // *Physiol Behav*. -2002. -V.77. -P.601-605.
278. Thomson SL, Garland Jr T, Swallow JG, Carter PA. Response of Sod-2 enzyme activity to selection for high voluntary wheel running. // *Heredity (Edinb)*.-2002. -V.88. №1. -P.52-61.
279. Toledano D, Tassin JP, Gisquet-Verrier P. Traumatic stress in rats induces noradrenergic-dependent long-term behavioral sensitization: role of individual differences and similarities with dependence on drugs of abuse. // *Psychopharmacology (Berl)*. -2013. -V.230. №3. -P.465-76.
280. de la Torre MR, Casado A, López-Fernández ME, Carrascosa D, Casado MC, Venarucci D, Venarucci V. Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes. // *Neurochem Res*. -1996. -V.21. №8. -P.885-888.
281. Trachootham D., Lu W., Ogasavara M.A., Rivera-Del Valle N., Huang P. Redox Regulation of Cell Survival. // *Antioxidant & Redox Signaling*. -2008. -V.10. №8. -P.1343-1374.
282. Tsuru-Aoyagi K., Potts M. B., Trivedi A. et al. Glutathione peroxidase activity modulates recovery in the injured immature brain. // *Ann.Neurol*. -2009. -V.65. №5. -P.540-549.
283. Tuor UI. Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. // *Neurosci Biobehav Rev*. -1997. -V.21. -P.175-179.
284. Udupi V, Rice-Evans C. Thiol compounds as protective agents in erythrocytes under oxidative stress. // *Free Radic Res Commun*. -1992. -V.16. №5. -P.315-323.
285. Uliaszek AA, Zinbarg RE, Mineka S, Craske MG, Sutton JM, Griffith JW, Rose R, Waters A, Hammen C. The role of neuroticism and extraversion in the stress-anxiety and stress-depression relationships. // *Anxiety Stress Coping*. -2010. -V.23. №4. -P.363-81.
286. Vallee M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H., Maccari S. Prenatal stress induce high anxiety and postnatal handling in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. // *J. Neuroscience*. -1997. -V.17. № 7. -P.2626-2636.
287. Van Lieshout R.J. & Boylan K. Increased depressive symptoms in female but not male adolescents born at low birth weight in the offspring of a national cohort. // *La Revue canadienne de psychiatrie*. -2010. -V.55. №7. -P.420-433.
288. Wanders RJ, Denis S. Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. // *Biochim Biophys Acta*. -1992. -V.1115. №3. -P.259-62.

289. Wanders RJ, Waterham HR. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. // *Biochim Biophys Acta*. -2006. -V.1763. №12. -P.1707-1720.
290. Wang X & Michaelis E.K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. // *Frontiers in Aging Neuroscience*. -2010. -V.2. -P.1-12.
291. Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. // *Brain, Behav & Immun*. -2005. -V.19. -P.296-308.
292. Weinstock M. Gender differences in the effect of prenatal stress on brain development and behavior. // *Neurochem. Res*. -2007. -V.32. -P.1730-1740.
293. Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: effects on behavior // *Neurobiology of stress*. -2017. -V.6. -P.3-13.
294. Wingate VP, Lawton MA, Lamb CJ. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. // *Plant Physiol*. -1988. -V.87. №1. -P.206-210.
295. Winterbourn C.C., Buss I.H., Chan T.P., Plank L.D., Clarc M.A., Winsdor J.A. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. // *Critical Care Medicine*. -2000. -V.28. № 1. -P. 143-149.
296. Wolf EJ, Logue MW, Hayes JP, Sadeh N, Schichman SA, Stone A, Salat DH, Milberg W, McGlinchey R, Miller MW. Accelerated DNA methylation age: Associations with PTSD and neural integrity. // *Psychoneuroendocrinology*. -2016. -V.63. -P.155-62.
297. Wong CM, Cheema AK, Zhang L, Suzuki YJ . Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. // *Circ Res*. -2008. -V.102. №3. -P.310-318.
298. Wong PT, Qu K, Chimon GN, Seah AB, Chang HM, Wong MC, Ng YK, Rumpel H, Halliwell B, Chen CP. High plasma cyst(e)ine level may indicate poor clinical outcome in patients with acute stroke: possible involvement of hydrogen sulfide. // *J Neuropathol Exp Neurol*. -2006. -V.65. №2. -P.109-115.
299. Wu B., & Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. // *Trends in Pharmacological Sciences*. -2012. -V.33. №12. -P.656–668.
300. Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, Liberzon I. Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. // *Depress Anxiety*. -2009. -V.26. №12. -P.1110-1117.
301. Yehuda R. Antelman SM. Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. // *Biol.Psychiatry*. -1993. -V.33. №7. -P.479-486.
302. Yehuda R, McFarlane AC, Shalev AY. Predicting the development of posttraumatic stress disorder from the acute response to a traumatic event. // *Biol Psychiatry*. -1998. -V.44. №12. -P.1305-1313.

303. Yehuda R, Schmeidler J, Wainberg M, Binder-Brynes K, Duvdevani T. Vulnerability to posttraumatic stress disorder in adult offspring of Holocaust survivors. // *Am J Psychiatry*. -1998. -V.155. №9. -P.1163-1171.
304. Yehuda R. Biology of posttraumatic stress disorder. // *J. Clin. Psychiatry*. -2001. -V.17. -P.41-46.
305. Yehuda R, Bierer L.M. The relevance of epigenetics to PTSD: implications for the DSM-V. // *J.Trauma Stress*. -2009. -V.22 -P.427-434.
306. Yehuda R, Bierer L.M., Sarapas C., Makotkine I., Andrew R., Seckl J. Cortisol metabolic predictors of response to psychotherapy for symptoms of PTSD in survivors of the World Trade Center attacks on September 11, 2001. // *Psychoneuroendocrinology*. -2009. -V.34. -P.1304-1313.
307. Yehuda R., Koenen K.C., Galea S., Flory J.D. The role of genes in defining a molecular biology of PTSD. // *Dis.Markers*. -2011. -V.30. -P.67-76.
308. Youdim MB, Ben-Shachar D, Yehuda S. Putative biological mechanisms of the effect of iron deficiency on brain biochemistry and behavior. // *Am J Clin Nutr*. -1989. -V.50. №3. -P.607-617.
309. Yu Q, Teixeira CM, Mahadevia D, Huang Y, Balsam D, Mann JJ, Gingrich JA, Ansorge MS. Dopamine and serotonin signaling during two sensitive developmental periods differentially impact adult aggressive and affective behaviors in mice. // *Mol Psychiatry*. -2014. -V.19. -P.688-698.
310. Zafir A., Banu N. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. // *Indian J.Biochem.& Biophys*. -2009. -V.46. -P.53-58.
311. Zambrzycka A, Cakała M, Kamińska M. Transition metal ions significantly decrease phospholipase C activity degrading phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in the brain cortex. // *Pol J Pharmacol*. -2003. -V.55. №5. -P. 915-917.
312. Zohar I, Weinstock M. Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the hypothalamus and amygdala in male and female rats. // *J Neuroendocrinol*. -2011. -V.23. №4. -P.320-328.
313. Zuckerman M. The psychophysiology of sensation seeking. // *J.Pers*. -1990. -V.58. -P.313-345.