

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ.И.П.ПАВЛОВА РАН

На правах рукописи

**ДЮЖИКОВА  
НАТАЛЬЯ АЛЕКОВНА**

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ  
МЕХАНИЗМЫ ПОСТСТРЕССОРНЫХ СОСТОЯНИЙ**

03.03.01- физиология

Диссертация на соискание ученой степени доктора  
биологических наук

Научный консультант  
д.б.н. Вайдо А.И.

Санкт-Петербург- 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. Стресс. Постстрессорные патологии. Посттравматическое стрессовое расстройство .....	18
1.2. Возбудимость как основной параметр функционального состояния нервной системы: влияние на функции мозга и поведение.....	23
1.3. Генетические, цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы действия стресса в формировании постстрессорных состояний: современные представления.....	35
1.3.1. Генетические механизмы действия стресса и формирования постстрессорных патологий .....	35
1.3.2. Цитогенетические механизмы действия стресса.....	38
1.3.2.1. Структурно-функциональная организация хромосом и стресс.....	38
1.3.2.2. Структура и функции хроматина. Фракции хроматина. Взаимодействие ДНК и гистонов.....	42
1.3.2.3. Структура хроматина в нейронах при различных состояниях организма и действии стресса.....	52
1.3.3. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в мозге.....	53
1.3.3.1. Метилирование ДНК.....	54
1.3.3.2. Некодирующие РНК.....	59
1.3.3.3. Ковалентные модификации гистонов.....	60
1.3.3.4. Варианты гистонов.....	62
1.3.3.5. Ремоделирование нуклеосом.....	63
1.3.4. Эпигенетические механизмы, связанные с действием стресса и формированием постстрессорных состояний.....	64
1.3.5. Транспозоны и стресс.....	80
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	83
2.1. Метод эмоционально-болевого стрессорного воздействия.....	84
2.1.1. Длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие.....	84
2.1.2. Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие.....	85
2.1.3. Массированное эмоционально-болевое стрессорное воздействие.....	86

2.2.	Цитогенетические методы.....	86
2.2.1.	Метод приготовления препаратов клеток костного мозга крыс.....	86
2.2.2.	Метод приготовления препаратов интерфазных ядер нейронов различных структур головного мозга крыс.....	87
2.2.3.	Метод тотального окрашивания препаратов по Романовскому-Гимза.....	87
2.2.4.	Метод дифференциального С-окрашивания хроматина интерфазных ядер нейронов различных структур головного мозга крыс.....	88
2.3.	Гистологические методы.....	88
2.3.1.	Гистологическая обработка ткани мозга.....	88
2.4.	Методы иммуноцитохимии.....	89
2.4.1.	Иммунофлуоресцентный метод.....	89
2.4.2.	DAB-АВС- иммунопероксидазный метод.....	90
2.4.3.	DAB-иммунопероксидазный метод с использованием универсального кита.....	90
2.5.	Метод ПЦР скрининга сайт-специфичного внедрения транспозонов. Двухступенчатый ПЦР.....	91
2.6.	Амплификация, клонирование, секвенирование и идентификация фрагментов мобильных элементов.....	94
2.7.	Мультиплексный ПЦР в реальном времени. Определение вариаций числа копий генов.....	94
2.8.	Методы анализ изображений.....	98
2.8.1.	Анализ количественных характеристик хроматина и гетерохроматина в интерфазных ядрах нейронов различных структур мозга крыс.....	98
2.8.2.	Анализ изображений срезов головного мозга крыс после иммунофлуоресцентного окрашивания.....	99
2.8.3.	Анализ изображений срезов головного мозга крыс после иммуноцитохимического окрашивания с использованием DAB.....	101
2.9.	Статистическая обработка результатов.....	103
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ.....	104
3.1.	Цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики нейронов развивающегося и зрелого мозга, а также костного мозга интактных крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.....	105
3.1.1.	Развивающийся мозг.....	105

3.1.2. Зрелый мозг.....	107
3.1.2.1. Площадь С-гетерохроматина.....	107
3.1.2.2. Экспрессия эпигенетически модифицированных сайтов.....	108
3.1.3. Костный мозг.....	113
3.1.3.1. Спонтанный уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс.....	113
3.1.4. Полиморфизм ретротранспозона L1 и вариации числа копий (copy number variation) генов grin1, ywhaz, gapdh, rpl13a в клетках гиппокампа и костного мозга крыс.....	114
3.1.5. Межлинейные различия по цитогенетическим и молекулярно-клеточным характеристикам нейронов развивающегося и зрелого мозга, а также костного мозга у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.....	116
3.2. Влияние эмоционально-болевого стресса на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики нейронов развивающегося и зрелого мозга, а также костного мозга крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.....	122
3.2.1. Развивающийся мозг.....	123
3.2.1.1. Влияние пренатального (короткого эмоционально-болевого) стрессорного воздействия на цитогенетические параметры клеток развивающегося гиппокампа эмбрионов крыс.....	123
3.2.1.2. Долгосрочные последствия влияния пренатального (короткого эмоционально-болевого) стресса на цитогенетические характеристики гиппокампа крыс.....	126
3.2.2. Зрелые крысы. Костный мозг.....	127
3.2.2.1. Влияние короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия, мутагена циклофосфана и сочетанного действия стресса и циклофосфана на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс.....	127
3.2.2.2. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс.....	130
3.2.3. Зрелые крысы. Головной мозг.....	133

3.2.3.1. Влияние короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на количественные характеристики хроматина (С-гетерохроматина) в нейронах различных структур мозга крыс.....	133
3.2.3.2. Влияние времени суток и короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на количественные характеристики хроматина (С-гетерохроматина) в нейронах гиппокампа крыс.....	134
3.2.3.3. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на количественные характеристики хроматина (С-гетерохроматина) в нейронах гиппокампа крыс.....	137
3.2.3.4 Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на эпигенетические процессы в нейронах различных структур мозга крыс.....	138
3.3. Долгосрочные эффекты влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики зрелого мозга крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.....	140
3.3.1. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в разные сроки после его окончания на количественные характеристики С-гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа крыс.....	141
3.3.2. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в разные сроки после его окончания на экспрессию эпигенетических модификаций в ядрах нейронов различных структур мозга крыс.....	141
3.4. Влияние стресса на инсерции ретротранспозона LINE 1 в ген <i>grin1</i> .....	150
3.5. Влияние стресса на количество вариаций числа копий генов <i>grin1</i> , <i>ywhaz</i> , <i>gapdh</i> , <i>rpl13a</i> .....	154
4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	156
4.1. Влияние эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики развивающегося мозга крыс : роль генетически детерминированной возбудимости нервной системы.....	157
4.2. Влияние короткого и длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические процессы в костном мозге , цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики различных	

районов головного мозга крыс : роль генетически детерминированной возбудимости нервной системы.....	159
4.3. Долгосрочные последствия влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические, эпигенетические и морфологические особенности клеток различных районов головного мозга крыс: роль генетически детерминированной возбудимости нервной системы.....	169
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	186
ВЫВОДЫ.....	190
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	192

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **АКТУАЛЬНОСТЬ ИЗБРАННОЙ ТЕМЫ, СТЕПЕНЬ ЕЕ РАЗРАБОТАННОСТИ**

В условиях современного мира стрессорные воздействия на организм человека на разных этапах онтогенеза, чрезвычайные по интенсивности и длительности, становятся все более существенным триггером нарушения психосоматического гомеостаза, что ведет к формированию постстрессорных патологий (стресс-зависимых заболеваний), долговременных нервных расстройств, сопровождаемых длительными нарушениями в функционировании нейро-эндокринно-иммунной системы (Тарабрина и др., 2007; Трошин, 2007; Игумнов, Жебентяев, 2011; Daskalakis et al., 2013; Kirkpatrick et al., 2014 и мн.др.). Патогенетическую базу этих заболеваний составляют механизмы травматической памяти, или памяти психоэмоционального стресса (Тарабрина и др., 2007; Вайдо и др., 2009). Особую актуальность в связи с этим приобретает изучение долгосрочных молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в их основе, выявление генов-кандидатов, контролирующих эти процессы (Skelton et al., 2012). Известно, что действие стресса связано с влиянием как на структурную целостность самой ДНК (генетические эффекты), так и на более высокий уровень ее организации во взаимодействии с гистоновыми белками – хроматин и его модификации (эпигенетические эффекты), регулирующие уровень экспрессии генов в клетках центральных и периферических органов. Среди них можно выделить гены стрессового ответа, гены рецепторов, гормонов, нейромедиаторов, факторов роста нервов (Stankiewicz et al., 2013). Важная роль в мутационном процессе, создании генетической изменчивости, влиянии на экспрессию генов принадлежит транспозонам – мобильным элементам (Хесин, 1986; Гвоздев, 1996, 1998а, б), которые также связаны с системой эпигенетической регуляции генома (Wood, Helfand, 2013). Мало исследованным остается их значение в клетках мозга, участие в механизмах реакции на стресс, процессах пластичности мозга и формировании постстрессорных патологических состояний (Hunter et al., 2015).

Генетические и эпигенетические процессы в нейронах имеют непосредственное отношение к регуляции функций мозга, поведения, обучения и памяти (Rudenko, Tsai, 2014; Akbarian et al., 2013; Graff et al., 2011; Stankiewicz et al., 2013). Поскольку в основе психических заболеваний с депрессивной составляющей и длительным течением лежит рассогласование в работе разных отделов нервной системы, известное как синдром дезинтеграции, нарушающий слаженную работу мозга (Бехтерева, 1988, 2010), важно понять,

какие глубинные механизмы, в каких структурах мозга являются определяющими и какова их динамика. Прежде всего, необходим поиск в клетках мозга и жидких сред организма как универсальных цитогенетических и молекулярно-клеточных маркеров постстрессорных нарушений, так и специфических изменений для разработки экспресс - методов дифференциальной диагностики постстрессорных патологических состояний. Особый интерес представляет исследование указанных процессов в гиппокампе – структуре мозга, являющейся мишенью действия стресса, связанной с механизмами обучения и памяти, формированием и регуляцией биологических ритмов (Арушанян, Бейер, 2001; Виноградова, 1975) и зоны новой коры больших полушарий мозга (сенсомоторной), ответственной за целый ряд моторных и других элементов поведенческого репертуара в норме и при патологиях.

В свете представлений о системном контроле генетических и цитогенетических процессов (Лобашев, 1973), нейроэндокринной регуляции реализации генетической информации (Пономаренко и др., 1975, Пономаренко, 1976, Камышев и др., 1981), важная роль в осуществлении пластических процессов в ЦНС и формировании патологии, их взаимосвязи с событиями на периферическом уровне принадлежит функциональному состоянию нервной системы, на что впервые указывал И.П.Павлов (Павлов, 1951). Существование индивидуальных (типологических) различий, обусловленных генетически детерминированным функциональным состоянием нервной системы, определяет изменчивость в степени функциональной активности различных звеньев нервной системы и создает предпосылки для дифференциальной реализации нормального и патологического поведения, различий в стресс-реактивности (Лопатина, Пономаренко, 1987; Вайдо, 2000). Изменчивость в уровне возбудимости нервной системы и связанные с этим особенности реакции на стресс имеют целый ряд физиологических, биохимических, нейроэндокринных коррелятов (Вайдо, 2000). Это несомненно затрагивает процессы на молекулярно-клеточном уровне, генетические и эпигенетические, которые создают основу для формирования долговременных постстрессорных патологических состояний. Генетические и эпигенетические механизмы тревожно-депрессивных расстройств и посттравматического стрессового расстройства активно изучаются в последние годы во всем мире (Marinova, Maercker, 2015). Однако, возможности для подобных исследований на мозге человека ограничены, а модели на животных и тест-системы разнообразны (Daskalakis et al., 2013b; Harro, 2013), результаты зачастую противоречивы и разрозненны. Выявлен ряд генов и эпигенетических модификаций в отдельных структурах мозга, связанных с развитием разных форм постстрессорных патологий. Но каковы сроки формирования и сохранения изменений,



характер их полиморфизма, специфичность их проявления в связи с разными формами и симптомами постстрессорных патологических состояний, каково взаимодействие этих механизмов на уровне целого мозга и отдельных систем, влияние на них индивидуальных особенностей свойств нервных процессов, - все эти важные вопросы остаются открытыми. Следует особо подчеркнуть, что их исследование в контексте связей с функциональным состоянием нервной системы является своевременным, новым и актуальным для развития подходов предиктивной персонифицированной медицины (Baranov, 2009). Данное исследование представляется актуальным и значимым не только для фундаментальной науки, но и для практического применения, в частности, его результаты могут послужить основой при разработке диагностических критериев и терапевтических средств профилактики и коррекции стресс-зависимых заболеваний.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Цель работы- исследовать цитогенетические (уровень хромосомных aberrаций, состояние хроматина) и молекулярно-клеточные, генетические и эпигенетические механизмы влияния психоэмоционального стрессорного воздействия разной интенсивности и продолжительности на формирование адаптивных и долговременных патологических постстрессорных состояний у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.

Конкретные задачи исследования заключались в следующем:

1. Оценить молекулярно-биологические параметры предрасположенности к развитию постстрессорных состояний.
2. Оценить уровень хромосомных aberrаций и состояние хроматина (С-гетерохроматина) в клетках развивающегося гиппокампа крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы, в нормальных условиях и после пренатального эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

У зрелых крыс линий, различающихся по уровню возбудимости нервной системы:

3. Оценить влияние на частоту хромосомных aberrаций в костном мозге мутагена циклофосфана эмоционально-болевого стрессорного воздействия (короткого и длительного), а также изучить модификации стрессом активности циклофосфана.

4. Оценить влияние короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на состояние хроматина (С-гетерохроматина) нейронов разных структур мозга: гиппокамп, сенсомоторная зона коры.
5. Оценить влияние суточной активности на спонтанное и связанное со стрессом состояние хроматина (С-гетерохроматина) в гиппокампе.
6. Изучить влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на состояние хроматина (С-гетерохроматина) и его эпигенетические модификации, связанные с содержанием метилцитозинсвязывающего белка- MeCP2, 5-метилцитозина, ацетилирования гистонов H3 и H4, метилирования и фосфорилирования гистона H3 в нейронах гиппокампа и сенсомоторной зоны коры в динамике долгосрочных изменений до двух месяцев после воздействия.
7. Изучить паттерн полиморфизма ретротранспозона LINE1 (L1) и индуцированные эмоционально-болевыми стрессорными воздействиями инсерции L1 в ген *grin1* ключевой субъединицы NR1 NMDA рецептора, а также количество вариаций числа копий гена *grin1* в геномной ДНК, выделенной из гиппокампа и костного мозга.

## НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Линии крыс, прошедшие длительную селекцию по высокому и низкому порогу возбудимости нервной системы, являются уникальной моделью влияния психоэмоционального стресса на формирование постстрессорных патологических состояний, позволяющей оценить вклад индивидуальной изменчивости по возбудимости нервной системы в эти процессы (Вайдо, 2000; Вайдо, Ситдигов, 1979). Изучение хромосомных нарушений в клетках разных тканей позволяет расширить существующие теоретические положения о влиянии особенностей функционального состояния нервной системы на характеристики генетического аппарата, оценить влияние психоэмоционального стресса на нестабильность генома и его долгосрочные последствия. Исследованы универсальные и специфические цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы реакции на психоэмоциональный стресс в динамике их долгосрочного изменения и/или сохранения до 2-х месяцев после воздействия. Такие длительные сроки в практике оценки постстрессорных молекулярно-генетических изменений исследуются впервые. Впервые изучена роль индивидуальных различий по возбудимости нервной системы в протекании цитогенетических и тонких эпигенетических процессов в клетках различных структур мозга после действия психоэмоционального стресса, что позволяет выделить факторы риска и

подойти к пониманию молекулярно-клеточных механизмов формирования устойчивых патологических постстрессорных состояний организма.

Селекция линий крыс по возбудимости нервной системы привела к дивергенции по цитогенетическим параметрам нейрональных элементов развивающегося и зрелого мозга, количественным характеристикам общего пула интерфазного конденсированного хроматина и уровню хромосомных aberrаций. Впервые выявлены зависимые от генетически детерминированного уровня возбудимости нервной системы цитогенетические, молекулярно-клеточные и молекулярно-генетические процессы непосредственно в нервных клетках различных структур мозга. Это дополнило спектр коррелятов, связанных с уровнем возбудимости нервной системы компонентами молекулярно-клеточного уровня.

Определены постстрессорные изменения хроматина нервных клеток, зависимые и независимые от исходного базового уровня возбудимости нервной системы животных. Впервые выявлена универсальная закономерность в реакции на эмоционально-болевое стрессорное воздействие, примененное на разных стадиях онтогенеза, со стороны хромосомного аппарата нейронов, проявляющаяся в снижении площади хромоцентров, что свидетельствует об уменьшении общего количества конденсированного хроматина (гетерохроматина) вследствие избирательной деконденсации и изменении хромоцентральной организации ядер клеток развивающегося и зрелого гиппокампа. Эта реакция не зависит от линейных характеристик возбудимости нервной системы крыс. В разных структурах мозга зрелых животных выявлена зависимость от уровня возбудимости нервной системы реакции на стресс со стороны хроматина нейронов и влияние на нее суточных ритмов. Впервые показана зависимость мутагенного эффекта эмоционально-болевого стресса и чувствительности к действию мутагена циклофосфана в клетках костного мозга от генетически-детерминированных характеристик возбудимости животных. Продemonстрировано протективное действие эмоционально-болевого стресса, снижающего последствия мутагенного влияния циклофосфана.

Впервые показано, что под влиянием длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия происходят долгосрочные модификации активности генома пирамидных нейронов гиппокампа, определяемые сниженным генетически детерминированным функциональным состоянием нервной системы. Показано участие эпигенетических модификаций- метилирования ДНК, ацетилирования гистонов H3 и H4, фосфорилирования и метилирования гистона H3 по активаторным сайтам в реакции на эмоционально-болевой стресс в разных структурах мозга. Динамика их долгосрочного изменения в нейронах является специфичной для каждой линии и зависимой от структуры

мозга (сенсо-моторная зона коры, гиппокамп). Низкая возбудимость нервной системы является фактором риска развития постстрессорной патологии, определяемой, как сильное, устойчивое, длительное депрессивно-подобное состояние, которое по совокупности модификаций поведения, может рассматриваться как модель посттравматического стрессового расстройства. Длительное проявление депрессивно-подобного состояния опосредовано устойчивой модификацией активности генома пирамидных нейронов, связанных с деконденсацией хроматина (С-гетерохроматина), последовательным снижением содержания метилцитозинсвязывающего белка и повышением ацетилирования гистона H4 в гиппокампе и устойчивым повышением ацетилирования гистонов H3 и H4 в сенсомоторной зоне коры головного мозга. Высокая возбудимость нервной системы является фактором риска развития постстрессорной патологии с преимущественным проявлением стереотипных, навязчивых движений, - синдрома навязчивых состояний на фоне двигательных нарушений. Это не связано с изменениями общей конденсации хроматина, но сопровождается последовательным повышением фосфорилирования по серину 10 и метилирования по лизину 4 гистона H3 в гиппокампе и разнонаправленными изменениями ацетилирования гистонов H3 и H4 и фосфорилирования гистона H3 в сенсомоторной коре. От генетически-детерминированного уровня возбудимости нервной системы зависят особенности развития и проявления постстрессорных патологических состояний, регулируемых различными цитогенетическими и молекулярно-клеточными механизмами.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ**

Работа посвящена актуальной проблеме биологии, связанной с исследованием цитогенетических и молекулярно-клеточных механизмов постстрессорных состояний. Особое внимание уделяется исследованию пролонгированных эффектов психоэмоционального стресса, составляющих основу патогенеза стресс-зависимых заболеваний. Полученные результаты имеют значение для развития современных воззрений на механизмы формирования постстрессорных состояний с длительным течением и расшифровки лежащих в их основе генетических и эпигенетических механизмов. Проведенные исследования расширяют спектр доказательств концепции о системном контроле генетических и цитогенетических процессов и обогащают ее молекулярно-генетическую основу. Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в подтверждении вовлечения хромосомного аппарата центральных и периферических структур в реакцию на психоэмоциональный стресс и установлении долговременных изменений

состояния хроматина в нейронах мозга, связанных с влиянием на экспрессию генов. Эти результаты расширяют современные представления о механизмах нейрональной пластичности, лежащих в основе изменения адаптивных возможностей организма к неблагоприятным воздействиям экстремального характера. Пластичность генома нейронов обеспечивается модификациями ДНК и гистонов, транспозициями мобильных элементов, специфичность которых определяется генетически-детерминированными механизмами чувствительности к восприятию стрессорных факторов и предрасположенности к формированию стресс-зависимых патологических состояний.

Подтверждена гипотеза дифференциальных постстрессорных модификаций хромосом,- различный паттерн эпигенетических изменений в разных отделах мозга при действии экстремальных факторов вносит вклад в развитие синдрома дезинтеграции, определяющего патогенез постстрессорных патологий с длительным течением (Вайдо, 2000). Возбудимость нервной системы влияет на качественные характеристики этого процесса и лежит в основе индивидуальных различий.

Важное значение имеет заключение о зависимости протекания молекулярно-клеточных процессов в нормальных условиях и при реакции на стресс от базового генетически детерминированного функционального состояния нервной системы организма: генетически детерминированная возбудимость нервной системы является фактором риска, определяющим специфику и временную динамику генетических и эпигенетических изменений в нейронах.

Продemonстрированные цитогенетические эффекты мутагена циклофосфана и стресса имеют практическое значение для обоснования подходов к определению индивидуальной чувствительности организма к действию генотоксикантов. Полученные в работе факты будут положены также в основу разработки методов профилактики и коррекции патологических постстрессорных состояний с учетом базовых генетических механизмов лежащих в основе их патогенеза.

Полученные результаты и выводы работы могут быть использованы для чтения курсов лекций по физиологии, нейробиологии, нейрогенетике, нейроэпигенетике, генетике развития для студентов биологических и медицинских специальностей.

## **МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Методология настоящего исследования имеет историческую ретроспективу и является развитием идей экспериментальной генетики высшей нервной деятельности школы

И.П.Павлова и сравнительной генетики поведения и физиологической генетики школы М.Е.Лобашева. Материал для работы получен селекционным методом, применен сравнительно-генетический подход к анализу результатов. В работе использованы стандартные этологический, цитогенетические методы анализа частоты хромосомных aberrаций и количественных характеристик хроматина, морфологические методы, иммуоцитохимический подход к анализу эпигенетических изменений в клетках различных структур мозга. Использован метод полимеразной цепной реакции для исследования вариаций количества копий генов и инсерций транспозонов.

## НАУЧНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Селекция крыс по возбудимости нервной системы привела к дивергенции по цитогенетическим и молекулярно-клеточным параметрам развивающегося и зрелого мозга: количественным характеристикам общего пула интерфазного конденсированного хроматина и С-гетерохроматина, спонтанной частоте хромосомных aberrаций, экспрессии эпигенетических модификаций, паттерну инсерционного полиморфизма ретротранспозона L1, количеству вариаций числа копий рибосомного гена *rpl13a*. Связанные с возбудимостью нервной системы базовые цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики разных структур мозга могут определять чувствительность к стрессорным воздействиям.
2. Выявлены общие универсальные постстрессорные цитогенетические изменения в развивающемся и зрелом гиппокампе высоко- и низковозбудимых крыс. К ним относятся снижение площади хромоцентров, свидетельствующее об уменьшении общего количества конденсированного хроматина (С-гетерохроматина), связанное с избирательной деконденсацией, а также изменение хромоцентральной организации нейрональных ядер в результате агрегации или дезагрегации хромоцентров.
3. Выявлены специфические, связанные с уровнем возбудимости нервной системы, компоненты реакции на короткий эмоционально-болевой стресс хромосомного аппарата зрелых нейронов и клеток костного мозга. В нейронах высоко- и низковозбудимых крыс происходят структурные изменения хроматина, особенности проявления которых у каждой линии зависят от структуры мозга и связаны с суточным ритмом. С высокой возбудимостью нервной системы при действии стресса и при действии мутагена циклофосфана связано возрастание нестабильности хромосом в клетках костного мозга.

4. Выявлены долгосрочные устойчивые постстрессорные цитогенетические изменения в нейронах развивающегося и зрелого мозга крыс. Формируемые у эмбрионов постстрессорные структурные изменения хроматина сохраняются в постнатальном периоде развития и не связаны с линейными особенностями возбудимости нервной системы крыс. В зрелых нейронах гиппокампа структурные изменения хроматина сохраняются до 2-х месяцев после стрессорного воздействия и определяются низким уровнем возбудимости нервной системы крыс.
5. Выявлено участие специфических эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в реакции на длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие. Динамика их долгосрочного, до 2-х месяцев изменения в нейронах является специфичной для каждой линии и зависимой от структуры мозга. Низкая возбудимость нервной системы определяет устойчивую модификацию активности генома пирамидных нейронов, связанных с деконденсацией хроматина (С-гетерохроматина), последовательным снижением содержания метилцитозинсвязывающего белка и повышением ацетилирования гистона H4 в гиппокампе и стабильным повышением ацетилирования гистонов H3 и H4 в сенсомоторной зоне коры головного мозга. Высокая возбудимость нервной системы опосредует не связанное с общим изменением конденсации хроматина последовательное повышение фосфорилирования и метилирования гистона H3 в гиппокампе и разнонаправленное изменение ацетилирования гистонов H3 и H4 и фосфорилирования гистона H3 в сенсомоторной зоне коры головного мозга. Эти механизмы могут составлять патогенетическую основу постстрессорных состояний.
6. Генетически-детерминированный уровень возбудимости нервной системы является фактором риска развития постстрессорных патологических состояний и определяет специфику их проявления, обеспечиваемую различными цитогенетическими и молекулярно-клеточными механизмами.

## **СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Результаты работы имеют высокую степень достоверности. Достоверность результатов определяется высоким качеством материала- селективированных линий крыс, прошедших более 70 поколений отбора, применением автоматизированных установок и программ для цитогенетического анализа и молекулярно-генетических исследований, использованием в экспериментах адекватных выборок и применением в зависимости от характера

однородности данных, параметрических, либо непараметрических методов статистического анализа. Для обработки результатов применяли стандартные программные пакеты Statgraphics Centurion XV11 и Statistica 6.0, подсчитывали и анализировали общепринятые статистические величины - медианы, средние арифметические величины и стандартные ошибки. Для сравнения данных использовали критерии Стьюдента и Фишера, методы однофакторного дисперсионного анализа, многофакторного дисперсионного анализа. При отклонении распределения значений от нормального, использовали также непараметрические критерии Вилкоксона, Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные материалы диссертации были представлены и доложены на:

Конференции «Физиологические механизмы развития экстремальных состояний» (Санкт-Петербург, 1995), 1 конгрессе FEPS (Federation of European Physiological Societies) (Маастрихт, Нидерланды, 1995), 11-м Международном совещании по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 1996), 1 конгрессе FAONS и 1 региональном конгрессе IBRO (Паттайя, Тайланд, 1996), конференции «Современные концепции эволюционной генетики» (Новосибирск, 1997), 33-м Международном конгрессе по физиологическим наукам (Санкт-Петербург, 1997), съездах Всесоюзного и Всероссийского физиологического общества им. И.П. Павлова (Ростов-на-Дону, 1998; Волгоград, 2013), Международном симпозиуме, посвященном 150-летию И.П.Павлова «Молекулярно-генетические механизмы адаптивного поведения» (Санкт-Петербург, 1999), 11 конференции Украинского общества нейронаук, посвященной 70-летию кафедры физиологии ДонДМУ им.М.Горького (Донецк, 2001), 2, 3, 4 Съездах Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000, Москва, 2005, Москва, 2010; Ростов-на-Дону, 2014), Международной школе-конференции, посвященной 100-летию со дня рождения М.Е.Лобашева «Системный контроль генетических и цитогенетических процессов» (Санкт-Петербург, 2007), Всероссийского симпозиума «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 1997, 1998), V11 и 1X Всероссийской с международным участием научно-практической конференции «Здоровье-основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения» (Санкт-Петербург, 2012, 2014), Всероссийской с международным участием конференции «Нейрохимические механизмы адаптивных и патологических функций мозга» (Санкт-Петербург-Колтуши, 2014)



, заседаниях Ученого Совета Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, Международном конгрессе по нейробиофармакологии (Германия, Берлин, 2014).

### **Личный вклад диссертанта.**

Результаты, представленные к защите, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Основным направлением экспериментальной работы диссертанта явилось исследование цитогенетических и молекулярно-клеточных процессов, генетических и эпигенетических, лежащих в основе формирования постстрессорных патологических состояний, моделируемых в эксперименте с использованием прошедших длительный отбор линий крыс, различающихся по уровню возбудимости нервной системы. Автор выполнял постановку целей и задач, участвовал в разработке экспериментальных моделей, проводил эксперименты, обработку и интерпретацию полученных результатов.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Стресс. Постстрессорные состояния. Посттравматическое стрессовое расстройство

Как известно, классическая концепция стресса («общий адаптационный синдром») связана с именем Г.Селье (Селье, 1960, 1972, 1979; Selye, 1950). В настоящее время термин «стресс» рассматривается в литературе в двух основных аспектах - как неспецифическая (общая) реакция организма на разноплановые воздействия (физические или психологические), нарушающие его гомеостаз, а также как соответствующее состояние нервной системы. Основной характеристикой этого состояния является «неспецифическое напряжение», прежде всего, гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), вызывающее изменения в различных органах, а также его развитие в несколько последовательных стадий – тревоги (первичное появление острых симптомов и начальные этапы формирования устойчивости), - резистентности (адаптация, повышение резистентности организма), - истощения (повреждение организма). Г. Селье выделял патологический (дистресс), вызванный сильными повреждающими воздействиями, и полезный физиологический (эустресс), связанный со слабыми краткосрочными воздействиями. В связи с большим потоком информации, посвященной механизмам действия стресса, определение этого понятия постоянно дополняется и насыщается новыми фактами, при этом основы классической концепции стресса, предложенной Г.Селье, остаются неизменными. В настоящее время стресс рассматривается как системный ответ целого организма, при котором в первую очередь нарушаются межсистемные связи функциональных систем, обеспечивающие гомеостаз (Судаков, Умрюхин, 2010).

Ведущая роль в формировании общего адаптационного синдрома принадлежит ЦНС, головному мозгу - первому и главному звену в развитии стресс- реакции (Шаляпина, Шабанов, 2005). Неспецифическая активация симпатoadреналовой и гипофизарно-адренокортикальной систем, являющихся компонентами стресс-системы (Gold, Chrousos, 2002), связана с выделением адреналина и глюкокортикоидных гормонов соответственно, обеспечивающих адаптацию и мобилизацию защитных сил организма при действии разноплановых стресс-факторов. Механизм регуляции стресс-системы обеспечивается активирующими и ингибиторными компонентами (Меерсон, 1981; Пшенникова, 2001). Ф.З. Меерсон и его последователи разработали концепцию о стресс-реализующих и стресс-лимитирующих системах организма, взаимодействие которых определяет особенности проявления реакции организма на стресс (Меерсон, 1981) . Стресс-лимитирующие системы могут быть подразделены на центральные (компоненты ГАМК-ергической,

опиоидергической, серотонинергической, дофаминергической систем), главная задача которых состоит в ограничении активации центральных звеньев стресс-системы, и периферические (аденозин, простагландины и антиоксидантная система), действие которых направлено на повышение устойчивости клеточных структур и органов к повреждениям.

Стрессорные реакции реализуются на различных уровнях : организменном, клеточном, геномном. В настоящее время подробно изучено функционирование различных звеньев так называемой нейро-эндокринно-иммунной системы при формировании реакции на стресс (Шаляпина, Шабанов, 2005; Anisman et al., 2008). Проявление реакции на стресс зависит от особенностей стресс-факторов, их восприятия организмом и наличием ресурсов для их преодоления (Goldstein, Kopin, 2007). В качестве стресс-факторов, вызывающих формирование стресс-реакции, могут выступать любые внешние или внутренние раздражители, различные по своей природе, но реально нарушающие или потенциально угрожающие постоянству внутренней среды организма. В зависимости от природы факторов, вызывающих стресс, различают психологический (психогенный), эмоциональный (иногда объединяемый единым понятием психоэмоциональный), тепловой, холодовой и другие виды стресса. В последние годы особо выделяют, так называемый, травматический стресс, в основе которого лежат события, приводящие наряду с физическими повреждениями, к значительным нарушениям в психической сфере (психотравматизации) при истощении мобилизационных резервных ресурсов организма (Тарабрина и др., 2007) . В зависимости от длительности воздействия разделяют острый и хронический стресс (Moisan, LeMoal, 2011). Действие стресс-факторов на организм может происходить на различных этапах пренатального и постнатального развития. В зависимости от этого разграничивают пренатальный стресс, стресс раннего периода жизни, когда мозг находится в процессе структурно-функционального развития и стресс у взрослого, половозрелого организма (Provencal, Binder, 2014; Harro, 2013). Сильные и длительно действующие стрессоры являются факторами риска развития психических заболеваний, долговременных нервных расстройств. Схема нейробиологической дисрегуляции при формировании депрессий представлена на рис.1.

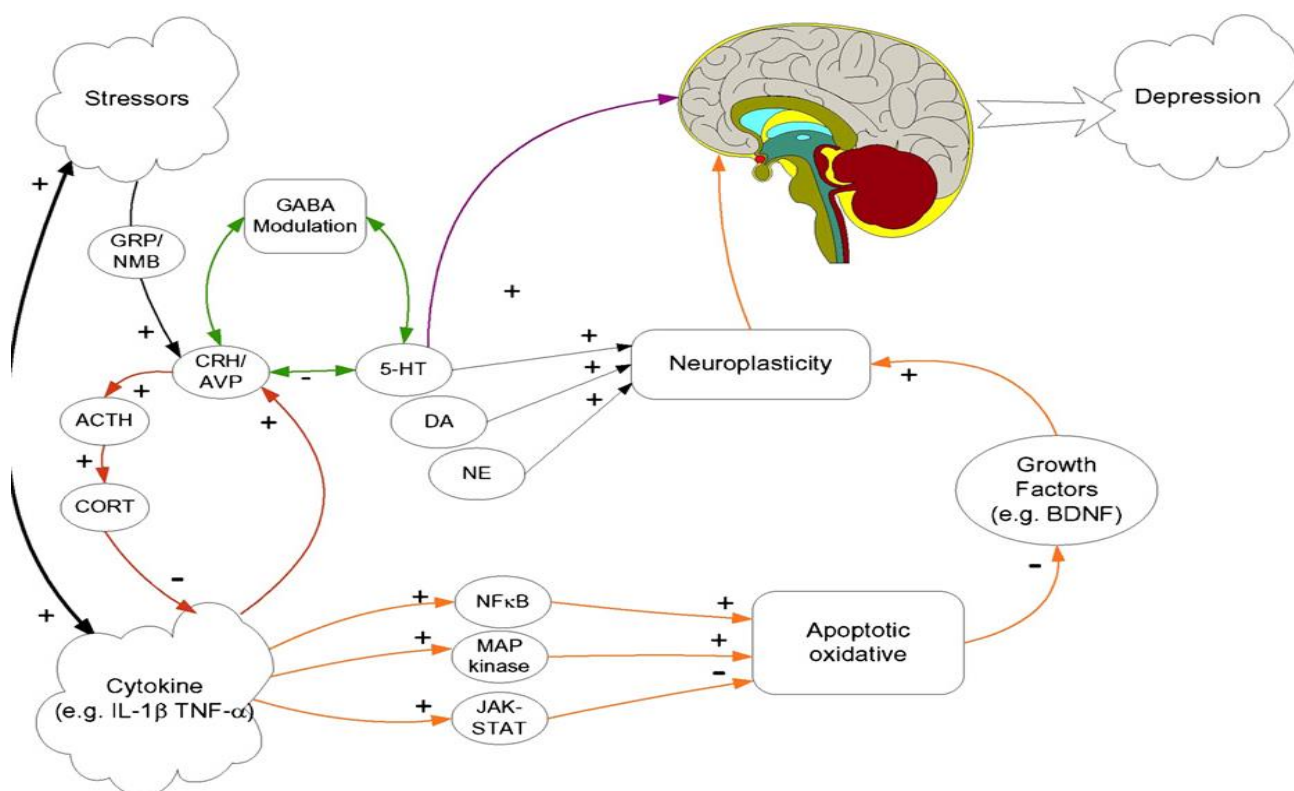


Рис.1. Схема нейробиологической дисрегуляции при формировании депрессий (Anisman et al., 2008)

С. А. Игумнов, В.А. Жебентяев (Игумнов, Жебентяев, 2011) выделяют следующие категории клинических проявлений реакции на стрессорные воздействия у человека :

1. Физиологические, непатологические реакции – кратковременное преобладание эмоциональной напряженности, психомоторных, психовегетативных проявлений при сохранении критической оценки происходящего и способности к целенаправленной деятельности.

2. Психогенные патологические реакции. Острые астенический, депрессивный, истерический и другие синдромы. Снижение критической оценки происходящего и способности осуществлять целенаправленную деятельность.

3. Психогенные невротические состояния. Неврастения, истерический невроз, невроз навязчивых состояний, депрессивный невроз. В ряде случаев утрата критического понимания происходящего и возможностей целенаправленной деятельности.

4. Реактивные психозы. Острые. Аффективно-шоковые реакции , сумеречные состояния сознания с двигательным возбуждением или заторможенностью. Затяжные. Депрессивные, параноидные, истерические и другие психозы.

Современная классификация психических и поведенческих расстройств 10-го пересмотра – МКБ-10 объединяет подобные расстройства в группу “Невротические, связанные со стрессом и соматоформные расстройства”. Раздел- “реакция на тяжелый стресс и нарушения адаптации” (F43) включает наряду с острой реакцией на стресс и расстройством адаптации -посттравматическое стрессовое расстройство . Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) - это комплекс психических нарушений, возникающих в результате стрессорного травматического события угрожающего или катастрофического характера, которое выходит за рамки обычного опыта и может представлять угрозу жизни (Kirkpatrick, Heller, 2014). Диагностические критерии ПТСР включают следующие основные группы симптомов : 1) навязчивые воспоминания (так называемые, флэш-бэки) 2) симптомы избегания-уклонения от внешних стимулов, напоминающих о травме 3) повышение возбудимости, гиперактивность (МКБ-10, 1994). Характерной особенностью данной патологии является ее развитие в отсроченный период после травмирующего события. Латентный период может составлять от нескольких недель до шести месяцев. В некоторых случаях может иметь место хроническое течение на многие годы с возможным переходом в устойчивое изменение личности. С симптомами ПТСР тесно связаны тревожность и депрессия. Следует отметить, что пол и возраст человека, подвергнутого психотравматизации, оказывает влияние на течение заболевания, особенности патологических последствий (Iwadare et al., 2014; Pfefferbaum et al., 2013) .

Для ПТСР характерна нейробиологическая дисрегуляция , включающая резкий выброс больших концентраций глюкокортикоидов, истощение коры надпочечников, пониженный уровень кортизола в крови, компенсаторную гиперпродукцию кортикотропин- рилизинг гормона, сенситизацию обратной связи . Недостаточность тормозного действия на норадренергические центры ствола мозга вызывает гиперактивацию симпатической нервной системы. Действие глюкокортикоидов на глутаматергические механизмы гиппокампа может вызывать апоптоз (Daskalakis et al., 2013a; Yehuda et al., 1998; Yehuda et al., 2012, 2013). Показано, что у больных с ПТСР наблюдаются нарушения нейромедиаторных систем: дофаминергической (Glover et al., 2003), норадренергической (Yehuda et al., 1992), серотонинергической (Spivak et al., 1999), ГАМК-ергической (Meyerhoff et al., 2014), опиоидной (Merenlender-Wagner et al., 2009). При ПТСР наблюдаются морфологические изменения некоторых областей мозга, уменьшение объема гиппокампа и префронтальной коры . Но дискуссионным остается вопрос, являются ли эти изменения следствием развития ПТСР, либо предсуществующими факторами риска для развития этого заболевания (Gilbertson et al., 2002). Так или иначе, совокупность структурно-функциональных нарушений

в префронтальной коре, гиппокампе и амигдале после травматических событий представляет собой «патологический нервный контур ПТСР» (Insel, 2009). Проблемой посттравматического стресса, исследованием ПТСР и разработкой клинко-психологических методик коррекции постстрессорных состояний в нашей стране занимается лаборатория психологии посттравматического стресса Института психологии РАН под руководством Н.В.Тарабриной (Тарабрина и др., 2007). Следует отметить, что подходы к исследованию механизмов ПТСР и определению биомаркеров диагностики у человека существуют и активно развиваются (методы нейровизуализации, биохимические, молекулярно-генетические методы), однако, возможности для исследования процессов, происходящих в мозге ограничены и их можно решать пока только с привлечением адекватных валидных моделей на животных (Daskalakis et al., 2013).

Таким образом, согласно современным представлениям, тяжелый травматический стресс приводит к развитию постстрессорных патологий, прежде всего - к формированию ПТСР - стойкого патологического состояния, связанного с длительными нарушениями в функционировании гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы, нейроэндокринными и нейроиммунологическими сдвигами. Долгосрочная модификация активности генов, контролирующих эти процессы за счет генетических и эпигенетических механизмов, может составлять основу их продолжительного течения, что требует экспериментального подтверждения. К генам-кандидатам относятся гены, участвующие в реакции на стресс, прежде всего, гены рецепторов, гормонов, нейромедиаторов, факторов роста нервов. Именно это направление по исследованию долговременных изменений экспрессии указанных генов и механизмов их регуляции под влиянием психоэмоционального стресса является необычайно востребованным в связи с необходимостью разработки терапевтических средств коррекции постстрессорных состояний с продолжительным проявлением.

Как известно, в развитие комплексных заболеваний вносят вклад генетические, эпигенетические компоненты и факторы среды (рис.2). Все они тесно взаимосвязаны и взаимозависимы (Lange, Schneider, 2010). Влияние генетических факторов подразумевает, прежде всего, существование генетической предрасположенности, индивидуальных характеристик генома, определяющих устойчивость, либо риск развития заболевания. Они в значительной мере определяются функциональным состоянием нервной системы, важнейшим параметром которого является возбудимость нервной системы.

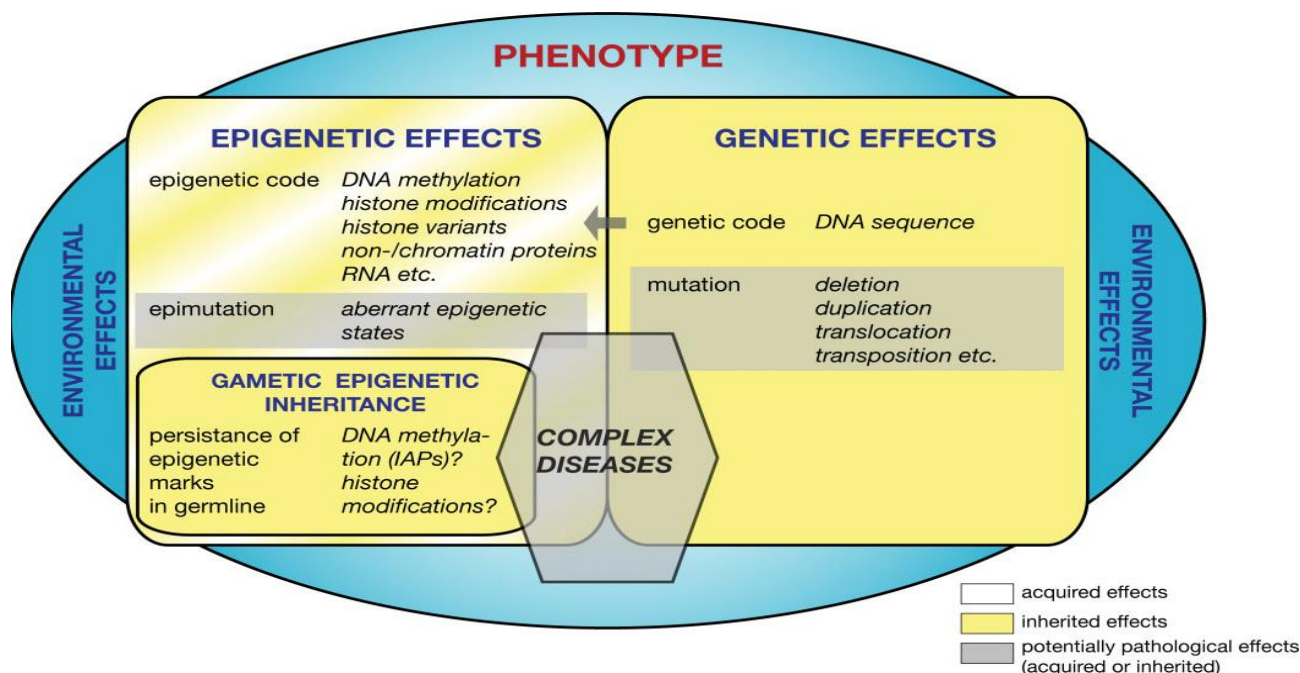


Рис.2. Схема, демонстрирующая факторы, вносящие вклад в формирование фенотипа и развитие комплексных заболеваний человека (Lange, Schneider, 2010)

## 1.2. Возбудимость как основной параметр функционального состояния нервной системы : влияние на функции мозга и поведение

Возбудимость хрестоматийно определяется как свойство (функция) возбудимых тканей, нервной и мышечной, отвечать на раздражение специфическим процессом возбуждения, который связан с возникновением специальных форм активности- ионных, химических, электрических и проявляется в нервных клетках импульсами возбуждения, а в мышечных- сокращением или напряжением (Александров, 1997 ). Наиболее часто применяемым и биологически адекватным раздражителем возбудимых тканей в физиологических экспериментах является электрический ток. Основные подходы к оценке возбудимости нервной системы включают измерение двигательной активности, непосредственно порогов нервно-мышечной возбудимости при раздражении нервов, скорости проведения нервных импульсов, биоэлектрической активности мозга, отдельных его структур и отдельных клеток (Rossinia et al., 2013). Для измерения возбудимости, прежде всего, используют определение порога,- минимальной величины раздражения, при котором возникает распространяющееся возбуждение. Величина порога зависит от функционального состояния ткани и особенностей раздражителя и связана с возбудимостью обратно пропорциональной зависимостью.

Впервые идея об «оптимальном очаге (участке) возбуждения» с «оптимальной возбудимостью» в центральной нервной системе, являющемся необходимым условием для адекватного осуществления психических процессов, когнитивной деятельности была высказана И.П.Павловым: «Если бы можно было видеть сквозь черепную крышку, и если бы место больших полушарий с оптимальной возбудимостью светилось, то мы увидели бы на думающем сознательном человеке как по его большим полушариям передвигается постоянно изменяющееся в форме и величине причудливо неправильных очертаний светлое пятно, окруженное на всем остальном пространстве полушарий более или менее значительной тенью» (Павлов, 1951). Вместе с тем, существует понятие о генерализованной активации мозга, его функциональном состоянии (тонусе), которое рассматривается как фоновая активность нервных центров для реализации поведения и других форм деятельности организма, где общая неспецифическая возбудимость является основной характеристикой (Зимкина, Лоскутова, 1976).

Начало исследований роли возбудимости нервной системы в реализации генетически-детерминированных особенностей поведенческих реакций связано с именем Л.В.Крушинского. В работах Л.В.Крушинского выявлена положительная зависимость между уровнем возбудимости нервной системы, проявлением и степенью выраженности генетически обусловленных оборонительных рефлексов и двигательной активности (подвижности) у собак как без дополнительных воздействий, так и при искусственном увеличении возбудимости инъекциями кокаина (Крушинский, 1960). Было убедительно продемонстрировано, что уровень возбудимости является одним из базовых свойств нервной системы, обеспечивающих генетически детерминированные особенности как нормального, так и патологического поведения (Крушинский, 1986, 1991). Концепция об уровне возбудимости мозга как модификаторе поведения легла в основу создания линии высоковозбудимых со слабым тормозным процессом крыс — линии Крушинского-Молодкиной, чувствительных к звуку и проявляющих целый ряд патологических состояний (эпилептиформные судорожные припадки, миоклонический гиперкинез, острые нарушения кровообращения) (Зорина и др., 2002).

Масштабное изучение влияния генетического полиморфизма по возбудимости на изменчивость проявления поведенческих актов у животных различного филогенетического уровня развития (мухи, пчелы, рыбы, птицы, мыши, крысы) было инициировано М.Е.Лобашевым (Пономаренко, 1975, 1976; Пономаренко и др., 1975; Лопатина и др., 1975; Лопатина, Пономаренко, 1987). В результате этих исследований установлены генетически детерминированные связи между функциональным состоянием нервной системы и



различными особенностями поведения, расширившие представления о механизмах участия нервной системы во взаимодействии организма с внешней средой (Лопатина, Пономаренко, 1987). В этих работах функциональное состояние нервной системы оценивалось как по порогам нервно-мышечной возбудимости, так и по двигательной активности. Исследовали изменения двигательной реакции в ответ на световые раздражители (дрозофила, рыбы) и в новой обстановке (дрозофила), обездвиживание при внезапном придании неестественного положения телу животного (рыбы, куры), реакции выбора режима освещенности и температуры (дрозофила, рыбы, пчелы), форм общественного поведения пчел, способность к обучению. Рассмотрим работы, в которых продемонстрированы генетические корреляции возбудимости нервной системы, оцениваемой непосредственно по порогам нервно-мышечной возбудимости, участвующих в реализации различных форм поведения.

Н.Г.Лопатиной (Лопатина, 1979) на пчелах пяти рас установлена значительная роль генетических факторов во взаимозависимости порога электрической возбудимости кожно-мышечного мешка, скорости впадения в эфирный наркоз (отражает состояние синапсов, передающих нервные импульсы на локомоторные органы) и особенностями ритма танца, характеризующего сигнальное поведение. Использование пигментных мутаций, изменяющих кинурениновый путь обмена триптофана у пчел, позволило расшифровать и конкретизировать связи между мутациями, их биохимическим проявлением – накоплением триптофана и его производных, либо повышением содержания кинуренина, влиянием на уровень возбудимости (снижение, либо повышение, соответственно) и проявлением сигнального поведения - его угнетения или стимуляции (Кузьмина и др., 1977, 1979а,б). В настоящее время установлена роль кинуренинов и их производных в эндогенной регуляции нейрональной возбудимости, что используется в терапевтических целях (Vecsei et al., 2013).

Существуют и активно исследуются модели на низших - одноклеточных и беспозвоночных в связи с возможностью изучения непосредственно возбудимости, корреляций с достаточно простыми локомоторными реакциями, удобством для отбора мутантов и проведения генетического анализа, определения роли ионных каналов в модуляции возбудимости и их генетической детерминации (Jegda, Salkoff, 1994; Preston, Hammond, 1998; Ramoino et al., 2006; Jepson et al., 2013).

Рассмотрим основные работы, выполненные на млекопитающих. Исследованием возбудимости нервной системы в рамках концептуальных разработок понятия общей неспецифической возбудимости на млекопитающих занимался в 70-е годы прошлого века чешский исследователь Я.Лат (Lat, 1973,1976,1978; Lat et al., 1969,1973; Lat, Holeckova, 1971; Irmis et al., 1969 a,b,c). Латом были выведены две линии (A+, A-), различающихся по общей

неспецифической возбудимости; они селектировались по уровню локомоторной активности, проявляемой в условиях новизны в установке, называемой лабиринтом Лата (Lat-maze). Для более возбудимой линии характерна более высокая двигательная активность в различных тестах, большее число социальных контактов при парном тестировании в «открытом поле» (Frankova, Tikal, 1989; Frankova, Makulecka, 1990).

Далее на основе этих линий были выведены неапольские высоковозбудимая (NHE) и низковозбудимая (NLE) линии крыс, селектированные по уровню активности в лабиринте Лата, которые различаются непосредственно по нервно-мышечной возбудимости (Cerbone et al., 1993). Селекция ведется с 1976 года. Выявлены межлинейные различия по эмоциональности, способности к обучению, морфологическим и нейроэндокринным особенностям гиппокампа, свидетельствующие о дезинтеграции процессов в этой структуре мозга у обеих линий (Cerbone et al., 1993). Эти линии использовались как модель для исследования функций гиппокампа, механизмов пространственной памяти. Цикл многолетних исследований позволил установить у животных высоковозбудимой линии NHE более низкую концентрацию альфа-адренорецепторов в гиппокампе и гипоталамусе (Cerbone et al., 1993), большую концентрацию NMDA рецепторов (Sadile et al., 1996), повышенный уровень возбуждающих аминокислот (Ruocco et al., 2009a,б), участие серотониновых рецепторов 5-HT<sub>7</sub>-R в модуляции особенностей эмоциональных реакций (Ruocco et al., 2014a), сниженную экспрессию генов раннего действия Fos и Jun и сниженный уровень внепланового синтеза ДНК под влиянием новой ситуации в лабиринте Лата (Papa et al., 1995). Кроме того, у них выявлена мезокортиколимбическая гиперфункция, гиперактивация дофаминергической системы с оверэкспрессией мРНК, участвующих в основном обмене и регуляции дофаминовых рецепторов (Viggiano et al., 2003). Поэтому высоковозбудимая линия NHE используется как модель синдрома дефицита внимания и гиперактивности (Gonzales-Lima, Sadile, 2000; Ruocco et al., 2014б), для исследования поведения, связанного с риском (risk-seeking behavior) (Ruocco et al., 2014a), нарушения процессов обучения и памяти, формирования алкогольной и наркотической зависимости (Pellicano, Sadile, 2006; Viggiano et al., 2002). Влиянием на компоненты дофаминергической системы фармакологическими препаратами удастся снизить проявление патологических симптомов (Ruocco et al., 2014в).

В Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН под руководством Н.Г. Лопатиной были начаты исследования механизмов генетической детерминации связей между функциональным состоянием нервной системы и реализацией поведения у млекопитающих (Пономаренко и др., 1975; Лопатина и др., 1975; Лопатина, Пономаренко, 1987). На 16

инбредных линиях мышей был выполнен большой цикл исследований генетических корреляций возбудимости нервно-мышечного аппарата с поведением (Дмитриев, Вайдо, 1981 а, б; Дмитриев, 1983). Сравнительно-генетическим, гибридологическим и мутационным методами выявлены высокие корреляции возбудимости с обучением. Установлена роль гена *exnm* (excitability neuromuscular) в детерминации порога нервно-мышечной возбудимости на рекомбинантно-инбредных линиях мышей (Дмитриев, 1981, Oliverio et al., 1973). Плейотропный эффект этого гена распространялся на контроль способности к образованию условного рефлекса активного избегания, содержание серотонина и норадреналина. Однако дальнейших молекулярно-генетических исследований структурно-функциональной организации этого гена не проводили, и сведения о нем ограничиваются в базе GeneBank только двумя приведенными выше работами <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=exnm>.

Для исследования генетически-детерминированных связей между функциональным состоянием нервной системы (возбудимостью нервной системы), функционированием мозга и широким спектром поведенческих признаков А.И. Вайдо была начата селекционная программа, направленная на создание линий крыс с различиями в уровне возбудимости нервной системы (Вайдо, Ситдилов, 1979). Отбор вели непосредственно по величине порога нервно-мышечной возбудимости при раздражении электрическим током (прямоугольные электрические импульсы длительностью 2мсек) большеберцового нерва *n. tibialis* (Вайдо, Ситдилов, 1979). Исходным материалом служили крысы аутбредной популяции Wistar (Рапполово). Были выведены 4 линии крыс с разными порогами возбудимости: ВП1, НП1, ВП2, НП2 (высокий и низкий пороги, 1,2- номер селекционной программы). В настоящее время поддерживаются две линии - ВП1(ВП) и НП2(НП), с контрастными величинами порогов возбудимости, 70 и 60 поколения, соответственно. У животных этих линий выявлены структурно-функциональные и метаболические изменения разных звеньев нервной системы (Ширяева и др., 1992в; Вайдо и др., 1992; Вайдо и др., 1985; Глушенко и др., 1992; Таранова и др., 1990), однонаправленные изменения возбудимости отделов периферической и центральной нервной системы (в основном, подкорковых структур) (Александрова и др., 1981). У линий происходят изменения функционирования ионных каналов (Vaido et al., 1998; Вайдо, 2000), структурно-функциональных особенностей мембран нервных клеток (Райзе и др., 1997; Герасимова и др., 2001), систем гормональной регуляции (Алехина и др., 1994б; Ордян и др., 1998; Ефимов и др., 1994; Ефимов, 1995; Шалапина и др., 1994, 1999), метаболизма медиаторов (Вайдо, 2000), чувствительности к анальгетикам (Ширяева и др., 1995). Обнаружено влияние возбудимости нервной системы на проявление инстинктивных реакций и особенности поведения, эмоциональность,

агрессивность, альтруизм, специфику стратегии поведения (Алехина и др., 1994а; Ширяева и др., 1987; Вайдо и др., 1987; Ширяева и др., 1992а, 1992б; Вайдо, 2000), способности к выработке условных рефлексов (Ширяева и др., 1992б, 1996) . Основные характеристики линий представлены в табл.1.

Генетически-детерминированный уровень возбудимости нервной системы влияет на чувствительность к стрессу, что продемонстрировано в различных тестах (Вайдо и др., 2000; Вайдо и др., 2009; Таранова и др., 1990; Шаляпина и др., 1994, 1999). Совокупность постстрессорных изменений, связанных с возбудимостью нервной системы, более подробно будет рассмотрена в гл. «Обсуждение». Важно отметить, что у крыс линий ВП и НП впервые продемонстрированы долгосрочные постстрессорные изменения поведения, сохраняющиеся на протяжении 6 месяцев (Ширяева и др., 1996) (рис.3). Эти поведенческие изменения наблюдаются у линий с разным уровнем возбудимости нервной системы, но у каждой из них имеют свои специфические особенности и отличаются от нормального поведения (Ширяева и др., 1996; Vaydo et al., 1993). Наблюдаемые в экспериментах устойчивые изменения поведенческих признаков у крыс линий ВП и НП можно соотнести с рядом симптомов ПТСР и компульсивного синдрома человека (Вайдо, 2000) (табл.2). Это предполагает существование долговременных генетических и эпигенетических изменений, прежде всего, в нейронах разных структур мозга и клетках периферических органов .

Еще один селекционный эксперимент был осуществлен на мышах Хегманом (Hegmann, 1975). В результате проведения трех селекционных программ было получено 6 линий мышей, различающихся по скорости проведения потенциалов действия в хвостовом нерве (Н, Н1, Н2 (high)- L, L1, L2 (low). Вследствии отбора произошло однонаправленное изменение этого признака в разных отделах периферической нервной системы. Межлинейные различия в скорости проведения нервного импульса были связаны с разным диаметром нервных волокон. У линий с высокой скоростью проведения двигательная активность и эмоциональность были выше, чем у линий с низкой скоростью проведения (Hegmann, 1979). Дальнейшего развития эта селекционная программа не имела.

Табл.1. Основные характеристики линий, различающихся по возбудимости нервной системы- ВП и НП

Низковозбудимые линии ВП	Высоковозбудимые линии НП
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокие пороги возбудимости в центральных и периферических отделах нервной системы.</li> <li>• Высокая скорость проведения нервных импульсов в периферических отделах нервной системы.</li> <li>• Большой диаметр нервных волокон в каудальном и большеберцовом нервах.</li> <li>• Низкие значения характеристик фокальных потенциалов в срезах обонятельной коры мозга</li> <li>• Усилена выраженность длительной посттетанической потенциации в гиппокампе</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие пороги возбудимости в центральных и периферических отделах нервной системы</li> <li>• Высокие значения характеристик фокальных потенциалов в срезах обонятельной коры мозга (активация ГАМК-рецепторов, связанных с Cl-каналами)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкая эмоциональность</li> <li>• Высокий порог агрессивного поведения</li> <li>• Повышенная способность к выработке УРАИ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокая эмоциональность</li> <li>• Низкий порог агрессивного поведения</li> <li>• Повышенная способность к выработке УРПИ</li> <li>• Высокий уровень стереотипии поведения</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокое содержание фосфолипида сфингомиелина в мембранах нейронов головного мозга.</li> <li>• Высокая активность АТФаз (общая; Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>;Mg<sup>++</sup>) в нейронах и Mg<sup>++</sup>-АТФазы в глиоцитах</li> <li>• Повышенное содержание калия в плазме крови</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Повышенная активность щитовидной железы (высокий уровень Т3 в плазме крови, морфологические параметры)</li> <li>• Повышенная активность ГГАС (высокий базальный уровень кортикостерона)</li> <li>• Высокий уровень дофамина в миндалине.</li> <li>• Высокое содержание кальция в головном мозге.</li> <li>• Высокое содержание кальмодулина в гиппокампе</li> </ul>

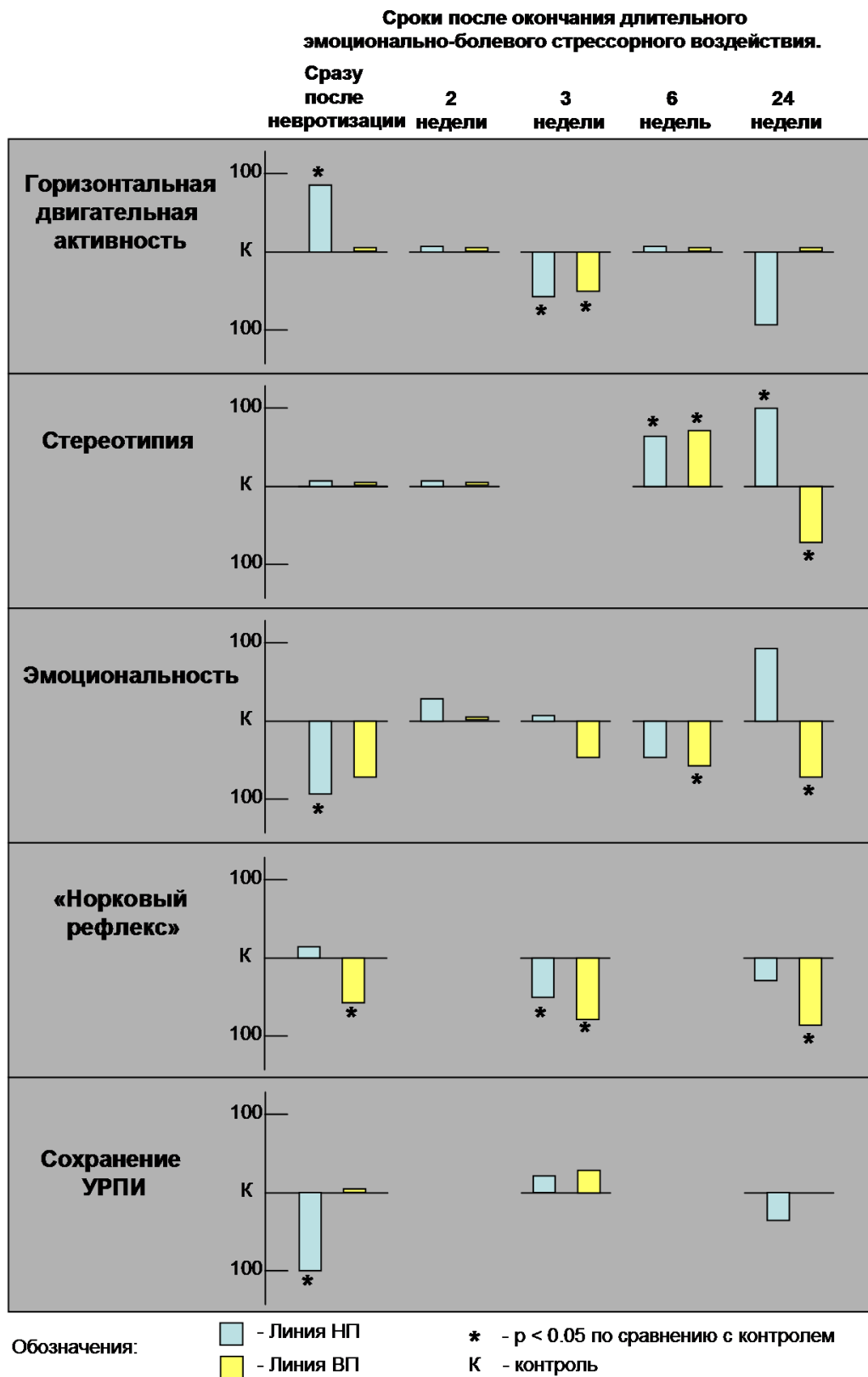


Рис.3. Длительные изменения различных параметров поведения крыс линий ВП и НП (% к контролю) (Ширяева и др., 1996; Вайдо, 2000).

Табл.2. Симптомы ПТСР и компульсивного синдрома у селектированных линий крыс

Низковозбудимая линия ВП	Высоковозбудимая линия НП
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Повышенная раздражительность</li> <li>•Нарушение пластических процессов</li> <li>•Депрессивноподобное состояние</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Увеличение стереотипии</li> </ul>

Далее рассмотрим селекционные модели, в которых селекция проводилась по поведенческим параметрам, а оценка возбудимости нервной системы была вторичной. Эти эксперименты также вносят вклад в понимание поведенческих и других коррелятов возбудимости нервной системы.

Бигнами (Bignami, 1965) на основе линии Спрег-Дуули (Sprague- Dawley) были выведены две линии крыс RHA (Roman High Avoidance) и RLA (Roman Low Avoidance), различающиеся по скорости обучения (выработки рефлекса активного избегания болевого раздражения электрическим током в челночной камере – shuttle box) (Broadhurst, Bignami, 1965; Driscoll, Battig, 1982). Оценка у них возбудимости по порогам проявления реакций вздрагивания и подпрыгивания при действии электрического тока различной интенсивности (flinch-jump) и в других тестах показала, что более возбудима линия RHA (Satinder, Hill, 1974, Satinder, 1976). У крыс этой линии обнаружена повышенная импульсивность при выполнении задачи «права выбора» ценности подкрепления в зависимости от времени его получения (delay-discounting task- DDT) , в тесте определения времени реакции при 5-вариантном выборе (five-choice serial reaction time task- 5-CSRT) , при планово-индуцированной полидипсии (schedule-induced polydipsia- SIP) (модель обсессивно-компульсивного расстройства - ОКР), меньшая тревожность в условиях новизны, устойчивость к действию стрессорных факторов (Diaz-Moran et al., 2012). Повышенная импульсивность и коморбидные характеристики у этой линии связаны с базальными нейрохимическими различиями в уровне моноаминов в стриатуме и прилежащем ядре (Moreno et al., 2010), ослабленной реакцией со стороны ГГАС (Piras et al., 2010). Поскольку высокий уровень импульсивности наблюдается при психопатологиях человека- ОКР, синдроме дефицита внимания, гиперактивности, шизофрении и разных формах асоциального поведения, эта линия активно используется как модель для изучения компонентов

импульсивного поведения и механизмов индивидуальной предрасположенности к импульсивности и связанных с этим патологиях (Moreno et al., 2010; Diaz-Moran et al., 2012; Coppens et al., 2012, 2013).

Линия RLA характеризуется высоким уровнем тревожности в различных тестах, повышенной эмоциональностью, более пассивной стратегией поведения, но парадоксально более высоким уровнем агрессивного поведения в тесте «резидент-интродер», более высокой стресс-реактивностью (повышенный уровень АКТГ, кортикотропин-рилизинг гормона, секреции кортикостерона и пролактина, выраженная реакция замирания) по сравнению с линией RHA (Steimer et al., 1998; Coppens et al., 2012, 2013). Животные этой линии в тесте принудительного плавания и других тестах, связанных с действием стресса (иммобилизация, климбинг) проявляют ряд элементов поведения, свойственных развитию состояния, подобного депрессии, симптомы которой устраняются антидепрессантами (Piras et al., 2010, 2014). Следует отметить, что у них выявлены также межлинейные различия в экспрессии следующих генов: CAMKK2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase), CRHBP (corticotrophin releasing hormone binding protein), EPHX2 (microsomal epoxide hydrolase), HOMER3 (homer protein), NDN (necdin), PRL (prolactin) and RPL6 (ribosomal protein L6). Экспрессия EPHX2, CAMKK2, PRL генов выше у линии RLA по сравнению с RHA, тогда как экспрессия HOMER3, CRHBP and RPL6 генов ниже у RLA по сравнению с RHA (Sabariego et al., 2011). То есть, результатом отбора явилась дивергенция линий и по молекулярно-генетическим признакам, уровню экспрессии генов, в том числе, и важного гена гормональной регуляции - кортикотропин-РГ-связывающего белка- CRHBP, гена Ca<sup>2+</sup>/КМ-зависимой протеинкиназы киназы, ключевого фермента в физиологических и патофизиологических процессах, - регуляции энергетического баланса, обмена глюкозы, гематопоезе, ожирении, процессах воспаления, канцерогенезе. В настоящее время наряду с поддержанием аутбредных линий RHA и RLA, выведена также инбредная колония RHA-1 и RLA-1 (Carrasco et al., 2008). На инбредных крысах удалось выявить роль центральных компонентов ГГАС, а именно установить более высокую экспрессию гена кортикотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе, амигдале, стриатуме крыс RLA-1 и определить, что этот гормон является ключевым нейробиологическим субстратом, детерминирующим различия между этими линиями (тревожность, стресс-реактивность). Учитывая, что линии различаются по возбудимости нервной системы, и в ходе длительного отбора было возможно формирование генетической детерминации этих различий, высока вероятность связи перечисленных особенностей этих линий и с генетически-детерминированным уровнем



возбудимости нервной системы, хотя специального исследования для выявления подобных корреляций не проводили.

На другой модели тревожных состояний у мышей, выведенных комбинацией методов скрещивания и отбора по поведенческим признакам, обнаружена повышенная возбудимость нейронов гиппокампа, что связано со снижением плотности K<sup>+</sup>-каналов (Virok et al., 2011). Создана трансгенная линия мышей (plp1tg/-mice), содержащая экстракопии гена миелин протеолипидного белка (plp1), имеющая низкую скорость проведения в аксональных трактах ЦНС и сниженный диаметр аксонов. Мыши этой линии отличаются особенностями поведения, связанного с проявлением тревожности, имеют дефицит пространственного обучения и рабочей памяти (Tanaka et al., 2009).

С уровнем возбудимости (процессами возбуждения) могут быть связаны импульсивность, тревожность, агрессивность. Поэтому в рамках рассматриваемой нами проблематики представляют интерес линии, селектированные по характеристикам тревожности и параметрам агрессивного поведения с точки зрения комплекса поведенческих, нейробиологических и молекулярно-генетических особенностей, связанных с отбором, среди которых, на основании уже известных зависимостей, возможно установление связей и с общей возбудимостью нервной системы. Линии крыс HAB и LAB (high, low anxiety-related behavior) получены в результате селекции по показателям тревожности и проявляют аномальные формы агрессивного поведения (Neumann et al., 2010). Являются моделью для изучения связи между агрессивностью (импульсивно-реактивно-враждебно-аффективной – impulsive-reactive-hostile-affective и контролируемой проактивно-инструментально-хищнической controlled-proactive-instrumental-predatory) (Vitiello, Stoff, 1997) и врожденными нарушениями в сфере эмоциональной регуляции, причем первый комплекс нарушений характерен для депрессивных состояний и ПТСР, а другой – для асоциальных и пограничных расстройств. По совокупности показателей линия HAB- модель тревожности с коморбидной депрессией (Neumann et al., 2010), линия LAB- модель асоциального поведения, включая патологическую агрессию (Veenema, Neumann, 2007). Выявлены межлинейные различия в активности ГГАС, аргинина-вазопрессина в мозге, системы серотонина, что с одной стороны, уточняет их вклад в формирование фенотипов, связанных с проявлением агрессии и тревожности, а с другой стороны, отражает участие тех же звеньев, которые проявляются в ходе отбора в других селекционных программах, затрагивающих и возбудимость нервной системы.

Работ, связанных с исследованием влияния генетически-детерминированной возбудимости нервной системы на поведение и механизмов их взаимосвязи на

млекопитающих мало. К ним относятся, прежде всего, рассмотренные выше селекционные программы, начатые еще в 60-70-е годы прошлого века и продолжающиеся до настоящего времени. Отбор по определенным свойствам нервных процессов и поведенческим признакам, коррелирующим с возбудимостью нервной системы, привел к созданию линий, всесторонне исследованных и активно использующихся в настоящее время как валидные модели нервно- психических патологий человека.

В самостоятельный раздел следует отнести работы, касающиеся возможности изменения возбудимости центральной нервной системы- мозга и отдельных его структур под влиянием внешних воздействий, стрессорных факторов, фармакологических препаратов и др. Задачи настоящей работы не предполагают подробного анализа этого направления исследований. Рассмотрим лишь некоторые примеры. Например, хронический стресс приводит к гипервозбудимости пирамидных нейронов латеральной амигдалы у крыс, что связано с редукцией количества и изменением функций  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ -каналов (Rosenkranz et al., 2010). Известно, что гипервозбудимость амигдалы сопровождается такими патологическими состояниями у человека, как депрессии, тревожность, ПТСР. Показано также, что гипервозбудимость амигдалы под влиянием стресса связана с глутаматергическими механизмами и коррелирует с особенностями проявления тревожности (Masneuf et al., 2014). Большой пласт работ посвящен изучению возбудимости гиппокампа при патологиях нервной системы. Различными стрессорными воздействиями и фармакологическими препаратами модифицируется возбудимость нейронов коры и гиппокампа (например, Tamagnini et al., 2014). Нокаут гена постсинаптического адгезионного белка- нейролигина-2 (NL2) вызывает среди прочих поведенческих и нейробиологических изменений, увеличение возбудимости гранулярных нейронов зубчатой извилины гиппокампа (Jedlicka et al., 2011). Современные технологии демонстрируют возможность изменения возбудимости центральных структур действием наночастиц (Jung et al., 2014).

Таким образом, под возбудимостью нервной системы в целом традиционно понимается некий фон, на котором разворачивается вся деятельность организма, включая поведение (Полетаева, 1999; Зорина и др., 2002). Возбудимость является одним из фундаментальных свойств нервной системы, основным параметром ее функционального состояния, который определяет степень функциональной активности разных ее звеньев, влияет на особенности проявления нормального и патологического поведения, имеет целый ряд физиологических, биохимических, нейроэндокринных коррелятов, что затрагивает процессы на молекулярно-клеточном уровне, генетические и эпигенетические (Лопатина, Пономаренко, 1987). Именно эта трактовка понятия «возбудимость» положена в основу

предпринятого исследования. Генетическая детерминация возбудимости является сложной, полигенной в силу мультимодальности самого признака. При этом можно выделить отдельные гены, которые являются общими, гомологичными для представителей различных систематических групп животных благодаря исследованиям в широком диапазоне моделей от простейших до высших млекопитающих. Селекционные программы позволяют накопить в результате отбора генетические различия по полигенной системе, детерминирующей возбудимость, что приводит к проявлению межлинейных различий по особенностям функционирования мозга и поведения с сопутствующим комплексом скоррелированных составляющих на различных уровнях организации. Возможен плеiotропный эффект влияния генов возбудимости на особенности функционирования разных отделов мозга. Важно подчеркнуть, что от возбудимости нервной системы зависит степень реактивности организма к внешним воздействиям и ее индивидуальные особенности. Генетические и эпигенетические механизмы, лежащие в основе формирования адаптивных и дезадаптивных, патологических постстрессорных состояний является предметом пристального внимания исследователей в последние годы, а расширившиеся методические возможности для проведения такого анализа в нервной системе, создают надежную основу для прогресса в этой области.

### **1.3. Генетические, цитогенетические и молекулярно-клеточные механизмы действия стресса в формировании постстрессорных состояний : современные представления**

#### ***1.3.1. Генетические механизмы формирования постстрессорных состояний и посттравматического стрессового расстройства***

Среди генетических механизмов формирования постстрессорных состояний важно разграничить механизмы генетической предрасположенности, собственно формирования патологий и передачи комплекса постстрессорных изменений последующим поколениям (феномен так называемого трансгенерационного переноса последствий стресса) .

Отдельный вопрос - структурно-функциональные изменения генов, возникновение мутаций вследствие тяжелых воздействий и их участие в детерминации заболеваний. Результаты эпидемиологических исследований показали, что предрасположенность к ПТСР наследуется (Rosenheck et al., 1986, 1998; Solomon, 1993; Yehuda et al., 1998, 2005). В исследованиях на близнецах- ветеранах боевых действий также был получен фактический

материал о предрасположенности к развитию ПТСР (Xian et al., 2000; Stein et al., 2002) . Риск развития ПТСР у монозиготных близнецов был выше, чем у dizиготных .

Механизмы трансгенерационного переноса постстрессорных состояний в настоящее время активно исследуются, но вопрос остается дискуссионным ( Hughes, 2014 а, б; Matthews , Phillips, 2012 ; Roth et al., 2014; Szyf, 2015). Возможно трансгенерационное программирование поведенческих изменений за счет эпигенетических модификаций (Skinner et al., 2008, 2014; Crews et al., 2012; Gapp et al., 2014) с вероятным закреплением этих изменений на уровне нуклеотидной последовательности ДНК (Fang et al., 2014).

Следующий вопрос - какие гены и какие структурные особенности этих генов детерминируют развитие этой патологии. Один из распространенных подходов – поиск полиморфных генов- кандидатов с помощью методов генотипирования. Результаты исследований ДНК-полиморфизмов - однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и варибельного числа tandemных повторов (VNTR) у испытавших жестокое обращение в детстве, у ветеранов боевых действий, жертв природных катаклизмов, показали связь с риском развития ПТСР определенных аллелей целого ряда генов (Skelton et al., 2012). Ниже приведен список выявленных к настоящему времени генов-кандидатов :

- ген FK506 связывающего белка 5 - Fkbp5- регулирует связывание кортизола и перенос глюкокортикоидных рецепторов (Binder et al., 2008; Xie et al., 2010) ;
- ген катехол-О-метилтрансферазы -Comt (Kolassa et al., 2010б);
- ген дофаминового рецептора- D2 ( Drg2) (Comings et al., 1991, 1996; Voisey et al., 2009; Young et al., 2002)
- ген дофаминового транспортера- Dat1 (Segman et al., 2001) ;
- ген серотонинового транспортера - Slc6a4 (Lee et al., 2005; Kilpatrick et al., 2007; Koenen et al., 2009; Kolassa et al., 2010a) ;
- ген альфа-2 рецептора ГАМК – Gabarα2 (Nelson et al., 2009) ;
- ген регулятор сигналинга G белка 2- Rgs2 (Amstadter et al., 2009).

Наиболее изученным является полиморфизм гена- переносчика серотонина, установлена связь между полиморфизмами этого гена и особенностями проявления психических расстройств (Margoob , Mushtaq, 2011) .

Таким образом, в список изученных к настоящему времени генов-кандидатов входят гены, связанные с рецепторами, гормонами стресса и медиаторами. Установлена их связь как с риском развития, так и с собственно формированием и особенностями проявления ПТСР.

Важнейшим звеном, запускающим под действием факторов внешней среды сигнальные каскады, влияющие на клеточные механизмы регуляции экспрессии генов, приводящие к

длительным изменениям в работе мозга, являются рецепторы глутамата, в частности, ионотропные НМДА рецепторы (NMDA- N-methyl-D-aspartate) (Reul et al., 2009). Им отводится особая роль в детерминации нейрональной возбудимости, синаптической пластичности (Monaghan , Cotman , 1986), реакции на стресс, а также в патогенезе постстрессорных и других психических заболеваний (Беспалов, Звартау, 2000; Chapman , 1998; Bradford, 1995; Dingledine et al., 1990). Установлено значение НМДА рецепторов в механизмах формирования ПТСР (Yamamoto et al., 2008). Активация НМДА рецепторов, протеинкиназ и транскрипционных факторов ведет к изменениям транскрипционных процессов, связанных с реорганизацией хроматина (Santos et al. 2006) . Методом иммунопреципитации на культуре клеток гиппокампа крыс было показано, что НМДА рецепторами опосредуется динамическая реорганизация хроматина, вызванная активацией промотора *1bdnf* гена за счет снижения метилирования гистона H3 по лизину 9 (meH3K9) и увеличения метилирования гистона H3 по лизину 4 (meH3K4) , а также ацетилирования гистона H3 по лизинам 9/14 (acH3K9/14) ( Tian et al., 2009 ). Блокада НМДА рецепторов предотвращает связанные с формированием памяти изменения метилирования ДНК *bdnf* гена, приводящие к блокированию его экспрессии в гиппокампе и дефициту памяти (Lubin et al., 2008).

НМДА-рецептор - это гетеромер, состоящий из 3-х типов субъединиц ( NR1, NR2, NR3). NR1-субъединица является основной , входит в состав всех без исключения действующих НМДА -рецепторов и является ключевой в детерминации их свойств (Sucher et al., 1996). Ген *grin1* (glutamate receptor ionotropic, N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype, subunit 1) кодирует ключевую NR1 (NMDAR1) субъединицу НМДА-рецептора, локализован на девятой хромосоме человека и на третьей хромосоме крысы (Brett et al., 1994; Kuramoto et al., 1997). Уровень экспрессии *grin1* достаточно высок в мозге, но зависит от района мозга и типа клеток (Maragos et al., 1988; Monaghan , Cotman , 1985). Изменения в экспрессии и / или трансляции *grin1* приводят к дисфункции НМДА-рецепторов, что может быть связано с патогенезом постстрессорных заболеваний.

В настоящее время очевидна взаимосвязь между состоянием НМДА рецепторов, эпигенетическим и транскрипционным статусом нервных клеток, формированием памяти и стресс-реактивностью, постстрессорными патологиями. Однако, какова роль генов самих НМДА рецепторов, прежде всего, гена *grin1* в процессах формирования реакции на стресс и патогенезе постстрессорных состояний с длительным проявлением не совсем понятно. Слабо изучены и тонкие механизмы регуляции транскрипции этого гена .

### ***1.3.2. Цитогенетические механизмы действия стресса***

#### ***1.3.2.1. Структурно-функциональная организация хромосом и стресс***

Стресс как системная неспецифическая реакция на экстремальные изменения среды, является важнейшим фактором, влияющим на активность генома, внутривидовую изменчивость и дающим материал для отбора. Концепция о роли стресса, как фактора генетической изменчивости и эволюционных процессов, принадлежит академику Д.К.Беляеву (Беляев, 1979; Бородин, 1987).

Многочисленные исследования, выполненные на клетках соматических и генеративных тканей, подтвердили индукцию повреждений генома разными видами стресса (Керкис, Скорова, 1977; Бородин, Беляев, 1980; Середенин, Дурнев, 1980). Было доказано, что степень повреждений хромосом в клетках костного мозга и тимуса мышей и динамика их изменений после психоэмоционального стресса (иммобилизации) были сравнимы с действием мутагена циклофосамида (Ингель и др., 1993, 1995). Состояние эмоционального напряжения, оцениваемое в различных психологических тестах у человека, оказывало влияние на частоту хромосомных aberrаций, индукцию репаративного синтеза ДНК и фрагментацию ДНК в лимфоцитах крови, значительно увеличивая эти показатели по сравнению с испытуемыми, пребывающими в состоянии психологического комфорта (Ингель, 2005; Dimitroglou et al., 2003). Психоэмоциональный стресс, испытываемый людьми в сейсмоопасных районах, наряду с возможными химическими и физическими воздействиями, также приводит к увеличению уровня хромосомных aberrаций и хромосомной нестабильности в соматических клетках (Nersesyan et al., 2001). В основе мутагенной активности стресса – генотоксическое действие эндогенных факторов гуморальной природы (Бородин, 1987; Керкис, Скорова, 1977; Середенин, Дурнев, 1992) и/или свободно-радикальных продуктов перекисного окисления (Васильев, Меерсон, 1984; Гуляева и др., 1989).

В работах Ю.Я. Керкиса (Керкис, 1940; Kerkis, 1975) впервые было высказано предположение о модифицирующей роли стресса в мутагенезе. Психоэмоциональный стресс приводил не только к индукции мутаций (Fishman et al., 1996; Fishman, Kelly, 1998), но и модифицировал характер повреждающего действия мутагенов (Ингель и др., 1993, 1995; Ингель, Ревазова, 1999). Аналогичные эффекты были получены и на половых клетках самцов мышей при изучении мейотических нарушений (Горюнов, Бородин, 1986).

Однако, процессы, происходящие непосредственно в геноме нейронов при стрессе изучены в меньшей степени. Влияние стресса на генетические процессы в нервной системе

исследуются на молекулярном уровне. Изучаются экспрессия генов раннего действия, генов гормонов и нейромедиаторов, рецепторов, факторов роста нервов, генов репарации, белков стресса и других веществ, связанных со стрессорным ответом, а также механизмы их регуляции (Явич и др., 1990; Senba, Veyama, 1997; Vellucci, Parrott, 1997; LeGreves et al., 1997; Fukudo et al., 1997; Auteliano et al., 1998; Irwin, 2000; Stam et al., 2002; Yamanishi et al., 2015; Zhao et al., 2015; Forsberg et al., 2015). Однако эти данные характеризуют прежде всего процессы, развивающиеся непосредственно после окончания процедуры стрессирования. Механизмы долгосрочных эффектов влияния стресса на генетический аппарат нейронов изучены недостаточно. Это обусловлено сложностью методических подходов в связи с отсутствием постоянных пролиферативных процессов в нейронах.

В настоящее время появляется все большее число свидетельств в пользу того, что составляющая значительную часть генома микро- и мини-сателлитная ДНК чрезвычайно чувствительна к действию внешних факторов и подвержена повреждениям (Pezer et al., 2012). Нестабильность этих типов последовательностей лежит в основе развития, в частности, нейродегенеративных заболеваний (Пузырев, Степанов, 1997). Для клеток нервной системы используются такие показатели повреждения ДНК как одностранные и двустранные разрывы. Эти типы повреждений ДНК индуцируются генотоксическими соединениями и могут влиять на процесс транскрипции, либо репликацию и репарацию, приводя к образованию генных мутаций (Vijg et al., 1987). Оценка уровня одностранных разрывов ДНК в нейронах различных областей мозга крыс линии Вистар и линий с различным уровнем возбудимости нервной системы после короткого и длительного эмоционально-болевого стрессирования показала, что острый стресс вызывает изменения в нейронах среднего мозга крыс линии Вистар, тогда как длительный - в нейронах среднего мозга и гиппокампа низковольтных крыс линии ВП1 (Паткин и др., 2001). Ишемия мозга, глюкозная нагрузка, помещение животных в новые условия вызывают двустранные разрывы ДНК в нейронах (Love et al., 1998; Lai, Singh, 1996; Suberbielle et al., 2013), что может приводить к апоптотической гибели клеток. Вместе с тем, возникновение двустранных разрывов ДНК рассматривается в последнее время, как отражение нормальных явлений пластичности генома нейронов, лежащих в основе их активности, и связанных с обеспечением динамических взаимодействий генома с влиянием среды, необходимых для формирования адаптивных реакций, процессов обучения и памяти (Савватеева-Попова и др., 2015).

Немногочисленные работы, касающиеся методов оценки состояния хроматина по характеристикам его конденсации в нейронах в различных экспериментальных условиях, в том числе и при действии стресса, будут рассмотрены в следующей главе.

В настоящее время в связи с изучением нейродегенеративных заболеваний активно развивается новое направление исследований- ведущей роли стресса как триггера структурной и функциональной пластичности развивающегося и зрелого мозга на экспериментальных объектах от беспозвоночных до млекопитающих (Савватеева-Попова и др., 2015), в котором ключевое значение отводится стероидным гормонам (McEwen et al., 2015).

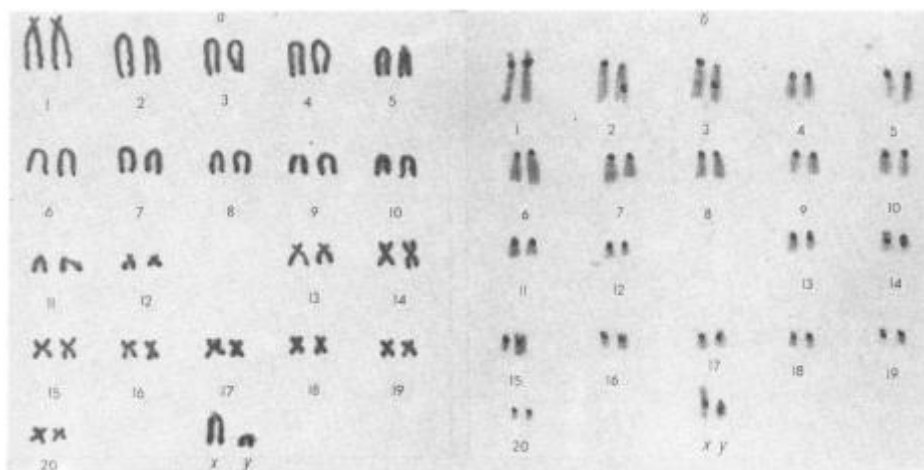
Отдельно следует упомянуть работы по выявлению методами молекулярной цитогенетики маркеров психических заболеваний, выполненных непосредственно на человеке. Показано, что анеуплоидия и структурные перестройки хромосом, отражающие нестабильность соматического генома, присутствуют в клетках мозга человека и оказывают влияние на развитие и функционирование мозга и в норме, и при формировании нервно-психических заболеваний (Iourov et al., 2010). При шизофрении, болезни Альцгеймера, атаксии- телеангиоэктазии в клетках коры выявлен мозаицизм (анеуплоидия) с участием определенных хромосом (Yurov et al., 2008; Iourov et al., 2009).

Представляется важным остановиться отдельно на особенностях кариотипа крысы *Rattus norvegicus* и реакции хромосом крысы на различные стрессорные воздействия, влияние генотоксикантов. Нормальный кариотип крысы ( $2n=42$ ) (рис.4 а) включает 20 пар аутосом и половые хромосомы (X,Y): аутосомы представлены 12 парами субтелоцентрических-acroцентрических и 8 парами субметацентрических хромосом, X хромосома- средних размеров акроцентрик и Y хромосома- мелкий акроцентрик (Мамаева, 2002). Идентификация хромосом осуществляется согласно идиограммам хромосом крысы (Sato et al., 1989). Структурный гетерохроматин крысы состоит из мелких прицентромерных блоков у части аутосом и интеркалярных блоков в аутосомах первой пары и X-хромосоме; Y- хромосома полностью гетерохроматинизирована (рис.4 б) (Графодатский, Раджабли, 1988).

Несмотря на то, что крыса является часто используемым экспериментальным объектом в биомедицинских исследованиях, моделью при изучении комплексных болезней человека, немногочисленны сведения о структурной организации хромосом, архитектуре генома этих животных (Camats et al., 2006). Возможности для цитогенетических исследований были ограничены низкой вариацией морфологии хромосом и отсутствием точного метода идентификации большинства морфологически сходных хромосом, поэтому долгое время



существовали разногласия в нумерации хромосомных пар. Тем не менее, еще в 70-е годы был определен паттерн бэндинга хромосом крысы с использованием окрашивания простыми и флуоресцентными красителями, и были описаны хромосомы этого вида (Hungerford et al., 1963; Schnedl et al., 1972; Wolman et al., 1972; Miller et al., 1972; Committee for standardized karyotype of *Rattus norvegicus*, 1973). Разработка и использование метода многоцветного спектрального кариотипирования (multicolor spectral karyotyping- SKY) позволило четко идентифицировать все хромосомы крысы. Были применены специфические зонды для всех 22 хромосом крысы, проводили комбинированное мечение набором 5 различных флуорохромов и гибридизацию *in situ*. Измерение полного спектра в каждой точке изображения с помощью специальной системы спектральных изображений и соответствующее программное обеспечение позволило осуществить идентификацию отдельных хромосом крыс по их специфическим спектрам эмиссии и провести цитогенетический скрининг сложного генома крысы (Buwe et al., 2003). Лучшему пониманию его организации способствуют работы, касающиеся изучению нестабильности генома, прежде всего, в условиях действия ионизирующей радиации, при действии других физических, химических факторов, обладающих мутагенным генотоксическим эффектом. В кариотипе крысы обнаружено 456 точек разрыва (breakpoints), индуцированных X-лучами, которые локализованы в 114 хромосомных бэндах, 25 из которых являются «горячими точками» (hot spots). 76% всех горячих точек ко-локализованы с интерстициальными теломерными последовательностями (Camats et al., 2006). Хромосомные локусы, участвующие в перестройках активно изучаются на линиях опухолевых и трансформированных клеток крыс. При исследовании трансформации эмбриональных фибробластов крысы *in vitro* показано, что хромосомы 1,3,6,7,9,11,15,17 чаще вовлекаются в численные и структурные перестройки хромосом (Ярцева, Федорцева, 2014). В местах разрывов хромосом находятся гены, связанные с регуляцией пролиферации, гены ростовых факторов, гены супрессоров опухолевого роста, онкогены, гены, контролирующие апоптоз и репарацию ДНК, гены цитоскелета и клеточной адгезии. Хромосомные перестройки приводят к подавлению или активации этих генов (Mitelman et al., 2007).



а

б

Рис.4. Нормальный кариотип крысы *Rattus norvegicus* ( $2n=42$ )- а; распределение структурного гетерохроматина- б ( Графодатский , Раджабли ,1988 )

#### 1.3.2.2. Структура и функции хроматина. Фракции хроматина. Взаимодействие ДНК и гистонов

Хроматин клеточного ядра является формой компактной упаковки ДНК. Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома ( Bradbury, 1998 ; Разин, Быстрицкий, 2012). Нуклеосома- это белковая глобула, обвитая фрагментом ДНК протяженностью 146 п.н., образующую 1,8 витка спирали . Белковый кор представляет собой октамер : тетрамер из гистонов (H3-H4)<sub>2</sub> и двух димеров из гистонов H2A-H2B. Димеры H2A-H2B соприкасаются с ДНК на входе и выходе из нуклеосомы, тетрамер ( H3-H4)<sub>2</sub> контактирует только с центральной частью фрагмента ДНК нуклеосомы. Положительно заряженные белки контактируют с отрицательно заряженной ДНК за счет электростатических взаимодействий . Между двумя параллельными витками спирали выходят наружу N-хвостовые домены гистонов H2B и H3. Со стороны плоских поверхностей нуклеосомы выходят наружу N-хвосты гистонов H2A и H4. Гистон H1 является линкерным гистоном и связывает нуклеосомы (Nishibuchi, Narayama, 2014). Для осуществления транскрипции необходим доступ к ДНК соответствующих регуляторных факторов , что достигается ослаблением ДНК-белковых взаимодействий в структуре нуклеосом и ослаблением межнуклеосомных контактов. При инактивации участков генома степень компактизации хроматина увеличивается. Эти изменения в структуре хроматина происходят за счет ковалентных модификаций- групп, присоединяемых к основаниям ДНК и/или к аминокислотным остаткам, расположенным на N-концах нуклеосомных гистонов (“хвостах” гистонов) при

участии специфических ферментов (Bradbury, 1998). Ковалентные модификации хроматина-основные, наиболее интенсивно исследуемые составляющие эпигенетической регуляции экспрессии генов (Эллис и др., 2010).

### *Хроматин и его фракции*

В состав хроматина клеточного ядра входят эухроматин и гетерохроматин (Bi, 2014; Dillon, 2004; Cann, Dellaire, 2011; Horn, Peterson, 2006). Исторически понятия «гетерохроматин» и «эухроматин» возникли как морфологические термины для обозначения специфических фракций хроматина. Эухроматин - деконденсированный хроматин, который распределен диффузно и слабо окрашивается гистологическими красителями; гетерохроматин- конденсированный, компактный хроматин, в результате окрашивания приобретает вид темно окрашенных «глыбок». В эухроматине расположено большинство генов. Гетерохроматиновые районы хромосом содержат незначительное количество генов. В настоящее время под гетерохроматином в целом понимают специфические участки хромосом, состоящие из высокоповторяющихся последовательностей ДНК, которые остаются конденсированными на протяжении всего клеточного цикла, имеют позднюю репликацию, обладают свойством положительного С-окрашивания (Прокофьева-Бельговская, 1986; Ворсанова и др., 2008). Среди характеристик гетерохроматина долгое время оставалось неизменным представление о генетической инертности, в последние годы все больше свидетельств в пользу важной роли гетерохроматина в регуляции активности генома. Несмотря на более, чем 80-летнюю историю изучения, до сих пор четкого определения гетерохроматина не существует, не ясны в полной мере его генетические функции и молекулярная организация, но есть ряд цитологических, молекулярно - биологических и генетических критериев, позволяющих отнести участки хромосом к гетерохроматиновым (Dimitri et al., 2009). Рассмотрим их более подробно.

### *Структура и функции гетерохроматина*

Гетерохроматиновые участки хромосом являются существенной частью генома эукариот и занимают у некоторых организмов до 30-50% физической длины хромосом. Термин “гетерохроматин” был введен в литературу Гейтцем (Heitz, 1928; Passarge, 1979; Прокофьева - Бельговская, 1986). Им же впервые у растений были описаны гетерохроматиновые области хромосом. Гетерохроматином называют часть хроматина, находящегося в конденсированном состоянии в интерфазе клеточного цикла. Гетерохроматиновые районы хромосом, как правило, реплицируются позже

эухроматиновых и в основном представлены высокоповторяющимися последовательностями ДНК. ДНК в составе гетерохроматина обеднена генами и чаще всего не транскрибируется. Количество и распределение гетерохроматина обычно видоспецифично и может быть определено с помощью методов дифференциального окрашивания, прежде всего, С - методом.

В настоящее время различают два основных типа гетерохроматина: структурный (постоянный, неактивный, конститутивный) и факультативный (обратно конденсируемый) гетерохроматин (Trojer, Reinberg, 2007). Структурным называют гетерохроматин, присутствующий во всех тканях организма и в обеих гомологичных хромосомах, передающийся потомству в составе хроматина в целом. Он локализован в центромерах и вторичных перетяжках, реже - близ теломер, видоспецифичен и может быть проанализирован методами дифференциального окрашивания (Арефьев, Лисовенко, 1995). Факультативный гетерохроматин присутствует только в одной из гомологичных пар хромосом, например, в инактивированной X хромосоме в процессе компенсации дозы гена у гомогаметного пола (Lyon, 1961), что получило название неравной инактивации X хромосомы (Basu, Zhang, 2011). В определенных условиях он способен переходить в эухроматин. Суть этого термина критиковалась за то, что он не полностью отражает принципиальные различия между гетерохроматином и эухроматином (Арефьев, Лисовенко, 1995). Образование факультативного гетерохроматина ведет к межклеточным вариациям активности генома. В его формировании и поддержании стабильности важную роль играют эпигенетические процессы. В настоящее время изучение факультативного гетерохроматина, детализация его особенностей в различных хромосомных локусах активно проводится в рамках клинко-диагностических исследований хромосомных аномалий человека для целей медицинской цитогенетики (Ворсанова и др., 2008). При хронических заболеваниях факультативный гетерохроматин может являться инкубатором патологических изменений за счет подавления генных сетей вследствие недостатка координированных транскрипционных активаторов (Sharma et al., 2012). В основе этих изменений лежит накопление эпигенетических репрессивных модификаций.

Гетерохроматиновые участки хромосом обладают рядом уникальных особенностей, которые отличают их от эухроматиновых участков. Кроме уже упомянутых выше свойств плотной конденсации в течение всего клеточного цикла, репликации в конце S- фазы клеточного цикла, генетической инертности и транскрипционной неактивности, они способны к «эффекту положения» и могут деконденсироваться под действием разнообразных агентов (Dillon, 2004; Dimitri et al., 2005; Horn, Peterson, 2006).

Основным критерием принадлежности участков хромосом к гетерохроматину является цитологический, - их более плотная конденсация по сравнению с остальной эухроматиновой частью хромосомы, выявляемая методами специфического окрашивания (Прокофьева-Бельговская, 1986). Цитологический гетерохроматин - это участки хромосом, которые при выявлении их различными методами, окрашиваются иначе, чем эухроматиновые районы. Различные методы дифференциального окрашивания позволяют довольно точно локализовать гетерохроматиновые участки на хромосомах. При использовании нефлуоресцирующих красителей гетерохроматин идентифицируется как более темные области, а люминесцентные красители дают зоны более яркого свечения. Но особенностью люминесцентных красителей является то, что они выявляют гетерохроматин в зависимости от его обогащенности АТ и ГЦ парами оснований. Адекватным методом для выявления конститутивного прицентромерного гетерохроматина является С - метод дифференциального окрашивания (Comings, 1972) с использованием нефлуоресцирующего основного красителя Гимза (Sumner, 1972). Этот метод позволяет выявить весь пул интерфазного гетерохроматина в виде четко идентифицируемых хромоцентров, благодаря тому, что гетерохроматиновые участки хромосом остаются в компактном (высококонденсированном) состоянии в интерфазе клеточного цикла. Этот метод один из самых распространенных и его, как правило, используют при необходимости выявить все гетерохроматиновые районы хромосом независимо от их нуклеотидного состава. Он считается наиболее адекватным методом выявления С-гетерохроматина и основан на повышенной устойчивости гетерохроматиновых участков к экстракции ДНК. Компоненты краски Гимза связываются почти исключительно с ДНК хромосомы и это связывание разворачивается ступенчато с формированием красящего комплекса. Формирование такого красящего комплекса будет происходить в разных участках хромосомы по-разному в зависимости от конфигурации и взаиморасположения молекул ДНК в хромосоме. Это и объясняет избирательность окраски разных хромосомных районов (Захаров, 1985). Следует отметить, что к настоящему времени выявлено деконденсированное состояние участков гетерохроматина ряда хромосом человека при эмбриональном развитии (Кузнецова, Баранов, 2011).

Методы анализа хромосом совершенствовались и развивались от рутинного окрашивания метафазных хромосом до дифференциального окрашивания их исчерченности по длине хромосом, высокоразрешающему анализу на стадии профазы-метафазы, разработке молекулярной гибридизации *in situ* (ISH, FISH) и молекулярного кариотипирования. Совершенствование методов анализа метафазных хромосом, обеспечившее детальное

изучение структуры и вариабельности хромосом человека и лабораторных грызунов, значительно расширило представления о молекулярных свойствах гетерохроматина.

Важным критерием, на основе которого устанавливают принадлежность определенных районов хромосом к гетерохроматиновым, является молекулярно - биологический критерий. За цитологической однородностью гетерохроматина кроется его молекулярная гетерогенность, что стало возможным определить благодаря развитию методов фракционирования генома эукариот, а также методов гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*. Гетерохроматиновые участки характеризуются обогащенностью фракцией высокоповторяющейся ДНК, в частности, сателлитной ДНК (стДНК). Эти последовательности различаются по протяженности и нуклеотидному составу. Они достаточно хорошо изучены в хромосомах человека (Кузнецова, Баранов, 2011). В составе конститутивного гетерохроматина человека выделяют три класса сателлитной ДНК с длиной повторов до 20 п.н.: первый класс обогащен АТ-парами, второй и третий имеют как АТ, так и ГЦ-пары, а также  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - сателлитную ДНК с протяженными повторами разной величины (Lee et al., 1997). Кроме фракции высокоповторяющейся ДНК в состав гетерохроматина обнаруживаются и другие повторяющиеся последовательности (Holmquist et al., 1998). В состав гетерохроматина входит целая серия белков - гистоновых и специфических негистоновых (Jones et al., 2000). Н3 и Н4 гистоны в составе гетерохроматина подвержены особым модификациям и, как правило, гипоацетилированы, кроме того, гистон Н3 метилирован по лизину 9 (K9), ДНК имеет сильную степень метилирования (высокая концентрация 5-метилцитозина). В случае слабого метилирования ДНК, гистоновые белки гиперацилированы (Turner et al., 1998; Richards, Elgin, 2002). Модифицированные коровые гистоны, варианты гистона Н1, некоторые негистоновые белки гетерохроматина имеют специфические структурно-функциональные особенности (Смирнов, 2009). Важно отметить, что установлена зависимость спектра входящих в состав гетерохроматина модифицированных гистонов и других белков от степени дифференцировки клеток и их пролиферативной активности (Grygoriev et al., 2009).

Высокий уровень компактизации ДНК в составе гетерохроматина достигается за счет взаимодействия нуклеосом друг с другом и формирования сложных комплексов негистоновых белков. Известно, что за компактизацию ДНК в гетерохроматине отвечают гистоновые белки (Comings et al., 1972, 1977) и специфические негистоновые белки (Mutsukuma, Utakoji, 1977; Seeler et al., 1998, Jones et al., 2000). В механизмах компактизации хроматина важную роль играет взаимодействие линкерного белка НР1 с метилированными сайтами гистонов и другими белками, необходимое для регуляции активности генов,

репликации ДНК и становления определенной архитектуры ядра (Eissenberg, 2000, 2014). Известно, что белок H1 связывается с метилированным сайтом гистона H3- methH3K9 и привлекает в эту область цитозинметилтрансферазу. С помощью этого фермента формируется сайт метилированного цитозина – MetCyt, который рекрутирует гистондеацетилазы. Деацетилирование гистонов завершает этап формирования компактных структур хроматина (Richards, Elgin, 2002). Еще одна точка зрения существует в пользу того, что в конденсации гетерохроматина принимают участие двухвалентные ионы металлов, способные связываться с фракцией повторяющейся ДНК (Sissoeff et al., 1976). Сателлитной ДНК способны связываться и некоторые белки ядерного матрикса (Лобов, Подгорная, 1999). По-видимому, существует общий этап в компактизации гетерохроматина различных хромосом и некоторые общие факторы, ответственные за плотную упаковку гетерохроматина (Gatti et al., 1983).

Хорошо известна связь гетерохроматина с мобильными элементами генома (Acosta et al., 2008; Gao et al., 2008). Высокое содержание ретротранспозонов выявлено в перичентромерном гетерохроматине человека и млекопитающих (Tomilin, 2008). Мобильные генетические элементы обнаружены в составе β-гетерохроматина у дрозофилы и у представителя грызунов *Microtus agrestis* (Neitzel et al., 1998). Гетерохроматин связан с переживанием и распространением транспозонов по геному за счет эпигенетических регуляторных механизмов (Dai et al., 2007; Gvozdev, 2013; Simmons et al., 2015). В настоящее время все больше свидетельств в пользу значимости разнообразных повторов в составе ДНК и ретроэлементов для нормального функционирования генома. Так, известна роль эндогенных ретротранспозонов в репрограммировании генома оплодотворенной яйцеклетки и регуляции экспрессии генов на начальных этапах эмбриогенеза у мышей (Peaston et al., 2004).

С особенностями конденсации гетерохроматина связан "эффект положения", открытый в 1934 году Сидоровым и Дубининым. Этот эффект, имевший место только в части клеток организма и проявлявшийся в разной степени, получил название «мозаичный эффект положения»-PEV (Жимулев, Беляева, 2003; Жимулев, 2003). Экспрессия эухроматиновых генов, перенесенных в результате хромосомной перестройки в гетерохроматиновые районы, нарушается, и, напротив, гены, локализованные в гетерохроматине, будут вести себя аномально в составе эухроматина (Weiler et al., 1995). Проявление этого эффекта зависит от количественного и качественного состава гетерохроматина (Baker, 1974) и находится под генетическим контролем – известен ряд его энхансеров и супрессоров (Perrin et al., 1998, Hendzel et al., 1998). Были обнаружены две группы мутаций, влияющие на PEV- энхансеры,

усиливающие эффект- E(VAR) и супрессоры, подавляющие его- Su(VAR). К первой группе относятся мутации в активаторах транскрипции, - E2F, GAGA, в белках, модифицирующих хроматин- гистоновых ацетилтрансферазах (Zhu et al., 2008; Sun, Elgin, 1999). Ко второй группе- мутации в структурных белках хроматина- H1 и белках-модификаторах- Su(VAR) (Delattre, 2000; Ner et al., 2002; Sun, Elgin, 1999). Механизмы, лежащие в основе проявления "эффекта положения", активно изучались с помощью трансгенеза (Roche et al., 1998).

Гетерохроматиновые районы гомологичных и негомологичных хромосом способны взаимодействовать с образованием хромоцентров. В настоящее время известно, что хромоцентры располагаются в ядре неслучайно, они связаны между собой и с ядерной мембраной, и их расположение специфично для разных типов клеток (Carma-Fonseca et al., 1996 и др.). Благодаря такой связи обеспечивается упорядоченность хромосом внутри ядра (Sadoni et al., 1999). Имеет место изменение локализации хромоцентров, которое может происходить в клеточном цикле при дифференцировке клеток и в патофизиологических условиях (Полторацкий, Подгорная, 1992). Изменение местоположения хромоцентров, возможно, связано со способностью хромосом к движению (Lamond, Earnshaw, 1998), что было установлено *in vivo*. Так, при использовании ДНК - связывающего домена человеческого центромерного белка CENP – В, сплавленного с зеленым флуоресцирующим белком (GFP) установили движение центромер. Непосредственное движение хромосомных плеч сопровождается циклами конденсации и деконденсации, а некоторые случаи изменения положения хромосом связывают с репликацией ДНК (Богачев и др., 2000).

Выявлены некоторые гены, кодирующие компоненты центромерного гетерохроматина, например, ген M31 у дрозофилы (Peterson et al., 1998).

Интересно отметить, что имеются структурные белки нейрональных ядер, взаимодействующие с гетерохроматином. Так, у грызунов обнаружен белок хроматина ZEP-37, принимающий участие в регуляции транскрипции и определяемый в дифференцированных постмитотических нейронах. Этот белок ассоциирован с ядрышком и взаимодействует с гетерохроматином (Payen et al., 1998; Mazarakis et al., 1996).

Основной генетической особенностью гетерохроматина является его обедненность генами. В настоящее время известно о наличии в составе гетерохроматиновых районов нескольких групп генов. Наиболее хорошо генетическая структура гетерохроматина изучена у дрозофилы. Локализация генов в гетерохроматине обусловлена особенностями их функционирования на определенных стадиях гаметогенеза и эмбриогенеза.



Первая группа – структурные гены. Они обладают способностью активно работать находясь только в гетерохроматиновом участке или в непосредственной близости от него. Наиболее яркий пример гетерохроматиновых генов - гены ядрышкового организатора, которые у высших эукариотических организмов локализуются в толще гетерохроматиновых блоков (Полторацкий, Подгорная, 1992) и способны нормально экспрессироваться только в этих районах. (обратный "эффект положения"). Гетерохроматиновая У хромосома содержит гены ядрышкового организатора (Hardy et al., 1981). В гетерохроматине Х хромосомы обнаружены гены ядрышкового организатора, ген CR+, факторы морфогенеза яиц. Кластер STELLAT, расположенный в дистальном гетерохроматине Х хромосомы, кодирует  $\beta$ -субъединицу протеинкиназы CK2 (Tulin et al., 1997). В гетерохроматиновом районе 2 хромосомы локализуются гены light (Delvin et al., 1990) и rolled (Eberl et al., 1993). В гетерохроматиновых районах хромосом 3 и 4 также локализуются единичные гены (Siucclair, 1975). У человека гены DUX необычной структуры локализуются в гетерохроматиновых районах хромосом (Beckers et al., 2001). Обнаружены последовательности, экспрессирующиеся в составе гетерохроматина, паралогичные генам ростовых факторов, иммуноглобулинов и др. (Dimitri et al., 2009).

К следующей группе гетерохроматиновых генов относятся необычные единицы транскрипции. Эта группа включает хромосомные факторы фертильности, обнаруженные в гетерохроматиновой У-хромосоме и Х-хромосоме у *Drosophila melanogaster* и активные только в период сперматогенеза (Хесин, Лейбович, 1976; Farkas et al., 2000). Интересными особенностями этих генов являются отсутствие продуктов трансляции с их транскриптов и действие на различных стадиях гаметогенеза и эмбриогенеза, в то время как их активность в соматических тканях взрослого организма отсутствует (Kirsch et al., 2004). Интересно отметить, что механизм инактивации Х-хромосомы у млекопитающих связан с экспрессией Xist гена, который картирован в центре инактивации Х-хромосомы (Xic) и кодирует нетранслируемую РНК (Jaenisch et al., 1998).

Третья группа гетерохроматиновых генов включает генетические элементы, работающие через взаимодействие с эухроматиновыми генами. Такие взаимодействия эухроматиновых генов с особыми гетерохроматиновыми элементами приводит к подавлению эффектов мутантных генов эухроматина (Hilliker, 1976). К настоящему времени описано около десятка таких элементов у дрозофилы (например, Habo, Da, Ste, Sd, Rsp).

Установлено, что многие гетерохроматиновые гены являются псевдогенами (Dimitri et al., 2005).

Таким образом, можно заключить, что гетерохроматин действительно обеднен генами в сравнении с эухроматином. Но даже те гены, которые в норме расположены в гетерохроматиновых районах, вероятно, обладают специфическими особенностями функционирования.

Относительно биологической роли гетерохроматина однозначных сведений не существует, но имеется ряд предположений. Однозначна связь гетерохроматина с процессом эволюции хромосом у эукариот (Прокофьева-Бельговская, 1986). Некоторые авторы приписывают гетерохроматину роль некоего «мусорного бака» (Hennig, 1999). Другие считают гетерохроматиновые районы важной, функционально значимой частью генома, связанной с обеспечением адаптации организма к условиям среды (Прокофьева-Бельговская, 1986; Ворсанова и др., 2008), поскольку гетерохроматин оказывает существенное влияние на многие фундаментальные процессы в ядре. Дискуссии и споры о функциональной роли гетерохроматиновых районов были и продолжаются до сих пор (Cook et al., 1994; Wallrath, 1998; Bi, 2014; Dillon, 2004; Dimitri et al., 2005; Cann, Dellaire, 2011; Horn, Peterson, 2006). И если перечислять основные функции этих районов, то в широком смысле гетерохроматин оказывает влияние на все жизненно важные процессы, происходящие в клеточном ядре: репликацию, транскрипцию, рекомбинацию, сегрегацию, репарацию. Кроме того, гетерохроматин является местом локализации специфических генов, которые способны экспрессироваться только в этих районах.

Крайне интересной представляется защитная роль гетерохроматина (Cann, Dellaire, 2011). Известно, что конденсация хроматина защищает ДНК от повреждений, вызванных различными физическими и химическими агентами (Warters et al., 1992, Terzoudi et al., 1997). В большинстве случаев мутаций происходит модификация гуанина и цитозина в аденин и тимин, которые в большом количестве содержатся в некодирующей ДНК. Избыточная ДНК, находящаяся в составе конденсированного хроматина, может предохранять гены от действия различных повреждающих факторов вследствие высокого содержания ГЦ - пар (Виноградов, 1999), которые атакуются большинством химических мутагенов и отвлекают на себя их действие. Конденсация хроматина приводит к уменьшению как уровня повреждений ДНК, так и уровня ее репарации (Lopez-Lortaza et al., 1993), то есть фактически является одним из способов пассивной защиты генома от повреждений.

Сведения о структурно - функциональных особенностях гетерохроматина клеток млекопитающих ограничены. Систематических исследований такого рода в клетках нервной системы до настоящего времени вообще не проводились в связи с

трудностями, возникающими при идентификации гетерохроматина в неделящихся дифференцированных нейронах. Исследование гетерохроматиновых районов хромосом представляется важным в связи с их ролью в адаптивных процессах клетки и организма в целом. Наиболее адекватной и удобной моделью для исследований гетерохроматина в головном мозге являются ядра постмитотических нейронов, в которых при помощи специфических методов окрашивания можно выявить участки конденсированного хроматина и гетерохроматина.

Обобщая представленный материал, необходимо подчеркнуть следующее: гетерохроматин локализован в прицентромерных районах хромосом, иногда в теломерных областях и интерстициально и является важнейшим структурным компонентом кариотипа. Гетерохроматин образован высокоповторяющимися последовательностями (сателлитной ДНК), транспозонами и немногочисленными генами. Короткие, многократно повторяющиеся последовательности образуют в хромосомах сверхконденсированные блоки. Распределение семейств повторяющихся последовательностей определяет структурную сеть интерфазного ядра, причем именно сателлитная ДНК, претендующая на роль организатора сети интерфазного хроматина, обеспечивает первый уровень пространственной организации хроматина, ретротранспозоны- второй, а последовательности MAR, SAR и ori, осуществляющие прикрепление к ядерной мембране и ядерному матриксу, участвующие в метаболизме ДНК-третий (Полторацкий, Подгорная, 1999). Районы негомологичных и гомологичных хромосом обладают способностью к слиянию с образованием хромоцентров. Динамика изменения пространственных и количественных характеристик хромоцентров позволяет судить об ассоциациях интерфазных хромосом, положении их центромерных районов, а также об особенностях пространственной организации экспрессии генов. В последние годы все большее количество фактов свидетельствует о значимой роли гетерохроматина в геноме: влияние на экспрессию эухроматиновых генов, существование в гетерохроматине активно транскрибируемых генов (в гетерохроматине дрозофилы обнаружено около 40 транскрибируемых локусов), роль в пространственной организации клеточного ядра, влияние на процессы репликации, транскрипции, рекомбинации, сегрегации хромосом, репарации, участие в обеспечении сайленсинга (Ayyanatham et al., 2003).

### *1.3.2.3. Структура хроматина в нейронах при различных состояниях организма и действии стресса*

Функциональная значимость гетерохроматина однозначно определена для процессов оогенеза, сперматогенеза, ранних стадий эмбриогенеза (Sumner, 1994; Жимулев, 1998; Кузнецова, Баранов, 2011). Обнаружены эмбриоспецифические структурные гены в гетерохроматине, функционирующие в течение ранних периодов развития (Pimpinelli et al., 1985, Eberl et al., 1993). Хроматин в значительной степени определяет особенности дифференцировки и развития нервных клеток, функционирования зрелых нейронов (Takizawa, Meshorer, 2008). Однако, какова роль структурных особенностей гетерохроматина и его динамических изменений в функционировании зрелых клеток в нервной системе и их связь с длительными модификациями поведения - эти вопросы остаются открытыми. На правомочность такой постановки проблемы указывают факты, свидетельствующие о влиянии ряда физиологических воздействий на состояние гетерохроматина и хроматина в целом в нейронах. Так, фармакологическая активация нейронов вызывает перераспределение гетерохроматина в ядре солитарного тракта (Chan et al., 2000), действие нейротоксинов приводит к продолжительным изменениям состояния и расположения гетерохроматиновых блоков в нейронах неокортекса крыс (Отеллин и др., 1998), хронический стресс низкой интенсивности вызывает структурные изменения в ядерном хроматине клеток гипофиза крыс (Komitowski et al., 1988), после транскрипционной активации в гипоталамических нейронах происходит ультраструктурная реорганизация хроматина (Garcia-Segura et al., 1993).

Исследование хроматина крупных нейронов показало, что гетерохроматин содержится в ядрышках, состоит из нескольких классов неактивной ДНК, связанной с фракцией неактивных рДНК повторов. Они являются особыми доменами хроматина, могут служить для регулирования РНК транскрипции, эффективного процессинга, защиты рДНК повторов от сайленсинга и / или гомологичной рекомбинации (Akhmanova et al., 2000).

В настоящее время хорошо известно, что конденсированное состояние хроматина связано с эпигенетическими модификациями коровых гистонов и ДНК. О них и их связи с процессами конденсации/деконденсации хроматина речь пойдет в следующем разделе. Важно, что посттрансляционные модификации гистонов, связанные с гетерохроматином, «метят» и отделяют области молчащих генов от районов, где расположены экспрессируемые гены (Litt et al., 2001a,б; Noma et al., 2001; Hall et al., 2002). Кроме того, возможно «вторжение» гетерохроматина в эухроматиновые области с целью временного выключения

активности генов (Ayyanathan et al., 2003). Однако, какие из этих механизмов и при каких условиях способствуют длительному (возможно, необратимому) поддержанию конденсированного состояния хроматина и соответственным образом влияют на паттерны экспрессии генома нейронов, - этот вопрос находится в начале своего изучения .

### ***1.3.3. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в мозге***

Термин “эпигенетика” ввел в науку Конрад Уоддингтон в 40-е годы прошлого века для обозначения взаимодействия генов со средой при формировании фенотипа. Он предложил схему эпигенетического ландшафта, отражающую принцип клеточной дифференцировки в рамках представлений о роли генов в развитии с учетом всех регуляторных процессов, ведущих к формированию зрелого организма (Уоддингтон, 1947; Waddington, 1942, 1957). В настоящее время под эпигенетическими подразумевают молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов, при реализации которых не затрагивается нуклеотидная последовательность ДНК, но происходят специфичные конформационные изменения структуры хроматина (Gottschling, 2004; Brownell, Allis, 1996; Riggs et al., 1996). Они определяются С.Д.Эллисом как “сумма изменений в хроматиновой матрице, которые в совокупности устанавливают и воспроизводят различные паттерны экспрессии генов (транскрипции) и сайленсинга на основе одного и того же генома” (Эллис и др., 2010) . Протекание эпигенетических процессов в центральной нервной системе имеет некоторые особенности в связи с общим отсутствием перманентных клеточных делений. Имеют место быть как быстрые, динамичные, так и долговременные изменения эпигенетических модификаций, различные комбинации которых обеспечивают адаптивные и патологические сдвиги в регуляции экспрессии генов в мозге. Существует представление о том, что эпигенетический код в клетках мозга может быть частью энграммы памяти (Fischer, 2014).

Все известные к настоящему времени эпигенетические модификации генома , которые активно функционируют и в клетках мозга, можно разделить на следующие группы : 1) изменения , связанные с нуклеиновыми кислотами - а) метилирование, деметилирование и гидроксиметилирование ДНК ; б) репрессия генов на уровне транскрипции и трансляции малыми РНК , РНК- интерференция ; 2) изменения гистоновых белков- а) включения специфических гистоновых белков- варианты гистонов; б) посттрансляционные модификации гистонов (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование и др. - добавление соответствующих меток к хвостам гистонов), сочетание которых определяет, так называемый, «гистоновый код» ; 3)

ремоделирование нуклеосом-структурных единиц хроматина (рис.5).

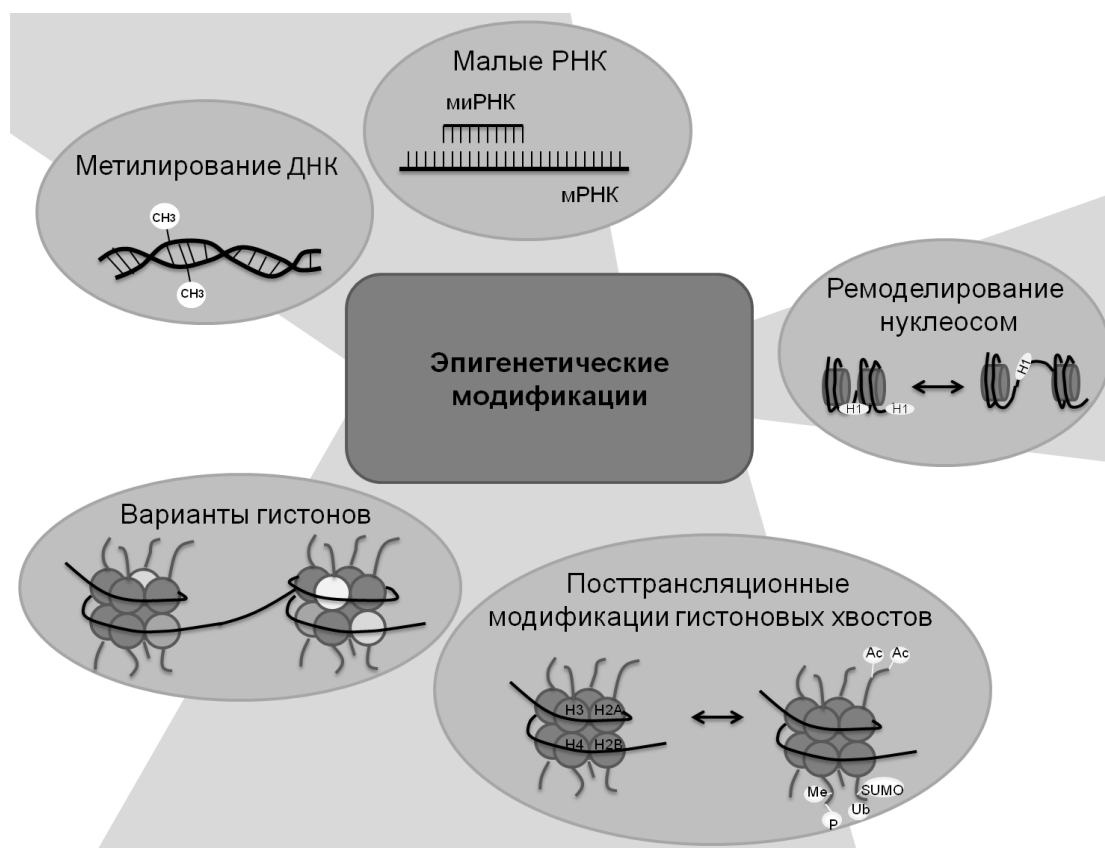


Рис.5. Схема, демонстрирующая спектр основных эпигенетических модификаций хроматина. Обозначения : H1, H2A, H2B, H3, H4 –гистоновые белки. Модификации гистоновых белков: Ac - (ацелирование), Me (метилирование), P- (фосфолирование), Ub- (убиквитинирование), SUMO- (сумоилирование).

#### 1.3.3.1. Метилирование ДНК

Метилирование ДНК является первой открытой и подробно охарактеризованной к настоящему времени эпигенетической модификацией в клетке. Метилирование ДНК характерно для геномов эукариот, но отсутствует у дрожжей и нематоды. У дрозофилы - крайне низкий уровень метилирования ДНК и его функции не вполне понятны (Weissmann et al., 2003). Метилирование ДНК является одним из основных механизмов регуляции функциональной активности генов, важнейшим процессом, поддерживающим конденсированное состояние хроматина (гетерохроматина) в целях стабилизации структуры генома, принимающим участие в процессах клеточной дифференцировки, репликации и репарации ДНК, играющего роль в защите генома - подавлении активности мобильных генетических элементов (Пендина и др., 2004). Метилирование является фермент-

опосредованной химической модификацией ДНК, заключающейся в присоединении метильной группы (CH<sub>3</sub>) к углероду в 5-м положении молекулы цитозина с образованием 5-метилцитозина (5-мс) (рис.6 ). В геномах млекопитающих в соматических тканях 70-80 % молекул цитозина в 5'-CpG-3' динуклеотидных последовательностях (С-цитозин, G-гуанин, р-фосфат, связывающий два нуклеотида) представлены 5-метилцитозином (Bird et al., 1995; Cross, Bird, 1995; Ehrlich, 1982). Распределение CpG нуклеотидов не является случайным. Первый вариант – это рассеянные CpG, распределенные по геному в виде одиночных динуклеотидов. Чаще всего они встречаются в интронах, реже в транскрибируемых областях. Тканеспецифичные гены имеют одиночные CpG в промоторных областях, причем степень их метилирования может быть различной в зависимости от типов клеток и тканей (Hoivik et al., 2013; Lee et al., 2006). Второй вид распределения- CpG островки- это короткие последовательности, где CpG динуклеотиды распределены кластерами (рис.6 ). Такие участки характерны для функционально активной части генома (свыше половины генов содержат CpG островки). CpG островки в основном расположены в промоторных областях, а участки хроматина, содержащие CpG островки имеют особенности строения, обеспечивающие активное взаимодействие с транскрипционными факторами (Tazi, Bird, 1990).

Приоритет в исследовании тканевой и возрастной специфичности метилирования ДНК у эукариот принадлежит отечественным ученым, доказавшим, что это один из механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки, который контролируется гормонами, а его нарушения приводят к развитию рака (Ванюшин, 2006). Одна из первых моделей, демонстрирующих эту важную для процессов развития эпигенетическую модификацию – инактивация X хромосомы (Lyon, 1961; Ohno et al., 1959). Р.Холлидей и А.Риггс (Holliday, Pugh, 1975; Riggs, 1975) дали начало исследованию этого феномена, предположив роль метилирования ДНК в детерминации эффекта “молчания” X хромосомы. Активные исследования процесса метилирования ДНК начались после выявления взаимосвязи между характером экспрессии генов и степенью метилирования ДНК (Razin, Cegar, 1991; Bird, 1992).

Основными ферментами, обеспечивающими процесс метилирования у эукариот, являются метилтрансферазы: DNMT1, DNMT2, DNMT3a и DNMT3b (Robertson et al., 2000; Turek-Plewa, Jagodzinski, 2005). DNMT1 представляет собой белок с молекулярной массой 200 кД (Bestor, Ingram, 1983). Этот наиболее изученный фермент системы метилирования у позвоночных является, поддерживающей метилтрансферазой, которая метилирует полуметилированную ДНК, образовавшуюся после цикла репликации ДНК. Инактивация

соответствующих генов DNMT1 в эмбриональных стволовых клетках мыши ведет к потере метилирования CpG (Li et al., 1992). Метилтрансферазы DNMT3a и DNMT3b необходимы для метилирования *de novo*: эмбриональные стволовые клетки и клетки эмбрионов в отсутствие этих белков не способны к метилированию *de novo* провирусных геномов и повторяющихся последовательностей (Okano et al., 1998, 1999). Совместное действие метилаз приводит к метилированию динуклеотидов CpG в неметилированной и полуметилированной ДНК *in vitro*, высокий уровень экспрессии наблюдается в эмбриональных стволовых клетках, более низкий - в соматических клетках взрослого организма (Okano et al., 1999). Инактивация этих ферментов вызывает эмбриональную летальность у мышей, а у человека развитие синдрома ICF, - иммунодефицит, центромерная нестабильность, утрата метилирования в повторяющихся последовательностях и центромерном хроматине, с внешними проявлениями в виде лицевых аномалий (Ehrlich, 2003). Функции DNMT 2 остаются пока неясными, поскольку этот фермент обладает слабой метилтрансферазной активностью, а его отсутствие не сказывается на уровне метилирования ДНК и не ведет к нарушениям развития (Okano et al., 1998). Интересными представляются вопросы, касающиеся механизмов общего и специфического деметилирования, а также гидроксиметилирования (Jiricny, Menigatti, 2008; Chen et al., 2014). Существует ДНК-деметилаза, способная узнавать и трансформировать 5-метилцитозин (5-mc) в цитозин, не нарушая целостности ДНК (Bhattacharya et al., 1999; Frank et al., 1991). То есть, возможно активное удаление метилированных CpG, замена метилированных остатков неметилированными. Однако, вопрос о механизмах деметилирования с помощью деметилаз остается дискуссионным. Также существуют белки, связывающиеся с метилированными сайтами, в результате чего блокируется работа метилазы, поддерживающей метилированный статус- DNMT1 (Lin et al., 2000). Механизм эксцизионной репарации, индуцируемый стрессом и повреждениями ДНК, активизирует неэнзиматические белки Gadd45α Gadd45β, которые регулируют торможение клеточного цикла и участвуют в репарации ДНК, связывая деаминирование и гликозилирование, таким образом удаляя метильную группу в цитозине (Barreto et al., 2007; Gehring et al., 2009; Ma et al., 2009; Rai et al., 2008). Белок TET1 (ten-eleven-translocation) превращает 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин, увеличивая возможность того, что деметилирование ДНК может быть ТЕТ-1 опосредованным процессом (Tahiliani et al., 2009). Существуют три ТЕТ белка- ТЕТ 1,2,3, которые могут участвовать в аналогичных реакциях (Ito et al., 2010). Известно, что элиминация 5 метилцитозина может происходить также в результате релаксации ДНК при переходе в активное состояние, что характерно для CpG сайтов высококонденсированного хроматина (Патрушев, 2000).



Метилирование влияет на транскрипцию как непосредственно путем изменения эффективности связывания факторов транскрипции с регуляторными участками ДНК, так и

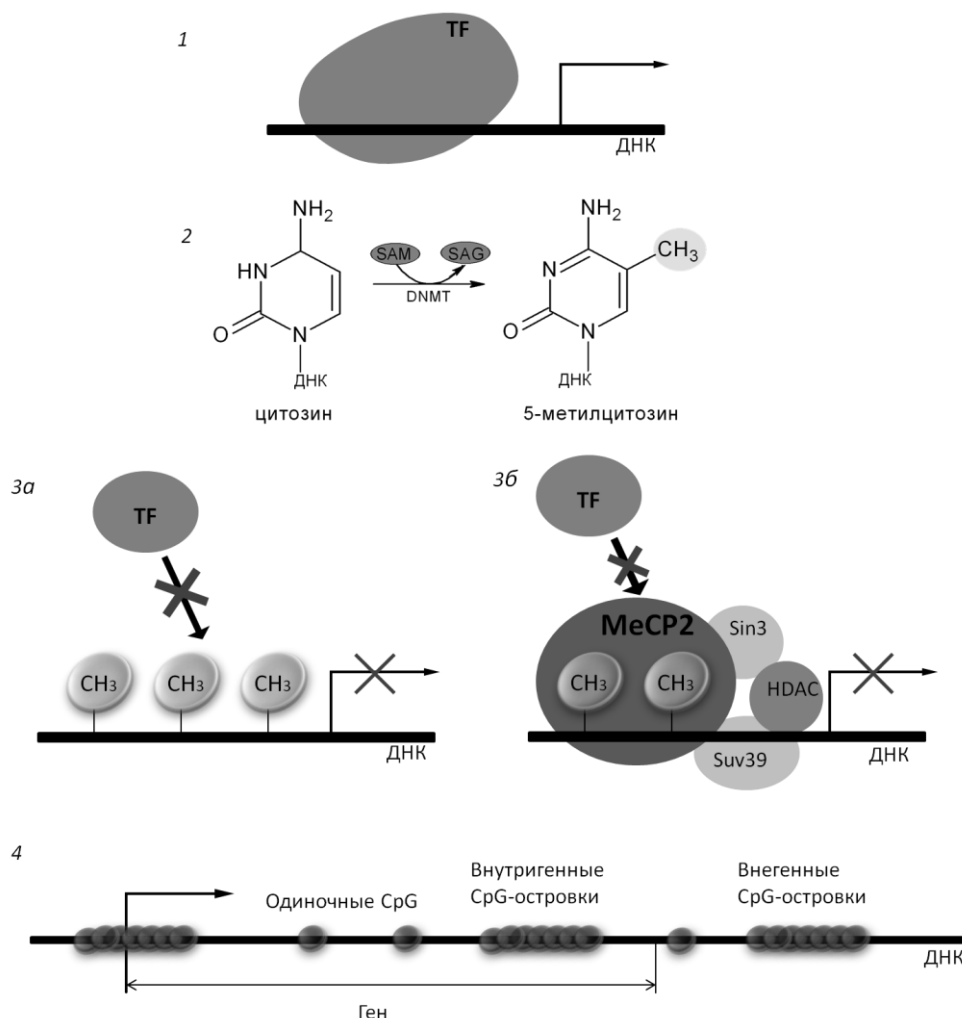


Рис.6. Схема, демонстрирующая процесс метилирования ДНК и возможные механизмы репрессии транскрипции. Обозначения : (1). Транскрипционный фактор (TF) связывается с гипометилированным участком промотора гена. (2). Метилирование цитозина. DNMT – ДНК метилтрансфераза, SAM – S-аденозилметионин, SAG– S –аденозилгомоцистеин. (3). Влияние метилирования ДНК на связывание белков с ДНК. (3а) Прямое ингибирование связывания специфических транскрипционных факторов. (3б). MeCP2 (метилсвязывающий белок) связывается с метилированными CpG динуклеотидами в промоторе гена, также связывается с гистоновыми деацетилазами (HDAC), Sin3, Suv39, и способствует, таким образом, репрессии транскрипции. (4). Распределение CpG-динуклеотидов в геноме.

опосредованно через формирование неактивных участков хроматина. То есть, существует два основных механизма влияния метилирования на транскрипцию. Первый- прямое

ингибирование связывания специфических транскрипционных факторов (с-Мус/Мун, AP-2, E2F, EBP-80, Ets, CREB/ATF-подобные белки), чьи сайты узнавания содержат одиночные метилированные CpG динуклеотиды (Singal, Ginder, 1999). Однако ряд транскрипционных факторов -Sp1, CTF, необходимые для инициации транскрипции на промоторах многих генов домашнего хозяйства, могут связываться как с метилированными, так и с неметилированными последовательностями, а также предотвращать метилирование соседних последовательностей нуклеотидов (Tate, Bird, 1993) . Второй : опосредование репрессии транскрипции через метил-CpG- связывающие белки – MeCP1 и MeCP2, входящие в состав MBD семейства белков и метилцитозинсвязывающий комплекс (Hendrich, Bird, 2000 ) (рис.6 ) . Метилцитозинсвязывающему комплексу принадлежит главная роль в инактивации генов. Данный комплекс состоит из пяти белков, которые объединены в одно семейство вследствие наличия у них специфического метил-CpG-связывающего домена (methyl- CpG-binding domain)- MeCP2, MBD1-4 (Bird, Wolffe, 1999). Все белки-члены семейства (за исключением MBD- 4) связаны с гистоновыми деацетилазами (HDAC), которые и обеспечивают репрессию транскрипции. MBD- 4 действует как репарационный фермент, который ревертирует спонтанные CpG – TpG замены, таким образом поддерживая метилирование CpG-динуклеотидов (Roloff et al., 2003).

Основным репрессирующим белком комплекса является метилцитозинсвязывающий белок -MeCP2. MeCP2 – это хромосомный белок, который *in vitro* связывается с ДНК , содержащей хотя бы один симметрично метилированный CpG-динуклеотид. При этом репрессорный эффект распространяется на несколько сот пар нуклеотидов (Nan et al., 1996) . Белок состоит из двух доменов: метилцитозинсвязывающего (MBD), необходимого для узнавания 5-метилцитозина, и репрессорного (TRD), имеющего сродство к гистондеацетилазе и обеспечивающего репрессию транскрипции (Nan et al., 1998) посредством связывания с ко-репрессорным комплексом mSin3a (Jones et al., 1998) , а также содержит WW-мотив, необходимый для образования комплексов с рядом других белков (Buschdorf, Stratling, 2004) . Иммунофлуоресцентный анализ хромосом мыши показал, что MeCP2 предпочтительно локализуется в прицентромерном гетерохроматине, который является областью высокой концентрации 5-метилцитозина (Nan et al., 1996) , тогда как локализация этого белка в области гетерохроматина мутантных клеток невозможна в силу низкого уровня метилирования геномной ДНК. Белок MeCP2 и его изоформы играют важную роль в эмбриональном развитии (Tate, Bird, 1993; Itoh et al., 2012) . Значение MeCP2 для функционирования нейронов определяется его ролью в качестве репрессора транскрипции (Guy et al., 2011). При отсутствии MeCP2 или подавлении его активности,

гены, которые должны быть сайленсированы в мозге, не репрессируются, что ведет к нарушениям в нейрональной функции.

Установлено, что MeCP2 экспрессируется на высоком уровне в большинстве областей развивающегося мозга крыс на поздней стадии эмбрионального развития. Причем областями с самой сильной экспрессией мРНК MeCP2 оказались нейроны гиппокампа, коры и мозжечка. Была выявлена корреляция экспрессии MeCP2 с дифференцировкой клеток (Jung et al., 2003). Оказалось, что уровень его экспрессии повышался в более дифференцированных нейронах, что указывает на роль MeCP2 в установлении и/или поддержании зрелости нейронов головного мозга. В литературе существуют также данные об экспрессии MeCP2 в гиппокампе взрослых животных под влиянием ишемии и киндлинга (Jung et al., 2002; Francis et al., 2002). Связанный с участием MeCP2 механизм репрессии транскрипции играет значительную роль в ЦНС млекопитающих не только в процессе развития, но и при функционировании зрелого мозга (Chen et al., 2001; Chen et al., 2014). Метилцитозинсвязывающий белок MeCP2 выполняет важную функцию поддержания структуры хроматина в нейронах зрелого мозга и участвует в механизмах эпигенетической регуляции работы нейронального генома (Akbarian, 2003). Показано также, что этот белок играет роль в процессах старения и патогенезе неврологических заболеваний (Ausio et al., 2014). MeCP2 является молекулярным линкером между метилированием ДНК, ремоделированием хроматина и регуляцией транскрипции (Li et al., 2011).

#### *1.3.3.2. Некодирующие РНК*

Эпигенетические изменения ДНК могут быть связаны также с длинной двуцепочечной РНК (dsRNA) и белковыми компонентами системы РНК-интерференции (Carthew, 2001; Matzke, Birchler, 2005; Meister, Tuschl, 2004; Tijsterman, Plasterk, 2004). РНК-интерференция первоначально описана как система деградации матричной РНК за счет комплементарных малых РНК (siRNA). Транскрипция инвертированных повторов, транскрипция участка ДНК с двух промоторов в противоположных направлениях (смысловое и антисмысловое), активность РНК-зависимой РНК-полимеразы ведут к образованию длинной двуцепочечной РНК (Лавров, Кибанов, 2007). Двуцепочечные РНК расщепляются до мелких фрагментов-малых РНК (siRNA) и связываются с белковыми комплексами (RISC), в составе которых вызывают деградацию и нарушения трансляции гомологичных мРНК (Tijsterman, Plasterk, 2004). Малые РНК являются специфическими посредниками для доставки других ферментов, участвующих в эпигенетических процессах (Matzke, Birchler, 2005). У

млекопитающих короткие интерферирующие РНК (siRNA) индуцируют метилирование ДНК, а также метилирование гистона H3, что ведет к снижению уровня экспрессии генов (Matzke, Birchler, 2005). Существует точка зрения, что РНК-зависимое метилирование ДНК - процесс, возникший в ходе эволюции для репрессии мобильных элементов генома (Галицкий, 2008). Некодирующие РНК могут выполнять консервативную эпигенетическую роль в регуляции репрессии генов как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне (Latham, Dent, 2007). Роль малых РНК велика в механизмах обучения и памяти, регуляции функций мозга и поведения. Активно исследуется роль миРНК в процессах синаптической пластичности, формировании стресс-зависимых нейропатологий (Emde, Hornstain, 2014).

### *1.3.3.3. Ковалентные модификации гистонов*

Основные известные посттрансляционные модификации гистонов разделяют на две группы: осуществляемые за счет малых химических групп (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование), либо за счет более крупных пептидов (убиквитинирование, сумоилирование) (Suganuma, Workman, 2011). В 60-х годах В.Олфри идентифицировал ацетилирование, метилирование, фосфорилирование гистонов у эукариот (Allfrey, Mirsky, 1964; Allfrey, 1966), и только в начале 2000-х были получены полновесные доказательства их роли в регуляции экспрессии генов благодаря развитию методов иммунопреципитации (Braunstein et al., 1993; Crane-Robinson et al., 1999; Thorne et al., 2004).

### *Ацетилирование гистонов*

Ацетилирование может происходить по остаткам лизина (K) различных сайтов во всех коровых гистонах – H3 (лизины 9,14,18,56 и др.), H4 (лизины 5,8,12,16 и др.), H2A (лизин 5 и др.), H2B (лизины 6,7,16,17 и др.) (Zheng et al., 2013). Наиболее активно в настоящее время изучаются ацетилированные формы гистонов H3 и H4. Добавление ацетильной группы нейтрализует позитивный заряд аминогруппы лизина, что ведет к снижению афинности между хвостами гистонов и отрицательно заряженной ДНК (Brownell, Allis, 1996), ослабляет межнуклеосомные взаимодействия, что обеспечивает доступ к ДНК регуляторных факторов. Ферменты, регулирующие уровень ацетилирования гистонов включают ацетилтрансферазы гистонов (histone acetyltransferase- HAT) и деацетилазы гистонов (histone deacetylase- HDAC), выполняющие противоположные функции соответственно по присоединению, либо удалению ацетильных групп (Shahbazian, Grunstein, 2007). Ацетилирование связано с

активацией транскрипции и декомпактизацией хроматина, деацетилирование, напротив, - с репрессией транскрипционных процессов и усилением конденсации хроматина.

### *Метилирование гистонов*

Метилирование гистонов осуществляется по остаткам лизина (K) и аргинина (R) и может вызывать как активацию, так и репрессию транскрипции (Peters, Schubeler, 2005; Khorasanizadeh, 2011). Остатки аргинина и лизина могут быть моно-, ди- и триметилированы. Метилирование по аргинину связано с активацией транскрипции. Влияние на транскрипцию метилирования по лизину зависит от специфики аминокислотного сайта, локализации в определенной области гена и может быть разнонаправленным (Shilatifard, 2006). Метилирование H3K9 в кодирующей части гена связано с экспрессией гена, тогда как – в промоторной области, напротив, с инактивацией транскрипции (Li et al., 2007). Монометилированный H3K4 обнаружен и в активных, и в инактивированных генах, триметилированный H3K4 связан исключительно с сайленсированными генами (Li et al., 2007). Ферменты, осуществляющие метилирование гистонов : метилтрансферазы гистонов (histone methyltransferase - HMT), специфичные для остатков аргинина и лизина (Trievel, 2004) и деметилазы гистонов (histone demethylase - HDM) : PADI – пептидиларгинин деиминазы , JMJC- содержащие jumonji-C домен деметилазы гистонов, LSD- лизин-специфичные деметилазы, имеющие специфичность в отношении деметилирования определенных сайтов (Schneider, Shilatifard, 2006; Klose, Zhang, 2007 ). Метилирование гистонов , метилтрансферазы и деметилазы гистонов играют существенную роль в функционировании нервной системы, в процессе нормального развития и в патогенезе болезней развития, нейродегенеративных и психических расстройств (Pattaroni, Jacob, 2013).

### *Фосфорилирование гистонов*

Фосфорилирование гистонов осуществляется по остаткам серина (S), треонина (T) и тирозина (Y) и связано с активацией транскрипции (Sawicka, Seiser, 2014; Loury, Sassone-Corsi, 2003). Отрицательный заряд фосфатной группы определяет отталкивание между гистоном и отрицательно заряженной ДНК. Фосфорилирование H3S10 связано с конденсацией хромосом в ходе клеточных делений , действуя как переключатель, извлекающий гистон HP1, связанный с метилированным H3K9 (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005).

Фосфорилирование гистонов регулируется ферментами протеинкиназами (protein kinase- PK) и протеинфосфатазами (protein phosphatase- PP) (Rossetto et al., 2012). Установлена прямая связь между эпигенетическими процессами и интранейрональными сигнальными путями, интенсивно использующими протеинкиназы и протеинфосфатазы, поэтому фосфорилирование гистонов может иметь особую роль в регуляции экспрессии генов именно в ЦНС (Levenson, Sweatt, 2006).

#### *Убиквитинирование гистонов*

Убиквитинирование гистонов заключается в присоединении белка убиквитина (76 а.к.) к составляющим гистонового кора- гистонам H2A и H2B. Убиквитинирование гистона H2A связано с репрессией транскрипции генов, убиквитинирование H2B имеет различные последствия для транскрипции генов, как активирующий, так и репрессирующий эффекты (Weake, Workman, 2008). Убиквитинирование связано с метилированием гистонов: убиквитинирование H2B предшествует метилированию гистона H3, убиквитинирование H2A может оказывать ингибирующий эффект на метилирование гистонов (Shilatifard, 2006; Weake, Workman, 2008).

#### *Сумоилирование гистонов*

Гистоны могут сумоилироваться. SUMO (small-ubiquitin-like-modifier) белки аналогичны убиквитину и имеют длину 100 а.к. Сумоилирование гистонов связано с репрессией транскрипции (Shiio, Eisenman, 2003), привлекает другие репрессорные комплексы. Сумоилирование препятствует ацетилированию гистонов (Garcia-Dominguez, Reyes, 2009). SUMO белки присоединяются к коровым гистонам с помощью специфических лигаз, действие которых изменяется протеазами (Garcia-Dominguez, Reyes, 2009).

#### *1.3.3.4. Варианты гистонов*

Наряду с основными, каноническими формами гистоновых белков, существуют варианты формы гистонов, выполняющие специфические функции. Варианты гистонов образуются в результате структурных изменений коровых гистонов (Henikoff, Ahmad, 2005; Sarma, Reinberg, 2005). Эти изменения могут включать как замену больших групп аминокислот в хвостах гистонов, в глобулярных центральных доменах, так и небольшое число аминокислотных замен (Li et al., 2007). Некоторые варианты гистонов имеют амино- и карбокситерминальные домены с уникальной активностью. Интеграция гистоновых

вариантов в отдельные участки генома в клеточном цикле может менять локальную регуляцию транскрипции генов (Pusarla, Bhargava, 2005; Talbert, Henikoff, 2010) . В настоящее время известны группы вариантных форм гистонов : H1, H2A, H2B и H3. В качестве примеров можно привести следующие замены : гистон H3 может быть заменен вариантом H3.3 в транскрипционно активных генах (Ahmad, Henikoff, 2002) . Возможно замещение корового гистона гистона H2A вариантом H2A.Z, связанным с активацией транскрипции. Выявлена роль этого вариантного гистона в механизмах памяти (Zovkic et al., 2014) . CENP-A – вариант гистона H3 важен для функционирования центромер и сегрегации хромосом. H2A.X вариант связан с выявлением повреждений ДНК для последующего рекрутирования комплексов репарации ДНК. Микро H2A вариант гистона H2 связан с неактивной X хромосомой. Синтез и замещение многими из этих гистоновых вариантов не ограничено S-фазой клеточного цикла и не зависит от репликации ДНК (Weber, Henikoff, 2014; Biterge, Schneider, 2014) . Активация подобных замещений может происходить и в ответ на стресс- факторы. Механизмы замены могут осуществляться через зависимый от АТФ комплекс обмена гистонов, либо через шапероны. Есть предположение, что функция обменных комплексов состоит в замещении модифицированных гистонов немодифицированными для удаления стойких меток в аминоконцах гистонов.

#### *1.3.3.5. Ремоделирование нуклеосом*

Ремоделирование нуклеосом - процесс, приводящий к изменению структуры хроматина. Он осуществляется при участии ферментов (комплексов ремоделирования хроматина), каталитически связанных с АТФ, который является источником энергии. Функции комплексов ремоделирования хроматина включают : 1) перемещение нуклеосом вдоль молекулы ДНК для обеспечения взаиморасположения нуклеосом на одинаковом расстоянии ; 2) декомпактизацию нуклеосом, изменение контактов между ДНК и гистонами; 3) перемещение нуклеосом с одной молекулы ДНК на другую ; 4) замены коровых гистонов вариантными формами (Разин, Быстрицкий, 2012). В состав комплексов ремоделирования хроматина входит субъединица с АТФазной активностью и другие субъединицы, обеспечивающие специфичность связывания с нужными областями хромосом. Комплексы ремоделирования хроматина делят на 4 группы : SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80 в зависимости от типа АТФазной субъединицы (Eisen et al., 1995). У эукариот эти комплексы определяются по содержанию SWI/SNF субъединицы АТФаз. Используя АТФ в качестве субстрата, они обеспечивают скольжение гистоновых октамеров вдоль молекулы ДНК (слайдинг), нарушая контакты гистонов с ДНК за счет высвобождения ДНК на поверхности нуклеосом и

волнообразного перемещения петли ДНК или протягивания ДНК через глобулу (Becker, Holz, 2002). Перемещение нуклеосомной глобулы происходит ступенчатым образом.

В целом, эпигенетические механизмы являются частью сложной, комплексной сети, включающей множественные позитивные и негативные прямые и обратные пути, которые затрагивают уровень ДНК и гистонов, а также структуру более высокого порядка – хроматин и осуществляют функцию регуляции экспрессии генов за счет сложных комбинаций различных вариантов модификаций, изучение которых в мозге находится еще на начальном этапе, несмотря на большое число работ в этой области (Cedar, Bergman, 2009; Latham, Dent, 2007).

#### ***1.3.4. Эпигенетические механизмы, связанные с действием стресса и формированием постстрессорных состояний***

Становится все более очевидным, что эпигенетические механизмы являются неотъемлемой составляющей многих функций развивающегося и зрелого мозга, принимают участие в многоуровневой комплексной регуляции основных нейрональных функций и высших когнитивных процессов (Rudenko, Tsai, 2014; Houston et al., 2013; Graff, Mansuy, 2008). В то же время накапливаются факты, свидетельствующие в пользу того, что патогенез некоторых болезней развития, нейродегенеративных и психических заболеваний связан с изменением спектра эпигенетических модификаций и уровня их экспрессии, что позволяет говорить о существовании нормальной и патологической эпигенетической регуляции (Graff et al., 2011; Dalton et al., 2014; Pena et al., 2014; Akbarian et al., 2013; Miller, Sweatt, 2007; Tsankova et al., 2006). Это открывает перспективы развития эпигеномных подходов в медицине (Mehler et al., 2008). С. Бергер предложил схему эпигенетического сигнального каскада- последовательность событий от исходных стресс-факторов до формирования спектра эпигенетических изменений (Berger, 2009) (рис.7). “Эпигенераторы”- все сигналы (стрессоры, медиаторы стресса, составляющие внутриклеточных процессов) приводят к активации “эпигенетических инициаторов” (CREB, REST и др.), которые посредством влияния на ферменты, регулирующие эпигенетические изменения- деацетилазы гистонов, ДНК метилтрансферазы и др., определяют эпигенетический статус - паттерны эпигенетических трансформаций. Очевидно, что требуется детальное изучение всех звеньев этой цепи для познания механизмов работы нейроэпигенома.

Наиболее интенсивно исследуемыми эпигенетическими процессами в контексте концепций стресса и постстрессорных патологий являются метилирование ДНК и модификации гистонов. В экспериментах на животных показано влияние разных видов



острого и хронического стресса на изменение эпигенетического статуса хроматина в различных структурных районах гиппокампа, префронтальной коре, прилежащем ядре



Рис.7. Сигнальный каскад эпигенетических изменений (по : Berger et al., 2009).

( nucleus accumbens ) (Stankiewicz et al., 2013). Так, в тестах принудительного плавания и предъявления хищника показано увеличение фосфорилирования гистона H3 по серину 10 в нейронах зубчатой извилины гиппокампа у крыс линии Вистар и мышей линии C57BL/6 (Bilang-Bleuel et al., 2005). В тесте принудительного плавания показано также увеличение фосфо-ацетилирования гистона H3 (серин 10, лизин 14, соответственно) у тех же объектов в зубчатой извилине гиппокампа (Chandramohan et al., 2008), изменение этой модификации в тесте на новизну показано у крыс линии Вистар также в зубчатой извилине гиппокампа (Chandramohan et al., 2007) . Иммобилизационный стресс приводил к увеличению триметилирования гистона H3 по лизину 9, снижению монометилирования гистона H3 по лизину 9 и триметилирования гистона H3 по лизину 27 в гиппокампе крыс Спрег-Доули (Hunter et al., 2009). Хронический переменный стресс вызывал снижение ацетилирования гистона H4 по лизину 12 и фосфо-ацетилирования гистона H3 (серин10, лизин 9 соответственно) у крыс линии Вистар (Ferland et al., 2011) . Разные варианты длительного иммобилизационного стресса- снижение триметилирования H3 по лизину 27, увеличение триметилирования H3 по лизину 9 и триметилирования гистона H3 по лизину 4 - в клетках

разных районов гиппокампа крыс Спрег-Дуули (Hunter et al., 2009). В тесте хронического социального поражения наблюдали увеличение ацетилирования гистона H3 по лизинам 9 и 14 в нейронах и глии медиальной префронтальной коры (Hinwood et al., 2011) и общего ацетилирования гистона H3 в гиппокампе крыс той же линии (Hollis et al., 2010). Изменение метилирования гистона H3 обнаружено в прилежащем ядре (nucleus accumbens) мышей линии C57BL/6 в условиях хронического социального поражения/ социальной изоляции (Wilkinson et al., 2009). В целом, в разных вариантах острого и хронического стресса изменения затрагивают фосфорилирование, ацетилирование и метилирование гистона H3 и ацетилирование гистона H4. Наиболее изученным среди различных отделов мозга оказался гиппокамп. Однако вопрос о том, насколько длительно могут сохраняться эти изменения, пока остается открытым.

Наряду с исследованием так называемых глобальных изменений эпигенетических паттернов в различных структурах мозга, чрезвычайно важным представляется определение эпигенетических модификаций в генах, участвующих в формировании и сохранении стрессорных реакций, характер влияния этих модификаций на экспрессию генов и далее на функции мозга и поведение.

Набор генов, вовлеченных в реакцию на стресс и имеющих эпигенетическую регуляцию, изучен в различных парадигмах психогенного стресса у человека и в моделях на животных. К ним относятся: перинатальный стресс (депрессивные состояния матери; пренатальные хронические воздействия); стресс раннего периода жизни- связанный с жестоким обращением в детстве, плохой заботой матери, депривацией и другими видами стрессирования в раннем детстве. Хронический переменный стресс. Хронический социальный стресс (Stankiewicz et al., 2013). Известны и гены, непосредственно связанные с риском развития ПТСР и патогенезом этого заболевания, причем эпигенетические механизмы регуляции их экспрессии активно исследуются в последние годы (Raabe, Spengler, 2013; Heinzelmann, Gill, 2013). Изученные области мозга- неокортекс, гипоталамус, гиппокамп, прилежащее ядро, амигдала. Наиболее значимые изменения в промоторах генов после испытания психогенного стресса связаны с метилированием ДНК, гиперметилированием, либо гипометилированием. Эта модификация наиболее изучена. Кроме того, показано изменение ацетилирования гистонов H4 и H3 – модификации, связанные с активацией транскрипции и метилирования гистона H3 по активаторному (лизин 4) и репрессорному (лизин 27) сайтам (Tsankova et al., 2007; Uchida et al., 2011). Эти сведения в обобщенном виде представлены на схеме (рис.8). Интересно отметить, что длительность стрессорного воздействия оказывает дифференцированное влияние на

экспрессию ацетилированных форм гистонов : острый стресс влияет на ацетилирование H4, тогда как длительный- на ацетилирование H3 (Tsankova et al., 2006).

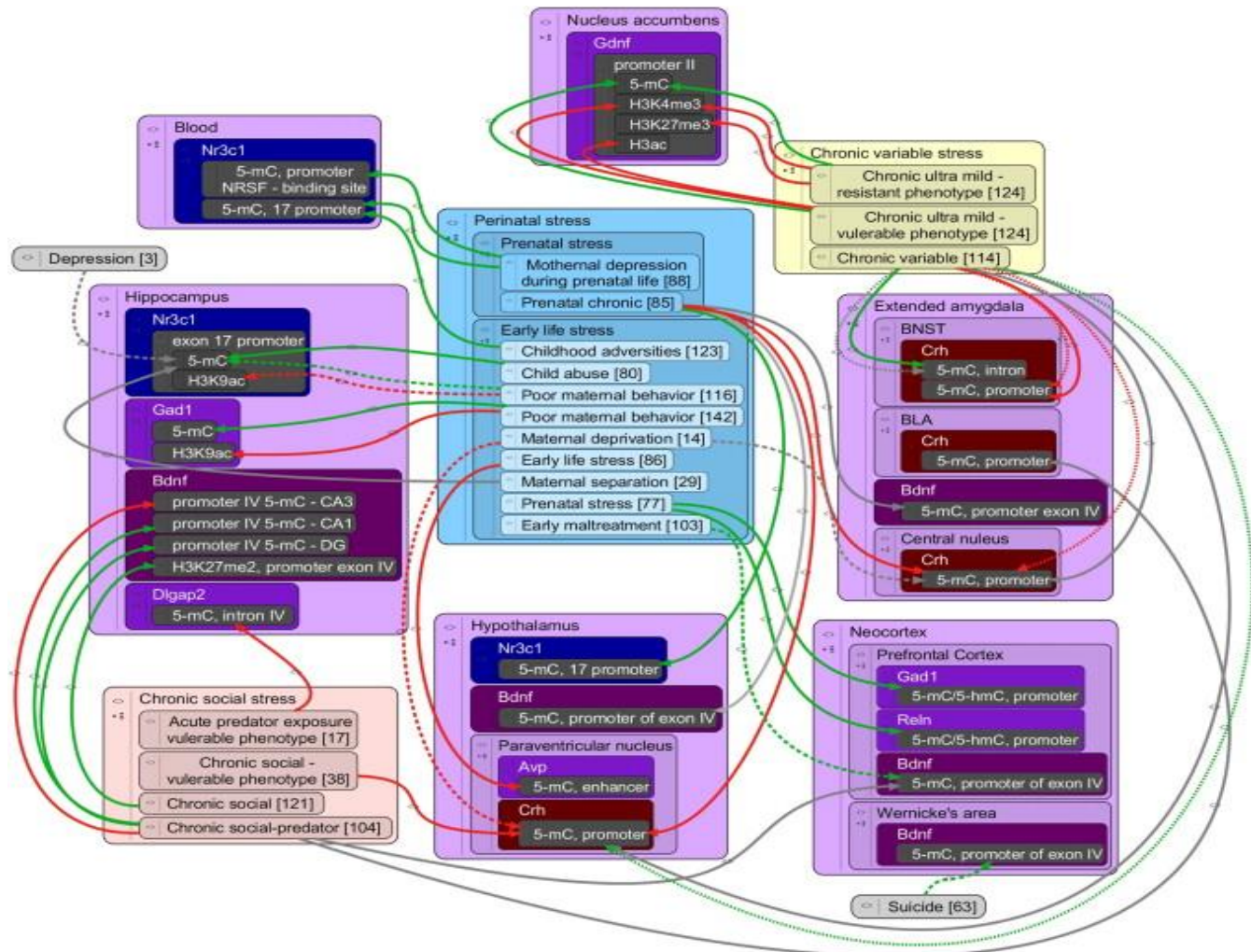


Рис.8. Основные гены, эпигенетическая регуляция которых продемонстрирована в различных парадигмах психогенного стресса (по : Stankiewicz, 2013). Обозначения : зелеными линиями показано повышение, красными- снижение, серыми- отсутствие влияния стрессоров на эпигенетические модификации. Сплошной линией обозначены результаты, полученные на самцах, мелким пунктиром- на самках, широким пунктиром- на самцах и самках. *Crh*- ген кортикотропин-рилизинг-гормона, *Nr3c1*- ген глюкокортикоидного рецептора, *Bdnf*- ген нейротрофического фактора мозга, *Gdnf*- ген глиального нейротрофического фактора , *Avp*- ген аргинина-вазапрессина , *Dlgap2*- ген disc large-associated белка2 , *Gad1/67*-ген декарбоксилазы глутаминовой кислоты.

Рассмотрим более подробно изменения метилирования ДНК в конкретных генах под влиянием разных видов психоэмоционального стресса и при развитии ПТСР.

### *Ген глюкокортикоидного рецептора (Nr3c1)*

Глюкокортикоидные рецепторы являются одними из наиболее важных участников реакции на стресс, механизма отрицательной обратной связи гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (Nishi, 2012; Reul, DeKloet, 1985). Нарушение процессов с участием глюкокортикоидных рецепторов может приводить к психическим расстройствам (Reul et al., 2000). Один из генов глюкокортикоидного рецептора - ген *nr3c1* (neuron-specific glucocorticoid receptor).

В серии экспериментов А.Вивер на крысах Лонг-Эванс было показано, что характер материнской заботы оказывает влияние на эпигенетическое программирование экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора - *nr3c1* в гиппокампе потомков. Влияние материнской заботы на метилирование гена глюкокортикоидного рецептора подтверждалось данными о перекрестном воспитании. Установленный в первую постнатальную неделю жизни уровень метилирования гена *nr3c1* сохранялся и у взрослых потомков (Weaver et al., 2004). У потомков матерей с высоким уровнем вылизывания/груминга, было показано повышение способности связывания транскрипционного фактора - индуцибельного фактора роста нервов белка А - NGFI-A - (nerve growth factor-inducible protein A) с экзоном 17 промотора гена глюкокортикоидного рецептора в гиппокампе, что в результате приводило к повышению экспрессии гена. Этот эффект объяснялся ацетилированием гистонов и деметилированием CpG сайта 16, расположенного в участке связывания NGFI-A (Weaver et al., 2007). У потомков матерей с низким уровнем вылизывания/груминга детенышей этот сайт всегда оставался метилированным. У животных, воспитанных заботливой матерью повышается экспрессия глюкокортикоидных рецепторов и чувствительность петли глюкокортикоидной обратной связи, снижая, таким образом, экспрессию гипоталамического кортикотропин-рилизинг гормона. Это приводит к снижению реакции гипоталамо-гипофиз-адреналовой системы и меньшей тревожности в сравнении с животными, воспитанными самками в условиях плохой заботы о потомстве (Liu et al., 1997; Francis et al., 1999). На основе имеющихся данных А.Вивер предложила модель эпигенетического регулирования экспрессии гена гиппокампального глюкокортикоидного рецептора и его влияния на проявление стрессорной реакции у потомков в зависимости от особенностей материнского поведения (Weaver, 2009). Следует отметить, что изменения на уровне гена, возникшие в ранний период жизни, сохранялись и у взрослых животных, определяя длительные изменения в поведенческих реакциях.

Инъекции трихостатина А (ингибитора деацетилаз гистонов) взрослым потомкам, которые воспитывались самками с низким уровнем заботы о потомстве, приводили к изменению экспрессии эпигенетических маркеров в экзоне 1<sub>F</sub> промотора гена глюкокортикоидного рецептора - увеличению ацелирования гистонов и деметелированию ДНК, что способствовало лучшему связыванию NGFI-A и повышало экспрессию этого гена. Приведенные данные впервые продемонстрировали репрограммирование поведения, сформированного в ранний период жизни с помощью фармакологической модуляции эпигенома у взрослых особей (Weaver et al., 2004). Инъекции метионина (предшественник S-аденозил-метионина, донор метильной группы) приводили, напротив, к гиперметилованию ДНК и снижению экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора в зрелом гиппокампе потомков заботливых матерей (Weaver et al., 2005).

Ген глюкокортикоидного рецептора человека имеет 8 кодирующих экзонов (2-9) и девять 5' некодирующих первых экзонов (A-J), каждый из которых содержит свой промотор. У человека, жестокое обращение родителей с детьми также приводит к изменению у них реакции на стресс и является фактором риска суицида. Сравнительное исследование эпигенетических изменений в промоторе гена *nr3c1* ткани гиппокампа (post mortem) покончивших жизнь самоубийством, имевших и не имевших опыт жестокого обращения в детстве показало повышение метилирования экзона 1<sub>F</sub> промотора гена *nr3c1* только в случае наличия истории жестокого обращения в детстве (McGowan et al., 2009).

Таким образом, результаты работы двух исследовательских групп свидетельствуют об общих эффектах влияния особенностей материнской заботы на эпигенетическую регуляцию экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора в гиппокампе человека и крысы. Отклонения в метилировании длительно сохраняются на протяжении жизни и определяют нарушения в поведении.

Известно влияние пренатального стресса (расстройства настроения у матери) на повышение метилирования гена глюкокортикоидного рецептора в мононуклеарных клетках пуповинной крови новорожденных (Oberlander et al., 2008), что также может отражать возможный негативный прогноз для развития ребенка. Выявлена также связь между гиперметилованием промотора гена *nr3c1* в лейкоцитах взрослых людей и опытом сильного стрессирования в детстве (Turkay et al., 2012). Использование периферических тканей и получение сходных с нервной тканью результатов делают ген глюкокортикоидного рецептора возможным маркером для дальнейших исследований эпигенетических изменений под влиянием стресса, при развитии психопатологий.

Под действием хронического стресса на взрослых крыс промотор гена глюкокортикоидного рецептора 1 $\gamma$  также подвергается эпигенетической регуляции, но имеет свои особенности в разных тканях. При этом длительность сохранения эпигенетических изменений не исследовалась (Witzmann et al., 2012). Недавно была продемонстрирована связь между проявлением симптомов ПТСР и уровнем метилирования гена глюкокортикоидного рецептора у человека (Labonte et al., 2014). У пациентов с ПТСР по сравнению со здоровыми испытуемыми наблюдали более низкий общий уровень метилирования в промоторах экзонов 1в и 1с гена глюкокортикоидного рецептора в периферических Т-лимфоцитах, что соответствовало повышенному уровню мРНК. Уровень кортизола в слюне коррелировал с экспрессией 1в мРНК. Авторы этой работы делают вывод, что травматические события могут индуцировать изменения в метилировании ДНК, влияющие на экспрессию гена глюкокортикоидного рецептора и активность гипоталамо-адренкортикальной системы, а симптомы ПТСР связаны преимущественно с метилированием 1в варианта экзона исследуемого гена (Labonte et al., 2014). Поскольку эпигенетические изменения в гене глюкокортикоидного рецептора отличаются у пациентов с депрессией, покончивших жизнь самоубийством и больных ПТСР, возможно, особенности метилирования ДНК в нем могут быть использованы в будущем как биомаркер для дифференциальной диагностики психопатологий.

#### *Ген кортикотропин-рилизинг-гормона (Crh/crh)*

Кортикотропин-рилизинг-гормон синтезируется в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и является основным активатором гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (Dunn, Swiergiel, 1999). Основным ген кортикотропин-рилизинг-гормона – *crh* (*crh*).

Для того чтобы определить, является ли стресс в ранний период жизни причиной эпигенетических изменений в промоторе гена *crh*, использовали 8-недельных крысят, которых отнимали от матери между 2 и 13 постнатальными днями. Было показано повышение уровня транскрипции гена кортикотропин-рилизинг-гормона в ответ на стресс и снижение метилирования в промоторе гена *crh* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, особенно в двух CpG динуклеотидах, локализованных до и внутри cAMP-response element (CRE) (Chen et al., 2012).

Для исследования влияния стресса на уровень метилирования гена *crh* были использованы взрослые мыши инбредных линий, подвергавшиеся в течение 10 дней

стрессированию в тесте социального поражения, для которого установлено индуцирование агедонии и социального избегания (Krishnan et al., 2007). У таких мышей наблюдалось значительное повышение уровня мРНК *crf* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и снижение уровня метилирования в четырех CpG динуклеотидах промотора *crf*, включая CpG -266, а также снижение экспрессии генов ДНК метилтрансферазы 3b и гистон- деацетилазы 2, увеличение количества фактора Gadd45, способствующего деметилированию ДНК. После курса инъекций антидепрессанта, имипрамина, у мышей наблюдалось снижение уровня социального избегания, а уровень экспрессии мРНК *crf* и метилирование промотора *crf* изменялись, приближаясь к значениям, характерным для нестрессированных животных (Krishnan et al., 2007).

В гене кортикотропин-рилизинг-гормона - *crf* исследовали функциональную роль метилирования и его влияние на поведение мышей в тесте хронического социального стресса (Elliott et al., 2010). Было показано, что промотор гена *crf* метилирован сильно, а интроны метилированы слабо. Высокий уровень метилирования был отмечен в CpG сайте - 226, который расположен в середине cAMP-responsive element (CRE) нуклеотидной последовательности. Метилирование CRE сайта приводило к ингибированию транскрипции гена. Хронический социальный стресс у взрослых мышей приводил к длительному деметилированию этой области гена у побежденных животных, проявляющих социальное избегание (Elliott et al., 2010).

Результаты этих исследований показывают, что эпигенетическая регуляция гена *crf* существенна для развития депрессивного поведения (социальное избегание, агедония) в ответ на стресс и может изменяться под влиянием стрессорных воздействий как в ранний период жизни, так и у взрослых животных, причем деметилирование определенной области гена кортикотропин-рилизинг-гормона может быть долгосрочным.

#### *Ген аргинин-вазопрессина (Avp)*

Аргинин-вазопрессин (*arginine-vasopressin*) играет важную роль в регуляции жидкостного гомеостаза, кровяного давления и участвует в формировании реакции на стресс (Engelmann et al., 2004). Детерминируется геном *avp*.

Стресс в ранний период жизни у мышей является причиной гиперсекреции кортикостерона, которая сопровождается стабильным повышением в экспрессии *avp* в нейронах паравентрикулярного ядра гипоталамуса (Murgatroyd et al., 2009).

В гене *avp* 4 CpG островка (CGI1-4): первый расположен в промоторе, второй перекрывается со вторым и третьим экзоном, третий и четвертый - в нижележащей

последовательности. Участок, расположенный после регуляторной части гена *avp* – внутригенный регион (IGR - intergenic region), разделяет гены *avp* и *oxytocin* и содержит энхансер, важный для экспрессии. У контрольных мышей линий C57BL/6 и CD1 в CGI1 и CGI2 наблюдался низкий уровень метилирования, а в более удаленном энхансере, включающем CpG сайты с 7 по 32 и область CGI3 - высокий уровень CpG метилирования. Последний регион является высоко консервативным и важен для регуляции экспрессии гена *avp*. В CGI4 обнаружили только несколько нерегулярно расположенных и высоко метилированных CpG динуклеотидов. Было обнаружено гипометилирование многих CpG динуклеотидов, расположенных в энхансере гена *avp* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса у стрессированных в раннем периоде жизни мышей разных возрастов по сравнению с контрольными. Гипометилирование 7 CpG динуклеотидов (CpG 7, 10, 12, 13, 14, 15, 17) коррелировало с изменением уровня мРНК *avp*. Сайты, в которых наблюдается изменение метилирования (CGI3), служат как ДНК-связывающие участки для метилцитозин-связывающего белка - MeCP2, что, в свою очередь, регулирует транскрипцию и, как следствие, нейрональную активность (Murgatroyd et al., 2009).

Таким образом, стресс в раннем периоде жизни может динамически контролировать метилирование гена *avp* в постмитотических нейронах, формируя стабильные изменения в экспрессии *avp*, запускающие нейроэндокринные и поведенческие изменения, сопутствующие депрессии (Murgatroyd et al., 2009).

#### *Ген проопиомеланокортина (Pomc)*

Проопиомеланокортин (proopiomelanocortin) является предшественником адренокортикотропного гормона (АКТГ), ключевого медиатора адренокортикального ответа на стресс, кодируется геном *potc*.

Эпигенетическую регуляцию экспрессии гена гипофизарного проопиомеланокортина *potc* исследовали с помощью процедуры стрессирования, которая заключалась в виде ежедневного отъема мышат от матери на 1-10 постнатальные дни (Wu et al., 2014). В гене *potc* расположены два CpG островка (CGI), один включает проксимальный и дистальный промотор (GCI1), второй – кодирующий участок гена (GCI2). 16 CpG сайтов, локализованных в 5'UTR (CpG сайты 1-5) и в дистальном промоторном регионе (CpG сайты 6-16), показали высокий уровень метилирования. Стресс индуцировал гипометилирование избирательно, - только в CpG сайтах 6-16 дистального промотора *potc* (Wu et al., 2014). Интересно, что изменение происходило с некоторым латентным периодом после воздействия и сохранялось до 1 года. При этом общий уровень метилирования дистального промотора



гена *rotsc* был снижен у контрольных мышей в возрасте одного года. Такую же картину наблюдали у мышей, подвергшихся стрессированию в раннем периоде жизни. В остальных исследованных регионах (CpG сайты 17-28 первого CpG островка и CpG сайты 29-44 второго CpG островка) наблюдался низкий уровень метилирования ДНК, который не изменялся под действием стресса и не зависел от возраста животных. Сайты, в которых было показано изменение метилирования, связаны с регуляцией экспрессии гена при участии кортикотропин-рилизинг-гормона и аргинин-вазопрессина. Также была показана высокая аффинность связывания MeCP2 с дистальной частью промотора гена *rotsc*, который, взаимодействуя с гистоновыми деацетилазами (HDAC2), репрессирует экспрессию гена. Эти данные вносят свой вклад в понимание механизмов формирования стабильных эпигенетических изменений в нейроэндокринных клетках под влиянием стресса раннего периода жизни (Wu et al., 2014).

#### *Ген нейротрофического фактора мозга (Bdnf)*

Нейротрофический фактор мозга BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – белок, кодируемый геном *bdnf*, один из наиболее активно исследуемых нейротрофических факторов, стимулирующих и поддерживающих развитие нейронов. BDNF участвует в реакции на стресс, механизмах долговременной памяти, патогенезе нейродегенеративных и психических расстройств (Stankiewicz et al., 2013).

Ген *bdnf* содержит девять 5'- некодирующих экзонов (I-IX), каждый из них связан с уникальным промотором, который дифференциально сплайсируется с общим 3'- кодирующим экзоном IX, обеспечивая ткане-специфичную регуляцию гена в процессе развития и во взрослом организме (Nair et al., 2007; Aid et al., 2007; Liu et al., 2006; Sathanoori et al., 2004).

Для оценки уровня метилирования гена *bdnf* был выбран участок экзона IV, включающий сайт начала транскрипции и cAMP response element, а также участок, кодирующий экзон IX, который содержит большое число CpG сайтов и локализован после начала сайта транскрипции этого экзона. Продemonстрировано динамическое изменение метилирования экзона IV в процессе развития у крыс (Roth et al., 2011).

В исследовании использовали крыс, которые получали достаточную материнскую заботу в течение первой постнатальной недели жизни, либо помещались к самкам, которые проявляли в своем поведении жестокость. Ранний негативный опыт вызывает изменения в метилировании гена *bdnf* в префронтальной коре, которые сохраняются длительное время и проявляются у взрослых животных. Было показано значительное метилирование обоих

экзонов (IV и IX) *bdnf* гена (Roth et al., 2011).

Особенности метилирования гена *bdnf* исследовали и на модели ПТСР у взрослых крыс (предъявление кошки) (Roth et al., 2011). Самцам крыс двукратно предъявляли кошку в сочетании с содержанием в незнакомом окружении, после чего исследовали паттерн метилирования экзона IV гена *bdnf* и уровень экспрессии гена в различных районах гиппокампа. Используемое воздействие вызывало повышение метилирования исследуемого гена в дорсальном гиппокампе: наблюдалось гиперметилирование в CA1 поле гиппокампа и увеличение метилирования в зубчатой извилине. В вентральном CA3 поле было показано снижение метилирования. Наблюдали снижение уровня мРНК *bdnf* как в дорсальном, так и в вентральном поле CA1. Различия в уровне метилирования гена в разных районах гиппокампа авторы связывали с различной функцией дорсальной и вентральной областей гиппокампа. Эпигенетическое маркирование гена *bdnf* может быть причинной дисфункции гиппокампа в ответ на травматический стресс (Roth et al., 2011).

#### *Ген глиального нейротрофического фактора (Gdnf)*

Глиальный нейротрофический фактор GDNF (glial cell line-derived neurotropic factor) играет роль в дифференцировке и выживании нейронов, защищает нейроны от токсических воздействий (Pasqual et al., 2008; Bespalov, Saarma, 2007).

Эпигенетический статус гена глиального нейротрофического фактора *gdnf* исследовали у мышей двух инбредных линий BALB/c и C57BL/6 в вентральном стриатуме после хронического стрессирования в тесте CUMS (chronic ultra-mild stress) (Uchida et al., 2011). Процедура стрессирования включала длительное воздействие различных факторов: наклон клетки, иммобилизационный стресс, парное размещение, мокрая клетка, запах 10% уксусной кислоты, ограничения доступности еды и освещенности ночью. Далее животные проходили тестирование в различных поведенческих тестах. Линия BALB/c в сравнении с линией C57BL/6 демонстрировала слабую адаптивную реакцию в ответ на стрессирующие стимулы и использовалась как стресс-чувствительная линия. В промоторе гена *gdnf* вблизи сайта начала транскрипции расположен CpG островок, высоко консервативный у мыши, крысы и человека. Эффект 6- недельного хронического стрессирования привел к значительному повышению уровня метилирования в CpG сайтах 2 и 3 этого островка у линии BALB/c, который снижался под действием имипрамина. У линии C57BL/6 наблюдалось повышение метилирования только в сайте 2 (Uchida et al., 2011). Повышение метилирования в CpG сайте 2, усиливало связывание метилцитозинсвязывающего белка. У мышей линии BALB/c MeCP2, взаимодействуя с гистоновой деацетилазой HDAC2,

способствовал снижению уровня ацетилирования H3 и репрессии транскрипции *gdnf*, что приводило к формированию депрессивного состояния. У животных линии C57BL/6 было так же показано повышение уровня метилирования CpG сайта 2 и связывания метилцитозинсвязывающего белка MeCP2 после действия хронического стресса, при этом степень ацелирования гистона H3 и уровень экспрессии гена *gdnf* были выше (Uchida et al., 2011). Эти отличия объяснялись тем, что у линии BALB/c хронический стресс усиливал связывание с промотором *gdnf* комплекса MeCP2-HDAC2, а у линии C57BL/6 - комплекса MeCP2-CREB (Chahrour et al., 2008). Показан разнонаправленный эффект влияния метилирования одного и того же сайта гена *gdnf* на характер экспрессии гена. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что эпигенетические изменения в гене *gdnf* совместно с генетическими факторами и влиянием среды определяют особенности поведенческих ответов на хронический стресс.

#### *Ген Disc Large-associated protein 2 (Dlgap2)*

Disk Large-Associated Protein 2 (DLGAP2) – принадлежит к гуанилат киназам, связанным с мембраной и локализуется в постсинаптических окончаниях, принимает участие в процессах синаптического ремоделирования и нейрональной трансмиссии, кодируется геном *dlgap2*.

Скрининг геномного паттерна метилирования ДНК клеток гиппокампа был проведен у крыс, подвергнутых травматическому стрессу (модель ПТСР) - предъявление предметов с запахом кошки (Chertkow-Deutsher et al., 2010). Показано, что сниженная адаптация к травматическому стрессу коррелирует с рядом изменений в уровне метилирования ДНК в клетках гиппокампа крыс. У крыс, проявляющих ряд симптомов ПТСР в ответ на стрессирование наблюдалось гипометилирование в специфическом сайте гена *dlgap2*, который связан с изменением его экспрессии, что не проявилось у крыс со сниженной стресс-реактивностью и контрольных (Chertkow-Deutsher et al., 2010). Интересен тот факт, что выявленная модификация CpG была обнаружена не в промоторной области, а в 4 интроне, и тем не менее оказывала влияние на экспрессию гена. Подобные примеры влияния изменений в интронных последовательностях на модуляцию генной экспрессии продемонстрированы и в исследованиях на раковых клетках (Klengel et al., 2013).

### Ген FK 506 связывающего белка 5 (*Fkbp 5*)

Один из важных регуляторов гормональной системы – FK506 связывающий белок 5 (FKBP5), регулирует связывание кортизола и перенос глюкокортикоидных рецепторов (Binder et al., 2008; Xie et al., 2010). Ген FK506 связывающего белка 5 - *fkbp 5*

Функциональный полиморфизм, изменяющий взаимодействие между сайтом начала транскрипции и энхансерами в *fkbp 5*, повышает риск развития связанных со стрессом психических расстройств в зрелом возрасте за счет аллель-специфического деметилирования гена *fkbp 5*, которое индуцируется травматическими событиями в детском возрасте. Вызванное стрессированием в раннем возрасте деметилирование этого гена вызывает усиление транскрипции с последующим долгосрочным нарушением регуляции гормонов стресса, функций иммунных клеток и нервных клеток в структурах мозга, вовлеченных в реакцию на стресс (Klengel et al., 2013).

### Ген рецептора эстрогена - *alpha 1b* (*Er-alpha 1b*)

Рецептор эстрогена альфа1 (*estrogen receptor alpha 1*) - один из двух типов рецепторов эстрогенов, ядерных рецепторов, активируемых половым гормоном эстрогеном, одним из генов кодирующих рецепторы типа альфа1 является ген *er-alpha 1b*.

В исследовании метилирования в промоторе гена рецептора эстрогена *er-alpha 1b* клеток медиальной преоптической области гипоталамуса у потомков матерей с высоким и низким уровнем заботы о потомстве было показано повышение уровня метилирования у потомков с плохой заботой матери по сравнению с альтернативной группой (Champagne et al., 2006). Дифференциально метилированные регионы включают Stat5 (signal transducer and activator of transcription) связывающий сайт. Было показано снижение связывания Stat5 с промотором гена *er-alpha 1b* у взрослых крыс, воспитанных в условиях низкого уровня материнской заботы. Характер материнской заботы был связан с уровнем метилирования промотора гена *er-alpha 1b* у потомков и определял механизм программирования индивидуальных различий в экспрессии *er-alpha 1b* и последующее материнское поведение у потомков женского пола (Champagne et al., 2006). Другое исследование продемонстрировало влияние постнатального стресса (материнская депривация) на модуляцию метилирования гена эстрогенового рецептора и его генную экспрессию у взрослых крыс в тканях гиппокампа (Wang et al., 2013).

### *Ген декарбоксилазы глутаминовой кислоты 1 (Gad1/Gad67)*

Глутаматдекарбоксилаза (Glutamic acid decarboxylase- GAD ) – фермент, катализирующий преобразование глутамата в ГАМК. В организме млекопитающих GAD существует в виде двух изоформ - GAD67 и GAD65, кодируемых двумя генами - *gad1* и *gad2*.

Известно, что характер материнской заботы влияет на развитие нервной системы, включая ГАМК-ергическую систему, функция которой связана и с патогенезом психических расстройств (Zhang et al., 2010) . В исследовании влияния материнской заботы на метилирование промотора гена *Gad1* в гиппокампе зрелых самцов было показано, что у потомков заботливых матерей наблюдалось повышение уровня гиппокампального мРНК *Gad1*, снижение метилирования цитозина и повышение ацелирования гистона H3 по лизину 9 (H3K9ac) в промоторе гена *Gad1*. Экспрессия DNMT1 была повышена только у потомков матерей с плохим уходом за детенышами. Метод иммунопреципитации хроматина показал повышение связывания NGFI-A с H3K9ac в промоторе *Gad1* клеток гиппокампа крысят, воспитанных заботливыми матерями . Таким образом, материнская забота может влиять на развитие ГАМК-ергической системы за счет изменения метилирования *Gad1* промотора, активацию NGFI-A и его взаимодействие с *Gad1* промотором (Zhang et al., 2010) . Подобный путь воздействия на экспрессию показан и в гене глюкокортикоидного рецептора (Weaver et al., 2004). Повышенное метилирование промотора гена *Gad1* было установлено в образцах мозга больных шизофренией (post mortem) по сравнению с контрольными образцами (Costa et al., 2006; Grayson et al., 2005).

### *Ген рилина (Reln)*

Рилин ( *reelin*) принимает участие в регуляции миграции нервных стволовых клеток в процессе внутриутробного и раннего постнатального развития. Во взрослом мозге рилин регулирует позиционирование нейронов, образуемых в процессе нейрогенеза, модулирует синаптическую пластичность, процесс долговременной потенциации, стимулирует развитие дендритов (Grayson et al., 2006). Рилин кодируется геном *reln*.

В последовательности около сайта начала транскрипции гена рилина человека расположен большой CpG островок. Исследование этого участка в ДНК, выделенной из мозга больных шизофренией (post mortem) и контрольных образцов, показало, что при шизофрении наблюдается снижение экспрессии мРНК рилина в различных областях коры, что коррелирует с повышением уровня метилированных остатков в CGI. Интересно, что наиболее сильное метилирование показано для нестандартных позиций: сайт CpTrpG (-134) и

сайт CpApG (-139), которые важны для регуляции экспрессии гена (Grayson et al., 2005). Однако, в другой работе результаты по изменению уровня метилирования в гене *reln* у больных шизофренией не подтвердились (Tochigi et al., 2008). Не было показано влияния раннего опыта на метилирование регуляторных областей гена *reln* (Roth et al., 2009), хотя известен эффект повышения мРНК у взрослых потомков крыс, воспитанных заботливой матерью (Weaver et al., 2005). Установлено снижение уровня метилирования CGI гена рилина в ответ на условия, вызывающие страх. Однако, эти изменения не вызывали патологических последствий, так как уровень метилирования возвращался к начальным значениям через 24 часа (Miller, Sweatt, 2007).

В связи с изучением эпигенетических механизмов формирования реакции на стрессорные воздействия и постстрессорных состояний представляют значительный интерес работы, выявляющие вклад индивидуальных генетически-детерминированных конституциональных свойств нервной системы в их реализацию. Различия в характере эпигенетических и поведенческих изменений в ответ на хронический стресс продемонстрированы в работах на мышах высокоинбредных линий BALB/c и C57BL/6, различающихся по возбудимости нервной системы (Uchida et al., 2011). Связь между эпигенетическим статусом особей и индивидуальными особенностями проявления поведения показана также в работе А.Несбита (Nesbitt, 2014).

На рис.9 представлены наиболее изученные гены, схематично показаны участки генов, в которых происходит изменение степени метилирования CpG островков в результате действия стресса.

В исследованиях на человеке показана связь между травматическими событиями, профилем метилирования ДНК в различных генах, влияющем на их экспрессию и развитием симптомов ПТСР у человека (Raabe, Spengler, 2013) (табл.3). К ним относятся ген глюкокортикоидного гормона- *Nr3c1*, ген серотонинового транспортера- *Slc6a4*, ген рецептора серотонина- *Htr2a*, ген нейротрофического фактора мозга- *Bdnf*, ген гипоталамического пептида, активирующего аденилат-циклазу- *Adcyap1r1(pacap)*, ген катехол-О-метилтрансферазы - *Comp*, ген алсина, белка, связанного патогенезом амиотрофического склероза- *Als2*. Выявлены также изменения метилирования в промоторах генов, связанных с иммунным ответом. Среди них гены toll-like рецептора 1 и 3 (*Tlr1* и *Tlr3*), интерлейкина 8 (И8), лимфотоксина альфа (*Lta*), рецептора киллерных клеток lectin-like субсемейства G1 (*Klrg1*) (Uddin et al., 2010). Деметилирование генов, вовлеченных в иммунный ответ, показывает строгую корреляцию с развитием ПТСР после травмирующего события (Rusiecki et al., 2013).

Схема гена	Воздействие/расстройство
<p><i>Nr3c1</i></p>	Низкий уровень материнской заботы ( <i>Rattus norvegicus</i> – Long Evans)
	Жестокое обращение в детском возрасте (жертвы суицида)
	Травматический стресс (пациенты с ПТСР)
<p><i>Crh</i></p>	Модель депрессии, стрессирование в ранний период жизни ( <i>Mus musculus</i> L., <i>Rattus norvegicus</i> - Sprague Dawley)
<p><i>Avp</i></p>	Стрессирование в ранний период жизни ( <i>Mus musculus</i> L.)
<p><i>Pomc</i></p>	Стрессирование в ранний период жизни ( <i>Mus musculus</i> L. – C57BL/6N)
<p><i>Bdnf</i></p>	Стрессирование в ранний период жизни, модель ПТСР ( <i>Rattus norvegicus</i> - Long-Evans, Sprague Dawley)
<p><i>Gdnf</i></p>	Хронический стресс ( <i>Mus musculus</i> L. – C57BL/6J, BALB/c)
<p><i>Dlgap2</i></p>	Модель ПТСР ( <i>Rattus norvegicus</i> - Sprague Dawley)

Рис.9. Схема участков генов, в которых происходит изменение степени метилирования CpG островков в результате действия стресса.

Обозначения : прямоугольниками обозначены экзоны генов, овалами - CpG динуклеотиды или CpG островок. Белым цветом обозначено гипометилированное , черным – гиперметилированное состояние соответствующих участков. Стрелками указаны сайты начала транскрипции. В гене *Bdnf* изменение степени метилирования в 4 экзоне варьирует в зависимости от стрессирования и области мозга. В гене *Dlgap2* происходит гипометилирование в 4 интроне.

Интересно отметить, что изменение в метилировании ДНК в иммунных клетках происходит преимущественно в CGI внутри тел генов, которые имеют ограниченный промотор. Гиперметилирование таких областей коррелирует с сайленсингом соответствующих генов (Deaton et al., 2011) . Известно, что вследствие ПТСР повышается риск сопутствующих заболеваний, связанных с нарушением иммунитета и это результат дисбаланса работы гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. Установлено также гипометилирование ретротранспозонов LINE 1 и Alu- повторов в клетках крови пациентов с ПТСР, участников боевых действий (Rusiecki et al., 2013). Гипометилирование ретротранспозонов- это прямой путь к их активации и повышению мутабельности генов. Эти данные еще раз убеждают во взаимосвязи различных уровней функционирования

генома и определяют еще одно звено в сложной цепи системной регуляции генетических процессов.

Табл 3. Спектр генов, связанных с развитием симптомов посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), в которых изменяется профиль метилирования ДНК и уровень экспрессии.

Гены	Изменение профиля метилирования ДНК и его связь с развитием ПТСР	Ссылка
Adcyap1, Adcyap1r1	Метилирование CpG островков у женщин – симптомы ПТСР.	Ressler et. al., 2011
Slc6a4	Метилирование модифицирует ряд симптомов ПТСР, ↓ метилирования промотора связано с ↑ риска развития ПТСР, ↑ метилирования промотора – протекторный эффект против ПТСР	Koenen et. al, 2011
Slc6a4	↑ метилирования промотора - ↑ риска ПТСР (9R аллель)	Chang et. al., 2012
Nr3c1	↑ метилирования экзона 1F промотора у испытавших жестокое обращение в детстве – риск суицида  ↓ метилирования промоторов 1B и 1C - ↑ риска ПТСР (травма у взрослых)	McGowan et. al., 2009  Labonte et. al., 2014
Comt	COMT Met/Met генотип в сочетании с CpG метилированием определяет ингибирование страха при ПТСР	Norrholm et. al., 2013
Fkbp5	↓ глюкокортикоидов - ↑ деметилирования - ↑ экспрессии гена у пациентов из группы риска развития ПТСР	Klengel et. al., 2013
Гены иммунного ответа, нейрогенеза, Dnmt3b, Dnmt3l, импринтированные гены: Nmn, Magel2, Atp10a	ПТСР связано с:  ↑ метилирования гена dnmt3b,  ↓ метилирования гена dnmt3l,  профиль метилирования связан с активацией генов иммунного ответа, подавлением генов нейрогенеза и startle реакции	Uddin et. al., 2010
Гены иммунного ответа: Tpr, Clec9a, Apc5, Anxa2, Tlr8	ПТСР связано с:  ↓ метилирования Tpr, Anxa2,  ↑ метилирования Clec9a, Apc5, Tlr8	Smith et. al., 2011
Man2c1	↑ метилирования связано с ↑ риска развития ПТСР	Uddin et. al., 2011
Повторяющиеся элементы: LINE-1, Alu	Участники боевых действий в Афганистане и Ираке – гипометилирование LINE-1 и гиперметилирование Alu	Rusiecki et. al., 2012

Обозначения : ↑ - возрастание, ↓ - снижение уровня метилирования.

### 1.3.5. Транспозоны и стресс

Впервые предположение о важной роли транспозонов при стрессе было сформулировано в работах Б. Мак-Клинток ( McClintock, 1984; Biemond, Vieira, 2006). В настоящее время развитие этих представлений приобрело особую актуальность для



нейробиологии (Reilly et al., 2013). Уже описаны молекулярные каскады клеточных ответов на стресс, включающие мобилизацию транспозонов (Muotri et al., 2007; Чересиз и др., 2008). Ряд генов, участвующих в иммунном ответе, реакции на стресс или внешние стимулы, обогащены транспозонами (Lagemaat et al., 2003). Получены факты, свидетельствующие о том, что насыщенность геномов млекопитающих ретроэлементами, в частности - LINE1 (L1), связана с выполнением ими адаптивных функций и участием в эпигенетической регуляции (Abrusan et al., 2008). Зависимость активности LINE элементов млекопитающих и человека от действия стресса активно изучается *in vitro* и *in vivo*. Получено достаточно большое количество свидетельств индукции транспозиций мобильных генетических элементов широким спектром стрессовых факторов, среди которых наиболее изученным является действие теплового шока (Caru et al., 2000). Ишемия мозга у мышей также может приводить к индукции мобильных элементов в нейронах гиппокампа (Costain et al., 2006). Однако особенности ответа генома нейронов на активацию транспозонов исследованы недостаточно. В биоинформационной работе Abrusan (2012) исследовано влияние инсерций транспозонов на метаболическую активность нервной системы. Влияние транспозиций на метаболизм ЦНС показано для болезней Паркинсона, Альцгеймера, шизофрении, при атаках, депрессии, множественном склерозе и др. (Reilly et al., 2013). Существует точка зрения, что внедрения транспозонов увеличивают разнообразие нейронов и тем самым изменяют пластичность мозга (Singer et al., 2010). Нейроны генетически мозаичны по содержанию L1, что может определять разнообразие нервных клеток и индивидуальные особенности функционирования мозга (Muotri, Gage, 2006). Обнаруженный генетический мозаицизм может быть связан с формированием нейронных сетей, иметь функциональные последствия и в проявлении поведенческих особенностей (Muotri et al., 2007). В работе Muotri et al. (2009) продемонстрировано увеличение активности L1 человека на фоне усиленной пролиферации нейральных стволовых клеток под влиянием внешних воздействий в нейронах субгранулярной зоны зубчатой извилины гиппокампа взрослых мышей. Клетки, подвергшиеся ретротранспозициям, сохранили способность к делению. Именно они могут быть потенциальным источником генетической изменчивости в мозге и определять особенности реакции на внешние стимулы (Muotri et al., 2009). Единичное воздействие острого краткосрочного стресса также влияет на экспрессию ретротранспозонов в гиппокампе крыс и на процессы обучения и памяти (Hunter et al., 2015).

Отметим, что копияемость L1 в клетках мозга значительно выше, чем в геномах клеток других органов – сердца и печени, причем в мозге наибольшее число копий обнаруживается именно в гиппокампе и фронтальной коре. Кроме того, как показал полномасштабный

геномный анализ, структура многих генов и их экспрессия различается за счет непосредственно эндогенных L1 ретротранспозиций, что определяет и значительные различия между инбредными линиями мышей (Akagi et al., 2010).

LINE (long interspersed element) ретротранспозоны, являются неотъемлемой и значимой частью генома млекопитающих. LINE1 (L1) ретроэлементы могут изменять геном за счет участия в формировании новых генов, влияя на экспрессию, вызывая изменения транскрипции и трансляции близлежащих генов и путем создания псевдогенов. Будучи активными в геноме млекопитающих, L1 ретротранспозоны играют важную роль в создании генетической изменчивости за счет инсерционного мутагенеза в зародышевых клеточных линиях и вызывают соматический мозаицизм в мозге млекопитающих в процессе онтогенеза. Ретротранспозиции L1 в гены, которые экспрессируются в зрелом мозге также могут иметь отношение к процессам пластичности нейронов и в конечном итоге к индивидуальным особенностям функций мозга и поведения. Структура L1 ретротранспозона крыс подробно изучена D'Ambrosio et al. (1986). Инсерция L1 de novo показана в ген Psd-93 (кодирует белок постсинаптического уплотнения, работа данного белка связана с функционированием глутаматных рецепторов, в том числе и NMDA-рецепторов). Кроме того, показаны инсерции L1 de novo в 5'-область гена транспортера нейротрансмиттера Slc6a6 (Singer et al., 2010). В работе Evrony et al. (2012) показано внедрение L1 de novo в ген AKT3.

Таким образом, к настоящему времени накоплено достаточно много фактов относительно нейробиологической и психологической составляющей патогенеза постстрессорных состояний, в частности, ПТСР. Однако исследования ключевых генетических и эпигенетических механизмов, роли ретротранспозиций находятся на начальном этапе, но уже сейчас получен целый ряд интригующих сведений, свидетельствующих о важной роли эпигенетических изменений, прежде всего, метилирования ДНК генов, связанных с реакцией на стресс, в детерминации долговременных нарушений функций мозга и поведения в генезе психопатологий в зависимости от индивидуальных особенностей свойств нервных процессов. Поэтому исследование спектра эпигенетических модификаций, определяющих специфические особенности индивидуальной чувствительности к стрессирующим воздействиям и связанных с формированием постстрессорных патологий в связи с возбудимостью нервной системы представляется важным и составляет предмет исследования в данной работе.

## 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на самцах крыс линий, селектированных по порогу возбудимости нервной системы – ВП1, ВП2 (высокий порог возбудимости), НП1, НП2 (низкий порог возбудимости) (1, 2 – селекционные программы) в возрасте 5; 6; 7,5; 11,5 месяцев, а также на эмбрионах крыс, полученных от самок крыс тех же линий. Основная часть экспериментов выполнена с использованием двух наиболее контрастно различающихся по величинам порога возбудимости нервной системы линий – ВП1 и НП2, в нескольких экспериментах использованы крысы четырех линий- ВП1, ВП2, НП1, НП2. Селекция этих линий крыс ведется в лаборатории генетики ВНД Института физиологии им. И.П.Павлова РАН А.И.Вайдо с 1978 года (Вайдо, Ситдилов, 1979). Животные отбираются по порогу возбудимости большеберцового нерва при действии прямоугольных электрических импульсов длительностью 2мсек. Исходным материалом для селекции служила аутбредная популяция крыс Вистар (источник- питомник «Рапполово»). В качестве родителей для соответствующих линий отбирались крысы с высокими и низкими порогами возбудимости (ВП и НП соответственно). В первых поколениях селекции скрещивались полные сибсы, далее, начиная с третьего поколения во избежании депрессии и снижения наследственной изменчивости, скрещивание в каждой линии проводили в случайном порядке. При отборе контроль уровня возбудимости проводится в каждом поколении, оценивается 100 особей в каждой линии. Проводили две селекционные программы – 1 и 2, в ходе выполнения которых были получены 4 линии крыс с разными значениями порогов возбудимости нервной системы : ВП1, ВП2, НП1, НП2, линии ВП1 и НП2 – маргинальные, с наиболее контрастными различиями в уровне возбудимости. В настоящее время поддерживаются только две линии- ВП1 и НП2 ( линия ВП1- 72 поколение селекции, линия НП2- 62 поколение селекции), для удобства обозначаемые как ВП и НП.

Крысы выращивались в стандартных условиях вивария лаборатории генетики ВНД Института физиологии им.И.П.Павлова РАН ( 12 часовой световой день, условия поддержания комнатной температуры) и содержались в условиях свободного доступа к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им.И.П.Павлова РАН.

Для цитогенетических исследований животных (n=6-8 в контрольных и опытных группах, соответствующих разным срокам после стрессорного воздействия)

декапитировали, быстро извлекали биологический материал : костный мозг из бедренной кости (всегда через 24 часа после окончания воздействия) или исследуемые структуры мозга (гиппокамп -зона, соответствующая СА3 полю), сенсо-моторная зона коры (в разные сроки после окончания воздействия – 1 час, 24 часа, 2 недели, 2 месяца).

Для иммуноцитохимических исследований животных (n=5-8 в контрольных и опытных группах, соответствующих разным срокам после стрессорного воздействия) в соответствии со сроками фиксации подвергали процедуре транскардиальной перфузии, после которой животных декапитировали , извлекали мозг и подвергали стандартной гистологической обработке (см. 2.2.).

В экспериментах, связанных с оценкой количества вариаций копий генов и активности ретротранспозона L1 каждая группа состояла из 3-х животных.

При работе с образцами эмбрионального мозга было применено два экспериментальных подхода : 1) для оценки пролиферативной активности и частоты хромосомных aberrаций использовались 17-дневные эмбрионы , которые извлекались из рогов матки, фиксировались целиком в жидкости Карнуа для последующей гистологической обработки; 2) для исследования состояния хроматина в ядрах нейронов гиппокампа из головной части эмбрионов под бинокулярной лупой выделяли участок, соответствующий развивающемуся гиппокампу. В каждой экспериментальной и контрольной группе использовали не менее 5 эмбрионов от 5 разных самок .

## **2.1. Метод эмоционально-болевого стрессорного воздействия**

### ***2.1.1. Длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие (ДЭБС)***

Длительное (15 дней) эмоционально-болевое стрессирование (ежедневно по 13 минут) (Necht et al., 1972) : подача 6 неподкрепляемых (10 секунд) и 6 подкрепляемых током (2,5 мА, 4 секунды) световых сигнала с вероятностью подкрепления 0,5 осуществлялось в специальной установке , управляемой дистанционно с помощью компьютерной программы, определяющей чередование сигналов в соответствии со схемой К. Гехта (с.85). Неподкрепляемые и подкрепляемые током световые сигналы подаются в прозрачную камеру с электрифицированным решетчатым полом с одномоментным межсигнальным интервалом. Данная схема не позволяет животному выработать условный рефлекс, поскольку комбинации воздействия тока и света каждый день являются новыми и не повторяются в течение 15 дней. Таким образом, моделируется ситуация, способствующая возникновению состояния, подобного неврозу ожидания, а долгосрочные последствия пережитого стресса

соответствуют симптомам посттравматического стрессового расстройства и других постстрессорных патологических состояний.

Схема длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия по К. Гехту (Hecht et al., 1972)

Дни	Сигналы											
1	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0
2	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+
3	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+
4	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0
5	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+
6	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+
7	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0
8	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+
9	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0
10	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+
11	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0
12	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
13	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	+	+
14	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
15	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+

Обозначения: + - световые сигналы, подкрепляемые током; 0 – световые сигналы, неподкрепляемые током.

### **2.1.2. Короткое эмоционально-болевое воздействие (КЭБС)**

Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие у крыс в соответствии с первым днем схемы (Hecht et al., 1972) : однократное 13 минутное воздействие следующих сигналов - 6 неподкрепляемых (10 секунд) и 6 подкрепляемых током (2,5 мА, 4 секунды) световых сигнала. Световые сигналы подаются в прозрачную камеру с электрифицированным полом с интервалом между сигналами в 1 минуту. Процедура короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия была применена: а) к взрослым половозрелым самцам крыс исследуемых линий (во всех основных экспериментах-

время начала – 9 часов утра), в случае исследования влияния ритма суточной активности, воздействие производилось, начиная с 8 часов утра (утренняя фиксация), и с 20 часов вечера (вечерняя фиксация), б) к беременным самкам- на 16-й день беременности (пренатальное стрессирование, соответствующее 17-му дню эмбрионального развития, когда происходят пролиферативные процессы в гиппокампе) (Резников, 1981).

### **2.1.3. Массированное эмоционально-болевое воздействие (МЭБС)**

Массированное эмоционально-болевое воздействие заключалось в продолжительном однодневном применении схемы 2.1.1. – 15 серий сочетания подкрепляемых и неподкрепляемых ударами тока световых сигналов по 13 минут (195 минут) с межсигнальными интервалами в 1 минуту.

В экспериментах по оценке влияния мутагена на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга использовали канцеростатик циклофосфан (ЦФ). ЦФ- это мутаген, требующий ферментативной активации, которая катализируется системой микросомальных монооксигеназ различных тканей (Grochow, Colvin, 1979; Domeyer, Sladek, 1980) с выделением хлорэтиламина, обладающего алкилирующей активностью. ЦФ растворяли в дистиллированной воде (20 мг/мл) и вводили крысам внутривентрально в дозе 25 мг/кг массы тела. Мутаген вводили крысам через сутки после КЭБС. Тем же раствором и в той же дозе обрабатывали интактных животных, которые служили в качестве контрольных. Приемы работы с ЦФ соответствовали методике Баркан, Яковлевой, 1979.

## **2.2. Цитогенетические методы**

### **2.2.1. Метод приготовления препаратов клеток костного мозга крыс (метафазный метод)**

Использовали стандартную методику Ford, Hamerton, 1956, модифицированную в лаборатории П.Я.Шварцмана (РГПУ им. А.И.Герцена) с использованием тотальной окраски по Романовскому- Гимзе (Быковская и др., 1994). Выделяли костный мозг из бедренных костей животных, помещали в центрифужную пробирку с теплым физиологическим раствором или средой для культуры клеток крови- растворы Игла или Хенкса объемом 8 мл. Пробирки с выделенной тканью центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 1000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сливали, а полученный осадок в

небольшом количестве оставшегося физиологического раствора подвергали тщательному ресуспензированию пастеровскими пипетками разного диаметра. Далее полученную суспензию подвергали гипотонической обработке с помощью 0,55 % раствора KCl в течение 20 минут при 37° С. Затем после центрифугирования (5 мин., 1000 об./мин) проводили фиксацию материала путем добавления фиксатора 3:1 (метиловый спирт: ледяная уксусная кислота), тщательно ресуспензируя материал. Время фиксации в свежеприготовленной порции фиксатора составляло 10 минут. Осуществляли центрифугирование (5 мин., 1000 об/мин). Надосадочную жидкость сливали и добавляли вторую порцию фиксатора, сопровождая эту процедуру ресуспензированием. Смену фиксатора осуществляли три раза. В третьей порции фиксатора клеточную суспензию раскапывали на предметное стекло и выжигали фиксатор в пламени спиртовки. Далее высушивали препараты в течение ночи и хранили при  $t = -20^{\circ}\text{C}$  до окрашивания.

### ***2.2.2. Метод приготовления препаратов интерфазных ядер нейронов различных структур головного мозга крыс***

Выделенную ткань помещали в центрифужную пробирку с физиологическим раствором объемом 5 мл. Материал ресуспензировали при помощи пипеток. Пробирку с клеточной суспензией центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 1000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сливали, а полученный осадок в небольшом количестве оставшегося физиологического раствора подвергали тщательному ресуспензированию пастеровскими пипетками разного диаметра. Затем проводили фиксацию материала путем добавления фиксатора 3:1 (метиловый спирт: ледяная уксусная кислота), тщательно ресуспензируя материал. Время фиксации составляло 10 минут. Осуществляли центрифугирование в течение 5 минут (1000 об. / мин). Надосадочную жидкость сливали и добавляли вторую порцию фиксатора, сопровождая эту процедуру ресуспензированием. Смену фиксатора осуществляли три раза. В третьей порции фиксатора клеточную суспензию наносили на предметное стекло методом раскапывания. Далее высушивали препараты в течение ночи и хранили при  $t = -20^{\circ}\text{C}$  до окрашивания.

### ***2.2.3. Метод тотального окрашивания препаратов по Романовскому-Гимзе***

Предварительно размороженные препараты окрашивали 5%-ым раствором красителя Гимза (Merck) в 0,5 М фосфатном буфере  $\text{pH} = 6,8$  в течение 10 мин, нанося на каждое

стекло стандартный объем красителя – 1 мл и распределяя ровным слоем по поверхности препарата. Окрашенные препараты отмывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре.

#### ***2.2.4. Метод дифференциального С-окрашивания хроматина интерфазных ядер нейронов различных структур головного мозга крыс***

Дифференциальное С-окрашивание гетерохроматина проводили по модифицированному методу Самнера (Sumner, 1972): Обрабатывали препараты 5%-ым раствором  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  в течение 12 минут при температуре  $t=+62^\circ\text{C}$ . Проводили через серию спиртов убывающей концентрации ( $96^0 - 70^0 - 40^0$ ) и отмывали дистиллированной водой. Инкубировали в буфере 2xSSC, (pH= 6,8)- ( $0,3\text{M NaCl} + 0,03\text{ M}$  цитрат Na) в ультратермостате при температуре  $t=+62^\circ\text{C}$  в течение 1,5 часов. Окрашивали препараты 5%-ым раствором красителя Гимза (Merck). , растворенном в 0,5 М фосфатном буфере pH=6,8 в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Окрашенные препараты отмывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре.

### **2.3. Гистологические методы**

#### ***2.3.1. Гистологическая обработка ткани мозга***

Образцы ткани мозга взрослых животных фиксировали в 4% растворе параформальдегида в 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,4) в течение ночи при температуре  $t=+4^\circ\text{C}$  . Фосфатный буфер – PBS приготавливали из расчета 2,7 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,4 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8 г NaCl на 1 л дистиллированной воды . После фиксации мозг промывали в PBS буфере в течение 1 часа, обезвоживали проведением через серию этиловых спиртов возрастающей концентрации ( $40^0$ - $70^0$ - $96^0$  по 1 часу в каждом из спиртов) , абсолютный спирт два раза по 30 минут и метилбензоат (1 ч и ночь, при комнатной температуре) . Затем материал проводили через смесь метилбензоата и парафина ( 1 ч при температуре  $65^\circ\text{C}$ ) и две порции парафина ( 1ч и 2ч соответственно при температуре  $65^0\text{ C}$ ). Серии срезов мозга во фронтальной плоскости (7мкм) на уровне -2,80 мм от брегмы (Paxinos, Watson, 1986) изготавливали при помощи микротомы. Полученные срезы помещали на предметные стекла, покрытые 0,3 % раствором желатина.



Для работы с эмбриональным мозгом из правого и левого рогов матки беременных самок, прошедших процедуру стрессирования и контрольных, извлекали эмбрионы (17 ЭД) и целиком фиксировали в жидкости Карнуа с последующей проводкой и заливкой в парафин. Делали серийные фронтальные срезы (7 мкм) конечного мозга в области развивающегося гиппокампа, окрашивали гематоксилином по Бемеру, заключали в канадский бальзам и изучали под световым микроскопом. После качественной оценки препаратов определяли число митозов на 1000 клеток нервной ткани, количество клеток на разных стадиях клеточного цикла (профаза, метафаза, анафаза, телофаза), частоту хромосомных aberrаций, выявляемых анафазным методом- мосты и фрагменты, рассчитывали митотический индекс как отношение ранних фаз к более поздним (Епифанова, 1965).

## **2.4. Методы иммуноцитохимии**

Иммуноцитохимические методы- это методы идентификации в клетке различных белков, в основе которых лежит реакция антиген-антитело. Мы использовали эти методы для определения экспрессии метилцитозинсвязывающего белка- MeCP2, 5-метилцитозина, ацетилированных форм гистонов H3 и H4, фосфорилированных и метилированных форм гистона H3 в гиппокампе и коре крыс исследуемых линий.

### **2.4.1. Иммунофлуоресцентный метод**

Срезы депарафинизировали в ксилоле (2 раза по 15 минут) и регидрировали в спиртах убывающей концентрации ( $96^0$ - $70^0$ - $40^0$ ) и дистиллированной воде (5 мин). Затем осуществляли демаскировку (активацию) антигена путем кипячения срезов в 0,03 М цитратном буфере (pH=6,0) в микроволновой печи в течение 10 мин. Отмывали срезы в фосфатном буфере (pH=7,4) 2 раза по 5 мин. Блокировали неспецифическое связывание инкубацией с 10% нормальной блокировочной сывороткой (donkey normal serum) в течение 2 часов при температуре  $t=+25^0\text{C}$ . Инкубировали срезы с поликлональным первичным антителом к MeCP2 (goat MeCP2 (C-17) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) во влажной камере при температуре  $+4^0\text{C}$  в течение ночи. После инкубации стекла отмывали в фосфатном буфере (pH=7,4) 3 раза по 5 минут. Затем обрабатывали срезы с вторичным Rhodamin- или FITC-конъюгированным антителом (разведение 1:200) (donkey-anti-goat IgG-R) (Santa Cruz Biotechnology, USA) в течение 1 часа при комнатной температуре в темной камере. Отмывали в фосфатном буфере (pH=7,4) 3 раза по 5 мин. Применяли

контрокрашивание DAPI в течение 5 минут для идентификации ядер нейронов и хроматина. Окрашенные препараты заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories) .

#### **2.4.2. DAB- ABC-иммунопероксидазный метод**

Для ABC-иммунопероксидазного метода использовали DAB-ABC-Elite Kit (mouse/rabbit/goat) (Vector). Осуществляли подавление пероксидазной активности путем инкубации срезов в течение 30 минут в 0,3% растворе перекиси водорода после депарафинизации срезов и процедуры выявления антигенов в соответствии с последовательностью, описанной выше. Производили блокировку срезов в нормальной блокировочной сыворотке (rabbit normal serum) в течение 2 часов при комнатной температуре. Инкубировали срезы с первичными антителами к MeCP2 (goat MeCP2 (C-17) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA), к ацетилированным формам гистона H4 (panAcH4) (Lys5,8,12) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) и H3 (AcH3Lys9/14) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) во влажной камере в холодильнике в течение ночи при  $t=+4^{\circ}\text{C}$ . Последовательно инкубировали срезы с биотинилированным антителом (1 час) и ABC-комплексом (rabbit-anti-goat IgG) (1 час). В промежутках между описанными процедурами отмывали срезы фосфатным буфером (pH=7,4) 3 раза по 5 мин. Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый кит (DAB substrate kit, Vector Labs, USA). Окрашивали срезы в течение 5 минут до развития реакции. Далее стекла со срезами отмывали в дистиллированной воде 3 раза по 5 мин. Осуществляли контрокрашивание гематоксилином в течение 5 секунд для выявления ядерных оболочек нейронов. Осуществляли дегидрирование срезов через батарею спиртов возрастающей концентрации ( $40^{\circ}$ - $70^{\circ}$ - $96^{\circ}$ ) и ксилол. Препараты заключали в постоянную не водную среду DePeX или Entellan (Sigma) и анализировали на световом микроскопе.

#### **2.4.3. DAB-иммунопероксидазный метод с использованием универсального кита ( Quick-kit )**

Использовали первичные антитела к 5-метилцитозину (5-mc antibody) (Abcam) фосфорилированному по серину 10 гистону H3 (phH3Ser10 antibody) (Santa Cruz ) метилированному по лизину 4 гистону H3 (Histone H3 (di+tri methyl K4) antibody (Abcam), QuickKit (Vector) и DAB-набор (Vector).

После стандартной проводки препаратов, включавшей депарафинизацию (2 смены ксилола по 15 мин) и гидратацию (проведение через серию спиртов убывающей

концентрации: спирт абсолютный и 96°-й - по 10 мин, 70°-й и 40°-й - по 5 мин - и дистиллированную воду (5 мин)), проводили демаскировку антигенов посредством нагревания препаратов с цитратным буфером (рН = 6,0) в микроволновой печи. Далее проводили процедуры подавления эндогенной пероксидазной активности в 0,3% растворе перекиси водорода (30 мин.) и блокировки с использованием блокировочного раствора из QuickKit в закрытой увлажнённой камере при комнатной температуре в течение 2 часов.

Затем на срезы наносили первичные антитела против 5-метилцитозина (5-mc antibody) (разведение 1:100), pH3Ser10 (разведение 1:100) , H3K4(di+tri)meth (разведение 1:400), инкубировали в течение ночи в увлажнённой камере при +4° С. В качестве вторичного использовали биотинилированное антитело из QuickKit (инкубация в течение 1 часа при  $t=+37^{\circ}\text{C}$ ). Затем препараты выдерживали в тех же условиях со стрептавидин-пероксидазным комплексом (QuickKit). Визуализацию реакции с первичным антителом проводили с помощью DAB-набора. После окрашивания препараты промывали 5 мин в дистиллированной воде, подвергали обратной проводке через спирты 40°, 70°, 96° и ксилол (всё по 10 мин) и заключали в среду DePeX (Sigma).

## **2.5. Метод ПЦР скрининга сайт-специфичного внедрения транспозонов. Двухступенчатый ПЦР**

*Диссекция зубчатой извилины* осуществлена по модифицированному нами методу Hagihara H. (Hagihara et al., 2009).

*Выделение ДНК из образцов ткани* осуществлялось с помощью набора Минипреп, версия с магнитными частицами с SiO<sub>2</sub>, (Силекс, рекомендации производителя) , либо методом с использованием протеиназы К. В этом случае образцы гомогенизируют в буфере (3 М гуанидин гидрохлорид, 10 mM ЭДТА, 5% твин-20, 0.5% тритон X-100, 50 mM ХЕПЕС, рН 5.3), далее вносят протеиназу К. Гомогенат инкубируют в термостате при 37 °С в течение 1 суток, периодически перемешивая на вортексе. Добавляют равный объем хлороформа для депротеинизации. Инкубируют пробы в термостате при 60 °С в течение 1 часа. Центрифугируют при максимальных оборотах в течение 5 минут. Переносят супернатант, содержащий нуклеиновые кислоты, в чистую пробирку. Приливают равный объем изопропанола. Добавляют 100 мкл ацетата натрия. Центрифугируют при максимальных оборотах в течение 5 минут. Удаляют супернатант. Добавляют равный объем 70% этанола. Повторяют 3 последних шага. Растворяют осадок в трис-ЭДТА буфере в термостате

при 55 °C в течение 30 минут. Приготовленные таким образом образцы геномной ДНК хранят при -20 °C.

***а) Метод ПЦР-скрининга сайт-специфичного внедрения ретротранспозона L1 в ген grin1***

Для выявления вероятных внедрений транспозонов в районы гена глутаматного рецептора *grin1* и образования комплексов транспозон – фрагмент гена использован метод ПЦР-скрининга на сайт-специфичное внедрение мобильных элементов (Kunze и др. 1997). Для этого были созданы три варианта праймеров для каждой конкретной комбинации транспозон-ген: (1) 5' транспозон-специфичный праймер на основе нуклеотидной последовательности клона из GeneBank (DQ100473 -DQ100482, X61294 - X61297), ; (2) 3' праймер, относящийся к 3' концу клона транспозона; (3) и ещё один 3' праймер, относящийся к 5' концу исследуемого гена (нуклеотидная последовательность клона взята из GeneBank) (табл.4). Для исследования отбирались праймеры не формирующие димеры и показавшие высокую ПЦР эффективность . Из шести пар праймеров, используемых для «прогулки по гену», 5' праймер относился к концу ORF 2 ретроэлемента (DQ100473 - DQ100482, X61294 - X61297), а 3' праймеры соответствовали различным районам гена *grin1* (Gene ID: 24408, AC\_000071, NC\_005102). Для седьмого набора праймеров 5' праймер относился к концу гена *grin1*, в то время как 3' праймер – к началу ORF 1 ретротранспозона L1 ( праймеры 7 и 8). Таким образом, применение сочетания одного 5' и двух 3' праймеров дает два типа фрагментов: (1) фрагмент мобильного элемента определенной длины и (2) комбинированный фрагмент, состоящий из части мобильного элемента и фрагмента гена. Фрагмент второго типа будет существенно длиннее первого и должен появляться только в случае, если транспозоны внедряются в районы гена. В качестве матричной использовалась ДНК из зубчатой извилины гиппокампа крыс.

***б) Двухступенчатый ПЦР, подготовительный и направленный для детекции вставок ретротранспозона L1 в ген grin1***

Праймеры для ПЦР подобраны с помощью пакета FAST PCR (Kalendar et al., 2011) к промоторной области *grin1* гена и к последовательностям нескольких ретротранспозонов L1 (табл.5). В качестве промоторной выбрана область 1500 п.н. до точки начала транскрипции и 100 п.н. после точки начала транскрипции.

Второй используемый метод включает два этапа проведения ПЦР реакции и является более чувствительным. 99 циклов ПЦР с обратным праймером экзона 1, ориентируемый в сторону от промотора. В результате линейно накапливается одна цепь с экзоном 1 и промоторной частью и увеличивается количество таких участков в сравнении с другими из

геномной ДНК. Полученная ДНК используется для проведения направленной ПЦР с праймером от экзона 1 и обратным праймером от L1. В этом случае ПЦР будет проходить как между L1 элементами, так и между L1 и праймером от экзона 1 в случаях наличия вставки в промотор гена. Детекция продуктов ПЦР осуществлялась с помощью электрофореза в агарозном геле. Гели фотографировались цифровой CCD-камерой (Хеликон), а изображения сохранялись в виде jpg-файла.

Табл.4. Наборы праймеров для изучения сайт-специфичного внедрения мобильных элементов L1 в ген *grin1*

Набор	№	5' праймер	№	3' праймер	Положение
I	1	CTGAGTGAGCTAACCCAA	2	ACCAGGGCTCACTCTGA	1519-1536
			3	ATACAAGCCCACCCTGA	3318-3335
			4	GACCCTTGGGTCAGCAA	11122-11139
			5	CCCAGGTTTTATGGGAGA	18319-18337
			6	CCTGGGCTTAGCCTCA	20722-20738
II	7	CAGTCCGGTGTCACTCA	8	GCACCAGGGTTCCAGA	26678-26694

Табл.5. Наборы праймеров для двухступенчатого ПЦР.

Name	Sequence	Length	Tm (°C)	LC (%)	PQ (%)	Locus	gi 389675126:c25179752489166
4176	gacagggccatctgtatggcgt	22	61.7	92	87	<a href="#">Grin1 exon1, reverse</a>	3086<-3107
4177	tggtttactgcctcgcggaacatctg	26	62.9	95	94	<a href="#">Grin1 exon1, reverse</a>	2995<-3020
4178	cgaatgtcagcaggtgcattggtctc	26	64.8	77	77	<a href="#">Grin1 exon1, reverse</a>	2880<-2905
4179	ccaccacaggacaatgtctgagc	22	61.8	80	80	<a href="#">Grin1 promoter, Forward</a>	701->722
4180	gaaacaagatcggtgcttctacgac	26	60.6	98	93	<a href="#">Grin1 promoter, Forward</a>	801->826
4181	cgtcagcaaatcttccgatagagc	25	60.3	91	80	<a href="#">Grin1 promoter, Forward</a>	1051->1075
4182	gagcagtgttggtggtctctctcc	23	60.7	78	67	<a href="#">L1 Reverse (1-6558 bp)</a>	100<-122
4183	caaagaagtgcagactgacaggagc	25	60.7	77	77	<a href="#">L1 forward</a>	6059->6083
4184	gtgcagactgacaggagccgga	22	63.4	80	73	<a href="#">L1 forward</a>	6066->6087
4185	gccttatacagtttctcttgggcca	26	60.8	86	80	<a href="#">L1 Reverse</a>	140<-165
4186	gactgaaggaacacccattcagagc	25	60.4	91	80	<a href="#">L1 forward</a>	5977->6001
4187	ggaagagctgtgagtttgaggcca	24	61.4	81	81	<a href="#">Grin1 promoter, Forward</a>	184->207
4188	agctgtgagtttgaggccagcctggt	26	65.4	75	75	<a href="#">Grin1 promoter, Forward</a>	189->214
4189	agggcaaaccccttcacagttgggctgca	29	68.6	83	80	<a href="#">Grin1 promoter, Forward</a>	495->523
4190	cttatacagtttctcttgggcca	25	58.1	88	86	<a href="#">L1 Reverse</a>	139<-163
4191	ctggtttccaggtgtctgcct	24	63.8	83	67	<a href="#">L1 Reverse</a>	304<-327
4192	ggggaagccctgggtcctgctaag	24	66.5	76	76	<a href="#">L1 forward</a>	6360->6383
4193	aagcaaccagagcttccaggagct	24	61.9	81	81	<a href="#">L1 forward</a>	6247->6270

## 2.6. Амплификация, клонирование, секвенирование и идентификация фрагментов мобильных элементов

Нуклеотидный состав мобильных элементов достаточно изменчив, однако как в пределах ретозэлементов, так и в пределах транспозонов есть высококонсервативные участки. Это гены, необходимые для транскрипции или транспозиции. У мобильных элементов Класса I и LINE таким геном является обратная транскриптаза (RT). Для амплификации консервативных участков ДНК мобильных элементов при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) использованы вырожденные и прямые праймеры. Данная методика достаточно хорошо разработана (Kunze и др. 1997). Амплифицированные фрагменты генов мобильных элементов разделялись на агарозном геле, вырезались и очищались от агарозы с помощью Qiagen Purification Kit (USA). Очищенные фрагменты были лигированы в pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) и трансформированы в *E. coli* XL1blue компетентные клетки. Рекомбинантные клоны были изолированы с помощью Qiagen Plasmid Isolation Kit (USA), скринированы на наличие инсерта рестрикцией *EcoRI* и секвенированы.

## 2.7. Мультиплексный ПЦР в реальном времени для определения числа копий (CNV) генов *grin1*, *ywhaz*, *gapdh*, *rpl13a*

Гены *gapdh*, *rpl13a*, *ywhaz* относятся к генам домашнего хозяйства и во многих работах используются в качестве контрольных, как дополнительный внутренний контроль для q-PCR, поскольку являются референсными генами со стабильной экспрессией (Bonefeld et al., 2008; Egan et al., 2007; Fiandaca et al., 2001; Radonic et al., 2004; Swijssen et al., 2012; Tan et al., 2012; Vandersompele et al., 2002; Watkins-Chow, Pavan, 2008; Wu et al., 2007).

***Grin1*** ( glutamate receptor ionotropic, N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype, subunit1 ) кодирует ключевую NR1 (NMDAR1) субъединицу NMDA-рецептора, локализован на девятой хромосоме человека и на третьей хромосоме крысы. NMDA-рецепторы являются многофункциональными в регуляции функций мозга в норме и патологии, играют важную роль в детерминации нейрональной возбудимости и синаптической пластичности. Изменения в экспрессии и / или трансляции *grin1* приводят к дисфункции NMDA-рецепторов, что связано с патогенезом эпилепсии, шизофрении, ишемии, нейродегенеративных заболеваний.

NMDA -рецептор - это гетеромер, состоящий из 3-х типов субъединиц (NR1, NR2, NR3). NR1-субъединица является основной, входит в состав всех без исключения действующих NMDA -рецепторов и является ключевой в детерминации их свойств (Sucher et

al., 1996). NR1 субъединица кодируется одним геном *Grin1* и представлена рядом изоформ, возникающих в результате альтернативного сплайсинга. NMDA рецепторы, в частности NR1 субъединица, являются важнейшим звеном, запускающим под действием факторов внешней среды сигнальные каскады, влияющие на клеточные механизмы регуляции экспрессии генов, что приводит к долговременным изменениям в работе мозга (Reul et al., 2009).

***Gapdh*** - кодирует глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Продукт этого гена катализирует важный этап метаболизма углеводов: обратимое окислительное фосфорилирование глицеральдегид-3-фосфата в присутствии неорганического фосфата и никотинамид-аденин динуклеотида (НАД). Обладает активностью глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и нитрозилазы (nitrosylase), принимая участие в гликолизе и функции ядра. *Gapdh* участвует в процессах транскрипции, транспорте РНК, репликации ДНК, апоптозе.

***Rpl13a*** - кодирует рибосомальный белок L13a, являющийся компонентом 60S субъединицы. Этот белок играет важную роль в репрессии воспалительных генов как компонент GAIT комплекса (interferon-gamma-activated inhibitor of translation) (Kapasi et al., 2007). Кроме того, экспрессия белка L13a человека индуцирует апоптоз (Chen et al., 1999).

***Ywhaz*** – кодирует белок активации тирозин- 3- монооксигеназы/ триптофан -5- монооксигеназы (tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, zeta polypeptide). Продукт этого гена относится к 14-3-3 семейству белков, которые опосредуют сигнальную трансдукцию путем связывания с фосфосерин-содержащими белками. Представители этого высоко консервативного семейства белков найдены и у растений, и у животных, 99 % идентичности ортологов мыши, крысы, овцы. Этот белок взаимодействует с IRS1 белком, что демонстрирует его значение в регуляции чувствительности к инсулину.

#### *Выделение ДНК с использованием протеиназы K*

Тотальную ДНК выделяли с использованием экстрагирующего буфера (1 М гуанидин тиоцианат (guanidine thiocyanate), 10 mM ЭДТА (EDTA), 5% Твин (Tween 20), 0.5% Тритон X-100 (Triton X-100), 50 mM ХЕПЕС (HEPES), pH= 5.3 с добавлением 200 мкг протеиназы K) в эппендорфах объемом 2 мл (<http://primerdigital.com/dna.html>). Образцы инкубировали при 37°C в течение ночи. Водную фазу экстрагировали при 65 °C с хлороформом и изоамиловым спиртом. ДНК осаждали добавлением равного объема изопропанола. Осадок ДНК растворяли в ТЕ буфере (10mM Трис и 1 mM ЭДТА), pH= 8,0 (с РНКазой А) при 55 °C. ДНК дополнительно осаждалась и растворялась в ТЕ буфере, pH= 8,0.

### *Дизайн флуоресцентно меченых праймеров и антипраймеров*

Праймеры для количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time multicolour multiplex PCR) подобраны к экзонам (табл.6) с использованием программного обеспечения FastPCR (Kalendar et al. 2011). Дизайн праймеров с использованием FastPCR минимизирует вероятность формирования вторичных структур и димеров в количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени. Кроме того, антипраймеры не участвуют в формировании димеров, так как 3'-блокирующая молекула является также эффективным полимеразным блоком. Зонд содержит олигонуклеотид (14 п.о.), добавленный к 5'-концу прямого или обратного ген-специфического праймера, что делает менее вероятным формирование вторичных структур (шпилек). Температура отжига ( $T_m$ ) этого олигонуклеотидного зонда и комплементарного к нему антипраймера - 53°C, что рассчитано с помощью программы FastPCR (Kalendar et al. 2011). Часть ген-специфических праймеров имеет более высокую  $T_m$  - (58-65° C). При температуре 67-72°C праймеры могут связываться с мишенью и вызвать полимеризацию без особых помех со стороны антипраймера с более низкой температурой отжига. Если в дальнейшем температура падает до 50°C, антипраймер связывает свободный, одноцепочечный праймер, но не двуцепочечный ПЦР продукт. Поскольку концентрация антипраймера в 2-3 раза выше, чем концентрация праймера, большинство свободных праймеров должны связывать антипраймеры при 50°C, таким образом, сильно подавляя флуоресценцию. Поскольку 5'-конец праймера комплементарен 3'-концу антипраймера, взаимодействие опосредовано экситонами (exciton) (Fiandaca et al. 2001), (Li et al. 2006) (т.е., прямой контакт - блокировка) между 5'-флуорофором и 3'-блокатором и антипраймером, что для большинства флуорофоров обеспечивает сильную блокировку. Нами использовался 3' Eclipse® Dark Quencher, который имеет широкий спектр длин волн поглощения (390-625 нм), что подходит для блокировки нескольких флуорофоров одновременно, включая FAM (6-Carboxyfluorescein, максимум эмиссии при длине волны -520 нм) и Cy5 (максимум эмиссии при длине волны -673 нм), используемых для мультиплексной ПЦР. Праймеры синтезированы в Eurofins MWG Operon (Германия).



Табл.6. Праймеры, используемые для мультиплексной ПЦР в реальном времени

3881	GTGAGTGCATCTGCGTCTCAGGA	32->54	61.0		<i>rpl13a</i> (60S ribosomal protein L13a);
3884	CTTGCTGCGACCCAAGGCGTCTTTAGC CGTACAAGG	355<-376	59.4	5'-Cy5	3881-3884, 3881-3885; 345bp
3885	CTTGCTGCGACCCAAGGCGTCTTTAGC CGTACAAGG	355<-376	59.4	5'-FAM	
3883	CTTGCTGCGACCCAACATCGGATACCC AAGGAGACG	813->834 (D17615)	58.5	5'-Cy5	<i>ywhaz</i> (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide); 3877-3883; 363bp
3877	GAAGCAGTTTGAACACTGGCCCT	1163<-1185 (D17615)	60.5		
3858	AGGCCCCATAACACAGCTGGAC	22069<- 22090	61.9		<i>grin1</i> (glutamate receptor ionotropic, N-methyl-D-aspartate (NMDA); 3858 -3865; 386 bp
3865	CTTGCTGCGACCCAAGGCTGTGGCTTA CTAGTGCCT	21705->21726	59.8	5'-FAM	
3871	TGGGTCGCAGCAAG		52.8	3'-Eclipse® Dark Quencher	Antiprimer (universal quencher)

***Количественная многоцветная мультиплексная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time multicolor multiplex PCR )***

Количественная мультиплексная ПЦР позволяет одновременно обнаруживать несколько различных последовательностей в одной пробирке. Исследуемые последовательности выявляются по характерной люминесценции ( флуоресцентной эмиссии) флуоресцеина (FAM канал) и цианина Cy5 (Cy5 канал). Количественную мультиплексную ПЦР в реальном времени проводили с использованием LightCycler® 480 System (Roche) на 384-луночных планшетах. Состав каждой реакции (объем-15мкл ) : 1 × Phire® (Thermo Scientific), 15нг ДНК, 200μM dNTP, 0.12 U Phire® Hot Start II DNA polymerase (Thermo Scientific) , два меченых флуорофорами праймера ДНК (200 нм) на 5'-конце и два немеченых праймера (200 нм) , антисмысловой праймер (3871) длиной 14 нуклеотидов (500

нМ), меченый 3' Eclipse® Dark Quencher . Амплификацию проводили по следующей программе: 98 ° C, 1 мин; 15 циклов по 10 сек при 98 ° C, 10 сек при 62 ° C, 10 сек при 72 ° C; 40 циклов по 10 сек при 98 ° C, 20 сек при 67 ° C, 5 сек при 72 ° C, 30 с при 50 ° C ( флуоресценция контролирует этот шаг ). Для каждого исследуемого гена (grin1, uwhaz, gapdh, rpl13a ) проводили три независимых эксперимента, чтобы определить среднее значение (SD) относительного числа копий. Проводили количественное сравнение Ct (Cycle threshold) неизвестных образцов со стандартной кривой образца с известным числом копий. Все образцы ДНК были представлены в 384-луночных планшетах четыре раза. Значения Ct автоматически выбираются в LightCycler® 480System для каждого типа анализа. Далее данные экспортируются в Microsoft Excel для дальнейшей обработки. Эффективность амплификации является важным фактором при выполнении относительной количественной оценки. В программе была задана стандартная кривая с коэффициентом корреляции 0,99 и с отклонением около -3.3 на полу-логарифмическом участке (десятикратные различия в концентрации гена-мишени должны привести к значениям Ct с различиями в 3.3) . На практике коэффициент корреляции был близок к идеальному (0,97 до 0,99) для всех комбинаций праймеров, которые были использованы для qПЦР.

## **2.8. Методы анализа изображений**

### ***2.8.1. Анализ количественных характеристик гетерохроматина в нейронах различных структур мозга крыс***

Обработка, накопление и анализ цитогенетических данных производились в Центре обработки изображений, созданном в Отделе автоматизации исследований и моделирования физиологических функций Института физиологии им. И.П. Павлова для анализа биологических и медицинских изображений (Дудкин и др.,1999). Информационная система реализована на установке, включающей: устройства для ввода и преобразования изображений, содержащую: микроскоп Jenaval (Carl Zeiss) с фильтром, соответствующим дискриминации хромоцентров на мониторе; телевизионную камеру малогабаритную типа CCD PИH758 с объективом CCD-5 (ПЗС 1/2, 758x582 эл,ч/б, разрешение 570 твл), оптический адаптер для сопряжения телевизионной камеры с микроскопом; фреймграббер типа MAG - 512 - плату ввода видеоизображения в компьютер (ввод/ вывод полного видео за 40 мс, "прозрачный" режим, видеопамять - 512x512x8 бит, объем видеопамяти - 4МБ, автоматическая запись последовательности кадров); IBM совместимый компьютер на базе процессора AMD K5-90 (оперативная память объемом 32 мБ, HDD-1.2 Gб), видеоадаптер типа TSENG ET-6000 (объем видеопамяти 2 МБ), оснащенный устройством чтения компакт-

дисков, монитором MultiSync M700 повышенного разрешения (1280\*1024), видеоконтрольным устройством - ВКУ (40 см по диагонали, 600 твл. ВК40В64) и устройством для накопления информации - ZIP.

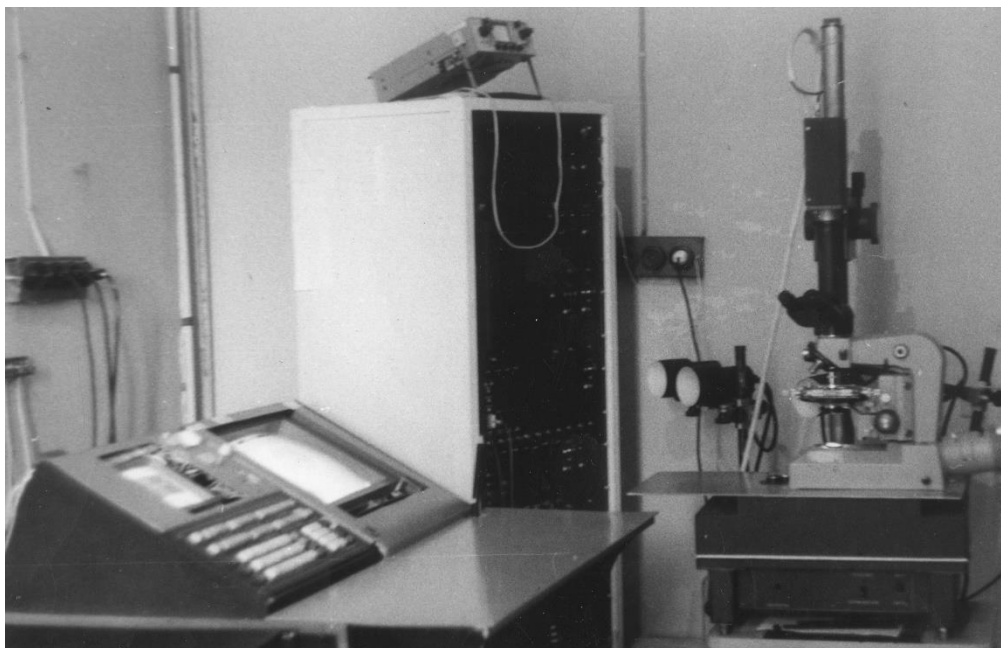
Результаты анализа всех свойств клеточных ядер и хромоцентров в них записывались в несколько связанных таблиц (ASCII файлы) и экспортировались в программы STATGRAPHICS PLUS и STATISTICA - 6.0 для проведения статистического анализа.

Часть изображений обрабатывали с использованием интерактивного телевизионного анализатора изображений АИ-1 (Всесоюзный телевизионный Институт) лаборатории научно-исследовательской кинематографии Института физиологии им.И.П.Павлова РАН, включающего блоки питания и обработки видеосигналов, микроскоп ЛОМО (МБИ-13) с видео-камерой (рис.10а), видеоконтролирующее устройство (ВКУ-40), световое перо, монитор для вывода результатов измерения (ВКУ-23), клавиатуру (рис.10б).

В обоих случаях проводили тщательный предварительный отбор анализируемых ядер клеток по площади ядра . Использовали наиболее крупные ядра , площадь которых находилась в диапазоне 250-350 мкм<sup>2</sup>, что указывало на высокую вероятность их принадлежности к нейронам. Изображения анализируемых ядер представлены на рисунке (рис.11 ).

### ***2.8.2. Анализ изображений срезов головного мозга крыс после иммунофлуоресцентного окрашивания***

Препараты изучали с помощью флуоресцентного микроскопа МИКМЕД11 (фильтры-Rhodamin, DAPI). Изображения срезов вводили в компьютер (черно-белая цифровая видеокамера сX05 Baumer Optronics) и анализировали с использованием программного обеспечения FISH-ВидеоТест (Санкт-Петербург). Учитывали количество мест связывания с антителами . Анализировали не менее 100 ядер на одном срезе (4-5 срезов на препарат). В каждом варианте опыта (контроля) изучали не менее 5 препаратов , полученных от разных животных. Микрофотографии, демонстрирующие иммунореактивность клеток к антителу против метилцитозинсвязывающего белка (MeCP2) представлены на рис.12.

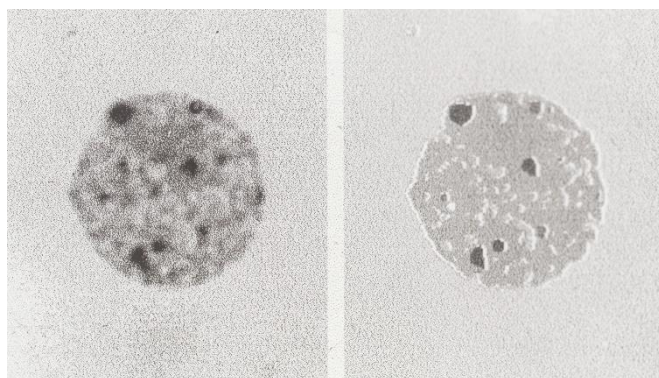


а



б

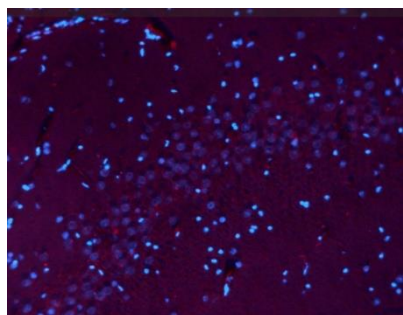
Рис.10. Интерактивный телевизионный анализатор изображений АИ-1 (Всесоюзный телевизионный Институт) : а) общий вид: блоки питания и обработки видеосигналов, микроскоп ЛОМО (МБИ-13) с видео-камерой, ВКУ-40, ВКУ-23, клавиатура; б) ВКУ-40 - видеоконтролирующее устройство , световое перо, ВКУ-23- монитор для вывода результатов измерения , клавиатура.



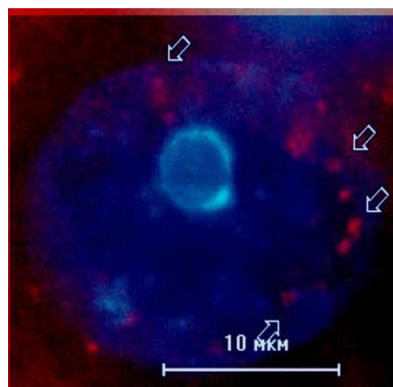
а

б

Рис.11. Микрофотографии, демонстрирующие расположение хромоцентров в ядрах нейронов гиппокампа : а) без обработки ; б) после обработки изображения ( дискриминации хромоцентров) (увеличение-100х)



А



Б

Рис.12. Микрофотографии, демонстрирующие иммунореактивность к метилцитозинсвязывающему белку MeCP2 в нейронах гиппокампа (поле СА3) : 1 ат - anti-goat MeCP2 (Santa-Cruz), А (увеличение 10х) ,Б (увеличение-100х) 11 ат - -Rhodamin-conjugated (Santa-Cruz), контрокрашивание-DAPI.

### ***2.8.3. Анализ изображений срезов мозга крыс после иммуноцитохимического окрашивания с использованием DAB***

Препараты анализировали с помощью микроскопа МИКМЕД 11 в обычном световом режиме. Изображения срезов вводили в компьютер при помощи цифровой фотокамеры-

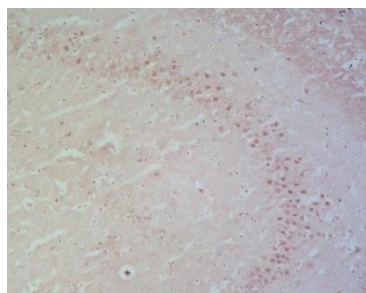
Canon . Учитывали количество мест связывания с антителами и количество иммуноположительных клеток . Анализировали не менее 100 ядер на одном срезе (4-5 срезов на препарат). В каждом варианте опыта (контроля) изучали не менее 5 препаратов , полученных от разных животных. Примеры микрофотографий, демонстрирующих иммунореактивность в клетках гиппокампа и сенсомоторной зоны коры представлены на рис.13 и рис.14.



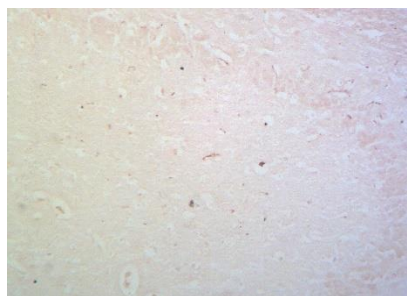
А



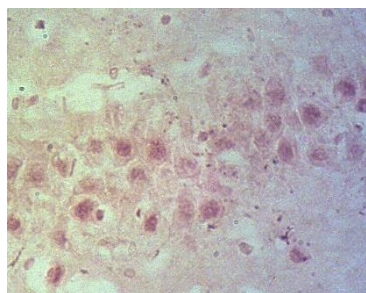
Г



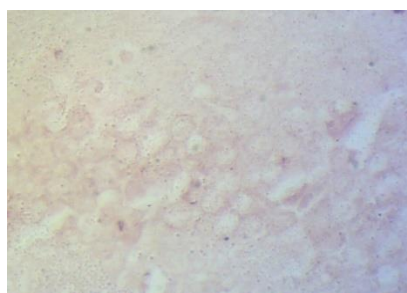
Б



Д



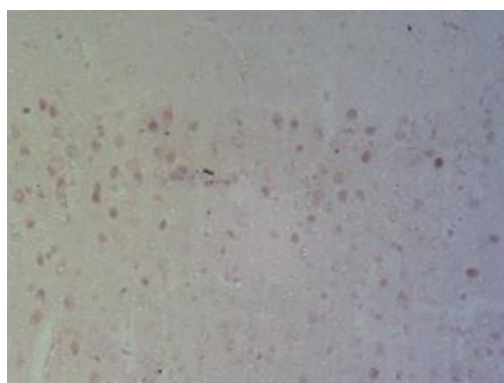
В



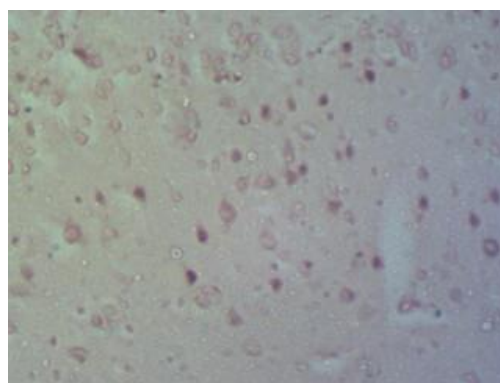
Е

Рис.13. Микрофотографии, демонстрирующие проявление иммунореактивности к фосфорилированному по серину 10 гистону H3 (1 антитело- pH3ser10 Santa Cruz, 11 антитело- универсальное биотинилированное из Quick Kit Vectastain) в клетках гиппокампа крыс : иммуноположительные клетки в СА3 поле гиппокампа- А- (увеличение- 4х),Б- (увеличение-10х), В- (увеличение-40х), отсутствие иммуноположительной реакции- Г- (увеличение- 4х),Д- (увеличение-10х), Е- (увеличение-40х).

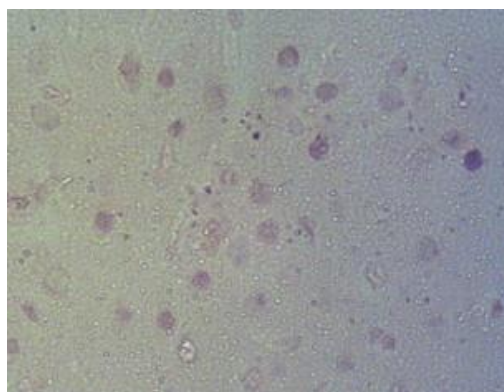




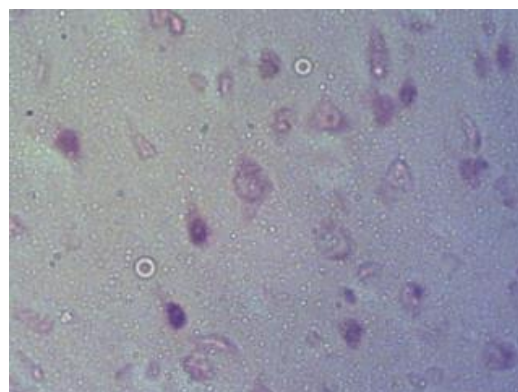
А



Б



В



Г

Рис.14. Микрофотографии, демонстрирующие иммунореактивность клеток верхних (А-ув.10х, Б-ув.40х) и нижних (В-ув.20х, Г-ув. 40х) слоев сенсомоторной зоны коры к H3phS10.

## 2.9. Статистическая обработка результатов

Для обработки результатов применяли стандартные программные пакеты Statgraphics Centurion XV11 и Statistica 6.0, подсчитывали и анализировали общепринятые статистические величины - медианы, средние арифметические величины и стандартные ошибки. Для сравнения данных использовали критерии Стьюдента и Фишера, методы однофакторного дисперсионного анализа, многофакторного дисперсионного анализа, непараметрические критерии Вилкоксона, Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель работы- исследование цитогенетических и молекулярно-клеточных механизмов действия стресса и формирования постстрессорных состояний . Важным фактором, определяющим реакцию организма на стрессорные воздействия является возбудимость , - основной параметр функционального состояния нервной системы. Уровень возбудимости нервной системы детерминирует особенности проявления комплекса поведенческих, физиологических, биохимических, нейроэндокринных признаков (Вайдо, 2000) и влияет на протекание генетических и цитогенетических процессов. Состояние генетического аппарата клеток отражают такие цитогенетические показатели как уровень хромосомных aberrаций и степень конденсации хроматина, методы исследования которых в активно пролиферирующих тканях являются надежным и часто используемым критерием его оценки. Изучение этих процессов в мозге имеет ряд методических ограничений в связи с отсутствием постоянных клеточных делений в постмитотических нейронах. Поэтому оценить степень нестабильности генома по частоте хромосомных нарушений в центральной нервной системе в связи с базовыми конституциональными генетически детерминированными особенностями нервных процессов возможно только в эмбриональном мозге на ключевых этапах активной пролиферации клеток в определенных районах . В структурах зрелого мозга показателем активности генома в нейронах может быть степень конденсации хроматина и связанные с ней цитогенетические параметры ядра : количественные характеристики конденсированного хроматина и высококонденсированного С-гетерохроматина (площадь и число хромоцентров, их оптические и пространственные свойства). Изменения конденсации хроматина связаны с эпигенетическими модификациями ДНК и гистонов, исследование которых в разных структурах мозга, их клеточного распределения и особенностей экспрессии представляется адекватным с применением методов иммуноцитохимии. Рассмотрим основные результаты оценки цитогенетических и молекулярно-клеточных характеристик клеток головного мозга у интактных крыс линий, контрастно различающихся по возбудимости нервной системы- ВП1 и НП2 в различные периоды онтогенеза (16-17 эмбриональный день, в возрасте 24 дней, 5, 6, 7,5, 11,5 месяцев). Ряд экспериментов выполнен на четырех линиях крыс, двух низковозбудимых- ВП1, ВП2, и двух высоковозбудимых- НП1, НП2, имеющих в пределах каждой группы близкие значения порогов возбудимости нервной системы, но различающиеся по генетическому фону, что дает возможность расширения доказательной базы для искомых закономерностей связи между цитогенетическими и молекулярно-клеточными параметрами и возбудимостью нервной системы.



### 3.1. Цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики нейронов развивающегося и зрелого мозга, а также костного мозга интактных крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы

#### 3.1.1. Развивающийся мозг

Результаты сравнения спонтанного уровня хромосомных aberrаций в клетках развивающегося мозга эмбрионов крыс (16-17 эмбриональный день) представлены в табл.7. Проанализированы стандартно определяемые анафазным методом хромосомные нарушения типа мостов и фрагментов, а также общий уровень всех типов хромосомных нарушений.

Таблица 7. Частота хромосомных aberrаций в клетках развивающегося гиппокампа интактных крыс линий ВП1, НП2 (%)

Тип нарушений	ВП1 $X \pm m$	НП2 $X \pm m$
Мосты	$1.73 \pm 0.37^*$	$0.64 \pm 0.27$
Фрагменты	$0.67 \pm 0.21^*$	$0.08 \pm 0.07$
Все типы нарушений	$2.40 \pm 0.50^*$	$0.72 \pm 0.27$

Обозначения : \*- отличия от линии НП2 достоверны ( $P < 0.01$ ).

Как видно из табл.7, спонтанный уровень хромосомных aberrаций, отдельно мостов и фрагментов, а также всех типов встречающихся нарушений в развивающемся мозге эмбрионов крыс низковозбудимой линии ВП1 значительно превосходит аналогичный показатель крыс линии НП2.

В табл.8 представлены показатели пролиферативной активности клеток развивающегося мозга крыс двух линий ВП1 и НП2 – митотический индекс и количество клеток, находящихся на разных стадиях митотического цикла : в профазе, метафазе, анафазе и телофазе.

Таблица 8. Митотический индекс и показатели пролиферативной активности клеток развивающегося гиппокампа интактных крыс линий ВП и НП2.

Показатель	ВП1	НП2
	$X \pm m$	$X \pm m$
Митотический индекс	$6.5 \pm 0.2^*$	$4.7 \pm 0.3$
Число клеток		
В профазе	$23.5 \pm 1.3^*$	$16.0 \pm 1.6$
В метафазе	$20.1 \pm 0.8^*$	$16.4 \pm 1.2$
В анафазе	$22.0 \pm 2.5^*$	$13.5 \pm 1.3$
В телофазе	$2.5 \pm 0.5$	$2.5 \pm 0.5$

Обозначения : \*- отличия от контроля линии НП2 достоверны ( $P < 0.001$ )

Как следует из табл.8, для клеток развивающегося мозга крыс низковоzbудимой линии ВП1 в норме характерна повышенная пролиферативная активность по сравнению с эмбрионами крыс высоковозбудимой линии НП2. Анализ фаз митоза показывает, что с возбудимостью нервной системы связана продолжительность первых трех фаз митоза, для телофазы эта закономерность не прослеживается.

Количественные характеристики (площадь и число хромоцентров) выявляемого рутинным окрашиванием общего пула конденсированного хроматина и выявляемого методом дифференциального окрашивания С-гетерохроматина в интерфазных ядрах нейробластов и дифференцирующихся нейронов в области гиппокампа у интактных эмбрионов крыс линий ВП1 и НП2, различающихся по возбудимости нервной системы представлены в табл.9.

Таблица 9. Количественные характеристики общего пула конденсированного хроматина (а) и С-гетерохроматина (б) в интерфазных ядрах нейробластов и дифференцирующихся нейронов в области гиппокампа у интактных эмбрионов крыс линий ВП1 и НП2 .

Линия крыс	Площадь хромоцентров, мкм <sup>2</sup>  X ± m	Число хромоцентров  X ± m
ВП1 (а)	11.06 ± 0.32*	8.83 ± 0.30
НП2 (а)	5.85 ± 0.14	7.81 ± 0.17
ВП1 (б)	6.98 ± 0.24*#	6.53 ± 0.13
НП2 (б)	4.36 ± 0.15#	6.32 ± 0.13

Обозначения : \*- отличия от соответствующих значений у линии НП2 достоверны (P < 0.05), # - отличия от площади общего пула конденсированного хроматина у той же линии достоверны (P < 0.05)

Как следует из табл.9, площадь хромоцентров, характеризующих общий пул конденсированного хроматина и С-гетерохроматина эмбрионов крыс низковольтной линии ВП1 превосходит аналогичные показатели высоковольтной линии НП2. По количеству хромоцентров межлинейных различий не обнаружено. Следует отметить, что дифференциальное окрашивание позволяет выявить среди общего объема конденсированного хроматина районы С-гетерохроматина, о чем свидетельствуют сниженные значения площади последнего.

### 3.1.2. Зрелый мозг

#### 3.1.2.1. Площадь С-гетерохроматина

Одной из задач проведенного исследования явилось сравнительное исследование площади С-гетерохроматина в нейронах гиппокампа (поле СА3) крыс двух линий ВП1 и НП2 разных возрастных групп с целью выявления возможного влияния возраста животных на изучаемый цитогенетический показатель и его связь с уровнем возбудимости нервной системы животных.

В табл.10 представлены результаты измерения площади С-гетерохроматина в нейронах гиппокампа (поле СА3) крыс в возрасте : 24 дня, 5;6;7,5;11,5 месяцев

Таблица 10. Площадь С-гетерохроматина (мкм<sup>2</sup>) в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) интактных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста

	24 дня x±m	5 месяцев x±m	6 месяцев x±m	7,5 месяцев x±m	11,5 месяцев x±m
ВП1	2,91±0,08*	2,69±0,4	2,21±0,09*	2,53±0,09*	1,69±0,06
НП2	2,32±0,04	3,09±0,4	1,94±0,09	1,96±0,09	1,79±0,06

Обозначения: \*- отличия от значений линии НП2 достоверны, P<0.05

Следует отметить, что в возрастной группе 5 месяцев наблюдается высокая вариабельность исследуемого показателя, зависящая от сезона года. Но объединение однородных данных позволяет заключить в целом об отсутствии межлинейных различий в этот период онтогенеза животных (табл.7). Как видно из табл.10, площадь С-гетерохроматина снижается с возрастом, но в возрастных группах 24 дня, 6 и 7,5 месяцев значения этого показателя у крыс линии ВП1 превосходят значения линии НП2, что согласуется с результатами, полученными на эмбрионах (16-17 ЭД) и отражает линейные характеристики животных, закрепленные отбором.

### 3.1.2.2. Экспрессия эпигенетических модификаций

Следующей задачей являлось сравнительное исследование базового уровня экспрессии эпигенетических модификаций (MeCP2, метилирования ДНК, ацетилирования гистонов H3 и H4, фосфорилирования и метилирования гистона H3) у интактных крыс двух линий ВП1 и НП2 разного возраста.

#### *Метилцитозинсвязывающий белок (MeCP2)*

Результаты анализа количества мест связывания с антителами к метилцитозинсвязывающему белку MeCP2 в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) интактных крыс линий ВП1 и НП2 в возрасте 5 месяцев, 6 месяцев, 7,5 месяцев представлены в табл.11. Данные получены с использованием двух различных методов, иммунофлуоресцентного и DAB-ABC-иммунопероксидазного.

Таблица 11. Количество мест связывания с антителами к MeCP2 в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) intactных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста (иммунофлуоресцентный метод-а; DAB-ABC-иммунопероксидазный метод-б)

Линия	5 месяцев $X \pm m$	6 месяцев $X \pm m$	7,5 месяцев $X \pm m$
ВП1(а)	2,94±0,10*	3,15±0,09*	3,30±0,07*
НП2(а)	2,17±0,08	1,69±0,14	4,19±0,09
ВП1(б)	4,93±0,12*	4,25±0,07*	3,38±0,07
НП2(б)	2,36±0,13	3,44±0,08	3,32±0,06

Обозначения: \* - различия с соответствующими значениями у линии НП2 достоверны ( $P < 0,05$ );

Из табл.11 следует, что межлинейные различия по количеству мест связывания с антителами к MeCP2 в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) выявили у intactных крыс линий ВП1 и НП2 в возрасте 5 и 6 месяцев : уровень экспрессии MeCP2 у низковоzbудимых крыс линии ВП1 был выше, чем у НП2, что продемонстрировано двумя используемыми методами. В возрасте 7 месяцев различия были выявлены только иммунофлуоресцентным методом, причем их направленность была противоположной, исследуемые значения были выше у крыс линии НП2 по сравнению с ВП1.

#### *5-метилцитозин*

В табл.12 представлены результаты анализа иммуноположительных ядер при связывании с антителами против 5-метилцитозина в нейронах гиппокампа (CA3) intactных крыс линий ВП1 и НП2 также в возрасте 5,6 и 7,5 месяцев.

Таблица 12. Доля иммуноположительных к 5-метилцитозину ядер нейронов гиппокампа (CA3) intactных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста .

Линия	5 месяцев $X \pm m$	6 месяцев $X \pm m$	7,5 месяцев $X \pm m$
ВП1	0,10±0,01	0,13±0,01	0,12±0,02
НП2	0,10±0,01	0,09±0,01	0,10±0,03

Как видно из табл.12, межлинейных различий в уровне экспрессии 5-метилцитозина не выявлено ни в одной из групп животных.

*Ацетилирование гистона H4 (panAcH4- Ac-H4K5,8,12)*

Результаты анализа количества мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H4 в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) и сенсо-моторной зоне коры intactных крыс линий ВП1 и НП2 в возрасте 5 месяцев, 6 месяцев, 7,5 месяцев представлены в табл.13.

Как следует из результатов, представленных в табл.13, различия в базовом уровне ацетилирования гистона H4 у крыс двух линий ВП1 и НП2 отсутствуют и в гиппокампе, и в сенсомоторной зоне коры, не выявлено и влияния возраста животных на этот показатель.

*Ацетилирование гистона H3 по лизинам 9 и 14 (Ac-H3K9/14)*

Количество мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H3 по лизинам 9 и 14 в ядрах нейронов гиппокампа и сенсо-моторной зоны коры intactных крыс линий ВП1 и НП2 в возрасте 5 месяцев, 6 месяцев, 7,5 месяцев представлены в табл.14.

Таблица 13. Количество мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H4 (pan-ac-H4) в ядрах нейронов различных структур мозга intactных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста ( $\bar{X} \pm m$ )

Сенсомоторная зона коры			
Линия/возраст	5 месяцев	6 месяцев	7,5 месяцев
ВП1	$1.99 \pm 0.07$	$1.84 \pm 0.07$	$2.36 \pm 0.09$
НП2	$1.78 \pm 0.10$	$1.91 \pm 0.07$	$1.88 \pm 0.10$
Гиппокамп (поле CA3)			
Линия/возраст	5 месяцев	6 месяцев	7,5 месяцев
ВП1	$2.55 \pm 0.32$	$2.08 \pm 0.05$	$2.26 \pm 0.04$
НП2	$2.38 \pm 0.31$	$1.59 \pm 0.10$	$2.33 \pm 0.13$

Таблица 14. Количество мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H3 (K9/14) (acH3K9/14) в ядрах нейронов различных структур мозга интактных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста ( $\bar{X} \pm m$ )

Сенсомоторная кора			
Линия/возраст	5 месяцев	6 месяцев	7,5 месяцев
ВП1	$0.91 \pm 0.04$	$0.74 \pm 0.06$	$0.68 \pm 0.05$
НП2	$1.16 \pm 0.06$	$0.85 \pm 0.05$	$0.86 \pm 0.07$
Гиппокамп (поле СА3)			
Линия/возраст	5 месяцев	6 месяцев	7,5 месяцев
ВП1	$1.80 \pm 0.43$	$1.34 \pm 0.35$	$1.64 \pm 0.12$
НП2	$1.30 \pm 0.01$	$1.32 \pm 0.05$	$1.41 \pm 0.03$

Как следует из результатов, представленных в табл.14, различия в базовом уровне ацетилирования гистона H3 у крыс двух линий ВП1 и НП2 отсутствуют, не выявлено и влияние возраста животных на этот показатель.

#### *Фосфорилирование гистона H3 по серину 10 (Ph-H3Ser10)*

В табл.15 представлены результаты анализа доли иммуноположительных ядер при связывании с антителами против фосфорилированного по серину 10 гистону H3 в нейронах гиппокампа (СА3) и сенсомоторной коры интактных крыс линий ВП1 и НП2 в возрасте 5,6 и 7,5 месяцев .

Как видно из табл.15, межлинейные различия по уровню фосфорилирования гистона H3Ser10 выявлены только в гиппокампе. Низковоzbудимые животные линии ВП1 имеют более высокий базовый уровень фосфорилирования гистона H3 в нейронах гиппокампа (СА3 поле) по сравнению с высоковозбудимыми крысами линии НП2 во всех трех возрастных группах. В сенсомоторной зоне коры межлинейных различий не обнаружено.

Таблица 15. Степень фосфорилирования гистона H3Ser10 ( pH3Ser10) в ядрах нейронов сенсомоторной зоны коры и гиппокампа интактных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста (доля иммуноположительных ядер).

Районы мозга	Линия	5 месяцев X±m	6 месяцев X±m	7,5 месяцев X±m
Сенсомоторная зона коры	ВП1	0.26±0.09	0.18±0.08	0.33±0.20
	НП2	0.35±0.08	0.38±0.07	0.32±0.18
Гиппокамп (CA3)	ВП1	0.49±0.04*	0.45±0.04*	0.44±0.04*
	НП2	0.14±0.04	0.07±0.04	0.10±0.03

Обозначения : \*-различия со значениями линии НП2 достоверны (P< 0,05)

#### *Метилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4-me-di-tri)*

В табл.16 представлены результаты анализа доли иммуноположительных ядер при связывании с антителами против ди-три- метилированного по лизину 4 гистону H3 в нейронах гиппокампа (CA3) и сенсомоторной коры интактных крыс линий ВП1 и НП2 в возрасте 5,6 и 7,5 месяцев.

Как следует из табл.16, у интактных крыс линии ВП1 в гиппокампе уровень ди-три- метилирования H3K4 выше, чем у НП2 только в возрастных группах 5 и 6 месяцев, тогда как в префронтальной коре межлинейные различия обнаруживаются в возрасте 7,5 месяцев.

Таким образом, анализ базового уровня экспрессии ряда эпигенетических модификаций у интактных крыс двух линий ВП1 и НП2 позволяет заключить, что существуют устойчивые межлинейные различия по уровню экспрессии метилцитозинсвязывающего белка, степени фосфорилирования и метилирования гистона H3 в гиппокампе у животных возрастных групп 5 и 6 месяцев. Значения исследуемых



показателей во всех случаях выше у крыс линии ВП1 по сравнению с НП2. Уровень возбудимости крыс изучаемых линий не связан с содержанием 5-метилцитозина, степенью ацетилирования гистонов H4 и H3.

Таблица 16. Степень метилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4-me-2-3) в ядрах нейронов префронтальной медиальной коры и гиппокампа интактных крыс линий ВП1 и НП2 разного возраста (доля иммуноположительных ядер).

Структуры мозга	Линия	Возраст		
		5 месяцев X±m	6 месяцев X±m	7,5 месяцев X±m
Префронтальная медиальная кора	ВП1	0.74±0.06	0.71±0.06	0.73±0.01*
	НП2	0.79±0.05	0.51±0.08	0.51±0.01
Гиппокамп (CA3)	ВП1	0.22±0.02*	0.24±0.02*	0.34±0.04
	НП2	0.11±0.02	0.07±0.04	0.25±0.04

Обозначения : \*-различия со значениями линии НП2 достоверны (P< 0,05)

### 3.1.3. Костный мозг

#### 3.1.3.1 Спонтанный уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга

Рассмотрим результаты оценки спонтанного уровня хромосомных aberrаций в клетках костного мозга у интактных крыс четырех линий ВП1, ВП2, НП1,НП2, различающихся по возбудимости нервной системы. Использование четырех линий крыс, имеющих близкие значения порога возбудимости для двух высоковозбудимых и двух низковоозбудимых линий позволит оценить вклад изменчивости по базовым характеристикам возбудимости нервной системы в активность генетического аппарата. Интенсивно

пролиферирующие и чувствительные к внешним воздействиям клетки костного мозга являются адекватной экспресс- моделью для решения этой задачи.

Результаты оценки частоты клеток с цитогенетическими нарушениями и частоты хромосомных нарушений в клетках костного мозга intactных крыс линий ВП1, НП1, ВП2, НП2 представлены в табл.17.

Как свидетельствуют результаты анализа числа клеток с цитогенетическими нарушениями и частоты хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс четырех линий с различной возбудимостью нервной системой, различий между исследуемыми показателями не выявлено, что позволяет сделать заключение об отсутствии влияния возбудимости нервной системы на спонтанный уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс.

Таблица 17. Частота клеток с цитогенетическими нарушениями и частота хромосомных нарушений в клетках костного мозга intactных крыс линий ВП1, НП1, ВП2, НП2 (%)

Линия	Число проанализированных метафаз	Число клеток с нарушениями	Число aberrаций на 100 метафаз	
			Одиночные фрагменты	Парные фрагменты
ВП1	1450	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.3	-
НП1	800	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	-
ВП2	1100	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	-
НП2	1000	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1

### **3.1.4. Полиморфизм ретротранспозона L1 и вариации числа копий (copy number variation) генов *grin1*, *ywhaz*, *gapdh*, *rpl13a* в клетках гиппокампа и костного мозга**

В табл. 18 представлены результаты ПЦР- скрининга внедрения мобильных элементов L1 в ген *grin1*. Степень выраженности бэндов после проведения электрофореза обозначена разным количеством знаков «+»: слабая - «+», средняя - «++», сильная - «+++».

Как следует из табл. 18, все бэнды можно разделить на две группы: 1) выраженные в одинаковой степени у обеих линий – 1,4,9,10,11,12,13,18,19; 2) вариабельные, независимые

от линейной принадлежности животных- 5,8,14,16,17,20 ; 3) специфичные для каждой линии – 3,6,7 . Это дает основания предположить существование особенностей инсерционного полиморфизма ретротранспозона L1 у крыс линий ВП1 и НП2.

Таблица 18. Результаты ПЦР-скрининга на внедрения ретротранспозона L1 в ген *grin1* крыс двух линий ВП1 и НП2.

	Линия ВП1			Линия НП2		
№ бэнда, Длина п.н.	1	2	3	4	5	6
Пара праймеров 1-2						
1. 540	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2. 600	-	-	-	-	-	-
3. 760	++	-	-	+++	+++	+++
4. 850	+	+	+	+	+	+
5. 950	+++	++		++	++	++
6. 1200	+++	+++	+++	+	+	+
7. 1300	+	+	+	-	-	-
8. 1500	+	++	++	++	++	++
Пара праймеров 1-3						
9. 520	++	++	++	++	++	++
10. 580	++	++	++	++	++	++
11. 690	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12. 810	+	+	+	+	+	+
13. 950	++	++	++	++	++	++
14. 1010	++	++	++	++	-	-
15. 1250	++	++	++	++	++	++
16. 1300	-	-	-	-	++	-
17. 1450	-	-	++	-	-	-
18. 1750	++	++	++	++	++	++
Пара праймеров 1-6						
19. 2000	+	+	+	+	+	+
Пара праймеров 7-8						
20. 480	+++	+	+++	+	+++	+++

Обозначения : 1,2,3; 4,5,6 – номера крыс; - - отсутствие бэнда, +- наличие бэнда, ++, +++- степень выраженности бэнда.

Результаты оценки копийности (copy number variation) генов *grin1*, *ywhaz*, *gapdh*, *rpl13a* в клетках гиппокампа и костного мозга интактных крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы представлены в табл.19.

Табл.19. Относительное количество вариаций числа копий (М) между двумя генами в гиппокампе и костном мозге крыс линий с различной возбудимостью нервной системы

Вариант	Линия	grin1: ywhaz	grin1: rpl13a	gapdh: grin1	gapdh: rpl13a	ywhaz: rpl13a
Гиппокамп	ВП1	1,8:1	23,0:1*	1,6:1	24,6:1*	17,1:1*
	НП2	1,4:1	2,8:1	1,7:1	2,9:1	1,8:1
Костный мозг	ВП1	2,1:1	23,7:1*	1,3:1	34,9:1*	24,7:1*
	НП2	2,5:1	1,7:1	1,1:1	1,4:1	2,1:1

Обозначения : М- медианы значений вариаций числа копий тестируемого гена по отношению к референсному. \*- различия со значениями у другой линии достоверны ( $p < 0,05$ ), критерий Манна-Уитни (U)

Как следует из табл.19 , и в гиппокампе, и в костном мозге крыс линии ВП1 обнаружено значительно более низкое (в десятки раз) количество вариаций числа копий гена rpl13a по сравнению с линией НП2, что проявляется в различных вариантах сравнения тестируемого и различных референсных генов.

### ***3.1.5. Межлинейные различия по цитогенетическим и молекулярно-клеточным характеристикам развивающегося и зрелого мозга, а также костного мозга у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы***

Полученные данные свидетельствуют, что селекция линий крыс, контрастно различающихся по порогу возбудимости нервной системы, привела к дивергенции по таким цитогенетическим параметрам нейрональных элементов развивающегося мозга как уровень хромосомных aberrаций, митотический индекс, количественные характеристики общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина . Исследуемые признаки связаны между собой в клеточном цикле, поскольку состояние хроматина определяет специфику возникающих структурных нарушений хромосом (Прокофьева-Бельговская, 1986) , реализация которых зависит от пролиферативной активности клеток и скорости митотических процессов ( Лебедева и др., 1993). В то же время каждый из этих признаков имеет самостоятельное значение для развития и функционирования мозга. Так, пролиферативная активность дифференцирующихся нейронов может влиять на нейроанатомические особенности ЦНС взрослого организма и, как следствие, на характеристики поведения и способность к обучению. Связанный с линейными

характеристиками возбудимости процесс пролиферации нейронов может приводить к разному их итоговому количеству. На исследуемых нами линиях крыс показано, что более высокая пролиферативная активность клеток развивающегося мозга крыс линии ВП1 по сравнению с крысами линии НП1 сопровождается увеличением плотности клеток (табл. 20) (цит. по данным Вшивцевой и др., 1997). Важно, что эти различия сохраняются у животных в возрасте 24 дней и 3-х месяцев. С этими процессами может быть связано и увеличение массы мозга у 24- дневных крысят линии ВП по сравнению с НП (Дмитриева, Гоццо, 1985).

Табл. 20. Относительное число клеток гиппокампа (количество клеток/ на 1 мм<sup>2</sup> нервной ткани) у эмбрионов (17 ЭД) и крыс линий ВП и НП в возрасте 24 дней и 3-х месяцев.

Линия	Эмбрионы (17 ЭД)	Крысята (24 дня)	Крысы (3 месяца)
ВП	118,0 ± 2,8*	18,7 ± 0,8*	12,5 ± 0,5*
НП	89,4 ± 2,0	8,7 ± 0,4	6,6 ± 0,2

Обозначения : \*- различия с линией НП достоверны (p< 0,01)

Митотический цикл контролируется многими генами, ответственными за каскад реакций, определяемых гормонами, факторами роста, факторами транскрипции, циклинами, циклинзависимыми киназами и т.д. Определенную роль могут играть и особенности мембран нервных клеток, определяющие их возбудимость. Различия в структуре мембран нейронов для наших линий показаны (Герасимова и др., 2001). Преимущественная корреляция продолжительности ранних фаз митоза с возбудимостью становится понятной, если предположить, что гены, детерминирующие синтез циклинзависимой киназы, которая определяет время вступления клеток в митоз, находится под контролем нервной системы. Очевидно также, что в наблюдаемых процессах участвуют нервные системы матери и плода, существует их взаимодействие и взаимное влияние, но оценить вклад каждой из них отдельно на базе имеющихся результатов мы не можем.

Возникающие в клетках развивающегося мозга хромосомные aberrации могут иметь двоякую роль в процессе развития и функционирования ЦНС. Сильные повреждения хромосом, либо накопление клеток с хромосомными aberrациями, несовместимые с их нормальным функционированием, приводит к клеточной гибели (Sapolsky, 1996; Bret et al., 1993), тогда как изменения, лежащие в пределах нормы реакции генотипа могут иметь регуляторное и приспособительное значение как у эмбрионов, так и у взрослых животных.

Так, например, сопровождающие нормальный процесс функционирования клетки одноцепочечные разрывы ДНК выполняют определенную роль в дифференциации клеток, в регуляции экспрессии генов и функционально связаны с механизмами координации клеточных процессов (Иванов, Тушмалова, 1988). Наблюдаемое нами в клетках развивающегося мозга явление фрагментации хромосом может быть необходимо для перестройки генетического аппарата в связи с особенностями функционирования клеток в развивающемся мозге крыс, различающихся по возбудимости линий и направлено на удаление части хроматина из хромосом в соответствии с элиминационным характером спонтанного хромосомного мутагенеза (Лебедева, Яковченко, 1988).

Преобразование структурно-функциональной организации хромосом, в частности, изменения степени конденсации хроматина в целом и особо значимых для процессов генотипической адаптации гетерохроматиновых районов хромосом являются с нашей точки зрения важными критериями оценки состояния генетического аппарата, связанного с приспособлением организма к условиям среды (Прокофьева-Бельговская, 1986). Изменение количественных характеристик конденсированного хроматина отражает степень его конденсации/ деконденсации, которая является, как известно, одним из основополагающих условий функционирования генома: с увеличением конденсации связано снижение экспрессии генов, и наоборот. В связи с этим выявленные нами различия по количественным характеристикам конденсированного хроматина позволяют предположить разную экспрессивность генома в развивающемся мозге эмбрионов крыс исследуемых линий. В то же время у зрелых животных на фоне высокой вариабельности количественных характеристик С- гетерохроматина в разные периоды онтогенеза, возраст 6 и 7 месяцев является определяющим для выявления межлинейных различий по площади С-гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа. Направленность этих различий сохраняется такой же как в эмбриональном мозге: у крыс линии ВП1 общий объем С-гетерохроматина оказывается большим по сравнению с линией НП2. Отметим также, что в предшествующих исследованиях И.А. Герасимовой (Герасимова и др., 2001) были обнаружены значимые различия по содержанию сфингомиелина- одного из фосфолипидов синаптических мембран головного мозга: его содержание у крыс с низкой возбудимостью нервной системы ВП1 было выше, чем у НП2. Известно, что сфингомиелин содержится во внутриядерных структурах, в частности, в хроматине, влияя на стабильность ДНК, ее биосинтез, участвует в процессах транскрипции и принимает участие в процессах компактизации хроматина (Lucki, Sewer, 2012). Гипотетически, если разница в содержании сфингомиелина сохраняется и во внутриядерном хроматине нервных клеток у крыс высоко- и низковозбудимой линий, это

также может вносить вклад и в формирование особенностей количественных характеристик хроматина и гетерохроматина, зависящих от базовой возбудимости нервной системы животных исследуемых линий.

Таким образом, на основании анализа полученных данных можно сделать заключение о том, что гены, контролирующие возбудимость: 1) активно функционируют в процессе эмбрионального развития мозга, 2) оказывают плеiotропное влияние на ряд исследуемых цитогенетических характеристик. В зрелом мозге проявление их влияния на количественные характеристики С-гетерохроматина и ряд эпигенетических процессов (фосфорилирование и метилирование гистона H3, экспрессия метилцитозинсвязывающего белка) зависит от возраста животных.

Одним из возможных каналов этой связи могут быть вторичные посредники. О справедливости такого рода предположений свидетельствуют данные, полученные в исследованиях на дрозофиле. Мутация одного гена, контролирующего активационные свойства белка-рецептора  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулина оказывает плеiotропное действие на возбудимость (Savvateeva, Kamyshev, 1981), цитогенетические характеристики личиночного мозга- слипание хромосом и митотический индекс (Токмачева, 1995), на эктопические контакты политенных хромосом (Мамон, Куцкова, 1993), на адаптивные свойства, в частности, чувствительность к тепловому шоку (Медведева, Савватеева, 1991, Медведева и др., 1995), а у насекомых имаго - и на способность к обучению (Савватеева, 1991). Существование тех же зависимостей в связи с возбудимостью можно ожидать и у исследуемых нами линий крыс. Тем более, что на взрослых животных показаны межлинейные различия по активности фосфодиэстеразы в гиппокампе (Шарагина и др., 1991) и уровню цАМФ, а направленность выявленных связей между уровнем возбудимости и величиной митотического индекса в клетках нервного ганглия личинок дрозофилы и в развивающемся мозге крыс совпадает. В этой связи важно отметить также, что у римской линии крыс RLA, селектированной по низкой скорости обучения в челночной камере с низким уровнем возбудимости, обнаружена повышенная экспрессия гена *camkk2* –  $\text{Ca}^{2+}$ /калмодулин-зависимой протеинкиназы киназы (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase) (Sabariego et al., 2011). CaMKK2 является представителем группы CaMKs, принимает участие в фосфорилировании и активации CaMKI, CaMKIV и AMP-активируемой протеинкиназы, участвует в регуляции многих важных физиологических и патофизиологических процессов, в том числе энергетического баланса, ожирения, гомеостаза глюкозы, кроветворения, воспаления и рака (Racioppi, Means, 2012).

Следует специально остановиться на полученных в данной работе результатах молекулярно-генетических исследований, свидетельствующих о существовании инсерционного полиморфизма ретротранспозона LINE1 в геноме крыс высоко-и низковоозбудимой линий и сниженного количества вариаций числа копий гена *rpl13a* у животных низковоозбудимой линии ВП1. Исходной задачей являлся анализ инсерционного полиморфизма ретротранспозона L1 в гене *grin1*, однако в процессе этой работы были выявлены межлинейные различия в общем геномном паттерне L1, который не был ограничен геном *grin1*, о чем свидетельствовало наличие копий L1 и в других частях генома. Что указывает на существование дифференциального полиморфизма геномного паттерна L1, являющегося результатом длительной селекции по возбудимости нервной системы исследуемых линий крыс. По-видимому, дивергенция линий в процессе селекции привела к закреплению и определенного геномного паттерна L1. Можно предположить, что выявленный полиморфизм может быть ассоциирован с линейными особенностями возбудимости в гиппокампе и разницей в чувствительности к стрессорным воздействиям. Соматический мозаицизм в мозге, вызванный мобилизацией ретротранспозонов, может напрямую влиять на кодирующие последовательности, определяющие основные нейробиологические процессы. Безусловно, кроме пропуска экзонов, альтернативного сплайсинга и изменений в транскрипции, часть внедрений может просто нарушать функционирование генов. Дальнейшее изучение взаимоотношений ген – мобильный элемент позволит глубже понять генетическую вариабельность клеток мозга, что поможет в решении важных вопросов, касающихся механизмов посттравматического стрессового расстройства, затяжных реактивных психозов, неврозов вследствие воздействия на нейрогенез и нейродегенеративные процессы.

Низкое количество копий гена *rpl13a*, обнаруженное в клетках головного и костного мозга несомненно является характеристикой линии ВП1 и может быть связано с линейными особенностями возбудимости нервной системы. Вариации числа копий генов (CNV) являются видом генетического полиморфизма, могут возникать в результате несбалансированных хромосомных перестроек и отражают уровень экспрессии генов. В данном случае можно определенно заключить, что уровень экспрессии рибосомального гена *rpl13a* снижен у крыс линии ВП1, что должно приводить к снижению выработки его продукта – 60S рибосомального белка L13a, выполняющего помимо канонической рибосомальной функции- экстра-рибосомальную функцию у высших эукариот, включая роль в мРНК специфическом трансляционном сайленсинге (связывает иницирующие факторы и участвует в контроле трансляции) (Mazumder et al., 2003). У человека является компонентом



комплекса гамма-интерферон-активируемого ингибитора трансляции, который опосредует ингибирование трансляции при воспалительных процессах. У крыс линии ВП1 эта функция может быть нарушена. Кроме того, *rpl13a* ген связан с липидным обменом в организме. Накопление жирных кислот активирует этот ген, активизирует определяемый этим геном путь через малые ядерные РНК (мяРНК) и запускает процесс апоптоза (Michel et al., 2011). Таким образом, отбор по высокому порогу возбудимости сопряжен со сниженной копийностью гена *rpl13a*, что может влиять как на функции рибосом, так и на контроль процессов трансляции и на особенности метаболических процессов у животных этой линии. Представляется важным отметить, что в другой селекционной программе у крыс римской линии RLA с низкой способностью к обучению и низкой возбудимостью нервной системы, которая также проявляет ряд симптомов постстрессорной депрессии, выявлена сниженная экспрессия одного из рибосомальных генов *rpl6* (Sabariego et al., 2011), что подтверждает возможность влияния отбора по характеристикам нервной системы на уровень экспрессии и рибосомальных генов. В особенности уровня экспрессивности генома, формируемого отбором по параметрам поведения, связанным с возбудимостью нервной системы, вносят вклад и рибосомальные гены, и этот общий паттерн может лежать в основе механизмов чувствительности к стрессорным воздействиям и формирования постстрессорных патологических состояний.

Таким образом, обобщая представленный материал, можно заключить, что генетически детерминированная возбудимость нервной системы влияет на цитогенетические параметры нейрональных элементов развивающегося мозга, - уровень хромосомных aberrаций, митотический индекс, количественные характеристики общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина. У зрелых животных на фоне высокой вариабельности количественных характеристик С-гетерохроматина в разные периоды онтогенеза, возраст 6 и 7 месяцев является определяющим для выявления межлинейных различий по площади С-гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа. Направленность этих различий сохраняется такой же, как в эмбриональном мозге. В зрелом мозге эпигенетический ландшафт - базовый уровень экспрессии ряда эпигенетических модификаций, фосфорилирования и метилирования гистона H3, экспрессии метилцитозинсвязывающего белка в гиппокампе также зависит от возбудимости нервной системы, что проявляется у животных в возрасте 5-6 месяцев. Следует отметить, что значения исследуемых цитогенетических и молекулярно-клеточных параметров во всех случаях выявления межлинейных различий, у животных низковозбудимой линии ВП1 превосходят значения, выявляемые у высоковозбудимой линии НП2. Дифференциальный

полиморфизм ретротранспозона L1 дополняет картину межлинейных различий по молекулярно-генетическим характеристикам генома, связанным с возбудимостью нервной системы. Выявленное снижение копийности гена *rpl13a* впервые позволило определить конкретный ген, механизмы изменения экспрессии которого были затронуты отбором по возбудимости. Возможность использования в дальнейшем полногеномного секвенирования, секвенирования нового поколения могло бы расширить список подобных генов.

Не выявлено связи с возбудимостью нервной системы спонтанного уровня хромосомных aberrаций в клетках костного мозга взрослых животных, содержания 5-метилцитозина, уровня ацетилирования гистонов H3 и H4 в нейронах гиппокампа и коры.

### **3.2. Влияние эмоционально-болевого стресса на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики нейронов развивающегося и зрелого мозга, а также костного мозга крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы**

Целью работы является исследование влияния психоэмоционального стресса (эмоционально-болевого стрессорное воздействие разной продолжительности - короткое и длительное) на цитогенетические (частота хромосомных aberrаций, состояние хроматина) и молекулярно-клеточные (эпигенетические) характеристики нейронов головного мозга и клеток костного мозга и определение длительности сохранения постстрессорных изменений в нейронах. Уровень хромосомных aberrаций и пролиферативная активность обычно оцениваются в интенсивно пролиферирующих клетках, в частности, костного мозга, а в головном мозге практически не исследованы в связи с методическими трудностями и чрезвычайно низким уровнем пролиферации у взрослых животных. Удобной моделью может служить эмбриональный мозг. Благодаря использованию линий с контрастными параметрами возбудимости нервной системы представляется возможным оценить вклад изменчивости по возбудимости, ее индивидуальных характеристик в исследуемые процессы. В зрелом мозге адекватным методом оценки состояния генетического аппарата является исследование степени конденсации хроматина в нейронах различных структур мозга и иммуноцитохимическое изучение экспрессии эпигенетически модифицированных сайтов. Рассмотрим последовательно влияние эмоционально-болевого стрессорного воздействия, примененного на 16-17 эмбриональный день пренатально при стрессировании матерей (короткий стресс) и в возрасте 5 месяцев (короткий и длительный стресс) на комплекс цитогенетических и молекулярно-клеточных характеристик мозга и костного мозга у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.

### 3.2.1. Развивающийся мозг

#### 3.2.1.1. Влияние пренатального (короткого эмоционально-болевого) стрессорного воздействия на цитогенетические параметры клеток развивающегося гиппокампа эмбрионов крыс

Результаты оценки частоты хромосомных aberrаций в клетках развивающегося гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены в табл.21.

Таблица 21. Частота хромосомных aberrаций в клетках развивающегося гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия (%)

Вид aberrаций	ВП1		НП2	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Мосты	1.73±0.37	3.00±0.56*	0.64±0.27	2.07±0.25*
Фрагменты	0.67±0.21	3.00±0.56*	0.08±0.07	0.93±0.23*
Все типы нарушений	2.40±0.50	5.00±0.80*	0.72±0.27	3.40±0.58*

Обозначения : \*- различия с соответствующим контролем той же линии достоверны ( $P < 0.01$ ).

Как следует из табл.21, короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к увеличению уровня хромосомных aberrаций, отдельно мостов и фрагментов и всех типов нарушений в целом, у крыс обеих линий. Повышение уровня хромосомных aberrаций выражено в большей степени у высоковозбудимой линии крыс НП2, что по-видимому, связано с более низким по сравнению с низковозбудимой линией ВП1 исходным уровнем хромосомных нарушений.

Результаты анализа митотического индекса и показателей пролиферативной активности клеток развивающегося мозга эмбрионов крыс линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены в табл.22.

Таблица 22. Митотический индекс и показатели пролиферативной активности клеток развивающегося гиппокампа крыс линий ВП и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Показатель	ВП1		НП2	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Митотический индекс	$6.5 \pm 0.2$	$10.1 \pm 0.4^*$	$4.7 \pm 0.3$	$8.5 \pm 0.5^*$
Число клеток				
В профазе	$23.5 \pm 1.3$	$35.3 \pm 1.7^*$	$16.0 \pm 1.6$	$36.0 \pm 3.4^*$
В метафазе	$20.1 \pm 0.8$	$33.1 \pm .5^*$	$16.4 \pm 1.2$	$21.9 \pm 1.2^*$
В анафазе	$22.0 \pm 2.5$	$27.6 \pm 1.5^*$	$13.5 \pm 1.3$	$25.3 \pm 3.9^*$
В телофазе	$2.5 \pm 0.5$	$5.5 \pm 0.3^*$	$2.5 \pm 0.5$	$2.9 \pm 0.5$

Обозначения :\*- различия с соответствующим контролем достоверны ( $P < 0.05$ ).

Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к увеличению митотического индекса и продолжительности фаз митоза в мозге эмбрионов крыс обеих линий. У эмбрионов крыс линии НП2 нет изменения числа клеток, находящиеся в телофазе, то есть стресс не влияет на продолжительность поздней стадии митоза- телофазы у высоковозбудимой линии. Следует отметить больший рост величины исследуемых показателей у крыс линии НП2 относительно более низких значений в контроле.

Количественные характеристики общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина ( площадь и число хромоцентров) в интерфазных ядрах нейробластов и дифференцирующихся нейронов у эмбрионов крыс линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия отражены в табл. 23 и 24 соответственно.

Таблица 23. Количественные характеристики общего пула конденсированного хроматина в интерфазных ядрах нейробластов и дифференцирующихся нейронов в области гиппокампа у эмбрионов крыс линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Линия крыс	Площадь хромоцентров, мкм <sup>2</sup>	Число хромоцентров
ВП1		
Контроль	11.06 ± 0.32	8.83 ± 0.30
Опыт	8.48 ± 0.33*	6.40 ± 0.40*
НП2		
Контроль	5.85 ± 0.14	7.81 ± 0.17
Опыт	4.00 ± 0.13*	5.12 ± 0.13*

Обозначения : \*- различия с контрольной группой достоверны (P < 0.05).

Таблица 24. Количественные характеристики С-гетерохроматина в интерфазных ядрах нейробластов и дифференцирующихся нейронов развивающегося гиппокампа у эмбрионов крыс линий ВП1и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Линия крыс	Площадь хромоцентров, мкм <sup>2</sup>	Число хромоцентров
ВП1		
Контроль	6.98 ± 0.24	6.53 ± 0.13
Опыт	5.42 ± 0.20*	5.41 ± 0.16*
НП2		
Контроль	4.36 ± 0.15	6.32 ± 0.13
Опыт	3.59 ± 0.10*	5.69 ± 0.09*

Обозначения : \*- различия с контрольной группой достоверны (P < 0.05).

Как свидетельствуют результаты, представленные в табл. 23 и 24, количественные характеристики общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина – площадь и число хромоцентров обнаруживают снижение после испытания животными короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия у эмбрионов крыс обеих линий, независимо от уровня возбудимости нервной системы.

Таким образом, короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие на беременных крыс в пренатальный период развития эмбрионов приводит к увеличению в развивающемся гиппокампе митотического индекса, уровня хромосомных aberrаций и снижению количественных характеристик общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина независимо от линейных характеристик нервной системы животных. Однако, степень повышения уровня хромосомных aberrаций и митотического индекса больше у высоковозбудимой линии крыс НП2, что может быть связано с более низкими по сравнению с низковоозбудимой линией ВП1 значениями этих показателей в контроле.

### *3.2.1.2. Долгосрочные последствия влияния пренатального (короткого эмоционально-болевого) стресса на цитогенетические характеристики гиппокампа крыс*

Результаты влияния пренатального (короткого эмоционально-болевого) стресса на площадь С-гетерохроматина (мкм<sup>2</sup>) в ядрах нейронов развивающегося гиппокампа эмбрионов и зрелого гиппокампа 24-дневных самцов крыс линий ВП1 и НП2 представлены в табл.25.

Таблица 25. Влияние пренатального (короткого эмоционально-болевого) стресса на площадь С-гетерохроматина (мкм<sup>2</sup>) в ядрах нейронов развивающегося гиппокампа эмбрионов и зрелого гиппокампа 24-дневных самцов крыс линий ВП и НП ( $\bar{X} \pm m$ )

Линия	Вариант	Эмбрионы ( 17 ЭД )	Крысята ( 24 ПД )
		$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$
ВП1	Контроль	6,98 $\pm$ 0,24	2,91 $\pm$ 0,08
	Опыт	5,42 $\pm$ 0,20*	2,61 $\pm$ 0,08*
НП2	Контроль	4,36 $\pm$ 0,15	2,32 $\pm$ 0,04
	Опыт	3,59 $\pm$ 0,10*	2,14 $\pm$ 0,04*

Обозначения: \*- различия с контролем той же линии достоверны,  $P < 0.05$

Как следует из табл.25, действие эмоционально-болевого пренатального стресса на беременную самку приводит: 1) к снижению площади хромоцентров в клетках развивающегося мозга эмбрионов крыс как низко-, так и высоковозбудимой линий (ВП1 и НП2) по сравнению с контрольными группами; 2) сниженные значения площади хромоцентров сохраняются у потомков стрессированных самок обеих линий и по достижении ими 24-дневного возраста.

Таким образом, в результате проведенных нами экспериментов показано, что пренатальное эмоционально-болевое стрессирование приводит к длительным изменениям состояния хроматина в клетках развивающегося гиппокампа.

### **3.2.2. Зрелые крысы. Костный мозг**

У зрелых животных оценка нестабильности хромосомного аппарата (определение уровня хромосомных aberrаций) под влиянием стрессорных и мутагенных факторов возможно только в активно пролиферирующих тканях, в частности, в клетках костного мозга. Рассмотрим влияние короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на частоту хромосомных аномалий у крыс четырех линий ВП1, ВП2, НП1, НП2, различающихся по возбудимости нервной системы и отражающих размах изменчивости порога возбудимости от высоких (ВП1) к контрастно низким (НП2) значениям с промежуточными составляющими (ВП2, НП1). Сравним стресс-реактивность линий, оцениваемую по уровню хромосомных aberrаций, с их чувствительностью к действию мутагена циклофосфана и оценим эффективность сочетанного действия эмоционально-болевого стресса и мутагена на исследуемые цитогенетические характеристики.

#### *3.2.2.1. Влияние короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия, мутагена циклофосфана и сочетанного действия стресса и циклофосфана на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс*

В табл.26 представлены результаты оценки частоты клеток с цитогенетическими нарушениями и частоты хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс линий ВП1, НП1, ВП2, НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Таблица 26. Частота клеток с цитогенетическими нарушениями и частота хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс линий ВП1, НП1, ВП2, НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия (%)

Вариант		Число метафаз	Число клеток с нарушениями	Число aberrаций на 100 метафаз	
				Одиночные фрагменты	Парные фрагменты
ВП1	Контроль	1450	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.3	-
	Опыт	1650	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1
НП1	Контроль	800	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.3	-
	Опыт	800	2.2 ± 0.5*	2.2 ± 0.5*	0.4 ± 0.2
ВП2	Контроль	1100	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	-
	Опыт	1100	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1
НП2	Контроль	1000	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.2 ± 0.1
	Опыт	1000	2.6 ± 0.5*	2.5 ± 0.5*	1.0 ± 0.1

Обозначения: \*- различия с контрольной группой той же линии достоверны ( $p < 0.05$ )

Как показано в табл. 26, короткий эмоционально-болевой стресс вызывает возрастание общего числа клеток с aberrациями и числа одиночных фрагментов у высоковозбудимых крыс линий – НП1 и НП2, что можно считать мутагенным эффектом. Выявленный мутагенный эффект может быть классифицирован как слабый мутагенный эффект стрессорного воздействия (Середенин, Дурнев, 1992). Следует отметить, что степень возрастания исследуемых параметров не различается у крыс НП1 и НП2 линии. Использование в опыте двух высоковозбудимых линий, близких по порогам возбудимости нервной системы, но различающихся по генетическому фону, дает веские основания полагать, что наблюдаемые изменения неслучайны.

В табл. 27 представлены результаты оценки частоты клеток с цитогенетическими нарушениями и частоты хромосомных нарушений, индуцированных циклофосфаном и комбинированным действием короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия и циклофосфана в костном мозге крыс линий ВП1, НП1, ВП2, НП2.



Таблица 27. Частота клеток с цитогенетическими нарушениями и частота хромосомных нарушений, индуцированных циклофосфаном и комбинированным действием короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия и циклофосфана в костном мозге крыс линий ВП1, НП1, ВП2, НП2 с различным уровнем возбудимости нервной системы (%)

Вариант	Количество						
	Проанализированные метафазы	Клетки с аберрациями	Клетки с множественными аберрациями	Фрагменты на 100 метафаз		Транслокации и (на 100 метафаз)	Поврежденные хромосомы (на 100 метафаз)
				Одиночные	парные		
ЦИКЛОФОСФАН							
ВП1	600	<u>33.0 ± 1.9</u>	7.2 ± 1.1	21.8 ± 1.7	3.0 ± 0.7	<u>36.0 ± 2.0</u>	<u>100.5 ± 0.3</u>
НП1	400	<u>42.8 ± 2.5</u>	5.6 ± 1.1	18.8 ± 2.0	2.8 ± 0.8	<u>48.3 ± 2.3</u>	<u>122.3 ± 2.6</u>
ВП2	600	<u>51.7 ± 2.0</u>	<u>26.8 ± 1.8</u>	10.3 ± 1.2	<u>2.2 ± 0.6</u>	<u>40.2 ± 2.1</u>	<u>100.1 ± 0.1</u>
НП2	400	<u>41.0 ± 2.5</u>	<u>7.8 ± 1.3</u>	15.0 ± 1.8	<u>0.5 ± 0.4</u>	<u>48.8 ± 2.1</u>	<u>120.3 ± 2.5</u>
КЭБС + ЦИКЛОФОСФАН							
ВП1	500	19.8 ± 1.8	<u>5.4 ± 1.0</u>	<u>9.8 ± 1.3</u>	1.6 ± 0.6	<u>15.4 ± 1.6</u>	<u>44.2 ± 2.2</u>
НП1	500	16.6 ± 1.7	<u>1.0 ± 0.4</u>	<u>22.4 ± 1.9</u>	1.8 ± 0.6	<u>4.0 ± 0.9</u>	<u>33.2 ± 2.1</u>
ВП2	400	<u>21.8 ± 2.1</u>	4.5 ± 0.9	<u>22.0 ± 2.1</u>	2.8 ± 0.8	<u>3.8 ± 0.9</u>	<u>58.3 ± 2.5</u>
НП2	500	<u>36.6 ± 2.2</u>	6.8 ± 1.1	<u>35.0 ± 2.1</u>	2.4 ± 0.7	<u>17.8 ± 1.7</u>	<u>79.8 ± 1.8</u>

Обозначения : значения, различающиеся при  $p < 0.05$  между линиями одной селекционной программы подчеркнуты

Как следует из табл. 27, высоковозбудимые линии (НП1 и НП2) проявили большую чувствительность к мутагену по сравнению с низковозбудимыми (ВП1 и ВП2) как по

количеству обменных перестроек типа транслокаций, так и по количеству поврежденных хромосом на 100 метафаз. Значения этих показателей у крыс НП1 и НП2 достоверно превышали аналогичные значения крыс ВП1 и ВП2 при сравнении между линиями в пределах одной селекционной программы. По числу одиночных фрагментов межлинейные различия не обнаружены, по количеству парных фрагментов- крысы линии ВП2 превосходят крыс линии НП2, тогда как между животными ВП1 и НП1 различий не выявлено. Характер различий по количеству клеток с абберациями сохранялся только между линиями НП1 и ВП1, тогда как количество клеток с абберациями у крыс линии ВП2 превосходило таковое у животных НП2. Следует отметить, что у крыс линии ВП2 на фоне достаточно ровных значений всех других показателей наблюдали очень высокий процент недифференцируемых множественных аббераций. Величина именно этого показателя, возможно, и повлияла на преобладающее значение количества клеток с абберациями.

Таким образом, в результате исследования действия циклофосфида среди изученных цитогенетических характеристик установлена определенная связь с возбудимостью нервной системы только количества обменных перестроек типа транслокаций. По частоте возникновения фрагментов такой закономерности не прослеживается, а число клеток с абберациями сложно, нелинейно связано с возбудимостью.

Короткий эмоционально-болевого стресс в сочетании с действием циклофосфана влияет на частоту хромосомных нарушений следующим образом: приводит к снижению количества клеток с абберациями, относительного количества транслокаций и поврежденных хромосом у животных всех четырех исследованных линий по сравнению с действием только циклофосфана (табл.27), то есть обладает протекторным эффектом. Интересно отметить, что у животных линии НП2 комбинированное действие стресса и циклофосфана приводит к минимальному снижению цитогенетического эффекта циклофосфана по сравнению с тремя другими линиями.

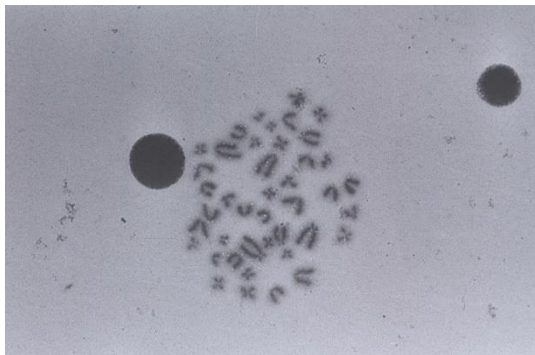
#### *3.2.2.2. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на частоту хромосомных аббераций в клетках костного мозга крыс*

Результаты влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на частоту клеток с цитогенетическими нарушениями и частоту хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс линий ВП1 и НП2 представлены на табл. 28.

Таблица 28. Частота клеток с цитогенетическими нарушениями и частота хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс линий ВП1 и НП2 после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (%)

Вариант		Число метафаз	Число клеток с нарушениями	Число аберраций на 100 метафаз	
				одиочные фрагменты	парные фрагменты
ВП1	Контроль	550	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.5	0.2 ± 0.2
	Опыт	684	2.2 ± 0.6	1.9 ± 0.5	0.4 ± 0.2
НП2	Контроль	479	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.4	-
	Опыт	700	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.2

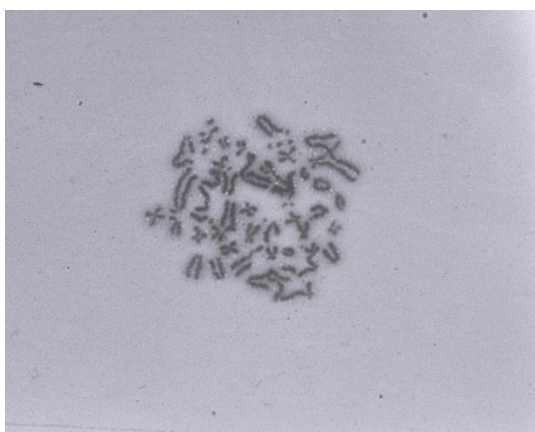
Длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие не влияет на частоту клеток с цитогенетическими нарушениями и частоту хромосомных нарушений в клетках костного мозга крыс линий ВП1 и НП2, поскольку нет достоверных изменений значений этих показателей после окончания процедуры стрессирования (табл.28). По-видимому, в процессе 15-дневного стрессирования возникшие в первый день под влиянием короткого стресса нарушения нивелируются. Хотя тенденция к росту общего числа клеток с нарушениями и одиочных фрагментов у крыс линии ВП1 под влиянием стресса указывает на возможность проявления эффекта при увеличении выборки (анализируемых клеток и количества животных).



а



б



в

Рис.15. Метафазные пластинки из клеток костного мозга крыс : а) норма; б) с одиночным фрагментом; в) с множественными нарушениями (об.х100 ; ок.х10)

### ***3.2.3. Зрелые крысы. Головной мозг***

В связи с отсутствием перманентных клеточных делений в зрелом мозге, нет возможности определить уровень хромосомных нарушений в нейронах. Нами применен подход к оценке состояния хромосомного аппарата в нейронах, использующий изучение количественных характеристик конденсированного хроматина в ядрах нервных клеток, выявляемого с помощью методов дифференциального окрашивания. Рассмотрим срочные (24 часа) эффекты влияния короткого эмоционально-болевого стресса на эти характеристики в разных структурах мозга, а также в разное время суток, а затем влияние на них длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

#### ***3.2.3.1. Влияние короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на состояние хроматина (С-гетерохроматина) в нейронах разных структур зрелого мозга крыс***

В табл. 29 представлены результаты оценки количественных характеристик С-гетерохроматина в нейронах гиппокампа и сенсомоторной зоны коры крыс двух линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Действие стресса приводит к изменениям количественных характеристик гетерохроматина в гиппокампе и сенсомоторной зоне коры головного мозга специфическим для каждой линии образом. В сенсомоторной коре у линии ВП1 выявлено уменьшение площади хромоцентров при неизменном их количестве (табл.29), т.е. снижение общего количества гетерохроматина не сопровождается изменением его распределения по ядру, тогда как у линии НП2 происходит увеличение числа хромоцентров при неизменном значении площади, что свидетельствует о сохранении количества гетерохроматина на фоне его перераспределения (табл.29). В гиппокампе линии ВП1 происходило уменьшение только одного показателя- числа хромоцентров, в основе которого также может лежать перераспределение гетерохроматинового материала внутри ядра, связанное с агрегацией в более крупные структурные единицы, а у линии НП2- и площади, и числа хромоцентров, то есть реальное уменьшение общего количества гетерохроматина (табл.26).

Таблица 29. Количественные характеристики С-гетерохроматина в нейронах разных структур головного мозга крыс двух линий ВП1 и НП2 после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Структура мозга	Линия	Вариант	Площадь хромоцентров, мкм <sup>2</sup>	Число хромоцентров
Сенсомоторная зона коры	ВП1	Контроль	$1.93 \pm 0.05$	$3.00 \pm 0.07$
		Опыт	$1.80 \pm 0.04^*$	$3.00 \pm 0.05$
	НП2	Контроль	$2.00 \pm 0.06$	$3.40 \pm 0.07$
		Опыт	$1.90 \pm 0.04$	$3.80 \pm 0.07^*$
Гиппокамп (поле СА3)	ВП1	Контроль	$2.20 \pm 0.08$	$3.32 \pm 0.10$
		Опыт	$2.27 \pm 0.09$	$2.85 \pm 0.12^*$
	НП2	Контроль	$3.14 \pm 0.12$	$3.44 \pm 0.11$
		Опыт	$2.35 \pm 0.11^*$	$2.98 \pm 0.10^*$

Обозначения : \*- различия с контрольными значениями достоверны ( $P < 0.05$ ).

Среди полученных данных обращает на себя внимание факт различной реакции на стресс в общей популяции нейронов сенсомоторной коры и клетках СА3 поля гиппокампа у исследуемых линий.

### 3.2.3.2. Влияние времени суток на связанное с действием короткого эмоционально-болевого стресса состояние хроматина (С-гетерохроматина) в гиппокампе крыс

В табл. 30 представлены характеристики общего пула конденсированного хроматина нейронов гиппокампа крыс линий ВП1и НП2 , подвергнутых действию короткого эмоционально-болевого стрессирования в разное время суток, утром и вечером.

Таблица 30. Влияние времени суток на характеристики общего пула конденсированного хроматина нейронов гиппокампа крыс линий ВП1и НП2 , подвергнутых действию короткого эмоционально-болевого стрессирования ( $X \pm m$ )

Линия	Время суток	Вариант	Площадь хромоцентров, мкм <sup>2</sup>	Число хромоцентров	Относительная оптическая плотность, у.е.
ВП1	Утро	Контроль	2.37 $\pm$ 0.11	10.52 $\pm$ 0.49	0.195 $\pm$ 0.003
		Опыт	1.47 $\pm$ 0.06*	14.47 $\pm$ 0.84*	0.151 $\pm$ 0.003
	Вечер	Контроль	2.35 $\pm$ 0.09	9.74 $\pm$ 0.40	0.116 $\pm$ 0.003#
		Опыт	2.33 $\pm$ 0.07	15.39 $\pm$ 1.02*	0.140 $\pm$ 0.003*
НП2	Утро	Контроль	2.88 $\pm$ 0.11	14.46 $\pm$ 0.51	0.220 $\pm$ 0.003
		Опыт	2.18 $\pm$ 0.09*	11.16 $\pm$ 1.12*	0.178 $\pm$ 0.004*
	Вечер	Контроль	2.91 $\pm$ 0.10	9.92 $\pm$ 0.45 #	0.114 $\pm$ 0.003#
		Опыт	2.04 $\pm$ 0.08*	18.05 $\pm$ 1.08*	0.135 $\pm$ 0.004*

Обозначения : \*- различия достоверны по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ) , #- различия достоверны по сравнению с утренними значениями ( $p < 0.05$ ).

В табл. 31 представлены количественные характеристики С-гетерохроматина нейронов гиппокампа крыс линий ВП1и НП2 , подвергнутых действию короткого эмоционально-болевого стрессирования в разное время суток, утром и вечером.

Как следует из табл. 30 и 31, суточным изменениям подвержены три показателя состояния хроматина нейронов- площадь и число хромоцентров и относительная оптическая плотность хромоцентров. Относительная оптическая плотность хромоцентров (общий пул конденсированного хроматина) изменяется у крыс обеих линий , число хромоцентров (общий пул конденсированного хроматина и С-гетерохроматина) и площадь хромоцентров (С-гетерохроматин)- только у крыс линии НП2. В вечерние часы по сравнению с утренними часами снижались оптическая плотность и число хромоцентров, характеризующих общий пул конденсированного хроматина (табл.30), тогда как площадь и число хромоцентров С-гетерохроматина- увеличивались (табл.31). В условиях действия короткого эмоционально-

болевого стрессорного воздействия снижалась площадь хромоцентров (общий пул конденсированного хроматина), у крыс линии ВП1- только в утренние часы, у крыс линии НП2- и утром, и вечером. (табл. 30). По числу хромоцентров (общий пул конденсированного хроматина) наблюдалась обратная картина : у крыс линии ВП1 происходило повышение числа хромоцентров, которое не зависело от времени суток, тогда как у крыс линии НП2 утром число хромоцентров уменьшалось, а вечером – увеличивалось. Оптическая плотность снижалась в вечерние часы у крыс обеих линий, причем утром наблюдали повышение этого показателя и только у крыс НП2.

Таблица 31. Влияние времени суток на характеристики С-гетерохроматина нейронов гиппокампа интактных и подвергнутых действию короткого эмоционально-болевого стрессирования крыс трех линий Вистар, ВП1, НП2 ( $\bar{X} \pm m$ )

Линия	Вариант	Площадь хромоцентров, $\mu\text{м}^2$	Число хромоцентров
УТРО			
ВП1	Контроль	$3.20 \pm 0.20$	$2.14 \pm 0.05$
	Опыт	$2.20 \pm 0.09$	$2.50 \pm 0.09^*$
НП2	Контроль	$2.70 \pm 0.07\&$	$1.92 \pm 0.07\&$
	Опыт	$2.10 \pm 0.13$	$2.18 \pm 0.04^*$
ВЕЧЕР			
ВП1	Контроль	$3.20 \pm 0.21$	$2.18 \pm 0.08$
	Опыт	$2.25 \pm 0.04$	$2.60 \pm 0.12^*$
НП2	Контроль	$4.32 \pm 0.16$	$2.30 \pm 0.13$
	Опыт	$2.44 \pm 0.16^*$	$2.42 \pm 0.04$

Обозначения : \*- различия с контролем той же линии достоверны ( $P < 0,05$ ), &- различия с контролем при вечерней фиксации достоверны ( $P < 0,05$ ).

Для С-гетерохроматина (табл.31) характер влияния короткого эмоционально-болевого стресса несколько отличался от влияния на общий пул конденсированного хроматина. Так,



снижение площади хромоцентров происходило только у крыс линии НП2 и только в вечерние часы и оно не сопровождалось изменением числа хромоцентров. Снижение числа хромоцентров у крыс линии НП2 происходило утром, а у крыс линии ВП1, наблюдали обратный процесс повышения числа хромоцентров, происходящее и утром, и вечером.

Таким образом, в целом обнаружено влияние суточного ритма на характер действия короткого эмоционально-болевого стресса на количественные параметры хроматина, одни из которых связаны с уровнем возбудимости нервной системы, другие- независимы от него.

### *3.2.3.3. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на состояние хроматина (С-гетерохроматина) в гиппокампе крыс*

В табл.32 представлены результаты оценки площади С- гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 через сутки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия с использованием двух различных установок для анализа- автоматизированной установки для анализа изображений (Дудкин и др., 1999) и полуавтоматической телевизионной системы для анализа изображений.

Таблица 32. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на площадь С- гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 через сутки после его окончания ( $X \pm m$ )

а)

Линия	Группа	Площадь гетерохроматина (мкм <sup>2</sup> )
ВП1	Контроль	$2.16 \pm 0.07$
	Опыт	$1.92 \pm 0.06^*$
НП2	Контроль	$2.20 \pm 0.09$
	Опыт	$2.34 \pm 0.09$

Обозначения : \*- различия с контролем той же линии достоверны ( $P < 0.05$ ),

б)

Линия	Группа	Площадь гетерохроматина(мкм <sup>2</sup> )	Число хромоцентров
ВП1	Контроль	$3.78 \pm 0.15$	$5.57 \pm 0.90$
	Опыт	$2.81 \pm 0.15^*$	$6.51 \pm 0.90$
НП2	Контроль	$3.04 \pm 0.27$	$6.34 \pm 0.60$
	Опыт	$2.71 \pm 0.27$	$6.10 \pm 0.69$

Обозначения : \* - различия с контролем достоверны ( $P < 0.05$ ).

(а)– автоматизированная установка для анализа изображений (Дудкин и др., 1999)

(б)– полуавтоматическая телевизионная система для анализа изображений.

Как следует из табл.32, длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к снижению площади С-гетерохроматина только у крыс высоковозбудимой линии ВП1 и не вызывает изменений у крыс линии НП2. Число хромоцентров не меняется под влиянием стресса у обеих линий.

#### *3.2.3.4. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на эпигенетические процессы в нейронах различных структур мозга крыс*

Рассмотрим срочный (24 часа) эффект действия длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на ряд эпигенетических процессов в двух районах мозга крыс линий ВП1 и НП2

Результаты оценки количества мест связывания с антителами к MeCP2, к ацетилированным формам гистонов H3 и H4, доли иммуноположительных к фосфорилированным по серину 10 и метилированным по лизину 4 формам гистона H3 ядер нейронов гиппокампа (CA3) крыс линий ВП1 и НП2 через 24 часа после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены в табл.33.

Таблица 33. Количество мест связывания с антителами к MeCP2, к ацетилованным формам гистонов H3 и H4 и доли иммуноположительных к фосфорилированному по серину 10 и метилированному по лизину 4 гистону H3 клеток гиппокампа (CA3) крыс линий ВП1 и НП2 через 24 часа после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Линия	Группа	MeCP2 $X \pm m$	H4ac(pan) $X \pm m$	H3K9/14ac $X \pm m$	H3Ser10ph $X \pm m$	H3K4me-2-3 $X \pm m$
ВП1	контроль	2,94±0,10	2,50±0.32	1.80 ± 0.43	0,49±0.04	0,22±0.02
	опыт	2,43±0,11*	2,76±0.21	1.50 ± 0.02	0,47±0.05	0,47±0.05
НП2	контроль	2,17±0,08	2,38±0.31	1.30 ± 0.01	0,14±0.04	0,10±0.02
	опыт	2,35±0,08	2,99±0.24	1.27 ± 0.06	0,51±0.04 *	0,10±0.02

Обозначения: MeCP2-метилцитозинсвязывающий белок, H4ac(pan)-ацетилирование гистона H4(лизины 5,8,12), H3K9/14ac-ацетилирование гистона H3(лизины 9/14), H3Ser10ph-фосфорилирование гистона H3(серин10), H3K4-2-3-me- ди-три- метилирование гистона H3(лизин4);\* - отличия от контроля достоверны ( $P < 0,05$ ).

Как следует из табл.33, через 24 часа после действия длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия снижается количество мест связывания с антителами к MeCP2 в гиппокампе крыс линии ВП1, тогда как количество мест связывания с антителами к ацетилованным формам гистонов H3 и H4 не меняется. При этом степень фосфорилирования гистона H3 меняется (возрастает) только у крыс линии НП2. Изменений степени метилирования гистона H3 в этот временной промежуток не происходит.

В табл.34 представлены результаты анализа количества мест связывания с антителами к ацетилованным формам гистонов H3 и H4 и доля иммуноположительных клеток к фосфорилированному по серину 10 гистону H3 в сенсомоторной коре крыс линий ВП1 и НП2 через 24 часа после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Как видно из табл. 34 через 24 часа после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия повышается степень ацетилирования гистонов H4 и H3 в нейронах сенсомоторной коры крыс линии ВП1, тогда как у крыс линии НП2 изменяется степень ацетилирования гистона H3 в сторону снижения и повышается степень фосфорилирования гистона H3 по серину 10.

Таблица 34. Количество мест связывания с антителами к ацетилированным формам гистонов H3 и H4 и доля иммуноположительных к фосфорилированному по серину 10 гистону H3 ядер нейронов сенсомоторной коры крыс линий ВП1 и НП2 через 24 часа после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Линия	Группа	H4ac(pap) X±m	H3K9/14ac X±m	H3Ser10ph X±m
ВП1	контроль	1.99 ± 0.07	0.91 ± 0.04	0.26 ± 0.09
	опыт	2.25 ± 0.06*	1.10 ± 0.05*	0.36 ± 0.08
НП2	контроль	1.78 ± 0.10	1.16 ± 0.06	0.35 ± 0.08
	опыт	1.92 ± 0.09	0.84 ± 0.06 *	0.70 ± 0.07 *

Обозначения: H4ac(pap)-ацетилирование гистона H4( лизины 5,8,12), H3K9/14ac-ацетилирование гистона H3(лизины 9/14), H3Ser10ph- фосфорилирование гистона H3(серин10); \* - отличия от контроля достоверны (P<0,05);

Таким образом, обобщая представленный материал можно заключить, что через сутки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в нейронах гиппокампа снижение площади гетерохроматина у крыс линии ВП1 сопровождается повышением экспрессии метилцитозинсвязывающего белка. У крыс линии НП2 происходит повышение степени фосфорилирования гистона H3 по серину 10.

В сенсомоторной зоне коры через 24 часа после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия у крыс линии ВП1 повышается степень ацетилирования гистонов H4 и H3, тогда как у крыс линии НП2 повышается степень фосфорилирования гистона H3 на фоне снижения уровня ацетилирования гистона H3.

### **3.3. Долгосрочные эффекты влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики зрелого мозга крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы**

Рассмотрим отдаленные последствия влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики сенсомоторной зоны коры и гиппокампа крыс двух линий с разным уровнем возбудимости нервной системы.

### ***3.3.2. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в разные сроки после его окончания на количественные характеристики С-гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа крыс***

Результаты анализа характеристик гетерохроматина- площади и числа хромоцентров в ядрах нейронов гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены в табл.27 . Данные получены с использованием автоматизированной установки для анализа изображений (табл.35-1) и полуавтоматической телевизионной системы для анализа изображений (табл.35-2).

Как видно из табл.35, снижение площади гетерохроматина при сохранении неизменного числа хромоцентров у крыс линии ВП1, выявленное через 24 часа после окончания длительного стрессирования, сохраняется спустя 2 недели и 2 месяца после воздействия. У крыс линии НП2 изменений характеристик гетерохроматина под влиянием стресса не происходит.

### ***3.3.3. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в разные сроки после его окончания на экспрессию эпигенетических модификаций в ядрах нейронов различных структур мозга крыс***

Эпигенетические модификации ДНК и гистонов являются важными составляющими механизма регуляции экспрессии генов в нейронах зрелого мозга. Их нарушения под действием стрессорных факторов при формировании постстрессорных состояний могут составлять основу длительных изменений в экспрессии генов, лежащие в основе их патогенеза. В связи с этим важно определить, какие эпигенетические модификации ДНК и гистонов подвержены изменениям под влиянием стресса и как долго они могут сохраняться, какова роль генетически-детерминированной возбудимости нервной системы в их проявлении. Рассмотрим результаты иммуноцитохимического изучения содержания метилцитозинсвязывающего белка, 5-метилцитозина, ацетилированных форм гистонов H4 и H3, фосфорилирования и метилирования гистона H3 в отдаленные сроки после действия длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в гиппокампе , сенсомоторной и префронтальной коре .

Таблица 35. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на характеристики гетерохроматина в ядрах нейронов гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после его окончания

1)

Срок после воздействия	Линия	Группа	Площадь гетерохроматина (мкм <sup>2</sup> ) X ± m
24 часа	ВП1	Контроль	2.16 ± 0.07
		Опыт	1.92 ± 0.06*
	НП2	Контроль	2.20 ± 0.09
		Опыт	2.34 ± 0.09
2 недели	ВП1	Контроль	2.21 ± 0.09
		Опыт	1.93 ± 0.09*
	НП2	Контроль	1.94 ± 0.09
		Опыт	2.13 ± 0.09
2 месяца	ВП1	Контроль	2.53 ± 0.09
		Опыт	2.09 ± 0.09*
	НП2	Контроль	1.96 ± 0.09
		Опыт	2.05 ± 0.09
6 месяцев	ВП1	Контроль	1.69 ± 0.06
		Опыт	2.43 ± 0.06*
	НП2	Контроль	1.79 ± 0.06
		Опыт	1.81 ± 0.06

Обозначения : \*- различия с контролем достоверны (P < 0.05).

2)

Линия	Срок после воздействия	Группа	Площадь гетерохроматина (мкм <sup>2</sup> ) X ± m	Число хромоцентров X ± m
ВП1	24 часа	Контроль	3.78 ± 0.15	5.57 ± 0.90
		Опыт	2.81 ± 0.15*	6.51 ± 0.90
	2 недели	Контроль	3.58 ± 0.11	7.75 ± 0.27
		Опыт	3.02 ± 0.11*	7.07 ± 0.27
НП2	24 часа	Контроль	3.04 ± 0.27	6.34 ± 0.60
		Опыт	2.71 ± 0.27	6.10 ± 0.69
	2 недели	Контроль	2.93 ± 0.17	6.78 ± 0.49
		Опыт	3.17 ± 0.15	6.58 ± 0.44

Обозначения : \* - различия с контролем достоверны (P < 0.05).

- 1) – автоматизированная установка для анализа изображений ;
- 2) – полуавтоматическая телевизионная система для анализа изображений .

#### *Метилцитозинсвязывающий белок (MeCP2) и 5-метилцитозин (5-мц)*

Результаты оценки количества мест связывания с антителами к метилцитозинсвязывающему белку (MeCP2) в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены в табл. 36. Данные получены с использованием иммунофлуоресцентного метода. Те же параметры, оценка которых проводилась с помощью DAB-ABC-иммунопероксидазного метода представлены в табл.37.

Как следует из табл. 36 и 37, количество мест связывания с антителами к MeCP2 сниженное уже через сутки после действия стресса у животных линии ВП1, сохраняется и через две недели. У крыс линии НП2 различий в эти временные интервалы не выявлено. Спустя два месяца после окончания стрессирования происходит уменьшение количества меток у крыс линии НП2, тогда как у ВП1 различия нивелируются. Это подтверждено двумя различными гистохимическими методами.

Таблица 36. Количество мест связывания с антителами к метилцитозинсвязывающему белку (MeCP2) в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (иммунофлуоресцентный метод)

Линия	Группа	24 часа $X \pm m$	2 недели $X \pm m$	2 месяца $X \pm m$
ВП1	контроль	$2,94 \pm 0,10$	$3,15 \pm 0,09$	$3,30 \pm 0,07$
	опыт	$2,43 \pm 0,11^*$	$2,25 \pm 0,10^*$	$3,16 \pm 0,05$
НП2	контроль	$2,17 \pm 0,08$	$1,69 \pm 0,14$	$4,19 \pm 0,09$
	опыт	$2,35 \pm 0,08$	$1,98 \pm 0,12$	$3,19 \pm 0,08^*$

Обозначения: \* - отличия от контроля достоверны ( $P < 0,05$ )

Таблица 37. Количество мест связывания с антителами к метилцитозинсвязывающему белку (MeCP2) в ядрах нейронов гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (DAB-ABC-иммунопероксидазный метод)

Линия	Группа	24 часа $X \pm m$	2 недели $X \pm m$	2 месяца $X \pm m$
ВП1	контроль	$4,93 \pm 0,12$	$4,25 \pm 0,07$	$3,38 \pm 0,07$
	Опыт	$3,21 \pm 0,11^*$	$3,79 \pm 0,09^*$	$3,46 \pm 0,09$
НП2	контроль	$2,36 \pm 0,13$	$3,44 \pm 0,08$	$3,32 \pm 0,06$
	опыт	$1,96 \pm 0,16$	$3,39 \pm 0,09$	$2,68 \pm 0,05^*$

Обозначения: \*- отличия от контроля достоверны ( $P < 0,05$ );

Результаты оценки содержания 5-метилцитозина в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы в разные сроки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены в табл.38.



Таблица 38. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на содержание 5-метилцитозина в ядрах нейронов гиппокампа (CA3) крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы в разные сроки после окончания воздействия (доля иммуноположительных ядер).

Линия	Группа	24 часа $X \pm m$	2 недели $X \pm m$	2 месяца $X \pm m$
ВП1	контроль	0,10 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02
	Опыт	0,07 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01*	0,15 $\pm$ 0,02
НП2	контроль	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,03
	Опыт	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,03

Обозначения: \* - отличия от контроля той же линии достоверны ( $P < 0,05$ ).

Как следует из табл. 38, изменение (повышение) экспрессии 5-метилцитозина происходит только у крыс линии ВП1 и только через 2 недели после воздействия.

#### *Ацетилирование гистонов H4 (pan) и H3(K9/14)*

Результаты анализа количества мест связывания с антителами к ацетилированному сайтам гистона H4 (pan) (H4Lys 5,8,12-ас) в ядрах нейронов различных структур мозга крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены на табл. 39.

Как следует из табл. 39, в сенсомоторной коре после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия у крыс линии ВП1 количество мест связывания с антителами к ацетилированным формам гистона H4, достоверно увеличенное через сутки, сохраняется и через 2 недели после воздействия. В гиппокампе подобное увеличение выявлено с латентным периодом 2 недели и сохранялось до 2 месяцев. У крыс линии НП наблюдали отставленное во времени увеличение количества мест связывания антител с ацетильными группами гистона H4, в гиппокампе- спустя 2 недели, в коре- через 2 месяца.

Таким образом, продемонстрирована зависимость постстрессорной динамики ацетилирования гистона H4 от генетически детеминированного состояния нервной системы организма, структуры мозга и от времени, прошедшего после окончания стрессорного воздействия.

Таблица 39. Количество мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H4 (H4ac(pan) в ядрах нейронов различных структур мозга крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия

		Сенсомоторная кора		
Линия	Вариант	24 часа $X \pm m$	2 недели $X \pm m$	2 месяца $X \pm m$
ВП1	контроль	$1.99 \pm 0.07$	$1.84 \pm 0.07$	$2.36 \pm 0.09$
	опыт	$2.25 \pm 0.06^*$	$2.25 \pm 0.07^*$	$2.37 \pm 0.10$
НП2	контроль	$1.78 \pm 0.10$	$1.91 \pm 0.07$	$1.88 \pm 0.10$
	опыт	$1.92 \pm 0.09$	$2.12 \pm 0.08$	$2.30 \pm 0.11^*$
		Гиппокамп (поле СА3)		
Линия	Вариант	24 часа $X \pm m$	2 недели $X \pm m$	2 месяца $X \pm m$
ВП1	контроль	$2.55 \pm 0.32$	$2.08 \pm 0.05$	$2.26 \pm 0.04$
	опыт	$2.76 \pm 0.21$	$2.71 \pm 0.11^*$	$2.48 \pm 0.07^*$
НП2	контроль	$2.38 \pm 0.31$	$1.59 \pm 0.10$	$2.33 \pm 0.13$
	опыт	$2.99 \pm 0.24$	$1.87 \pm 0.09^*$	$2.36 \pm 0.08$

Обозначения: \*- отличия от контроля достоверны,  $P < 0.05$

Результаты анализа количества мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H3 (Лизины 9/14) в ядрах нейронов сенсомоторной зоны коры и гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены на табл. 40.

Как следует из табл.40, у крыс линии ВП1 наблюдается достоверное увеличение ацетилирования гистона H3 в сенсомоторной зоне коры, стабильно сохраняемое до 2-х месяцев после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия и отсутствие изменений в гиппокампе. В то же время у крыс противоположного направления селекции НП2 наблюдаются колебания уровня ацетилирования в коре (снижение через 24 часа, увеличение спустя 2 недели) и отставленный по времени рост значений исследуемого параметра в гиппокампе к 2-м месяцам после воздействия.

Таблица 40. Количество мест связывания с антителами к ацетилированным сайтам гистона H3 (H3K9/14ac) в ядрах нейронов различных структур мозга крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия

		Сенсомоторная кора		
Линия	Вариант	24 часа X±m	2 недели X±m	2 месяца X±m
ВП1	контроль	0.91 ± 0.04	0.74 ± 0.06	0.68 ± 0.05
	опыт	1.10 ± 0.05*	1.23 ± 0.06*	1.20 ± 0.05*
НП2	контроль	1.16 ± 0.06	0.85 ± 0.05	0.86 ± 0.07
	опыт	0.84 ± 0.06*	1.46 ± 0.06 *	0.93 ± 0.06
		Гиппокамп (поле СА3)		
Линия	Вариант	24 часа X±m	2 недели X±m	2 месяца X±m
ВП1	контроль	1.80 ± 0.43	1.34 ± 0.35	1.64 ± 0.12
	опыт	1.50 ± 0.02	1.55 ± 0.23	1.59 ± 0.08
НП2	контроль	1.30 ± 0.01	1.32 ± 0.05	1.41 ± 0.03
	опыт	1.27 ± 0.06	1.43 ± 0.06	1.55 ± 0.01*

Обозначения: \*- различия с контролем достоверны  $P < 0.05$

Таким образом, впервые при исследовании влияния длительного эмоционально-болевого стресса на степень ацетилирования гистонов H4 и H3 в сенсомоторной зоне коры и гиппокампе крыс с различной генетически детерминированной возбудимостью нервной системы показаны длительно сохраняемые изменения ацетилирования гистонов H3 и H4, динамика изменения которых зависит от уровня возбудимости крыс изучаемых линий и района мозга.

#### *Фосфорилирование гистона H3 по серину 10 (H3Ser10ph)*

Результаты оценки степени фосфорилирования гистона H3 по серину 10 (доля иммуноположительных клеток) в сенсомоторной коре и гиппокампе крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы в отдаленные сроки после действия длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия представлены на табл.41.

Как следует из табл.41, длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к повышению количества иммунопозитивных ядер нейронов у крыс линии НП2 в сенсомоторной зоне коры и гиппокампе. Это изменение сохраняется в гиппокампе спустя 2 недели после воздействия, а в коре- возвращается к контрольному уровню. У крыс линии ВП1 изменений изучаемого параметра не наблюдали ни в одной из исследованных структур.

Таблица 41. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на степень фосфорилирования гистона H3 по серину 10 (H3Ser10ph) в ядрах нейронов сенсомоторной зоны коры и гиппокампа крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы в разные сроки после окончания воздействия (доля иммуноположительных ядер).

Структуры мозга	Линия	Вариант	Сроки после воздействия		
			24 часа X±m	2 недели X±m	2 месяца X±m
Сенсомоторная зона коры	ВП1	контроль	0.26±0.09	0.18±0.08	0.33±0.20
		опыт	0.36±0.08	0.19 ±0.07	0.20±0.07
	НП2	контроль	0.35±0.08	0.38±0.07	0.32±0.18
		опыт	0.70±0.07 *	0.21±0.07	0.30±0.07
Гиппокамп (CA3)	ВП1	контроль	0.49±0.04	0.45±0.04	0.44±0.04
		опыт	0.47±0.05	0.46±0.04	0.45±0.03
	НП2	контроль	0.14±0.04	0.07±0.04	0.10±0.03
		опыт	0.51±0.04 *	0.36±0.03 *	0.06±0.03

Обозначения : \*- различия со значениями в контроле достоверны (P< 0,05).

#### *Метилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4-me-di-tri)*

В табл. 42 представлены результаты анализа доли иммуноположительных клеток к метилированному по лизину 4 гистону H3 в префронтальной коре и гиппокампе крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы в разные сроки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. Как следует из табл.42, под влиянием стресса уровень метилирования гистона H3 снижается в префронтальной медиальной коре крыс линии ВП1 с латентным периодом 2 месяца, а в гиппокампе- к 2-м

неделям после окончания воздействия. У крыс линии НП2 изменения происходят только в гиппокампе- уровень метилирования повышается спустя две недели и сохраняется на таком же уровне через два месяца после воздействия.

Таблица 42. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на степень метилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4me-2-3) в ядрах нейронов префронтальной медиальной коры и гиппокампа крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы в разные сроки после окончания воздействия (доля иммуноположительных ядер).

Структуры мозга	Линия	Вариант	Сроки после воздействия		
			24 часа	2 недели	2 месяца
			X±m	X±m	X±m
Префронтальная медиальная кора	ВП1	контроль	0.74±0.06	0.71±0.06	0.73±0.01
		опыт	0.72±0.15	0.69 ±0.07	0.58±0.02*
	НП2	контроль	0.79±0.05	0.51±0.08	0.51±0.01
		опыт	0.76±0.04	0.50±0.09	0.54±0.02
Гиппокамп (CA3)	ВП1	контроль	0.22±0.02	0.24±0.02	0.34±0.04
		опыт	0.47±0.05	0.08±0.03*	0.36±0.04
	НП2	контроль	0.11±0.02	0.07±0.04	0.25±0.04
		опыт	0.10±0.02	0.41±0.03*	0.46±0.04*

Обозначения : \*- различия со значениями в контроле достоверны (P< 0,05).

Таким образом, обобщая результаты анализа изменений ряда эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в отдаленные сроки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия, можно заключить : Показано участие эпигенетических модификаций- метилирования ДНК, ацетилирования гистонов H4 и H3, фосфорилирования и метилирования гистона H3 по активаторным сайтам в реакции на эмоционально- болевой стресс в разных структурах мозга . Динамика их долгосрочного изменения в нейронах является специфичной для каждой линии и зависимой от структуры мозга (префронтальная и сенсо-моторная зоны коры, гиппокамп) .

### 3.4. Влияние стресса на инсерции ретротранспозона LINE1 в ген *grin1*

На рис.16 представлены результаты *in situ* гибридизации соматических хромосом крысы с ORF фрагментом ретротранспозона LINE1, демонстрирующие распространение L1 в геноме крысы *Rattus norvegicus*.

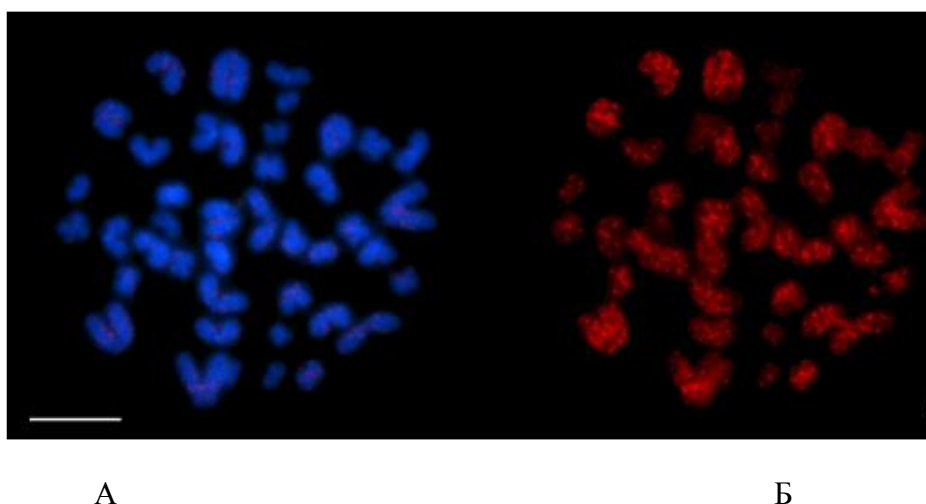


Рис.16. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) с ORF фрагментом ретротранспозона LINE1( Б ) и дифференциальное окрашивание DAPI (А) соматических хромосом *Rattus norvegicus*.

В табл.43 и на рис.17 представлены результаты ПЦР-скрининга на внедрения ретротранспозона L1 у крыс двух линий ВП и НП после действия короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия. Как следует из табл.43, наблюдают несколько классов различных бэндов : стабильно проявляющиеся во всех пробах и имеющие индивидуальную вариабельность и линейную специфичность у интактных крыс (это более подробно описано в разделе 3.1.4.). Действие стресса приводит к появлению специфических бэндов : 2- специфичен для линии НП; 3- специфичен для линии ВП; 5,6- изменяются у обеих линий относительно линейных особенностей экспрессии в контрольных группах.

Нами был клонирован и секвенирован фрагмент гена размером 1310 пн. Прямой праймер:AGGCGAAGATTCTGCATGGAGA;обратныйпраймер:CCCTGGTACCTGCCCAGAGC. Данные нуклеотидного сиквенса были поданы в GenBank под номером JN387089. ПЦР-скрининг на сайт-специфичное внедрение мобильных элементов выявил 15-22 химерных фрагмента, показывая множественные внедрения ретротранспозона L1 в интроны гена *grin1* Большинство внедрений локализовано в начале гена (рис.18). Два из амплифицированных фрагментов № 1 (527 пн) и № 11 (690 пн) (Табл. 43) были клонированы и секвенированы.

Данные нуклеотидного сиквенса были поданы в GenBank под номерами JN387090 и JN387091. Поиск по базе данных BLAST показал, что 5' конец фрагмента 1 на 94% - 95% соответствует ретротранспозону L1 (AC\_111321.8; AC\_126722.7; AC\_140734.5; AC\_095803.6, etc.), а 3' конец соответствует на 84% - 99% последовательности гена *grin1* (AC\_000071.1). Кроме того, соответствие было найдено с последовательностями на хромосоме 13, что свидетельствует о локализации вероятно нефункциональной копии фрагмента *grin1* на этой хромосоме.

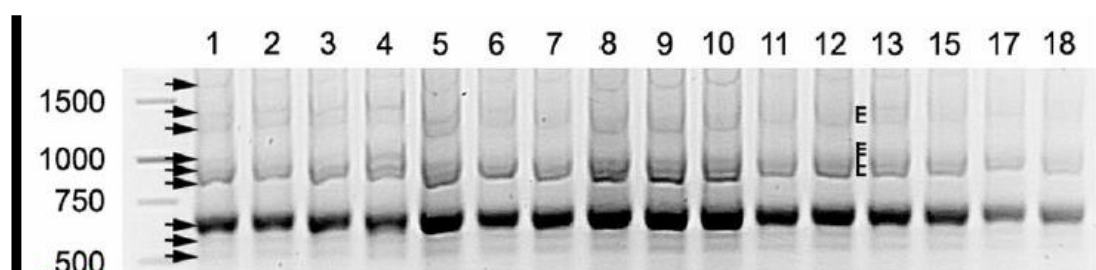


Рис.17. Результаты ПЦР-скрининга внедрения ретротранспозона L1 в ген *grin1* в норме и после применения короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия. Обозначения : 1-18- номера проб: 1-3- ВП опыт, 4-6- ВП контроль; 7-9-НП опыт, 10-12-НП контроль; 13,15-Вистар опыт, 17,18-Вистар контроль.

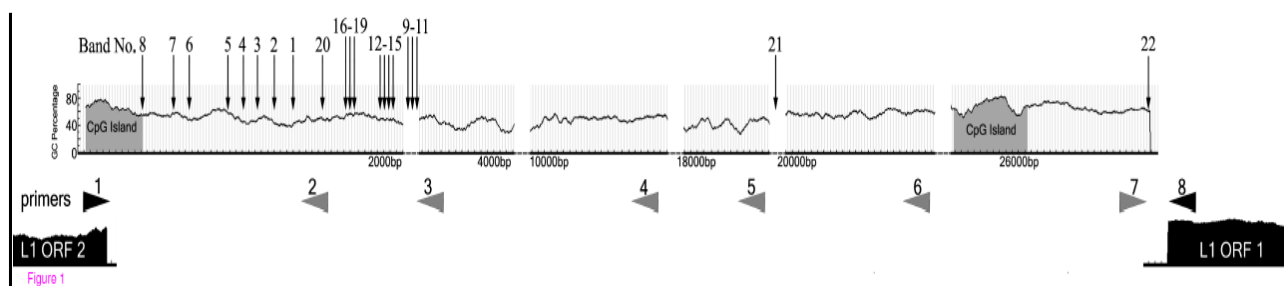


Рис.18 Схема, демонстрирующая сайты внедрения L1 в ген *grin1* (показано стрелками).

Табл.43. Результаты ПЦР-скрининга на внедрения ретротранспозона L1 в ген *grin1* крыс двух линий ВП и НП после действия короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Линии	ВП						НП					
Группы	Стресс			Контроль			Стресс			Контроль		
№ проб	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пара праймеров 1-2												
Бэнд, п.н.												
1. 540	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2. 600							++	++	++			
3. 760	++	++	++	++			+++	+++	+++	+++	+++	+++
4. 850	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. 950	++	++	++	+++	++		+	+	+	++	++	++
6. 1200	+	+	+	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+
7. 1300				+	+	+						
8. 1500	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Пара праймеров 1-3												
9. 520	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
10. 580	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
11. 690	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12. 810	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13. 950	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
14. 1010	++		++	++	++	++	++	++	++	++		
15. 1250	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
16. 1300											++	
17. 1450	++	++	++	++	++	++						
18. 1750	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Пара праймеров 1-4 ( бэндов не обнаружено)												
Пара праймеров 1-5( бэндов не обнаружено)												
Пара праймеров 1-6												
19. 2000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Пара праймеров 7-8												
20. 480	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	+++	+++
Сумма	17	16	17	18	17	16	17	17	17	16	16	15

Обозначения : +++, ++, +- степень выраженности бэнда (сильная, средняя, слабая), желтым цветом обозначены участки, которые были клонированы и секвенированы.



На рис.19 представлены результаты направленного ПЦР-скрининга внедрения ретротранспозона L1 в ген *grin1* с использованием праймеров к последовательностям гена *grin1* и последовательностям транспозона L1 (см. гл. Материал и методы) на геномной ДНК гиппокампа и костного мозга крыс двух линий ВП1 и НП2 после короткого, длительного и массивного эмоционально-болевого стрессорных воздействий.

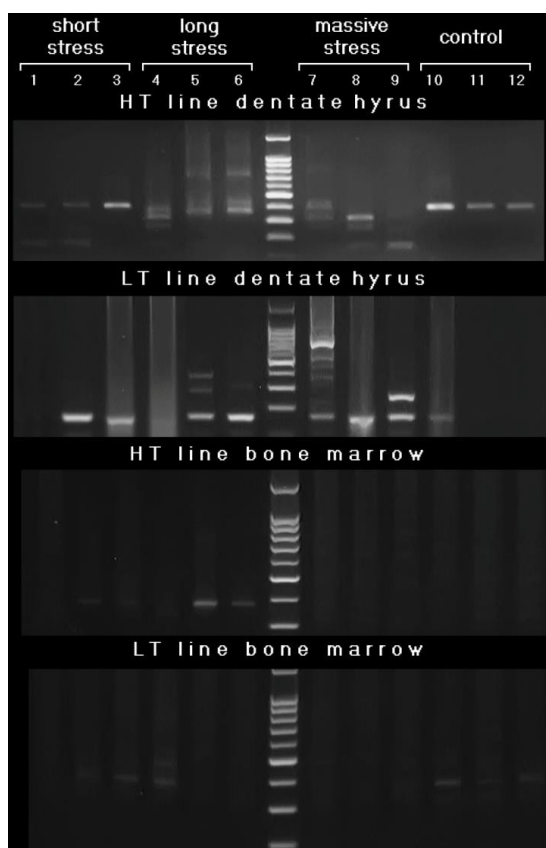


Рис.19. Результаты направленного ПЦР-скрининга внедрения ретротранспозона L1 в ген *grin1* после применения разных схем эмоционально-болевого стрессорного воздействия (короткое, длительное и массивное). Обозначения : LT- линия ВП , HT- линия НП, short stress- КЭБС, long stress- ДЭБС, massive stress- МЭБС, 1,2,3...12- номера крыс.

Как видно из рис.19 , схема длительного и массивного стрессорных воздействий вызывает появление дополнительных специфических полос, рисунок которых различается у крыс двух линий, что свидетельствует о возрастании активности ретроэлемента L1 в гиппокампе крыс под действием продолжительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. В костном мозге только у группы крыс линии ВП1 выявляются специфические полосы, свидетельствующие о внедрении L1 в ген *grin1*.

Таким образом, показано существование ткане-специфических линейных особенностей активизации ретротранспозона L1 под влиянием длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

### 3.5. Влияние стресса на количество вариаций числа копий генов *grin1*, *ywhaz*, *gapdh*, *rpl13a*

Относительное количество вариаций числа копий между двумя генами в гиппокампе и костном мозге крыс линий с различной возбудимостью нервной системы ВП1 и НП2 после длительного и массивного эмоционально-болевого стресса представлено в табл.44.

Табл.44. Относительное количество вариаций числа копий (М) между двумя генами в гиппокампе и костном мозге крыс линий с различной возбудимостью нервной системы после длительного и массивного эмоционально-болевого стресса.

Вариант	Линия	<i>grin1</i> : <i>ywhaz</i>	<i>grin1</i> : <i>rpl13a</i>	<i>gapdh</i> : <i>grin1</i>	<i>gapdh</i> : <i>rpl13a</i>	<i>ywhaz</i> : <i>rpl13a</i>
Гиппокамп	ВП1 контроль	1,8:1	23,0:1a	1,6:1	24,6:1a	17,1:1a
	ВП1 ДЭБС	1,6:1	18,9:1a	1,9:1	27,6:1a	13,8:1a
	ВП1 МЭБС	1,5:1	24,1:1a	1,6:1	37,5:1a	16,0:1a
	НП2 контроль	1,4:1	2,8:1	1,7:1	2,9:1	1,8:1
	НП2 ДЭБС	1,1:1	2,3:1	1,7:1	3,2:1	2,3:1
	НП2МЭБС	1,3:1	2,3:1	1,6:1	2,8:1	1,9:1
Костный мозг	ВП1 контроль	2,1:1	23,7:1a	1,3:1	34,9:1a	24,7:1a
	ВП1 ДЭБС	2,1:1	28,7:1ab	1,4:1	41,0:1a	26,2:1a
	ВП1 МЭБС	1,9:1	24,3:1a	1,3:1	41,2:1a	16,2:1a
	НП2 контроль	2,5:1	1,7:1	1,1:1	1,4:1	2,1:1
	НП2 ДЭБС	2,9:1	1,7:1	1,1:1	1,5:1	2,1:1
	НП2МЭБС	2,6:1	1,8:1	1,2:1	1,9:1	2,3:1a

Обозначения : М- медианы значений вариаций числа копий тестируемого гена по отношению к референсному. а - различия со значениями двух других групп достоверны ( $p < 0,05$ ), b- различия со значением в контрольной группе той же линии достоверны ( $p < 0,05$ ), критерий Манна-Уитни (U).

Как видно из табл.44, только в костном мозге длительный эмоционально-болевым стресс у крыс линии ВП1 вызывает снижение количества вариаций числа копий гена *rpl13a* и только в одном варианте по отношению к гену *grin1*. Независимо от влияния длительного и массированного эмоционально-болевого стресса, и в гиппокампе, и в костном мозге крыс линии ВП1 происходит снижение количества вариаций числа копий гена *rpl13a* по отношению к трем исследуемым референсным генам *grin1*, *ywhaz*, *gapdh* (табл.44).

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Определение цитогенетических и молекулярно-клеточных механизмов, связанных с действием стресса и формированием постстрессорных патологий и выявление соответствующих биомаркеров для дифференциальной диагностики дезадаптивных состояний с учетом индивидуальных, генетически-детерминированных свойств нервной системы важно для разработки подходов предиктивной персонализированной медицины. Одним из факторов, лежащих в основе индивидуально-типологических свойств нервной системы и определяющих реакцию организма на стрессорные воздействия является возбудимость нервной системы, основной параметр ее функционального состояния (Вайдо, 2000). Известно, что уровень возбудимости нервной системы создает генерализованный фон, от которого зависят и особенности проявления стресс-реактивности организма, определяемые комплексом поведенческих, физиологических, биохимических, нейроэндокринных сдвигов (Вайдо, 2000), изменениями в протекании глубинных генетических и цитогенетических процессов. Такие цитогенетические параметры, как уровень хромосомных aberrаций и степень конденсации хроматина являются надежными показателями состояния генетического аппарата клеток в условиях различного рода воздействий на организм и отражают его чувствительность к стрессирующим факторам. Методы их исследования в активно пролиферирующих тканях являются часто используемым критерием его оценки. Как уже указывалось выше, изучение этих процессов в мозге имеет ряд методических ограничений в связи с отсутствием постоянных клеточных делений в постмитотических нейронах. Оценить частоту хромосомных нарушений в центральной нервной системе возможно только в эмбриональном мозге на ключевых этапах активной пролиферации клеток в определенных районах развивающегося мозга (Резников, 1981; Резников, Назаревская, 1989). В структурах зрелого мозга показателем активности генома в нейронах может быть степень конденсации хроматина и связанные с ней цитогенетические параметры ядра: количественные характеристики конденсированного хроматина и высококонденсированного С-гетерохроматина (площадь и число хромоцентров, их оптические и пространственные свойства) (Komitovsky et al., 1988). Изменения конденсации хроматина связаны с эпигенетическими модификациями ДНК и гистонов, исследование которых в разных структурах мозга, их клеточного распределения и особенностей экспрессии представляется адекватным с применением методов иммуноцитохимии.

Обобщим основные результаты оценки влияния короткого и длительного эмоционально-болевого стрессорных воздействий, примененных на разных этапах

онтогенеза - в пренатальный период развития эмбрионов и у взрослых, половозрелых животных на комплекс цитогенетических и молекулярно-клеточных характеристик клеток головного мозга у крыс линий, контрастно различающихся по возбудимости нервной системы.

#### **4.1. Влияние эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики развивающегося мозга крыс: роль генетически детерминированной возбудимости нервной системы**

Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие на беременных крыс в пренатальный период развития эмбрионов приводит к увеличению в клетках развивающегося мозга митотического индекса, уровня хромосомных aberrаций и снижению количественных характеристик общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина независимо от линейных характеристик нервной системы животных. Важно отметить парадоксальный рост пролиферативной активности клеток развивающегося гиппокампа под влиянием короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия. В других тканях у взрослых животных стресс оказывает, напротив, ингибирующее влияние на митотический индекс. Вероятно, это связано с особенностями эмбрионального развития мозга, спецификой нервной ткани и соотношением гормонов про- и антимитотического действия в развивающемся организме.

Исследуемые признаки связаны между собой в клеточном цикле: состояние хроматина определяет специфику возникающих структурных нарушений хромосом (Прокофьева-Бельговская, 1986), реализация которых зависит от пролиферативной активности клеток и скорости митотических процессов (Лебедева и др., 1993). Изменения каждого из этих признаков под влиянием стресса может иметь самостоятельное значение для развития мозга и его функционирования. Так, сдвиг в пролиферативной активности дифференцирующихся нейронов и увеличение частоты хромосомных aberrаций, приводящее в случае высоких значений к гибели клеток, может повлиять на нейроморфологические особенности ЦНС взрослого организма, вызвать изменения количества нейронов. Известно, что пренатальный стресс оказывает существенное влияние на структурно-функциональные особенности нервной системы, врожденные и приобретенные поведенческие реакции, что предполагает возможность стрессогенной модификации цитогенетических, находящихся под нейрогормональным контролем, процессов в ходе нейрогенеза (Дыгало и др., 1997; Jones et al., 1997, Lordi et al., 1997; Williams et al., 1998).

Показано, что результатом отдаленного влияния короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия в пренатальный период является изменение планиметрической плотности нейронов гиппокампа у 24-дневных и 3-х месячных крыс, зависящее от конституциональных характеристик нервной системы животных (табл.45, данные Вшивцевой В.В., Shiryaeva et al., 2008). Таким образом, пренатальное стрессирование приводит к длительным клеточно-тканевым изменениям гиппокампа, как зависящим (планиметрическая плотность нейронов) (Shiryaeva et al., 2008), так и не зависящим (площадь С-гетерохроматина) от уровня возбудимости нервной системы крыс. Возможно, это сопряжено с одновременным становлением в онтогенезе структурно-функциональных характеристик нервной системы, связанных с возбудимостью.

Таблица 45. Влияние пренатального (короткого эмоционально-болевого) стресса на относительное число клеток гиппокампа (на 1мм<sup>2</sup> нервной ткани) в ядрах нейронов развивающегося гиппокампа эмбрионов (16-17ЭД) и зрелого гиппокампа 24-дневных и 3-месячных самцов крыс линий ВП и НП ( $X \pm m$ )

Линия	Вариант	Эмбрионы(16-17ЭД) $x \pm m$	Крысята(24 дня) $x \pm m$	Крысы(3 мес.) $x \pm m$
ВП1	Контроль	118,0 $\pm$ 2,8	18,7 $\pm$ 0,8	12,5 $\pm$ 0,5
	Опыт	114,2 $\pm$ 3,6*	15,3 $\pm$ 0,6*	10,9 $\pm$ 0,5*
НП2	Контроль	89,4 $\pm$ 2,0	8,7 $\pm$ 0,4	6,6 $\pm$ 0,2
	Опыт	93,7 $\pm$ 2,4	7,3 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,2

Обозначения: \*- различия с контролем той же линии достоверны,  $P < 0.05$

Исходя из полученных результатов можно думать, что долгосрочные последствия влияния стресса на поведение потомков стрессированных матерей могут быть связаны как с нарушениями процесса нейрогенеза, так и с изменением структуры хромосом нейронов, влияющим на экспрессию генов (уменьшение площади гетерохроматина- деконденсация хроматина- увеличение доступа к промоторам генов транскрипционных факторов- рост экспрессии генов) и в результате модификации характеристик нейронов. В настоящее время эти положения имеют подтверждения в литературе (Отеллин и др., 2007, Jia et al., 2010, Odaqiri et al., 2008). Известно, что испытание пренатального стресса приводит к широкому

спектру негативных последствий на взрослый организм, поскольку вызывает репрограммирование генома и эпигенома (Bale, 2015 ).

#### **4.2. Влияние короткого и длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические процессы в костном мозге, цитогенетические и молекулярно-клеточные характеристики различных районов головного мозга крыс : роль генетически детерминированной возбудимости нервной системы**

Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие на взрослых, половозрелых животных также оказывает влияние на цитогенетические характеристики как клеток костного мозга, так и постмитотических нейронов в разных структурах головного мозга. Рассмотрим последовательно особенности влияния короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия – 1) на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга в сопоставлении с влиянием мутагена циклофосфана и сочетанным действием стресса и мутагена ; 2) на характеристики хроматина и гетерохроматина в нейронах различных структур мозга с оценкой влияния суточного ритма на проявление действия стресса у крыс линий, различающихся по возбудимости нервной системы.

Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие индуцирует рост хромосомных aberrаций в клетках костного мозга только у крыс высоковозбудимых линий НП1 и НП2. Выявленный эффект влияния стрессорного воздействия по существующей классификации может быть отнесен к мутагенному и классифицируется как слабый мутагенный эффект (Середенин, Дурнев, 1992). Мутагенный эффект короткого стресса можно объяснить генотоксическим действием эндогенных факторов гуморальной природы и/или свободнорадикальных продуктов перекисного окисления в результате активации перекисного окисления липидов на первых стадиях действия стресса (Таранова и др., 1994 ). Представляется вероятным, что при нарушении гормонального баланса гормоны способны прямо или опосредованно взаимодействовать с ДНК . Короткий эмоционально-болевым стресс индуцирует в клетках костного мозга крыс формирование фрагментов, в основном, одиночных, редко-парных. Перестроек обменного типа не обнаружено. Однако, следует упомянуть о существовании критической точки зрения на природу фрагментов (например, Biessman et al., 1990a,б). Так, даже индуцируемые облучением фрагменты могут отражать наличие временной, обратимой деконденсации хроматина и не могут служить истинным критерием мутагенеза. Тем не менее, независимо от существующих взглядов на

происхождение и значение для клетки выявленных хромосомных аномалий, можно определенно полагать, что существует влияние применяемой в нашей работе схемы короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на структурно-функциональные характеристики хромосом клеток костного мозга, зависимое от линейных особенностей (уровня возбудимости) животных. Высокий уровень возбудимости нервной системы (низкий порог) оказывается критичным при формировании цитогенетического эффекта короткого стресса.

После длительного стрессирования изменений уровня хромосомных нарушений не выявлено. Ранее было установлено, что длительный стресс влияет на гормональный статус селектированных линий. У крыс линии ВП1 снижается уровень кортикостерона, у линии НП2- ослабляется функция щитовидной железы (Дмитриева, Лопатина, 1991, Дмитриева и др., 1994). Это может приводить к общему снижению метаболической активности и, возможно, тем самым ослаблять мутагенное влияние стресса.

В условиях действия мутагена, так же как и при действии эмоционально-болевого стресса более чувствительными оказываются также высоковозбудимые линии крыс. Крысы высоковозбудимых линий (НП1 и НП2) проявили большую чувствительность к мутагену по сравнению с низковоозбудимыми (ВП1 и ВП2) как по количеству обменных перестроек типа транслокаций, так и по количеству поврежденных хромосом на 100 метафаз. Значения этих показателей у крыс НП1 и НП2 достоверно превышали аналогичные значения крыс ВП1 и ВП2 при сравнении между линиями в пределах одной селекционной программы. Направленный характер повышения обменных процессов между хромосомами у высоковозбудимых линий НП может быть обусловлен тем, что отбор по возбудимости нервной системы сопровождался изменениями генома, которые сопряжены с увеличением уровня эктопического спаривания хромосом и негомологичной рекомбинации при действии мутагена. Это в свою очередь может определяться активностью мобильных генетических элементов в геноме. Результаты наших исследований как раз свидетельствуют в пользу линейных различий в полиморфизме ретротранспозона LINE1 и линейных особенностях его активизации под влиянием стрессорных воздействий. Подобная ситуация наблюдалась и при отборе линий дрозофилы с низкой половой активностью, характеризующихся повышенной мутабельностью (Гвоздев, Кайданов, 1986).

Поскольку существует корреляция между уровнем возбудимости и степенью метаболической активности органов и тканей, можно предположить, что циклофосфан-мутаген непрямого действия, требующий ферментативной активации системой микросомальных оксигеназ (Grochow, Colvin, 1979; Domeyer, Sladek, 1980), должен



индуцировать повышенный уровень хромосомных нарушений у высоковозбудимых животных НП линий, которые характеризуются более активным функционированием щитовидной железы и гипоталамуса (Гофман и др., 1987, Дмитриева, Гоццо, 1985). Это и прослеживается при анализе частоты транслокаций, которая составляет более высокие значения у крыс линий НП1 и НП2 по сравнению с ВП1 и ВП2 соответственно. По другим исследуемым показателям (частоте фрагментов и количеству клеток с абберациями) выявлен иной характер различий у крыс изучаемых линий. Так, по числу одиночных фрагментов межлинейные различия не обнаружены, по количеству парных фрагментов крысы линии ВП2 превосходят крыс линии НП2, тогда как между животными ВП1 и НП1 различий не выявлено. В целом, сравнивая результаты, полученные по всем линиям, отчетливой связи этого показателя с возбудимостью нервной системы не наблюдали. В соответствии с характеристиками линий по количеству обменных перестроек можно было ожидать пропорционального изменения и количества клеток с абберациями. Однако характер различий по этому показателю сохранялся только между линиями НП1 и ВП1, тогда как количество клеток с абберациями у крыс линии ВП2 превосходило таковое у животных НП2. Следует отметить, что у крыс линии ВП2 на фоне достаточно ровных значений всех других показателей наблюдали очень высокий процент недифференцируемых множественных аббераций. Величина именно этого показателя, возможно, и повлияла на преобладающее значение количества клеток с абберациями. Таким образом, в результате исследования действия циклофосфида среди изученных цитогенетических характеристик установлена определенная связь с возбудимостью нервной системы только количества обменных перестроек типа транслокаций. По частоте возникновения фрагментов такой закономерности не прослеживается, а число клеток с абберациями сложно, нелинейно связано с возбудимостью.

Циклофосфан относится к мутагенам непрямого действия, эффективность которых зависит от уровня экспрессии генов, контролирующих Р-450 цитохром-зависимые монооксигеназы. При сочетании действия короткого эмоционально-болевого стресса и циклофосфана, короткий стресс модифицирует на клеточном и тканевом уровне реакцию метаболической биотрансформации ксенобиотиков в направлении блокирования системы ферментов первого этапа метаболической активации (превращения циклофосфана в активную форму хлорэтиламина). Ферменты метаболической активации противодействуют поражению клеток ксенобиотиками. Исходя из этого логического ряда, можно ожидать, что агенты прямого действия на геном могут оказаться значительно более агрессивными при их сочетании со стрессорными воздействиями. Короткий эмоционально-болевой стресс в

сочетании с действием циклофосфана влияет на частоту хромосомных нарушений следующим образом: приводит к снижению количества клеток с абберациями, относительного количества транслокаций и поврежденных хромосом у животных всех четырех исследованных линий по сравнению с действием только циклофосфана, то есть обладает протекторным эффектом. Интересно отметить, что у животных линии НП2 комбинированное действие стресса и циклофосфана приводит к минимальному снижению цитогенетического эффекта циклофосфана по сравнению с тремя другими линиями.

Короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к изменению цитогенетических показателей в нейронах различных структур головного мозга крыс исследуемых линий. При действии стресса прослеживается снижение площади С-гетерохроматина, зависимое от района мозга (гиппокамп, сенсомоторная зона коры) и от линейных особенностей крыс. Так, в сенсомоторной зоне коры изменения этого параметра происходят у крыс линии ВП1, а в гиппокампе-у крыс линии НП2. Изменения числа хромоцентров происходит независимо от их площади и разнонаправленно: в сенсомоторной зоне коры- число хромоцентров увеличивается, и только у крыс линии НП2, в гиппокампе, напротив, происходит снижение числа хромоцентров, причем у животных обеих линий. Уменьшение числа хромоцентров в гиппокампе может свидетельствовать об активации транскрипционных процессов, обеспечиваемых различными путями у двух линий крыс: у ВП1- за счет формирования особой пространственной структуры ядра со специфической хромоцентральной организацией, у НП2- за счет избирательной деконденсации части участков гетерохроматина. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о влиянии короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия на количественные характеристики С- гетерохроматина в нейронах, характер которого различается в двух структурах мозга в зависимости от возбудимости нервной системы крыс исследуемых линий. Выявленная зависимость может быть связана с межлинейными особенностями внутриклеточных регуляторных систем (циклического- АМФ и фосфоинозитидной), продемонстрированными ранее (Шарагина и др., 1992; Райзе и др., 1997) и отражать изменения в рамках адаптивных реакций у двух линий.

Здесь же следует упомянуть, что в ответ на короткое эмоционально-болевое стрессорное воздействие значительно возрастает количество каинатных рецепторов, представляющих первое звено механизма эксайтотоксичности, в гиппокампе крыс линии НП2, что демонстрируют результаты иммуногистохимического изучения локализации и распределения GluR56/7-содержащих каинатных рецепторов (табл.46 и рис.20 , данные Левиной А.С., Левина и др., 2011). Увеличение количества рецепторов можно объяснить

процессами сенситизации вследствие гипервозбуждения клеток и, возможно, увеличением числа синапсов, т.к. к качественным особенностям развития патологических процессов относится и образование новых межнейронных связей вследствие пластических изменений (Крыжановский, 1997). Эффекты увеличения количества каинатных рецепторов вследствие аноксического стресса описаны в литературе (El-Khodori et al., 2004).

Таблица 46. Площадь (мкм<sup>2</sup>) иммуногистохимического мечения GluR5/6/7-содержащих каинатных рецепторов на срезах гиппокампа крыс двух линий в норме и после действия короткого стресса.

группа линия	Контроль $X \pm m$	Опыт $X \pm m$
ВП1	6867,92 $\pm$ 357,422	6669,54 $\pm$ 452,755
НП2	5058,89 $\pm$ 400,75*	9820,15 $\pm$ 335,944**

Обозначения: \*- различия с контролем линии ВП1 достоверны ( $P < 0,05$ ), \*\* - различия с контролем той же линии достоверны ( $P < 0,05$ ), t-критерий Стьюдента и тест Манна-Уитни.

Известно, что суточные ритмы оказывают существенное влияние на протекание многих процессов, связанных с системами жизнеобеспечения организма. Нами показано, что время суток влияет и на особенности действия эмоционально-болевого стресса на цитогенетические характеристики нейронов гиппокампа. Выявленный характер изменений, вероятно, связан с вечерней и ночной активностью крыс, сопровождающейся соответствующим повышением интенсивности матричных процессов в темное время суток и в результате деконденсацией определенных участков хроматина (Ярыгин, Мустафин, 2000). Можно предположить также, что при этом в мозге происходит избирательная активация определенных групп генов. Так, например, в гиппокампе крыс выявлены циркадианные изменения в экспрессии Fos-белков (Kononen et al., 1990) и м РНК нейротрофического фактора BDNF (Berchtold et al., 1999). Универсальной реакцией на стрессорное воздействие является продемонстрированное в данной работе снижение площади участков конденсированного хроматина. Следует отметить, что у крыс линии НП2 эта реакция не зависит от времени суток, тогда как у крыс линии ВП1 проявляется лишь утром, в вечерние часы изменений по сравнению с контролем не происходит.

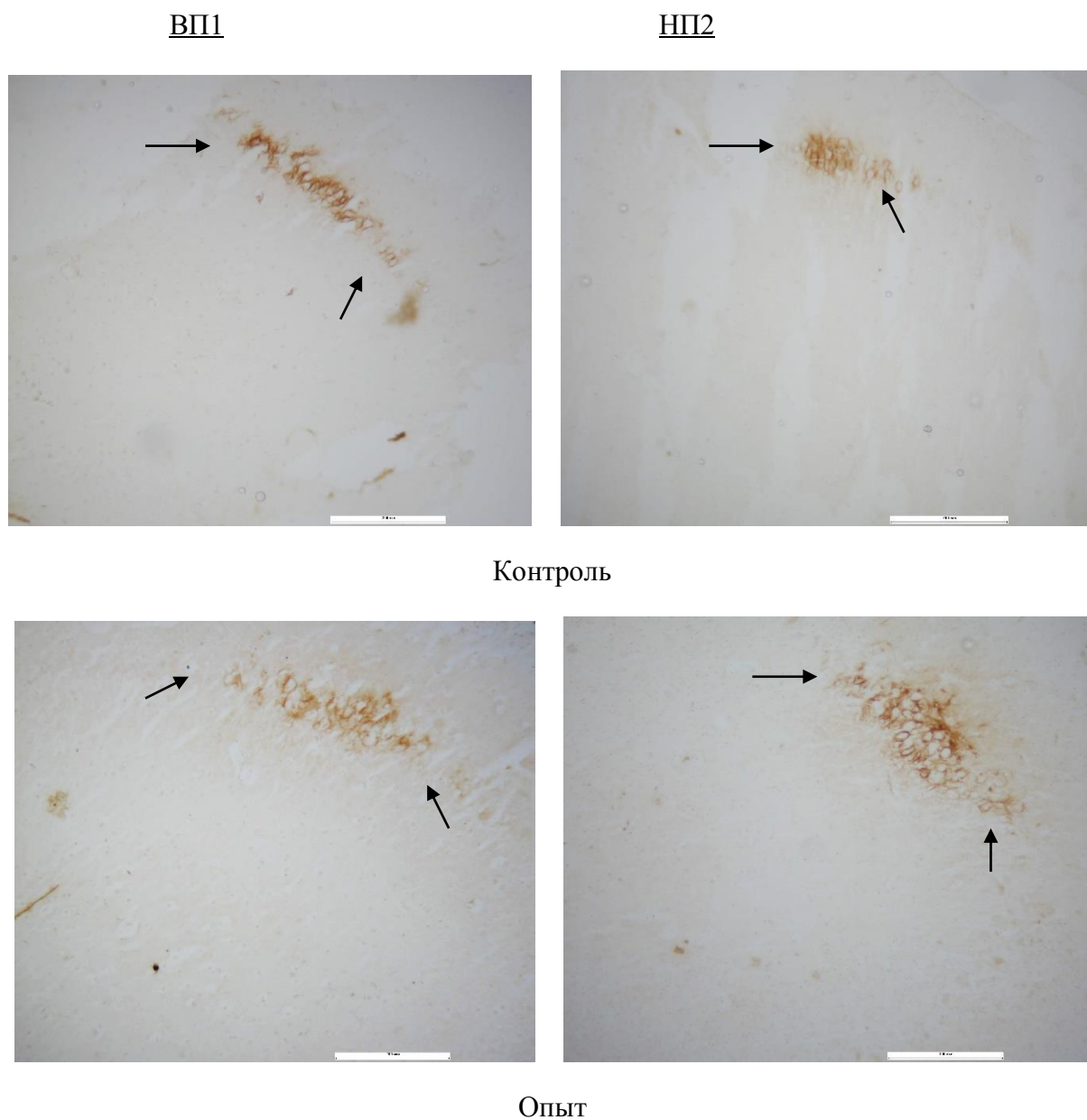


Рис.20 . Распределение каинатных рецепторов в гиппокампе крыс в норме (контроль) и после короткого стресса (опыт); иммуногистохимическое окрашивание, I AT – к GluR 5/6/7 (Santa Cruz)(разведение 1:100), II AT – универсальное биотинилированное (Quick Kit); масштаб: 200 мкм.Стрелками обозначены границы районов пирамидного слоя, содержащих рецепторы.

По числу хромоцентров в условиях короткого эмоционально-болевого стресса наблюдается обратная картина : у крыс линии ВП1 повышение числа хромоцентров не зависит от времени суток, тогда как у крыс линии НП2 утром число хромоцентров уменьшается, а вечером – увеличивается. Эти данные позволяют предположить, что чувствительность генетического аппарата к внешним воздействиям у животных,

контрастных по возбудимости нервной системы, являющихся крайними вариантами нормы признака в популяции, имеют разный суточный ритм. Правомочность подобного утверждения может быть подкреплена и другими фактами, полученными ранее на линиях ВП1 и НП2. Так, ритмы вкусовой чувствительности к фенилтиокарбамиду различаются у крыс с низким и высоким порогами возбудимости нервной системы (Павлова, 1997). Было обнаружено, что проявление межлинейных различий в эмоциональной реактивности у крыс с разным функциональным состоянием нервной системы зависит от фазы циркадного ритма (Ширяева и др., 1992). Суточный ритм изменения поведенческих параметров несомненно сопряжен с активностью нейронального генома прежде всего в структурах мозга, связанных с реализацией поведения. В работах, выполненных на линиях дрозофилы, различающихся по уровню функциональной активности нервной системы, доказано влияние суточного ритма на связь между проявлением поведенческих признаков (двигательная активность) и активностью генетического аппарата (частота кроссинговера) (Корочкина и др., 1985). Изменение оптической плотности после стрессорного воздействия на животных не было специфичным для каждой из линий. Однако изучение влияния на нее суточного ритма позволяет внести некоторые уточнения в направленность изменения этого показателя. В утренние часы после короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия оптическая плотность у животных обеих линий снижается, тогда как в вечерние часы – повышается. Эти изменения отражают по-видимому универсальные механизмы суточной регуляции активности генома при воздействии на организм стрессорных факторов. Изменения исследуемых показателей: числа и площади районов конденсированного хроматина, их относительной оптической плотности происходят независимо, что свидетельствует в пользу специфичности механизмов, определяющих проявление этих признаков и/или связано со структурно-функциональной гетерогенностью участков конденсированного хроматина (гетерохроматин, эухроматин и т.д.).

Длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие также приводит к изменениям в нейронах гиппокампа на хромосомном уровне, зависящим от уровня возбудимости нервной системы животных. Также, как и при действии короткого эмоционально-болевого стрессорного воздействия, примененного на разных этапах онтогенеза, происходит снижение площади районов гетерохроматина в ядрах постмитотических нейронов гиппокампа крыс, но только у низковозбудимой линии ВП1. Снижение площади гетерохроматина свидетельствует о процессах его деконденсации под действием стрессорных факторов. При этом может начаться экспрессия как обнаруженных в последнее время гетерохроматиновых генов (Beckers et al., 2001), так и не

функционировавших вследствие эффекта положения эухроматиновых участков хромосом. Показано, что у линии ВП1 после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия наблюдается снижение уровня кортикостерона (Ордян и др., 1998). Поскольку стероидные гормоны входят в систему антиоксидантной защиты, такой эффект наряду с предполагаемым увеличением перекисного окисления липидов может определять у крыс линии ВП1 и влияние на состояние хроматина в нейронах. Возможна причинно-следственная связь между изменением количественных характеристик хроматина в нейронах и резким возрастанием возбудимости вследствие влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия у крыс линии ВП1 (Ширяева и др., 1992). Под влиянием длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия у крыс этой линии происходит увеличение содержания РНК в нейронах гиппокампа (Вайдо и др., 2009), что указывает на усиление в них транскрипционных процессов, связанных с ремоделированием хроматина. В настоящее время с помощью различных методов, включая *microarray*, продемонстрировано изменение экспрессии многих генов сразу после стрессорных воздействий (Irwin, 2000), однако остается открытым вопрос, насколько долго оно сохраняется и каковы регуляторные механизмы долгосрочных изменений генной экспрессии.

Таким образом, на основании изучения влияния различающихся по длительности стрессорных воздействий на количественные характеристики хроматина нейронов гиппокампа и сенсомоторной зоны коры головного мозга крыс с различной возбудимостью нервной системы можно заключить : обязательными компонентами реакции на стресс со стороны хромосомного аппарата нейронов являются : 1) снижение площади хромоцентров, наблюдаемое и после короткого, и после длительного стресса , свидетельствующее об уменьшении общего количества конденсированного хроматина , вызванного избирательной деконденсацией части гетерохроматиновых районов; 2) изменение хромоцентральной организации нейрональных ядер после действия короткого стресса в результате агрегации или дезагрегации хромоцентров, причем соотношение этих компонентов в разных структурах мозга является специфичным для каждой линии. В этой связи интересно отметить, что длительный эмоционально-болевым стресс подавляет формирование одонитевых разрывов ДНК в гиппокампе только у крыс линии ВП1 и не вызывает их изменения в коре (Паткин и др., 2001).

Сравнивая чувствительность исследуемых линий крыс к действию короткого и длительного эмоционально-болевого стрессорных воздействий в других тестах, можно заключить : большей стресс- реактивностью в ответ на короткий эмоционально-болевым стресс обладают высоковозбудимые крысы, тогда как – на длительный – низковозбудимые

(Вайдо, 2000). Высоковозбудимые крысы в условиях острого стресса проявляют ускоренное развитие стрессового ответа по гормональным характеристикам, имеют более длительный выброс кортикостерона, что указывает на сниженную чувствительность ГГАС к сигналам обратной связи и подтверждается при использовании дексаметазонового теста (Ордян и др., 1998) и при оценке относительного числа кортикостероидных рецепторов (Ефимов и др., 1995). Возможно, этот комплекс реакций можно отнести к адаптивным на основании того, что схемы длительного стрессирования: эмоционально-болевое воздействие на протяжении 15 дней и лишение парадоксальной фазы сна, длящееся 24 часа, приводят к более выраженным изменениям поведения у низковозбудимых крыс. Депривация парадоксальной фазы сна приводила к нарушению процессов консолидации памяти при выработке условного рефлекса пассивного избегания у низковозбудимых крыс ВП вследствие резкого возрастания возбудимости животных (Ширяева и др., 1992). У низковозбудимых линий длительное эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводило к нарушению безусловнорефлекторных компонентов поведения, формированию состояния, подобного ступору, характеризуемого неподвижностью и отсутствием «норкового рефлекса» (Ширяева и др., 1992; Vaydo et al., 1993). На основании сравнительной оценки влияния длительного эмоционально-болевого стресса на разные биохимические и электрофизиологические показатели у крыс высоко- и низковозбудимых линий, можно также сделать вывод о более высокой реактивности к длительному стрессирующему воздействию у крыс линии ВП1. Рассмотренные изменения поведения сопровождались у них активацией  $K^{+}$ - $Na^{+}$ -АТФ-азы в гиппокампе, увеличением содержания фосфодиэстеразы и кальмодулина в гипоталамусе (Глущенко и др., 1992; Шарагина и др., 1992). Через 2 месяца после воздействия только у крыс линии ВП1 снижалась способность к формированию длительной посттетанической потенциации в гиппокампе (Вайдо, 2000). По данным литературы известно, что низкое функциональное состояние мозга является фактором риска развития патологий центральной нервной системы, что показано в экспериментах по модуляции функционального состояния (Хананашвили, 1978).

При этом важно подчеркнуть, что долгосрочные последствия влияния длительного эмоционально-болевого стресса на поведение выявляются у крыс как низковозбудимых, так и высоковозбудимых линий, однако их специфичность как в особенностях проявления, так и в динамике изменений зависит от генетически детерминированного уровня возбудимости животных. Сразу после окончания длительного стрессирования наиболее выраженные и разнообразные изменения поведения произошли у низковозбудимых крыс: на фоне повышения возбудимости, изменения болевой чувствительности, поведения в тесте

«открытое поле», латентных периодов в тестах «тревожности», условных рефлексов активного и пассивного избегания, нарушение «норкового рефлекса» (Вайдо, 2000). Через две недели у крыс высоковозбудимой линии возрос порог возбудимости, тогда как у низковоозбудимой – произошло его выравнивание и возвращение к контрольным значениям. У обеих линий резко снизилась двигательная активность в «открытом поле» (Ширяева и др., 1996). В период от 2-х недель до 6 месяцев после воздействия возникшие у животных обеих линий изменения поведения продолжают волнообразно меняться: у крыс линии ВП1 затронуты преимущественно эмоциональные компоненты поведения, у НП2- двигательные (Ширяева и др., 1994). При этом наблюдаются существенные сдвиги в амплитудах циркадных ритмов указанных элементов поведения. Далее к 6 месяцам после воздействия у крыс линии ВП1 развивается постстрессорная симптоматика состояния депрессии, характеризуемого полным подавлением «норкового рефлекса», резким снижением эмоциональности и стереотипии (Ширяева и др., 1996). У высоковозбудимой линии НП2 постстрессорные изменения проявились в увеличении навязчивых движений- стереотипных поворотов головы (Ширяева и др., 1996). Эти изменения поведения сопровождались комплексом соматических и вегетативных нарушений, что в совокупности позволяет говорить о формировании постстрессорного патологического состояния с элементами психогенного невротического расстройства у животных обеих линий. У низковоозбудимой линии – это ярковыраженная симптоматика депрессивного состояния с длительным проявлением, которое по характеру развития в отсроченный период после окончания стрессорного воздействия может быть сопоставимо с симптомами посттравматического стрессового расстройства человека и являться экспериментальной моделью для его изучения. У высоковозбудимой линии крыс стресс-зависимое патологическое состояние, наряду с волнообразными изменениями двигательных компонентов поведения, характеризуется значительным возрастанием навязчивых движений, и их устойчивое проявление у животных может рассматриваться как элемент невроза навязчивых состояний. По современной классификации психических и поведенческих расстройств 10 пересмотра (МКБ-10), патологии с подобной симптоматикой у человека объединены в рубрику «Невротические, связанные со стрессом и соматоформные расстройства». Таким образом, становится понятно, что как высокий, так и низкий уровень возбудимости нервной системы являются факторами риска формирования постстрессорных патологических состояний, развитие и симптоматическая картина которых различается в зависимости от генетически детерминированного базового уровня функционального состояния нервной системы. Исследование цитогенетических, молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов



формирования этих состояний крайне важно для возможности их дифференциальной диагностики у человека и подбора адекватных терапевтических способов их коррекции в соответствии с индивидуальным персонализированным подходом.

#### **4.3. Долгосрочные последствия влияния длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на цитогенетические, эпигенетические и морфологические особенности клеток различных районов головного мозга крыс : роль генетически детерминированной возбудимости нервной системы**

Рассмотрим данные об изменениях характеристик гетерохроматина в совокупности с соответствующими изменениями эпигенетически модифицированных сайтов в нейронах гиппокампа у крыс двух линий с различной возбудимостью нервной системы через сутки после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. У животных низковозбудимой линии ВП1 снижение площади конденсированного хроматина в ядре сопровождается снижением содержания метилцитозинсвязывающего белка, тогда как у крыс высоковозбудимой линии НП2 количественные характеристики хроматина не изменяются, но повышается степень фосфорилирования гистона H3. В то же время в пирамидных нейронах сенсомоторной зоны коры у низковозбудимых крыс линии ВП1 повышается степень ацетилирования гистонов H3 и H4, тогда как у высоковозбудимых крыс линии НП2 степень ацетилирования гистона H3 снижается при повышении, так же как и в гиппокампе, степени фосфорилирования гистона H3. Следующий вопрос, насколько долго могут сохраняться возникшие изменения, каков их спектр, их динамика в разных структурах мозга и как это связано с возбудимостью нервной системы.

Выявленные через сутки постстрессорные изменения количественных характеристик хроматина в нейронах гиппокампа у крыс линии ВП1 сохраняются до двух месяцев после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. Изменение площади свидетельствует об уменьшении общего количества гетерохроматина в нейронах поля СА3 гиппокампа низковозбудимых крыс. Это может быть связано с избирательной деконденсацией части гетерохроматиновых районов вследствие координированной активации определенных групп генов, сохраняемой до двух месяцев после воздействия. В литературе немногочисленны сведения об изменении количественных и структурных характеристик гетерохроматина в нейронах при изменении их функциональной активности и в условиях стрессорных воздействий. В последние годы исследуется важная роль эпигенетических механизмов в процессах ремоделирования хроматина при формировании памятного следа

(Levenson, Sweatt, 2006). Стимуляторы долговременной памяти изменяют конформацию хроматина в нейронах коры и гиппокампа и увеличивают количество активно транскрибируемых участков генома, воздействуя через цАМФ- независимую протеинкиназу 2 на систему  $\text{Ca}^{++}$ -АТФаза-сократительные белки (Куликова и др., 1997). При формировании долговременной памяти в условиях активации NMDA рецепторов происходят структурные изменения гетерохроматина за счет усиления процесса ацетилирования гистона H3 (Levenson, Sweatt, 2006). Важно подчеркнуть, что только у крыс линии ВП1 изменение структурных характеристик гетерохроматина сопровождается сохраняемым через 24 часа, 2 недели, 2 месяца после окончания длительного эмоционально-болевого стрессирования увеличением уровня общей ядерной РНК в нейронах поля СА3 гиппокампа (табл.47, данные Соколовой Н.Е., Вайдо и др., 2009). Это указывает на возможную связь между снижением общего количества гетерохроматина и увеличением транскрипционной активности, зависящую от конституциональных свойств нервной системы животных.

Табл. 47. Содержание РНК (оптическая плотность в относительных единицах) в ядрах нейронов поля СА3 гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия ( $X \pm m$ ).

Линия	Вариант	Через 24 часа	Через 2 недели	Через 2 месяца
ВП1	контроль	$38,8 \pm 2,1$	$37,2 \pm 1,7$	$35,3 \pm 1,9$
	Опыт	$46,9 \pm 3,4^*$	$50,3 \pm 1,5^*$	$44,9 \pm 2,2^*$
НП2	контроль	$33,8 \pm 3,4$	$40,0 \pm 4,4$	$34,7 \pm 2,4$
	Опыт	$36,6 \pm 5,3$	$41,6 \pm 4,4$	$33,4 \pm 2,7$

Обозначения: \*- различия между значениями в контрольной и опытной группах достоверны ( $P < 0,05$ ).

В работе Р.Стама показано, что неизбежный электрошок, примененный однократно, приводит к длительной сенситизации поведения и индукции экспрессии генов раннего действия (Stam et al., 2000). Развитие реакции преувеличенного страха в модели ПТСР у крыс связано с изменением профиля экспрессии митохондриальных генов, сохраняемого до двух недель после трехдневного неизбежного стрессорного воздействия (Li et al., 2014). Известно также, что тепловой шок вызывает транскрипционную активацию конститутивного гетерохроматина в геноме человека (участков гетерохроматина хромосомы 9) (Rizzi et al.,

2004), сведения о возможности трансформации гетерохроматина в эухроматин под влиянием стресса в клеточных культурах человека содержатся и в работе Р. Вальгардсдоттера (Valgardsdottir et al., 2005). Доказательства функциональной роли конститутивного гетерохроматина накопились к настоящему времени: транскрипция сателлитных последовательностей описана для клеток различных организмов (Diaz et al., 1981; Miyahara et al., 1985; Epstein et al., 1986; Schafer et al., 1986; Wu et al., 1986; Bonaccorsi et al., 1990; Gaubatz and Cutler, 1990; Belyaeva et al., 1992; Rudert et al., 1995; Rouleux-Bonnin et al., 1996; Renault et al., 1999). Но это в основном исследования на простейших и беспозвоночных, а также на культурах клеток человека, сведения такого рода для нейронов головного мозга единичны.

Длительное эмоционально-болевое воздействие приводит к дифференциальным, зависимым от базового уровня функционального состояния нервной системы, изменениям характеристик ядер нейронов поля СА3 гиппокампа. Последовательность вступления разных систем ядерного аппарата нейронов гиппокампа в реакцию на эмоционально-болевые воздействия и сроки сохранения возникающих эффектов также различаются и зависят от конституциональных особенностей нервной системы исследуемых животных. Сопоставляя данные о количественных изменениях гетерохроматина, результаты анализа гетерогенной ядерной РНК с морфологическими характеристиками гиппокампа у крыс тех же линий в тех же экспериментальных условиях, можно заключить: для линии ВП1 характерны регистрируемые через сутки после воздействия и сохраняющиеся до двух месяцев синхронные изменения площади гетерохроматина, уровня гетерогенной ядерной РНК и плотности нейронов гиппокампа. Тогда как для линии НП2 при отсутствии изменений со стороны параметров гетерохроматина и ядерной РНК, характерен отставленный эффект влияния стрессорного воздействия на численную плотность нейронов гиппокампа (табл.48, данные Вшивцевой В.В., Вайдо и др., 2009). Следует отметить, что гиппокамп- структура мозга, чувствительная к влиянию экстремальных факторов внешней среды, мишень для действия гормонов и нейромедиаторов, активируемых при стрессе (Giar et al., 2000). Устойчивые нарушения в работе ГГАС при формировании постстрессорных патологий ведут и к органическим поражениям гиппокампа: так, у пациентов с посттравматическим стрессовым расстройством фиксируют атрофию гиппокампа (Sapolsky et al., 2001; Hull, 2002; Winter, Irle, 2004). В основе снижения объема гиппокампа в результате стресса могут лежать различные причины: гибель нейрональных и глиальных клеток, уменьшение их размеров, снижение дендритного ветвления, редукция нейропиля, и др. (Czeh, Lucassen, 2007).

Табл.48. Плотность расположения нейронов в поле СА3 гиппокампа крыс линий ВП1 и НП2 в разные сроки после окончания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия ( $X \pm m$ )

Линия	Вариант	Через 24 часа	Через 2 недели	Через 2 месяца
ВП1	Контроль	$12,5 \pm 0,5$	$11,3 \pm 0,3$	$13,2 \pm 0,5$
	Опыт	$10,7 \pm 0,2^*$	$9,1 \pm 0,7^*$	$9,8 \pm 0,2^*$
НП2	контроль	$8,4 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,2$	$7,7 \pm 0,2$
	Опыт	$7,7 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,1^*$

Обозначения : \*- различия между значениями в контрольной и опытной группах достоверны ( $P < 0,05$ ).

Однако, конкретные механизмы атрофических изменений гиппокампа при постстрессорных патологиях остаются малопонятными. Известно, что хронический стресс приводит к дегенеративным изменениям апикальных дендритов в пирамидных нейронах поля СА3 гиппокампа у приматов и других млекопитающих (Uno et al., 1989). Длительная иммобилизация вызывает уменьшение числа нейронов поля СА3 гиппокампа у крыс (Mizoguchi et al., 1992). Хроническое введение кортикостерона вызывает у крыс массивную гибель нейронов гиппокампа (Sapolsky et al., 2001). Но в работах других авторов эти данные не подтверждаются (Volmann-Hondorf et al., 1997; Bremner, 2001). Известно, что массивный выброс в кровь гормонов коры надпочечников, в т.ч. и глюкокортикоидов при стрессе (Lucassen et al., 2001), приводит к усиленному выделению нервными клетками глутамата – одного из основных возбуждающих нейромедиаторов. В высоких концентрациях глутамат действует на нервные клетки как эксайтотоксикант – вещество, нарушающее процессы жизнедеятельности клетки за счет её гипервозбуждения. Механизм эксайтотоксичности затрагивает вначале ионные и метаболические процессы, что приводит к дегенеративным изменениям в клетке вплоть до её гибели. Клеточная гибель может протекать как по апоптотическому вследствие запуска программы клеточной гибели, так и по некротическому пути за счет необратимых повреждений мембраны и органелл клетки (Крыжановский, 1997). Ранее нами было показано, что маркер нейродегенерации FluoroJade не выявил ни апоптотических, ни некротических изменений в гиппокампе ни после короткого, ни после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (рис.21, данные Левиной А.С., Левина и др., 2011), однако реакция клеток гиппокампа на

нейротоксикант каиновую кислоту была различной у крыс линий ВП1 и НП2 (рис. 22, данные Левиной А.С., Левина и др., 2011) . Чувствительность к каинату клеток поля СА3 гиппокампа была выше у крыс низковозбудимой линии по сравнению с высоковозбудимой, о чем свидетельствуют различия в значениях общей площади нейродегенеративных изменений, индуцированных каинатом (табл. 49 , данные Левиной А.С., Левина и др., 2011). Таким образом, генетически детерминированная возбудимость нервной системы предопределяет восприимчивость к нейротоксическим ядам и степень органического поражения гиппокампа при их действии.

Таблица 49.Площадь (мкм<sup>2</sup>) районов нейродегенерации СА3-поля гиппокампа, индуцированной каиновой кислотой.

Линия	X±m
ВП1	106818 ± 15907,8
НП2	51897 ± 7363,8 *

Обозначения: \*Различия между группами достоверны ( P < 0,05), t-критерий Стьюдента и тест Манна-Уитни.

Таким образом, выявленные изменения в численной плотности нейронов гиппокампа после стрессорных воздействий могут быть связаны возможно с гибелью клеток по ,так называемому, промежуточному, темному типу, что требует специального исследования, также требуется более детальная по времени фиксация материала после и в процессе стрессорных воздействий, чтобы исключить возможность клеточной гибели в другие, более ранние временные сроки.

К факторам риска возникновения органических поражений гиппокампа при психопатологиях могут относиться генетически детерминированные конституциональные свойства нервной системы. Противоречивые данные литературы о влиянии стресса на плотность расположения нейронов гиппокампа могут быть связаны с различным уровнем функционального состояния нервной системы крыс, в том числе, и с уровнем возбудимости нервной системы. Возможно и участие эпигенетических механизмов в реализации нейротоксического действия стресса на центральную нервную систему.

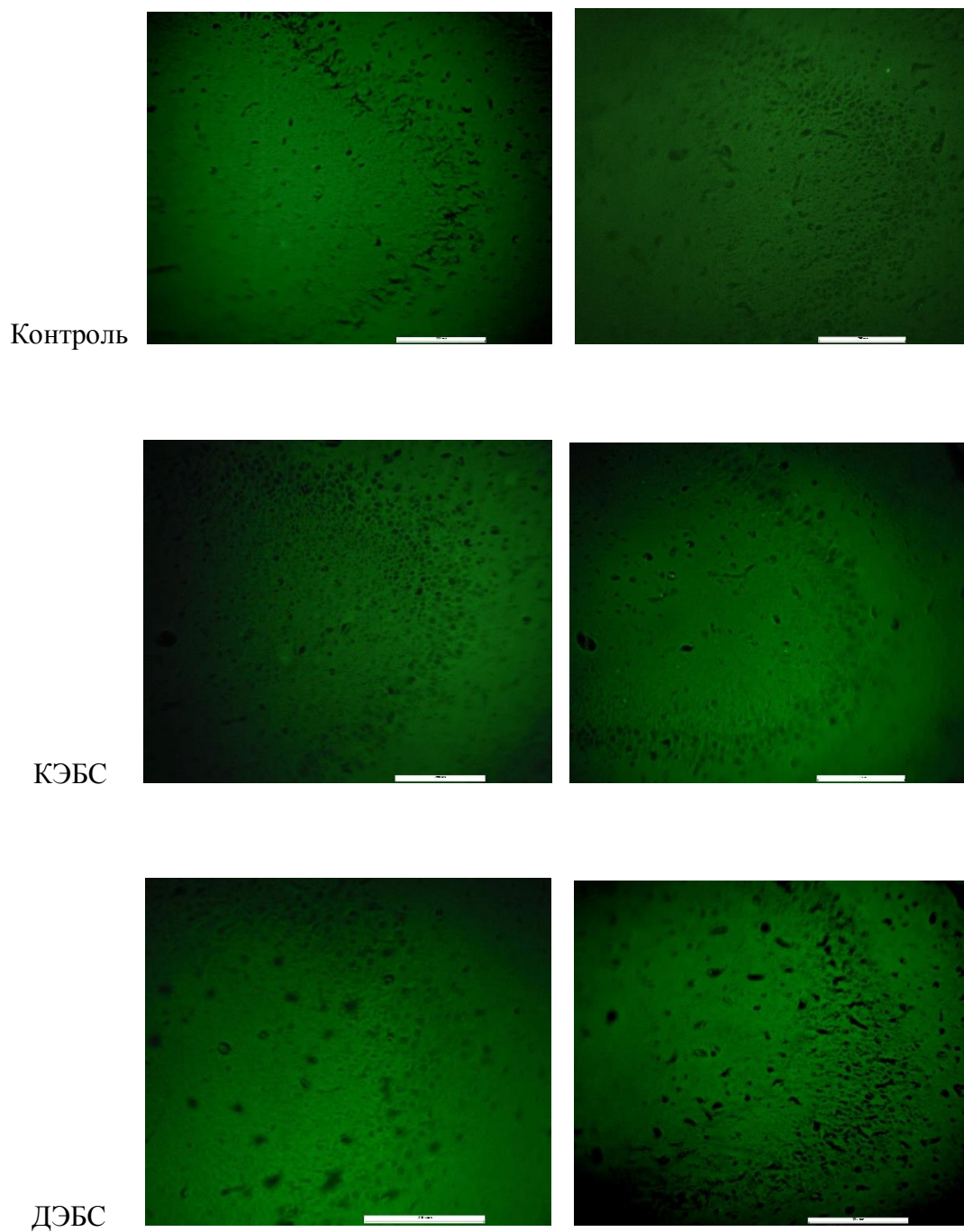
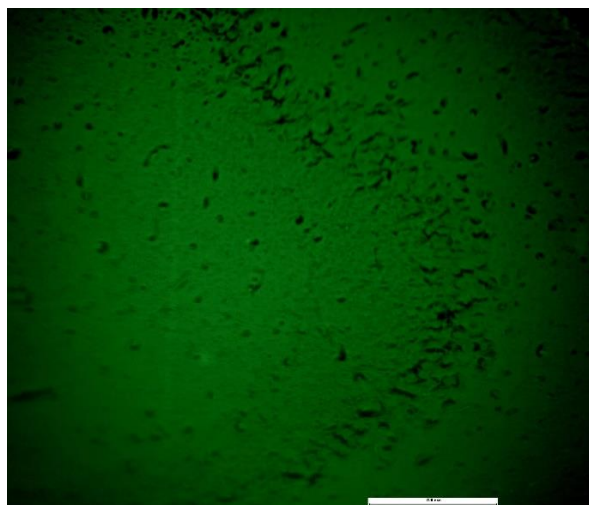
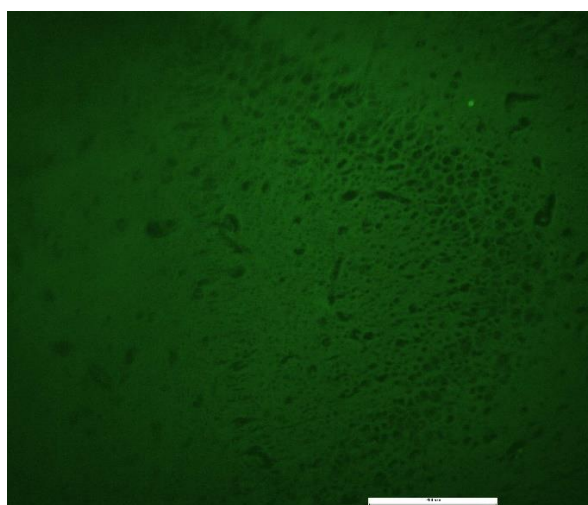
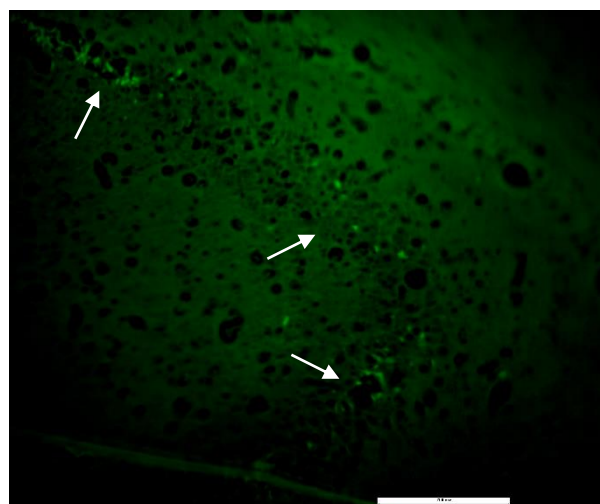
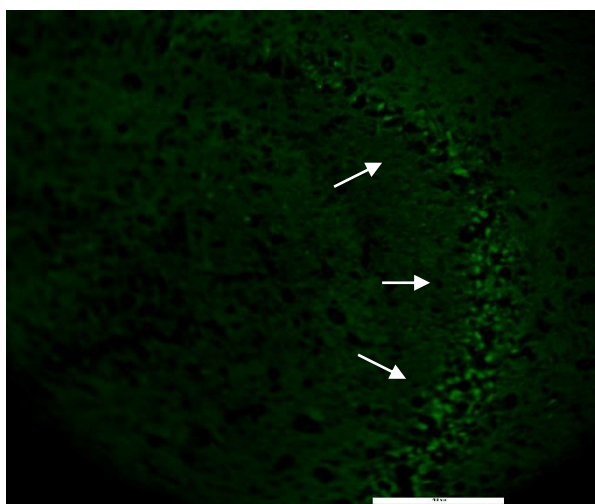


Рис.21. Срезы гиппокампа крыс (поля CA2-CA3) после эмоционально-болевых стрессорных воздействий (КЭБС, ДЭБС) - окрашивание маркером нейродегенерации FluoroJade B (масштаб: 200 мкм).

ВП1НП2

Контроль



Каиновая кислота

Рис. 22 . Срезы гиппокампа крыс двух линий после инъекции каиновой кислоты - окрашивание маркером нейродегенерации FluoroJade B (поля CA1-CA3)(масштаб: 200 мкм). (Дегенерирующие клетки – указаны стрелками).

Как показали результаты наших исследований, эпигенетические модификации генома, включающиеся в процесс деконденсации хроматина и возможно связанные с процессами морфологических изменений гиппокампа, имеют сложную, нелинейную динамику на протяжении двух месяцев (табл.50). Так, снижение количества конденсированного хроматина в гиппокампе у крыс линии ВП1 сопровождаются снижением содержания метилцитозинсвязывающего белка, которое сохраняется до двух недель после воздействия. Возможность существования отдаленных последствий влияния стрессирующих воздействий

на экспрессию MeCP2 подтверждается также данными об избирательном увеличении уровня экспрессии гена MeCP2 спустя 28 дней после киндлинга в зубчатой фасции гиппокампа (Francis et al., 2002). Через две недели - повышается уровень 5-метилцитозина и степень ацетилирования гистона H4, но снижается уровень ди-три-метиличивания гистона H3. Через два месяца- среди исследованных модификаций сохраняется повышенным только уровень ацетилирования гистона H4. У крыс высоковозбудимой линии НП2 после стресса не происходит изменений количественных характеристик хроматина в нейронах гиппокампа, но изменяется уровень экспрессии эпигенетически модифицированных сайтов, по-видимому, влияющих на тонкие механизмы экспрессии генов, не вызывающие изменений общего количества гетерохроматина в нейронах. Их специфика и динамика отличается от того, что выявлено у линии ВП1. Так, через сутки возрастает степень фосфорилирования гистона H3, сохраняемая до двух недель после воздействия. Через две недели изменяется экспрессия еще двух эпигенетических модификаций: повышается степень ацетилирования гистона H4 и степень метилирования гистона H3. Степень метилирования гистона H3 сохраняется повышенной и через два месяца после воздействия. Срок два месяца после воздействия оказывается критичным для изменения экспрессии метилцитозинсвязывающего белка (снижение) и ацетилированных форм гистона H3 (повышение). Важно отметить, что в нейронах сенсомоторной зоны коры динамика изменения экспрессии ацетилированных форм гистонов H3 и H4, а также фосфорилированной формы гистона H3 у крыс линий ВП1 и НП2 имеет свою структурную специфичность, отличную от гиппокампа. Так, у крыс линии ВП1 возрастающая после стрессирования степень ацетилирования гистона H3 сохраняется на более высоком уровне до двух месяцев после воздействия, тогда как ацетилирование гистона H4 сохраняется на более высоком уровне до двух недель после воздействия. У крыс высоковозбудимой линии НП2 в этой зоне мозга нет долговременно сохраняющихся изменений экспрессии изучаемых эпигенетических модификаций и наблюдается их «переключение» в исследуемые временные интервалы. Через сутки после воздействия увеличивается фосфорилирование гистона H3, но снижается его ацетилирование. Через 2 недели фиксируется, напротив, повышение ацетилирования гистона H3 при отсутствии других изменений. Через два месяца происходит отставленная по времени реакция на стрессорное воздействие, - повышенная экспрессия ацетилированных форм гистона H4.

Таким образом, в наших исследованиях на линиях крыс с генетически-детерминированными в результате длительной селекции различиями по уровню возбудимости нервной системы - ВП1 и НП2 показано участие эпигенетических модификаций- метилирования ДНК, ацетилирования гистонов H4 и H3, фосфорилирования и



метилирования гистона H3 по активаторным сайтам в реакции на эмоционально-болевого стресс. Динамика их долгосрочного (до 2-х месяцев) изменения в нейронах оказалась

Табл. 50. Схема долгосрочных изменений экспрессии эпигенетически модифицированных сайтов в гиппокампе (поле СА3) и сенсомоторной зоне коры головного мозга крыс линий ВП1 и НП2 после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия.

Структура мозга	Линия	Через 24 часа	Через 2 недели	Через 2 месяца
Гиппокамп	ВП1	↓MeCP2	↓MeCP2 ↑5-мц ↑H4ac(pan) ↓H3K4me2-3	↑H4ac(pan)
	НП2	↑H3Ser10ph	↑H4ac(pan) ↑H3K4me2-3 ↑H3Ser10ph	↓MeCP2 ↑H3K4me2-3 ↑H3K9/12ac
Сенсомоторная зона коры	ВП1	↑H4ac(pan) ↑H3K9/12ac	↑H4ac(pan) ↑H3K9/12ac	↑H3K9/12ac
	НП2	↑H3Ser10ph ↓H3K9/12ac	↑H3K9/12ac	↑H4ac(pan)

специфичной для каждой линии и зависимой от структуры мозга ( сенсо-моторная зоны коры, гиппокамп). Спектр эпигенетических изменений, характерный для каждой из линий с высоким и низким уровнем возбудимости нервной системы, определяет и особенности долгосрочных нарушений в их поведении после испытания длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия (Ширяева и др., 1992, а,б; Vaydo et al., 1993). Различия в характере эпигенетических и поведенческих изменений в ответ на хронический стресс

продемонстрированы в работах на мышах высокоинбредных линий BALB/c и C57BL/6, различающихся по возбудимости нервной системы (Uchida et al., 2011). Связь между эпигенетическим статусом особей и индивидуальными особенностями проявления поведения показана также в работах А.Несбита (Nesbitt et al., 2014) и Ф.Холлиса (Hollis et al., 2011).

Можно предположить, что у крыс низковозбудимой линии ВП1 специфика симптомокомплекса постстрессорной патологии может быть обусловлена преимущественным вовлечением ацетилирования гистонов и метилирования ДНК: повышением ацетилирования гистонов H3 и H4 в коре и снижением содержания метилцитозинсвязывающего белка в гиппокампе, которое на более поздних сроках сменяется повышением ацетилирования гистона H4. Следует подчеркнуть, что именно эти эпигенетические модификации напрямую связаны со структурно-функциональными преобразованиями гетерохроматина в ядре (Bartova et al., 2008), которые и были выявлены у крыс низковозбудимой линии после длительного стресса, причем направленность их совокупных изменений согласуется и характеризует процесс деконденсации хроматина (гетерохроматина) в нейрональных ядрах. У крыс же высоковозбудимой линии НП2 особенности стресс-зависимых изменений определяются преимущественным участием процессов фосфорилирования и метилирования гистона H3 (повышение фосфорилирования гистона H3 в гиппокампе, к которому через две недели подключается метилирование гистона H3). Такой вывод можно сделать на основании анализа тех эпигенетических модификаций, изменения которых стабильно удерживаются на протяжении хотя бы двух исследуемых временных периодов. Интересно и то, что только у крыс линии НП2, и только фосфорилирование гистона H3 согласованно изменяется и в гиппокампе, и в коре через сутки после воздействия. Важно отметить также, что срок две недели является, по-видимому, критическим, переходным, от изменений «первого порядка» к изменениям «второго порядка» на молекулярном уровне, закрепляющим долговременные нарушения, о чем свидетельствует наиболее широкий спектр возникающих изменений эпигенетических модификаций у обеих линий именно в этой точке. Как раз через две недели после стрессирования наблюдаются эффекты рассогласования функционирования центральных и периферических частей нервной системы, имитирующие синдром дезинтеграции по терминологии М.Г. Айрапетьянца и А.М.Вейна (1982). В промежутке между ранними и отдаленными сроками, когда завершается формирование патологической матрицы постстрессорных нарушений, изменения поведения у крыс исследуемых линий носят

волнообразный характер, что по-видимому может иметь и молекулярно-генетическое обоснование.

В нашей работе исследовалась только одна модификация – метилирование ДНК (содержание метилцитозинсвязывающего белка и 5-метилцитозина), которая является, как правило, репрессирующей в отношении транскрипционных процессов и связана с сайленсингом. Все остальные исследуемые нами посттрансляционные модификации гистонов H3 и H4 являются активирующими, повышающими экспрессию генов. Метилирование ДНК- присоединение метильной группы к молекуле цитозина в 5-положении, ингибирует транскрипцию двумя путями, за счет непосредственного изменения эффективности связывания транскрипционных факторов с регуляторными участками ДНК, либо через метилцитозинсвязывающие белки- MeCP1 и MeCP2 (Nan et al., 1998). В зависимости от направленности изменений – повышении или понижении содержания этих факторов можно говорить соответственно о репрессии или активации транскрипции. MeCP2 в мозге действует как репрессор транскрипции, связываясь с метилированными CpG динуклеотидами (Nan et al., 1993) и привлекая Sin3A/HDAC- комплекс сайленсинга в хроматине (Bienvenu, Chelly, 2006). Механизм, лежащий в основе MeCP2-зависимой транс-активации еще недостаточно хорошо понятен (Chahrour et al., 2008). Тем не менее, поскольку нейрональный MeCP2 ассоциируется преимущественно с метилированными последовательностями ДНК *in vivo* (Klose et al., 2005; Skene et al., 2010), это свидетельствует в пользу того, что метилирование ДНК предполагает существование MeCP2 транс-активирующей функции. В наших экспериментах мы наблюдали в СА3 поле гиппокампа снижение общего содержания MeCP2, сохраняемого до двух недель после стресса и сменяемого повышением ацетилирования гистона H4; направленность их изменений хорошо согласуется с общеизвестным соотношением между снижением метилирования ДНК и повышением ацетилирования гистонов. Поскольку характер изменения содержания 5-метилцитозина был несколько иным, зафиксировано его возрастание только спустя 2 недели после стресса, можно думать, что снижение MeCP2 не сопровождается одновременным снижением содержания 5-метилцитозина; эти процессы могут быть несинхронными и, по-видимому, имеют свои особенности на уровне регуляции экспрессии конкретных генов. Следует отметить, что характер влияния метилирования ДНК на экспрессию генов зависит от контекста, поскольку 5-метилцитозин может претерпевать конверсию в 5-гидроксицитозин и далее в 5-формилцитозин и 5-карбоксицитозин (Liyanage et al., 2014). Для эмбриональных стволовых клеток мыши известно, что эухроматин обогащен, а гетерохроматиновые районы обеднены 5-гидрокиметилцитозином (Kubiura et al., 2012),

повторяющиеся микросателлитные последовательности содержат 5- формилцитозин и 5- карбоксицитозин (Shen et al., 2013).

Важно учесть и тот факт, что некоторые авторы приписывают MeCP2 в мозге функции, не связанные с сайленсингом метилированных промоторов генов, - независимое от метилирования связывание MeCP2 и участие в компактизации хроматина (Yasui et al., 2007). Тем не менее, можно определенно сказать, что снижение содержания MeCP2 и повышение ацетилирования гистона H4 в гиппокампе сопровождает процесс деконденсации хроматина (гетерохроматина), длительно поддерживаемый после стресса у низковозбудимых крыс. Отметим, что MeCP2 преимущественно локализуется в прицентромерном гетерохроматине, который является областью повышенной концентрации 5-метилцитозина (Nan et al., 1996), и его изменения отражают процессы ремоделирования хроматина,- наиболее консервативных, сильно конденсированных районов гетерохроматина. Известно, что потеря MeCP2 влияет на экспрессию дискретного подмножества генов, необходимых для функционирования зрелых нейронов (Chahrour et al., 2008; Chang et al., 2006; Chen et al., 2003; Deng et al., 2007; Diaz de Leon-Guerrero et al., 2011; Leikenhuis et al., 2004; Martinowich et al., 2003; Nuber et al., 2005; Peddada et al., 2006; Tudor et al., 2002). Важно подчеркнуть также и то, что специфичность участия MeCP2 в контроле генной экспрессии в значительной степени определяется районом мозга и связана с особенностями выполняемых им функций (Belichenko et al., 1997; Kishi, Macklis, 2005; Shahbazian et al., 2002a,b). Известно, что нокаут *mecp2* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса вызывает повышение реактивности к стрессорным воздействиям (Fyffe et al., 2008), но точные механизмы действия MeCP2 остаются неизвестными. Длительные изменения уровня метилирования промоторов генов обнаружены при ПТСР у человека, причем ряд этих изменений связаны с определенными формами этого заболевания, что может лечь в основу дифференциальной диагностики постстрессорных патологий (Labonte et al., 2014). Особый интерес представляет исследование процессов деметилирования ДНК при психопатологиях. Мало известно о протекании этого процесса в постмитотических нейронах (Mahgoub, Manteggia, 2013). Наши данные вносят вклад в понимание именно этого процесса.

Процесс ацетилирования гистонов также играет значительную роль в регуляции экспрессии генов (Suganuma, Workman, 2011). Ацетилирование происходит по остаткам лизина различных сайтов во всех коровых гистонах (Zheng et al., 2013). Наиболее активно изучаются в связи с действием стресса ацетилированные формы гистонов H3 и H4. Добавление ацетильной группы нейтрализует позитивный заряд аминогруппы лизина, что ведет к снижению аффинности между хвостами гистонов и отрицательно заряженной ДНК,

ослабляет межнуклеосомные взаимодействия, что облегчает доступ к ДНК регуляторных факторов. Ацетилирование связано с активацией транскрипции и декомпактизацией хроматина, деацетилирование- с репрессией транскрипции и усилением конденсации хроматина.

Постстрессорное повышение ацетилирования гистонов H3 и H4 у крыс линии ВП1 поддерживалось на протяжении длительного времени в нейронах сенсомоторной зоны коры (ацетилирование гистона H3- два месяца, гистона H4- две недели), что указывало на возможное увеличение экспрессии определенных генов за счет этого регуляторного механизма в генезе стресс-зависимой патологии, связанной с высокой возбудимостью нервной системы. В других моделях на животных также показана роль ацетилирования гистонов в механизмах депрессий и посттравматического стрессового расстройства, есть такие данные и на человеке. Обнаружено влияние острого и длительного стресса на разные сайты ацетилирования гистонов H3 и H4, проявляющих противоположные эффекты в разных структурах мозга при разных видах стрессирующих воздействий (Stankiewicz et al., 2013). Снижение H4K12ac и H3K9ac после хронического переменного стресса- в нейронах гиппокампа крыс (Ferland, Schrader, 2011); напротив, увеличение H3K9ac и H3K14ac в нейронах интралимбической медиальной префронтальной коры после хронического стресса социального поражения у крыс (Hinwood et al., 2011). Следует отметить, что изменения поведения, соответствующие депрессивно-подобной симптоматике, сохранялись до нескольких месяцев, однако эпигенетические изменения фиксировались начиная от 30 минут до 24 часов после окончания процедур длительного стрессирования, длительную динамику их изменения в этих работах не изучали. Показано также, что крысы, менее чувствительные к хроническому стрессу социального поражения имеют увеличенный уровень ацетилирования гистона H3 по лизину 18 (H3K18ac) в префронтальной коре (Kenworthy et al., 2014). При этом большое количество работ в области эпигенетического сигналинга при депрессивных расстройствах посвящено изучению активности ферментов ацетилирования и деацетилирования- гистоновых ацетилтрансфераз (HATs) и деацетилаз (HDACs) с использованием их ингибиторов (Bagot et al., 2014). Ингибиторы гистоновых деацетилаз подавляют нарушения поведения и обладают анти-депрессивным влиянием (Covington et al., 2009; Tsankova et al., 2006; Schröder et al., 2007; Weaver et al., 2004; Yamawaki et al., 2012). Следует отметить, что в работе Х.Ковингтона было обнаружено волнообразное изменение ацетилирования H3 гистона (H3K14ac) в прилежащем ядре- nucleus accumbens мышей линии C57BL/6, фиксируемое до 10 дней после испытания животными стресса социального поражения, причем через час после окончания теста

НЗК14ас снижалось, через 24 часа – повышалось и через 10 дней оставалось повышенным по отношению к контролю (Covington et al., 2009), тогда как в гиппокампе повышалось через 24 часа, а через 10 дней возвращалось к контрольному уровню, в амигдале – повышалось через час и сохранялось повышенным до 24 часов (Covington et al., 2011). Результаты этих работ подтверждают существование различной динамики изменения эпигенетических модификаций, зависимой от структуры мозга при состояниях, подобных депрессии. Они устраняются антидепрессантами, влияющими на активность гистоновых деацетилаз избирательно в разных структурах мозга (Covington et al., 2011), действуя на разные элементы депрессивного поведения, что указывает на регуляцию с помощью ацетилирования гистонов различных компонентов патологического поведения. С помощью ингибиторов деацетилаз возможна регуляция уровня ацетилирования в промоторах определенных генов (Tsankova et al., 2006). Однако, экспрессия деацетилаз может быть различной в разных структурах мозга и в ряде случаев противоположной по своей направленности, что препятствует антидепрессивному влиянию соответствующих препаратов, действующих на ацетилирование гистонов (Bagot et al., 2014). При сравнении крыс с высокой и низкой стресс-реактивностью в тесте повторяющегося социального поражения HR (High Responders, имеют высокую двигательную активность и исследовательское поведение в новой среде) и LR (Low Responders, имеют низкую двигательную активность и исследовательское поведение в новой обстановке), отобранных из общей популяции крыс линии Sprague-Dawley показан более высокий уровень общего ацетилирования гистонов НЗК14 и Н2В в гиппокампе крыс HR (Hollis et al., 2011). Крысы HR были более восприимчивы к хроническому стрессу социального поражения по сравнению с LR, что сопровождалось снижением общего уровня ацетилирования гистонов НЗ в гиппокампе. У крыс LR постстрессорный уровень ацетилирования гистона НЗ повышался. По-видимому, особенности статуса ацетилирования гистонов в гиппокампе и его изменения могут определять специфику проявления депрессивного поведения. При конвульсиях, вызванных электрическим током происходят изменения ацетилирования гистонов НЗ и Н4 на промоторах генов *bdnf*, *c-fos*, *creb* в клетках гиппокампа, что коррелирует с изменением генной экспрессии (Tsankova et al., 2004). При этом даун-регуляция *c-fos* гена была вызвана снижением ацетилирования Н4, а индукция *bdnf* гена – увеличением ацетилирования НЗ. В целом, НЗ и Н4 ацетилирование по-разному модулируют состояние гиппокампа в связи с проявлениями депрессии; наиболее отчетливо роль изменений ацетилирования гистонов в реализации последствий действия стресса прослеживается в амигдале и префронтальной коре.

Фосфорилирование гистона H3 заключается в присоединении отрицательно заряженных фосфатных групп, прежде всего, к серину в 10 положении, нейтрализует базовый заряд хвостов гистонов и снижает сродство к ДНК, что вызывает активацию транскрипции. Фосфорилирование H3 гистона является индикатором сильного возбуждения нейронов. Так, его увеличение обнаружено в нейронах гиппокампа и других областях мозга *in vivo* после индукции судорожной готовности у мышей пилокарпином (Mori et al., 2013). Действие стресса (острый стресс) : принудительное плавание, предъявление хищника, тест новизны) ведет к связанному с фосфорилированием гистона H3 ремоделированию хроматина в нейронах, вызывающее изменения в экспрессии генов, которое опосредовано сигнальным путем NMDAрецепторы/MAPK/MSK1/2 (митоген и стресс-активируемые киназы) (Chandramohan et al., 2007; Bilang-Bleuel et al., 2005; Reul et al., 2009). Роль этой модификации в механизмах постстрессорных патологических состояний не исследована. Результаты данной работы свидетельствуют в пользу того, что фосфорилирование гистона H3 не играет существенной роли в проявлении депрессивно-подобного состояния и других сопутствующих нарушений,- основного комплекса симптомов ПТСР у низковозбудимых животных. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на высоковозбудимых крыс активизирует процесс фосфорилирования гистона H3, что может быть связано с их базовым высоким генетически детерминированным уровнем возбудимости нервной системы, который может возрастать в условиях стресса. Так, например, в тесте лишения парадоксальной фазы сна порог возбудимости у крыс НП2 снижался в 2,2 раза, как показано ранее (Вайдо, 2000). В целом, этот процесс за счет гипервозбуждения нейронов может создать предпосылки к изменениям именно той модификации, которая, как известно из литературы, связана с нейрональной возбудимостью и затрагивает дофаминергическую систему. Следует отметить, что у высоковозбудимых крыс по сравнению с низковозбудимыми повышен уровень дофамина в миндалине, тенденция к более высокому уровню есть в лобной коре и гиппокампе (Вайдо, 2000). Повышение экспрессии фосфорилированного сайта гистона H3 в гиппокампе может являться одним из элементов специфических, зависящих от уровня возбудимости нервной системы аллостатических изменений, формирующих устойчивые отклонения в поведении, характерные для этой линии- усиление стереотипных движений головы (Ширяева и др., 1996).

Что касается метилирования гистона H3 по активаторному сайту – H3K4me2-3, участие этой модификации в реакции на стресс не исследовано. Существует несколько работ, в которых изучалось триметилирование гистона H3 по лизину 4- модификации, связанной с активацией транскрипции (Kouzarides, 2007; Shilatifard, 2008; Ruthenberg et al., 2007).

Известно лишь, что после хронического иммобилизационного стресса (21 день) увеличивается иммунореактивность клеток гиппокампа к H3K4me3 (Hunter et al., 2009). Следует отметить, что острый и хронический иммобилизационный стресс разнонаправленно влияют на изменение H3K4me3 иммунореактивности, причем в разных районах гиппокампа : острый стресс снижает H3K4me3 в CA1 поле, хронический стресс- увеличивает H3K4me3 в зубчатой извилине гиппокампа. Репрессорные модификации, связанные с метилированием гистона H3- H3K9me3 (модификация, связанная с формированием гетерохроматина и сайленсингом генов) (Hunter et al., 2012) , H3K9me1, H3K27me3 (модификация, связанная с развитием репрессии транскрипции генов- developmental repression of gene transcription) (Kouzarides , 2007) по-разному изменяются в разных районах гиппокампа после острого и хронического иммобилизационного стресса. В основном наблюдается их снижение по сравнению с достаточно высоким базовым уровнем (Hunter et al., 2009). Все изменения в перечисленных работах фиксировали не позднее, чем через 24 часа после окончания процедур короткого и длительного стрессирования, и вопрос о том, насколько устойчивы эти изменения остается открытым.

Отметим, что острый иммобилизационный стресс может также увеличивать H3K9me3 в транспозонах, тем самым препятствуя нестабильности генома (Hunter et al., 2012). Изменение H3K4me3 было выявлено и в определенных генах- семейства синапсинов в префронтальной коре при депрессиях, но не при биполярных заболеваниях (Cruceanu et al., 2013). Высокий уровень H3K4me3 в гене биосинтеза полиаминов *oaz* был обнаружен в префронтальной коре у жертв суицида (Fiori et al., 2012).

В наших исследованиях впервые показано повышение H3K4me2-3 в гиппокампе высоковозбудимых крыс и понижение H3K4me2-3 в гиппокампе у низковоозбудимых крыс в ответ на длительный эмоционально-болевой стресс с латентным периодом две недели и дальнейшим сохранением повышенного уровня до двух месяцев после воздействия у крыс линии НП2. Очевидно влияние генетически детерминированной возбудимости нервной системы на характер и динамику изменения H3K4me2-3 после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия, что может вносить вклад в специфику долговременных постстрессорных нарушений поведения у высоко-и низковоозбудимых животных.

Однако, важно подчеркнуть, что регуляция транскрипции осуществляется посредством комбинаторных паттернов различных эпигенетических модификаций гистонов и ДНК, работающих в пределах коротких и длительных временных интервалов, что приводит к меняющимся, преходящим либо стабильным, в ряде случаев наследуемым изменениям. Наши результаты, полученные иммуноцитохимическим методом в разных



районах мозга в условиях длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия, укладываются в общепринятые представления о взаимодействии эпигенетически модифицированных сайтов в регуляции экспрессии генов при реализации различных физиологических и патологических процессов. В литературе показано участие фосфорилирования, метилирования гистона H3 и ацетилирования гистонов H3 и H4, метилирования ДНК в реакции на различные виды острого и хронического психоэмоционального стресса, в том числе и в клетках гиппокампа (Stankiewicz et al., 2013). Однако в связи с особенностями самих тестов, разных линий животных, используемых в экспериментах, общее сравнение этих результатов затруднено. Ни в одной из работ не был проведен анализ изменений эпигенетических модификаций вплоть до двух месяцев после воздействия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из основных задач нейробиологии является изучение механизмов адаптации и дезадаптации, приводящей к патологии. Стрессорные события, чрезвычайные по интенсивности и длительности, являются факторами риска формирования патологических состояний, болезней нервной системы. Генетический статус особи определяет устойчивость, либо склонность к их развитию, при этом важными являются особенности свойств нервных процессов и основного параметра функционального состояния нервной системы- возбудимости. Таким образом, направленность приспособительных реакций и их конечный итог, результирующий вектор становления гомеостатических, либо аллостатических изменений, зависит от взаимосвязанного влияния генетических и средовых факторов. Генетическая изменчивость по функциональному состоянию нервной системы, моделируемая в ходе длительной селекции крыс по пороговым значениям возбудимости нервной системы –высоким и низким, отражает накопленные в результате отбора генетические различия по полигенной системе, детерминирующей возбудимость. Коррелятивные связи генетически детерминированной возбудимости нервной системы, в основе которых лежит плейтропное действие генов, координирующих возбудимость, затрагивают функционирование мозга и поведение, работу разных звеньев гормональной регуляции, метаболизма нейромедиаторов, структурно-функциональные особенности нервных клеток, ионных каналов. Совокупность этих признаков составляет матрицу индивидуальных особенностей нервных процессов, определяющих и степень чувствительности к стрессорным воздействиям. Исследование ее цитогенетических, молекулярно-клеточных, молекулярно-генетических составляющих в центральных и периферических структурах представляет важную задачу для установления глубинных механизмов изменчивости в стресс-реактивности и предрасположенности к развитию стресс-зависимых патологий. Понимание этих связей необходимо для разработки методов предиктивного прогнозирования развития постстрессорных патологических состояний, их дифференциальной диагностики, своевременной профилактики пролонгированного проявления нарушений на различных уровнях, их медикаментозной коррекции.

В нашей работе продемонстрировано, что низкая возбудимость нервной системы обуславливает более высокую пролиферативную активность, более высокий уровень хромосомных aberrаций и большее количество конденсированного хроматина и С-гетерохроматина в клетках развивающегося гиппокампа, причем более высокий уровень конденсации хроматина сохраняется в этой структуре мозга и у взрослых животных, но

проявление межлинейных различий зависит от возраста животных. У крыс низковозбудимой линии наличие большего количества конденсированного хроматина может обеспечиваться высоким уровнем экспрессии метилцитозинсвязывающего белка в сочетании с фосфорилированием гистона H3 по серину 10 и ди-три-метилованием гистона H3 по лизину 4. Именно у низковозбудимых крыс выявлено снижение количества вариаций числа копий гена *rpl13a*, свидетельствующее о сниженной экспрессии этого гена в десятки раз, что лежит в рамках выявленных связей : повышенная конденсация хроматина – сниженная экспрессия генов. Выявленный полиморфизм ретротранспозона LINE 1 (L1) также имеет отношение к специфическим особенностям линий, связанным с их генетически-детерминированной возбудимостью.

Следует отметить, что концепция стрессовых расстройств вошла в международную классификацию болезней только в середине 90-х годов. С введением этой терминологии в практику психиатрии был обозначен не просто психогенный характер заболеваний этой группы, но и причины их формирования- разнообразные экстремальные воздействия- стрессоры- стресс- факторы. Результат их воздействия – нарушение психосоматического гомеостаза, согласованной деятельности систем организма. К стресс-зависимым патологическим состояниям относят депрессивные расстройства, посттравматическое стрессовое расстройство, психосоматические болезни и др. Элементы этих состояний моделируются на животных, линиях мышей и крыс. Однако каковы цитогенетические, молекулярно-клеточные и молекулярно-генетические механизмы памяти стресса, травматической памяти этот вопрос в начале своего изучения. Какие из них универсальны, какие зависят от функционального состояния нервной системы и связаны с ними. Совокупность каких скоррелированных признаков изменяется при действии психоэмоционального стресса, какие из них преходящие и адаптивные, какие лежат в основе патологического симптомокомплекса и имеют длительное устойчивое проявление, либо отдаленные вспышки , эпизоды. В нашей работе выявлены как общие , независимые от функционального состояния нервной системы, так и специфические, зависимые от него, механизмы реакции на эмоционально-болевой стресс хроматина развивающихся и зрелых клеток гиппокампа. К универсальным относятся снижение площади хромоцентров, свидетельствующее об уменьшении общего количества гетерохроматина, связанное с избирательной деконденсацией и изменение хромоцентральной организации нейрональных ядер в результате агрегации или дезагрегации хромоцентров, что характерно для клеток и развивающегося, и зрелого мозга. В клетках развивающегося гиппокампа характерной особенностью реакции на стресс является увеличение пролиферативной активности и

частоты хромосомных нарушений. Специфические, связанные с генетически-детерминированным уровнем возбудимости нервной системы механизмы реакции хроматина на эмоционально-болевого стресс выявлены в зрелых нейронах и клетках костного мозга. Так, в нейронах специфичность изменения количественных характеристик гетерохроматина у высоко- и низковозбудимых крыс зависит от структуры мозга и связана с суточным ритмом. В клетках костного мозга высокая возбудимость нервной системы определяет постстрессорное увеличение частоты хромосомных aberrаций и более сильную чувствительность к действию мутагена циклофосфана.

Впервые обнаружено, что эмоционально-болевого стрессорное воздействие вызывает устойчивые долгосрочные изменения структурных характеристик хроматина. При этом формируемые в эмбриональном периоде постстрессорные изменения количественных характеристик общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина сохраняются и в постнатальном периоде развития и не зависят от генетически детерминированного уровня возбудимости нервной системы крыс. Тогда как в зрелых нейронах гиппокампа постстрессорные изменения количественных характеристик гетерохроматина сохраняются до 2-х месяцев после стрессорного воздействия и опосредованы низким уровнем возбудимости нервной системы крыс. В реакции на длительное эмоционально-болевого стрессорное воздействие принимают участие следующие эпигенетические модификации: метилирование ДНК, ацетилирование гистонов H3 и H4, фосфорилирование и метилирование гистона H3 по активаторным сайтам. Динамика их долгосрочного, до 2-х месяцев изменения в нейронах является специфичной для каждой линии и зависимой от структуры мозга- сенсомоторная зона коры и гиппокамп. Таким образом, низкая возбудимость нервной системы является фактором риска развития постстрессорной патологии, определяемой как сильное, устойчивое, длительное депрессивно-подобное состояние, которое по совокупности модификаций поведения, может рассматриваться как модель посттравматического стрессового расстройства. Длительное проявление депрессивно-подобного состояния опосредовано устойчивой модификацией активности генома пирамидных нейронов, связанных с деконденсацией хроматина (С-гетерохроматина), последовательным снижением содержания метилцитозинсвязывающего белка и повышением ацетилирования гистона H4 в гиппокампе и устойчивым повышением ацетилирования гистонов H3 и H4 в сенсомоторной зоне коры головного мозга. Высокая возбудимость нервной системы является фактором риска развития постстрессорной патологии с преимущественным проявлением стереотипных, навязчивых движений, синдрома навязчивых состояний на фоне двигательных нарушений. Это не связано с

изменениями общей конденсации хроматина, но сопровождается последовательным повышением фосфорилирования по серину 10 и метилирования по лизину 4 гистона H3 в гиппокампе и разнонаправленными изменениями ацетилирования гистонов H3 и H4 и фосфорилирования гистона H3 в сенсомоторной коре. Генетически-детерминированный уровень возбудимости нервной системы определяет особенности пластических изменений нервной системы, обеспечиваемых модификациями ДНК и гистонов, транспозициями ретротранспозона L1. Использование линий крыс с контрастным уровнем возбудимости нервной системы позволило вычленить кратко- и долгосрочные эффекты действия эпигенетических механизмов травматической памяти, или памяти психоэмоционального стресса в цепи событий: реорганизация хроматина- посттрансляционные модификации ДНК и гистонов- активность транспозонов непосредственно в клетках мозга. Понимание механизмов геномных эффектов стресса необходимо для поиска мишеней инновационных способов терапии и профилактики постстрессорных патологических состояний.

## ВЫВОДЫ

1. Селекция линий крыс по возбудимости нервной системы привела к дивергенции по цитогенетическим и молекулярным параметрам нейрональных элементов развивающегося и зрелого мозга : количественным характеристикам общего пула интерфазного конденсированного хроматина и С-гетерохроматина, уровню хромосомных aberrаций, экспрессии эпигенетических модификаций. Выявлен инсерционный полиморфизм ретротранспозона L1 и сниженное количество вариаций числа копий гена *gpl13a* у низковозбудимых животных линии ВП. Выявленные различия могут быть ассоциированы с линейными особенностями возбудимости в гиппокампе и определять разницу в чувствительности к стрессорным воздействиям.
2. Эмоционально-болевое стрессорное воздействие индуцирует образование хромосомных aberrаций в клетках костного мозга крыс. Частота хромосомных нарушений зависит от длительности воздействия и от уровня возбудимости нервной системы животных .
3. Высоковозбудимые линии обладают большей чувствительностью к действию мутагена циклофосфана по сравнению с низковозбудимыми по количеству обменных перестроек типа транслокаций и по количеству поврежденных хромосом на 100 метафаз. Однократное эмоционально-болевое стрессорное воздействие обладает протекторным эффектом и снижает мутагенный эффект циклофосфана независимо от характеристик возбудимости нервной системы.
4. Пренатальное эмоционально-болевое стрессорное воздействие приводит к увеличению частоты хромосомных нарушений и снижению площади конденсированного хроматина и С-гетерохроматина в клетках развивающегося мозга независимо от линейных характеристик возбудимости нервной системы животных.
5. При сопоставлении изменений количественных характеристик гетерохроматина у линий ВП и НП прослеживается следующая закономерность: обязательными компонентами реакции на стресс со стороны хромосомного аппарата нейронов являются: 1) снижение площади хромоцентров, свидетельствующее об уменьшении общего количества гетерохроматина, связанное с избирательной деконденсацией ; 2) изменение хромоцентральной организации нейрональных ядер в результате агрегации или дезагрегации хромоцентров, соотношение этих компонентов в разных структурах мозга является специфическим для каждой линии.

6. Впервые под влиянием эмоционально-болевого стрессорного воздействия продемонстрированы долгосрочные изменения структурных характеристик хроматина и эпигенетических модификаций в нейронах различных структур мозга. а) Формируемые в эмбриональном периоде различия по количественным характеристикам общего пула конденсированного хроматина и С-гетерохроматина сохраняются и в постнатальном периоде развития (в возрасте 24 дней). б) Изменения количественных характеристик гетерохроматина в зрелых нейронах гиппокампа сохраняются до 2-х месяцев после длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия. в) Показано участие эпигенетических модификаций - метилирования ДНК, ацетилирования гистонов H3 и H4, фосфорилирования и метилирования гистона H3 по активаторным сайтам в реакции на длительный эмоционально-болевой стресс. Динамика их долгосрочного (до 2-х месяцев) изменения в нейронах оказалась специфичной для каждой линии и зависимой от структуры мозга (сенсо-моторная зоны коры, гиппокамп).
7. Под влиянием стресса выявлены внедрения ретротранспозона L1 в ген *grin1* у обеих линий крыс.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров Ю.И. Основы психофизиологии.- М. : ИНФРА- М, 1997.- 349 с.
2. Александрова Н.П., Ширяева Н.В., Кратин Ю.Г., Лопатина Н.Г. Порог активации мозга у крыс, селектированных по возбудимости нервно-мышечного аппарата// Докл.АН СССР.- 1981.- Т.259.- С. 1233-1235.
3. Алехина Т.А., Вайдо А.И., Ширяева Н.В., Лопатина Н.Г. Общие характеристики поведения крыс, селектированных по длительности пассивно-оборонительной реакции и порогу нервно-мышечной возбудимости // Журн. высшей нервн.деятельн.- 1994а.- Т.44, Вып.3.- С.597-603.
4. Алехина Т.А., Шульга В.А., Лопатина Н.Г., Ширяева Н.В., Вайдо А.И. Нейрогормональные характеристики крыс, селектированных по длительности пассивно-оборонительной реакции и порогу нервно-мышечной возбудимости // Журн. высшей нервной деятельности.- 1994б.- Т.44, В.4-5.-С.837-841.
5. Арефьев В.А., Лисовенко Л.А. Англо-русский толковый словарь генетический терминов. Москва. ВНИРО.- 470 с., 1995.
6. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Место гиппокампа в биоритмологической организации поведения // Успехи физиологических наук.- 2001.- Т.32, №1.- С.79-95.
7. Айрапетьянц М.Г., Вейн А.М. Неврозы в эксперименте и в клинике.- 1982: Наука.- с.272.
8. Баркан Р. С. Яковлева Т.К. Чувствительность клеток костного мозга к мутагенному действию циклофосфана. В кн.: Вопросы радиобиологии и биологического действия цитостатических препаратов. Томск, -1977. - С. 91-94.
9. Беспалов А.Ю., Звартау Э.Э. Нейропсихофармакология антагонистов NMDA-рецепторов. –СПб.: Невский Диалект, 2000.-297 с.
10. Беляев Д.К. Некоторые генетико-эволюционные аспекты стресса и стрессуемости // Вестн. АМН СССР.-1979.- №7.- С.9-14.
11. Бехтерева Н.П. Здоровый и больной мозг человека.-Л. : Наука.-1988.- 262 с.
12. Бехтерева Н.П. Здоровый и больной мозг человека / Н.П. Бехтерева; под ред. С.В.Медведева. М.: АСТ; СПб : Сова; Владимир : ВКТ, 2010.- 399 с.
13. Богачев С.С., Лихачева Е.В., Борисевич И.В., Кокоза Е.Б. Динамика положения хроматина в объеме интерфазного ядра.//Онтогенез.- 2000.-Т.31, №4.- С.243-250.
14. Бородин П.М. Стресс и генетическая изменчивость// Генетика.- 1987.-Т.23.- С.1003-1010



15. Бородин П.М. , Беляев Д.К. Влияние стресса на частоту кроссинговера во 2-ой хромосоме доменной мыши // Докл. АН СССР.-1980.- Т.253.- С.727-729.
16. Быковская Н.В., Дюжикова Н.А., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г., Шварцман П.Я. Частота хромосомных aberrаций , индуцированных стрессорным воздействием и циклофосфаном в клетках костного мозга крыс, селектированных по порогу возбудимости нервной системы// Генетика.-1994.-Т.30,№9.-С.1224-1228.
17. Быковская Н. В., Хайцев Н. В., Шварцман П. Я. Частота хромосомных aberrаций, индуцированных гипоксией, в клетках костного мозга крыс, различающихся по устойчивости к этому фактору // Генетика.- 1993. -Т. 29, № 32. -С. 2308-2111.
18. Вайдо А.И. Физиолого-генетический анализ возбудимости нервной системы и поведения лабораторной крысы. Дисс. на соискание уч. степени докт.биол.наук.- Санкт-Петербург.- 2000.-197 с.
19. Вайдо А.И., Вшивцева В.В., Лукашин В.Г., Ширяева Н.В. Структурно-функциональные и метаболические изменения нервной системы у низко- и высоковозбудимых крыс при лишении парадоксальной фазы сна// Журнал высшей нервной деятельности.- 1990.- Т.40, Вып.3.-С.518-523.
20. Вайдо А.И., Дюжикова Н.А., Ширяева Н.В., Савенко Ю.Н., Соколова Н.Е., Вшивцева В.В. Системный контроль молекулярно-клеточных и эпигенетических механизмов долгосрочных последствий стресса// Генетика.- 2009.-Т.45,№3.-С.342-348.
21. Вайдо А.И., Енин Л.Д., Ширяева Н.В. Скорость проведения потенциалов действия по хвостовому и большеберцовому нервам у линий крыс, селектированных по возбудимости нервно-мышечного аппарата// Генетика.-1985.- Т.ХХ1,№2.- С.262-264.
22. Вайдо А.И., Жданова И.В., Ширяева Н.В. Реакция «эмоционального резонанса» у крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы// Журн.высш.нервн.деят.-1987.- Т.37, Вып.3.-С.575- 577.
23. Вайдо А.И., Ситдииков М.Х. Селекция линий крыс по долгосрочному порогу возбудимости нервно-мышечного аппарата // Генетика.-1979.- Т.ХV, №1.- С.144-148.
24. Вайдо А.И., Ширяева Н.В., Хиченко В.И., Любославская П.Н., Старостина М.В. Развитие длительной посттетанической потенциации и изменение содержания белка S-100 в срезах гиппокампа крыс с различным функциональным состоянием нервной системы// Бюлл.эксперим.биологии и медицины.- 1992.- Т.113,№6.- С.645-648.
25. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика// Генетика.- 2006.- Т.42,№9.-С.1186-1199.
26. Виноградова О.С. Гиппокамп и память.- М.- 1975.- 333 с.

27. Виноградов А. Е. Парадокс размера генома и проблема избыточной ДНК // Цитология . - Т. 41, № 1 . - 1999 . - С.5-13 .
28. Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Соловьев И.В., Юров Ю.Б. Гетерохроматиновые районы хромосом человека : клинико-биологические аспекты.-М.: ИД «МЕДПРАКТИКА-М».- 2008.-300 с.
29. Васильев В.К., Меерсон Ф.З. Повреждение и репаративный синтез ДНК различных органов крыс, вызванные эмоционально-болевым стрессом.// Вопросы мед.химии.-1984.-Т.30, №2.- С.112-114.
30. Галицкий В.А. Гипотеза о механизме инициации малыми РНК метилирования ДНК de novo и аллельного исключения// Цитология.- 2008.-Т.50,№4.- С.277-286.
31. Гвоздев В.А. Регуляция активности генов при созревании клеточных РНК // Соросовский образовательный журн.- 1996. - №12.- С.11-18.
32. Гвоздев В.А. Подвижная ДНК эукариот.1. Структура, механизмы перемещения и роль подвижных элементов в поддержании целостности хромосом // Соросовский образовательный журн.- 1998а.-№8. - С.8-14.
33. Гвоздев В.А. Подвижная ДНК эукариот. 2. Роль в регуляции активности генов и эволюции генома // Соросовский образовательный журн. 1998б.-№8. - С.15-21.
34. Гвоздев В.А., Кайданов Л.З. Геномная изменчивость , обусловленная транспозициями мобильных элементов, и приспособленность особей *D. melanogaster* // Журн. общ. биологии.-1986.- Т.47.- С.51-63.
35. Герасимова И.А., Флеров М.А., Вайдо А.И., Ширяева Н.В. Фосфолипидный состав синапсом коры головного мозга крыс, различающихся по порогу возбудимости нервной ткани// Нейрохимия.- 2001.- Т.18, №4.- С.273-278.
36. Глуценко Т.С., Ширяева Н.В., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г., Таранова Н.П., Кудрявцева И.Н. Активность  $Na^{++}$ ,  $K^{+}$  АТФ-азы в структурах головного мозга невротизированных крыс, различающихся по порогу возбудимости нервной системы// Физиол.журн. им.И.М.Сеченова.- 1992.- Т.78, №2.-С. 71-77.
37. Горюнов И.П., Бородин П.М. Влияние эмоционального стресса на частоту мейотических нарушений у самцов мышей// Генетика.-1986.-Т.22, №6.-С.119-121.
38. Гофман М.А., Вайдо А.И., Ширяева Н.В. Морфофункциональные различия по щитовидной железе у двух линий крыс// Пробл.эндокрин.- 1987.-Т.33, №4.- С.57-59.
39. Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных животных. Атлас. –Новосибирск: Наука. 1988.- 128 с.

40. Гуляева Н.В., Дупин А.М., Левшина И.П., Обидин А.Б., Болдырев А.А. Карнозин предотвращает активацию свободнорадикального окисления липидов при стрессе.// Бюлл.экспер.биол.и мед.-1989.-Т.107, №2.-С.144-147.
41. Дмитриев Ю.С. Локализация генов, ответственных за линейные различия по порогам нервно-мышечной возбудимости у мышей // ДАН СССР.- 1981.- Т.261. С.- 203-206
42. Дмитриев Ю.С. Изучение генетической зависимости между нейробиологическими (порог возбудимости) и поведенческими особенностями у линий мышей и их гибридов // Генетика.- 1983.- Т.19.- С.958-964
43. Дмитриев Ю.С., Вайдо А.И. Исследование некоторых параметров функционального состояния нервной системы и особенностей поведения в связи с их наследственной обусловленностью у инбредных линий мышей. Сообщение 1. Анализ наследования порога возбудимости нервно-мышечного аппарата у инбредных линий мышей// Генетика.- 1981 а.- Т.17.- С. 282-290.
44. Дмитриев Ю.С., Вайдо А.И. Исследование некоторых параметров функционального состояния нервной системы и особенностей поведения в связи с их наследственной обусловленностью у инбредных линий мышей. Сообщение 11. Корреляция порога нервно-мышечной возбудимости с некоторыми поведенческими показателями у мышей// Генетика.- 1981 б.- Т.17.- С. 291-297.
45. Дмитриева Н.И., Гоццо С. Структурные особенности головного мозга крыс, селектированных по порогу возбудимости// Арх.анат.- 1985.-Т.88, №2.- С.5-10.
46. Дмитриева Н.И., Идрисова Д.А., Вайдо А.И., Ширяева Н.В., Арутюнян Н.А., Лопатина Н.Г., Шаляпина В.Г.. Морфофункциональные показатели щитовидной железы в отдаленные сроки после длительного стрессирования у линий крыс, селектированных по возбудимости нервной системы// Проблемы эндокринологии.- 1994.-Т.40, №1.-С.50-52.
47. Дмитриева Н.И., Лопатина Н.Г. Влияние стресса на морфофункциональные особенности щитовидной железы у крыс линий, селектированных по возбудимости нервной системы// Пробл. Эндокринологии.-1991.-Т.37, №6.- С.59-61.
48. Дудкин К.Н., Миронов С.В., Дюжикова Н.А., Лопатина Н.Г. Информационная система для автоматической обработки цитогенетических данных : анализ интерфазного хроматина нервных клеток мозга эмбрионов крыс с различной возбудимостью нервной системы// Цитология.-1999.- Т.41, №3/4.-С.237-249.
49. Епифанова О.И. Гормоны и размножение клеток. М.:Наука .- 1965.-244 с.
50. Ефимов С.В. Характеристика глюкокортикоидных рецепторов в мозгу крыс с разной стрессорной реактивностью гипоталамо-адренокортикальной системы .

Автореферат диссерт. на соиск. уч.степени канд.биол.наук.  
Санкт-Петербург.-1995.- 21 с.

51. Ефимов С.В., Вайдо А.И., Ширяева Н.В., Шалапина В.Г. Глюкокортикоидные рецепторы в гиппокампе у крыс с разной возбудимостью нервной системы // Физиол. журн.им.И.М.Сеченова .- 1994.- Т.80, № 11.- С.51-55.

52. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учебное пособие.- 2-е изд.- Новосибирск :Сиб.унив.изд-во, 2003.- 479 с.

53. Жимулёв И.Ф., Беляева Е.С. Гетерохроматин, эффект положения гена и генетический сайленсинг// Генетика.- 2003.- Т.39, N 2.- С.1-15.

54. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Атлас.- М.: Медицина.- 1982.-264 с.

55. Зимкина А.М., Лоскутова Т.Д. О концепции функционального состояния центральной нервной системы// Физиол.человека.-1976.- Т.2.- С.179-192.

56. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетики поведения.- 2002.- Изд-во МГУ : Изд-во «Высшая школа».- 383 с.

57. Иванов В.Т. , Тушмалова Н.А. Синтез ДНК и высшие функции мозга // Успехи современной биологии.- 1988.- Т.106, Вып.5.- С.163-178.

58. Игумнов С.А., Жебентяев В.А. Стресс и стресс-зависимые заболевания. СПб.: Речь.- 2011.- 346 с.

59. Ингель Ф.И., Прихожан Л.М., Геворкян Н.М. Длительный психоэмоциональный стресс как индуктор мутаций у млекопитающих и модификатор мутагенеза // Бюлл. exper. биол. и медицины.- 1993.-№9.- С.307-309.

60. Ингель Ф.И., Бодягин Д.А., Геворкян Н.М. Модификация психоэмоциональным стрессом мутагенных свойств ксенобиотиков// Токсикол. вестник.- 1995.-№3.- С.5-9.

61. Ингель Ф.И., Ревазова Ю.А. Модификация эмоциональным стрессом мутагенных эффектов ксенобиотиков у животных и человека// Исследования по генетика.СПб: Изд-во СПбГУ.- 1999. -Вып.12.- С.86-103.

62. Ингель Ф.И. Качество жизни и индивидуальная чувствительность генома человека. Есть ли выход из порочного круга ?// Экологическая генетика.-2005.-Т.3, №3.-С.38-45.

63. Камышев Н.Г., Савватеева Е.В., Пономаренко В.В. О нейрогормональных факторах регуляции генетических и цитогенетических процессов. В кн. Физиологическая генетика и генетика поведения.- Л.: Наука.- 1981.- с.182.

64. Керкис Ю.Я. Физиологические изменения в клетке как причина мутаций// Усп.соврем. биологии.-1940.- Т.12, №1.-С.143-159.
65. Керкис Ю.Я., Осетрова Т.Л., Логвинова В.В., Яснова Л.Н., Скорова С.В. Генетические и физиологические (гуморальные) факторы , контролирующие индуцированный и спонтанный мутационный процесс у млекопитающих. В кн. Проблемы теоретической и прикладной генетики.- 1973.- Новосибирск : ИЦиГ СО АН СССР. - С.75-93.
66. Керкис Ю.Я., Скорова С.В. О факторах, концентрирующих интенсивность спонтанного мутационного процесса // Информационный бюллетень Научного Совета по проблемам радиобиологии АН СССР. -1977. -№ 20. - С. 51–52.
67. Корочкина С.Е., Савватеева Е.В., Клименко В.В., Пономаренко В.В. Спонтанная и индуцированная температурой рекомбинация у линий дрозофилы с измененным метаболизмом цАМФ .// Доклады АН СССР.- 1985.- Т.285.- С.1454-1458.
68. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и при патологии.-М.: Изд-во МГУ.-1960.- 264 с.
69. Крушинский Л. В. Биологические основы рассудочной деятельности: Эволюционные и физиолого-генетические аспекты поведения. - Москва: Изд-во МГУ.- 1986. - 270 с.
70. Крушинский Л. В. Эволюционно-генетические аспекты поведения. - Москва: Наука.-1991. - 256 с. (Избранные труды).
71. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. Руководство.- М.:Медицина.- 1997.- 352 с.
72. Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Прицентромерный гетерохроматин как главный режиссер программы индивидуального развития. // Генетика человека и патология / Под ред. Пузырева В.П..- Вып.9.- Томск : Печатная мануфактура.- 2011.- С.59-63.
73. Кузьмина Л. А, Лопатина Н. Г., Пономаренко В. В. О некоторых биохимических путях влияния мутации snow на нейрологические признаки медоносной пчелы //Доклады АН СССР. -1977.-Т. 257, № 4. - С. 955-957.
74. Кузьмина Л. А, Лопатина Н. Г., Пономаренко В. В. Кинуренин в наследственно обусловленных нарушениях функции нервной системы и поведения медоносной пчелы // Доклады АН СССР. -1979а. - Т. 245, № 4. - С. 964-967.
75. Кузьмина Л. А, Лопатина Н. Г., Пономаренко В. В. Триптофан в угнетающем поведении и функцию нервной системы эффекте мутации snow медоносной пчелы// Доклады АН СССР. -1979б. - Т. 245, № 5. - С. 1236-1238.

76. Куликова О.Г., Рейхарт Б.А., Сапронов Н.С. Участие генетического аппарата в механизмах слефообразования : роль кальций-регуляторной системы у крыс// Журн. высш.нервн.деятельности.- 1997.-Т.47,Вып.4.- С.708-713.
77. Лавров С.А., Кибанов М.В. Некодирующие РНК и структура хроматина // Успехи биологич. химии.- 2007.- Т.47.- С.53-88.
78. Лебедева Л.И., Скорова С.В., Ахмаметьева Е.М. Возможные механизмы возникновения перестроек хромосом. Сообщение VI. Задержка митоза как протекторный механизм. Происхождение спонтанных разрывов хромосом. // Генетика.- 1993.- Т.29,№11.- С.1826-1830.
79. Лебедева Л.И., Яковченко Н.Н. Возможные механизмы возникновения перестроек хромосом. Сообщение IV. О перестройках хромосом при спонтанном мутагенезе.// Генетика.-1988.- Т.24, №6.- С.1033-1040.
80. Левина А.С., Савенко Ю.Н., Дюжикова Н.А., Вайдо А.И. Каинатные рецепторы в гиппокампе крыс линий, различающихся по уровню возбудимости нервной системы. // Морфология.- 2011. -Т.139, № 3.- С.25-29.
81. Лобашев М.Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса// Вестн.ЛГУ.- 1947.- №8.- С.10-29.
82. Лобашев М.Е., Пономаренко В.В., Полянская Г.Г., Цапыгина Р.И. О роли нервной системы в регуляции различных генетических и цитогенетических процессов// Журн. эволюц. биохим. и физиол.- 1973.- Т.9, №4.- С.396-406.
83. Лобов И.Б, Подгорная О.И. Роль белков ядерного матрикса в формировании гетерохроматина.// Цитология.- 1999.-Т. 41, № 7.- С.562-573
84. Лопатина Н.Г., Смирнова Г.П., Пономаренко В.В. Гипотеза нервной регуляции процесса реализации наследственной информации. В кн.: Проблемы высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. Л. -1975.- С. 107-121.
85. Лопатина Н.Г. Сравнительно-генетическое изучение порогов нервно-мышечной возбудимости в связи с сигнальным поведением медоносной пчелы // Генетика.- 1979.-Т.15.- С.1979-1988.
86. Лопатина Н.Г., Пономаренко В.В. Исследование генетических основ высшей нервной деятельности. В кн.: Физиология поведения. Нейробиологические закономерности/ Ред. А.С.Батуев.-Л.: Наука.-1987.- С.9-59.
87. Мамаева С.Е. Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. -М.: Научный мир.-2002.- 231 с.

88. Мамон Л.А., Куцкова Ю.А. Роль белков теплового шока в восстановлении индуцированных высокой температурой повреждений митотических хромосом у *D.melanogaster*// Генетика.- 1993.-Т.29, № 4.- С.604-612.
89. Медведева А.В., Токмачева Е.В.,Савватеева Е.В. , Корницкий В.С. Особенности организации генома дрозофилы у мутантов с изменениями метаболизма вторичных посредников и способности к обучению// Физиол. журн.-1995.- Т.81, №8.-С.90-93.
90. Медведева А.В., Савватеева Е.В. Влияние ts- мутаций по гену *agnostic* , контролирующему функции кальмодулина и способность к обучению, на эктопическую конъюгацию политенных хромосом у дрозофилы // Докл. АН СССР.- 1991.- Т.318, №4.- С.733-736.
91. Медведева А.В., Савватеева Е.В. Влияние температуры на пространственную организацию политенных хромосом мутантов дрозофилы с измененными функциями кальмодулина// Докл. АН СССР.-1991.-Т.318, №4.- С.988-991.
92. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. М.: Наука.-1981.- 277 с.
93. Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца. М.:Наука.-1993.-157 с.
94. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам .- М.: Медицина.-1988.-256 с.
95. Международная классификация болезней (10-й пересмотр). Классификация психических и поведенческих расстройств. Клинические описания и указания по диагностике. СПб.: Адис.-1994.- С.131-170.
96. Ордян Н.Э., Вайдо А.И., Ракицкая В.В., Ширяева Н.В., Пройма Ф.И., Лопатина Н.Г., Шаляпина В.Г. Функционирование гипофизарно-адренокортикальной системы у крыс, селектированных по порогу чувствительности к электрическому току// Бюлл.экспер.биологии и медицины.- 1998.- Т.4.-С. 443-445.
97. Отеллин В. А., Неокесарийский А. А., Коржевский Д. Э. Изменения структуры ядер нейронов неокортекса в условиях дефицита серотонина и катехоламинов // Цитология.- 1998.- Т.40, №4.-С.256-259
98. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э. Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты.- СПб.: Изд-во «Десятка».- 2007.-240 с.
99. Павлов И.П. (1926). Лекции о работе больших полушарий головного мозга.- Полн.собр.соч. М; Л., 1951.-Т.4. 451 С.

100. Павлова М.Б. Сравнительное изучение вкусовой чувствительности к фенилтиокарбамиду у крыс, различающихся по порогу возбудимости нервной системы. // Журн. высш. нервн. деят. -1997.- Т.47.- С.123-129.
101. Паткин Е.Л., Вайдо А.И., Кустова М.Е., Ширяева Н.В., Лопатина Н.Г. Однонитевые разрывы ДНК в отдельных клетках мозга различных линий крыс в норме и при стрессорном воздействии// Цитология.- 2001.- Т.43, №3.- С.269-272.
102. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. М.: Наука.-2000. -830 с.
103. Пендина А.А., Гринкевич В.В., Кузнецова Т.В., Баранов В.С. Метилирование ДНК- универсальный механизм регуляции активности генов // Экологическая генетика.- 2004.- Т.2, Вып.1.- С.28-37.
104. Полетаева И.И. Собаки Л.В.Крушинского.// Природа.-1999.- №8.- С.150-155.
105. Полторацкий В.П., Подгорная О.И. Роль сателлитной ДНК в пространственной организации хроматина в интерфазном ядре // Цитология. - 1992. - Т. 3, № 2.- С. 3-10.
106. Пономаренко В.В. О некоторых молекулярных и системных аспектах генетического контроля поведения. В кн.: Труды XI съезда Всесоюзн. физиол. общества им.И.П.Павлова.-1970.-Л.-С.97-101.
107. Пономаренко В.В. Исследование условно-рефлекторной деятельности некоторых форм врожденного поведения и нейрофизиологических признаков в связи с их наследственной обусловленностью у животных разных филогенетических уровней (птицы, рыбы, насекомые). Дисс. докт.биол. наук.- Л.- 1975.
108. Пономаренко В.В. Генетика поведения. В кн. : Физиологическая генетика Ред. М.Е.Лобашев, С.Г. Инге-Вечтомов. -Л.: Медицина.- 1976.- С.350-382.
109. Пономаренко В.В., Лопатина Н.Г., Маршин В.Г., Никитина И.А., Смирнова Г.П., Чеснокова Е.Г. О реализации генетической информации, детерминирующей деятельность нервной системы и поведение животных различных филогенетических уровней. В сб.: Актуальные проблемы генетики поведения.- Л.: Наука.- 1975.- С.195-218.
110. Прокофьева – Бельговская А.А. Гетерохроматические районы хромосом.- М.:Наука.- 1986.- 431 с.
111. Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука. – 1997.-224 с.
112. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия.-2001, №4.- С.28-40.



113. Разин С.В., Быстрицкий А.А. Хроматин : упакованный геном. М.: БИНОМ.- 2012.-176 с.
114. Райзе Т.Е., Ширяева Н.В., Вайдо А.И. Изменение метаболизма фосфоинозитидов в мозгу крыс, различающихся по порогу нервно-мышечной возбудимости, невротизирующем воздействии и при действии антиоксидантов// Российский физиол. журн. им.И.М.Сеченова.-1997.-Т.83,№3.-С.122-128.
115. Резников К.Ю. Пролиферация клеток мозга позвоночных в условиях нормального развития мозга и при его травме. М.: Наука.-1981.- 149 с.
116. Резников К.Ю., Назаревская Г.Д. Пролиферация и цитогенез в развивающемся гиппокампе. М.:Наука.- 1989.- 125 с.
117. Смирнов А.Ф. Структурно-функциональная организация хромосом. СПб: Нестор-История.-2009.- 204 с.
118. Тарабрина Н.В., Агарков В.А., Быховец Ю.В. , Калмыкова Е.С., Макаrchук А.В., Падун М.А., Удачина Е.Г., Химчан З.Г., Шаталова Н.Е., Щепина А.И. Практическое руководство по психологии посттравматического стресса. Ч.1. Теория и методы. М.: Когито-Центр.-2007.- 208 с.
119. Таранова Н.П., Кленникова В.А., Вайдо А.И., Ширяева Н.В., Лопатина Н.Г., Кулагин Д.А. Влияние нарушений сна на активность АТФ-аз нейронов и глиоцитов гиппокампа у крыс, селектированных по порогу возбудимости нервной системы // Нейрохимия.- 1990.- Т.9, №1.- С.24-31.
120. Токмачева Е.В. Изучение цитогенетических особенностей формирования адаптивных реакций в связи с активационными свойствами кальмодулина у *Drosophila melanogaster*. Автореф.дисс. на соискание канд.биол.наук.- СПб.- 1995.- с. 120.
121. Трошин В.Д. Стресс и стрессогенные расстройства : диагностика, лечение, профилактика.- М.: ООО «Медицинское информационное агентство».- 2007.- 784 с.
122. Савватеева Е.В. Генетический контроль систем вторичных посредников и их роль в обучении// Усп.совр.генетики.-1991.-Т.17.-С.33-99.
123. Савватеева Е.В., Шарагина Л.М., Лопатина Н.Г. Активность фосфодиэстеразы и активационные свойства кальмодулина , выделенных из гиппокампа и других отделов головного мозга крыс линий, селектированных по возбудимости нервной системы и различающихся по длительной потенциации, способности к обучению и реакции на стресс// Биол. мембраны.-1991.-Т.8.-С.1185-1186.
124. Савватеева-Попова Е.В., Медведева А.В, Никитина Е.А. От нейрогенетики к нейроэпигенетике. // Генетика.- 2015.- Т.51, №5.- С.613-624.

125. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз.-1960.- 254 с.
126. Селье Г. На уровне целого организма. М.:Наука.-1972.- 122 с.
127. Селье Г. Стресс без дистресса. М.: Прогресс.- 1979.-126 с.
128. Середенин С.В., Дурнев А.Д., Ведерников А.А. Влияние эмоционального стресса на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей // Бюлл. экспер.биол. и медицины.-1980.-Т.90, №7.- С.91-92.
129. Середенин С.В., Дурнев А.Д. Фармакологическая защита генома. М.: ВИНТИ.- 1992.- 161 с.
130. Судаков К.В., Умрюхин П.Е. Системные основы эмоционального стресса. М.: ГЭОТАР-Медиа.-2010.- 112 с.
131. Уоддингтон К. Организаторы и гены . М.: Госиздат.-1947.-239 с.
132. Хананашвили М.М. Экспериментальная патология внд. М.: Медицина.- 1978.- 368 с.
133. Хананашвили М.М. Патология внд (поведения).- М.- 1983.- 288 с.
134. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.:Наука.- 1986.- 472 с.
135. Хесин Р.Б., Лейбович Б.А. Структура хромосом, гистоны и активность генов у дрозофилы.//Молекулярная биология.-1976.-Т.10, №1.С.-3-34.
136. Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. Мобильные элементы и стресс.// Вестник ВОГиС.-2008.-Т.12, №1-2.- С.216-241.
137. Шаляпина В.Г., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г., Ордян Н.Э., Ракицкая В.В., Савченко О.Н., Ширяева Н.В. Изменение секреции половых стероидных гормонов при стрессе у крыс с разной возбудимостью мозга// Росс.физиол.журн. им.И.М.Сеченова.- 1999.- Т.85, №11.- С.1428-1433.
138. Шаляпина В.Г., Ефимов С.В., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г., Ракицкая В.В., Ширяева Н.В. Свойства глюкокортикоидных рецепторов в стриатуме и гипоталамусе крыс, селектированных по порогу возбудимости нервной системы // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова- 1994.- Т.80, №1.-С.41-46.
139. Шаляпина В.Г., Шабанов П.Д. Основы нейроэндокринологии. СПб : Элби-СПб.- 2005.- 472 с.
140. Шарагина Л.М., Савватеева Е.В., Вайдо А.И., Ширяева Н.В., Алехина Т.А., Лопатина Н.Г. Состояние системы вторичных посредников головного мозга крыс различных линий в норме и после невротизации// Биологич.мембраны.-1992.- Т.10-11.- С.1102-1105.

141. Ширяева Н.В., Вайдо А.И., Петров Е.С., Хофман Г.Ю., Забродин И.Ю., Макарова Т.М. Поведение в открытом поле крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы// Журн. высш. нерв. деят.- 1987.- Т.37, Вып.6.- С.1064-1069.
142. Ширяева Н.В., Вайдо А.И., Левкович Ю.И., Лопатина Н.Г. Поведение в открытом поле крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы в разные сроки после невротизации// Журн. высш. нерв. деят.- 1992а.- Т.42, №4.- С.754-757.
143. Ширяева Н.В., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г., Кулагин Д.А., Глущенко Т.С., Таранова Н.П. Дифференциальная чувствительность к невротизирующему воздействию линий крыс, различающихся по порогу возбудимости нервной системы//Журн.высш.нервн.деят.- 1992б.-Т.42, №1.-С.137- 143.
144. Ширяева Н.В., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г. Влияние невротизации спустя длительные сроки после ее окончания на поведение крыс, различающихся по возбудимости нервной системы// Журн.высшей нервной деятельности.-1996.- Т.46, Вып. 1,- С.157-162.
145. Ширяева Н.В., Лукашин В.Г., Вшивцева В.В., Вайдо А.И. Структурно-функциональные и метаболические изменения нервной системы у низко- и высоковозбудимых крыс при лишении парадоксальной фазы сна // Журн. высшей нервной деятельн.- 1992в.- Т.40, Вып.3.- С.518-523.
146. Ширяева Н.В., Семенова С.Г., Вайдо А.И., Лопатина Н.Г. Особенности эффектов морфина и налоксона у линий крыс, различающихся по порогу возбудимости нервной системы // Журн. высшей нервной деятельн.- 1995.- Т.45, Вып.5.- С.976-980.
147. Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. Эпигенетика. Москва : Техносфера.- 2010.- 496 с.
148. Явич М.П., Рожинская И.И., Голубева Л.Ю., Меерсон Ф.З. Влияние хирургического стресса на синтез ДНК в печени и клетках мозга // Вопросы мед. химии.- 1990.- Т.36, №5.- С.8-11.
149. Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф. Особенности изменений кариотипа клеток крысы в процессе их трансформации in vitro // Цитология.- 2014.-Т.56, №1.- С.14-35.
150. Ярыгин В.Н., Мустафин А.Г. Суточный ритм чувствительности активности генома нервных клеток к измененному двигательному режиму// Вестн. РАМН.- 2000.- Т.8.- С.11-17.
151. Abrusán G. Somatic transposition in the brain has the potential to influence the biosynthesis of metabolites involved in Parkinson's disease and schizophrenia. //Biol. Direct. - 2012.- V.7, № 41.-P.1-7.

152. Abrusan G., Giordano J., Warburton P.E. Analysis of transposon interruptions suggests selection for L1 elements on the X chromosome.// *PLoS Genet.*-2008.-V.4, №8.- e1000172.
153. Acosta M.J., Marchal J.A., Fernández-Espartero C.H., Bullejos M., Sánchez A. Retroelements (LINEs and SINEs) in vole genomes: differential distribution in the constitutive heterochromatin.//*Chromosome Res.* 2008.- V.16, №7.- P.949- 959.
154. Ahmad K., Henikoff S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly //*Molecular cell.*- 2002.- V. 9, № 6.- P. 1191-1200.
155. Aid T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm K., Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited //*Journal of neuroscience research.*- 2007.- V. 85, № 3.- P. 525-535.
156. Akagi K., Stephens R.M., Li J., Evdokimov E., Kuehn M.R., Volfovsky N., Symer D.E.. MouseIndelDB: a database integrating genomic indel polymorphisms that distinguish mouse strains.//*Nucl.Acids Res.*-2010.-V.38.-D600-D606.
157. Akbarian S. The neurobiology of Rett syndrome //*Neuroscientist.*-2003.- V. 9, №1.- P. 57-63.
158. Akbarian S., Beeri M. S., Haroutunian V. Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition //*JAMA neurology.* -2013.- V. 70, №. 6.- P. 711-718.
159. Akhmanova A., Verkerk T., Langeveld A., Grosveld F., Galjart N. Characterisation of transcriptionally active and inactive chromatin domains in neurons.//*J. Cell Sci.*- 2000 .- V.113, Pt 24.- P.4463-74.
160. Allfrey V.G. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. //*Proc. Can. Cancer Conf.* -1966.- V.6.- P.313-335.
161. Allfrey V.G., Mirsky A.E. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis.//*Science.*- 1964.- V.144, №3618.- P.559.
162. Amstadter A. B., Koenen, K. C., Ruggiero, K. J., Acierno R., Galea S., Kilpatrick D.G., Gelernter J. Variant in RGS2 moderates posttraumatic stress symptoms following potentially traumatic event exposure //*Journal of anxiety disorders.* -2009.- V. 23, № 3.- P. 369.
163. Anisman H., Gibb J., Hayley S. Influence of continuous infusion of interleukin-1beta on depression-related processes in mice: corticosterone, circulating cytokines, brain monoamines, and cytokine mRNA expression. //*Psychopharmacology (Berl).* -2008 .- V.199,№ 2.- P.231-244
164. Ausió J., Paz A. M., Esteller M. MeCP2: the long trip from a chromatin protein to neurological disorders //*Trends in molecular medicine.*- 2014.- V. 20, №. 9.- P.487-498

165. Auteliano D.J. Stress-induced stimulation of pituitary POMC gene expression is associated with activation of transcription factor AR-1 in hypothalamus and pituitary. // *Brain Res.* – 1998.- V.45, №1.- P.75-82.
166. Ayyanathan K., Lechner M.S., Bell P., Maul G.G., Schultz D.C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F.J. . Regulated recruitment of HP1 to a Euchromatic gene induces mitotically heritable , epigenetic gene silencing : a mammalian cells culture model of gene variegation.// *Genes Dev.*- 2003.-V.17, №15.- P.1855-1869.
167. Bagot R.C., Labonté B., Peña C.J., Nestler E.J. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression.//*Dialogues Clin. Neurosci.*- 2014.-V.16, №3.- P.281-295.
168. Baker W.K. Mechanisms of chromosomal and gene inactivation in *Drosophila*.//*Genetics.*- 1974 .- V.78, №1.- P.333-341.
169. Bale T.L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. //*Nat. Rev. Neurosci.*- 2015 .- V.16, №6.- P.332-344.
170. Baranov V.S. Genome paths : a way to personalized and predictive medicine // *Acta Naturae.*-2009.- V.1, №3.- P. 70-80.
171. Barreto G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach D., Swaminathan S.K., Handa V., Döderlein G., Maltry N., Wu W., Lyko F., Niehrs C . Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation //*Nature.* -2007.- V. 445, №7128.- P. 671-675.
172. Bártová E., Krejčí J., Harnicarová A., Galiová G., Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review.//*J.Histochem. Cytochem.*- 2008.- V.56, №8.- P.711-721.
173. Basu R., Zhang L.F. X chromosome inactivation: a silence that needs to be broken.//*Genesis.*- 2011.- V.49, №11.- P.821-34.
174. Becker P.B., Horz W. ATP-dependent nucleosome remodeling// *Annu.Rev.Biochem.* -2002.- V.71.- P. 247-273.
175. Beckers M., Gabriels J. , van der Maarel S., De Vriese A., Frants R.R., Collen D., Belayew A. Active genes in junk DNA? Characterization of DUX genes embedded within 3.3 kb repeated elements // *Gene.*- 2001.- V.264, №1.- P.51 -57.
176. Belichenko P.V., Hagberg B., Dahlström A. Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome.//*Acta Neuropathol.*- 1997.- V.93, №1.- P.50-61.
177. Belyaeva T. A., Vishnivetsky P. N., Potapov V. A., Zhelezova A. I., Romashchenko A. G. Species- and tissue-specific transcription of complex, highly repeated satellite-like Bsp elements in the fox genome.// *Mamm. Genome.*-1992.-V 3.-P. 233–236.

178. Berchtold N.C., Oliff H.S., Isackson P., Cotman C.W. Hippocampal BDNF mRNA shows a diurnal regulation, primarily in the exon III transcript.//Brain Res. Mol.- Brain Res.- 1999.- V.71, №1.- P.11-22.
179. Berger S.L., Kouzarides T., Shiekhhattar R., Shilatifard A. An operational definition of epigenetics// Genes Dev.-2009.- V. 23.- P. 781-783.
180. Beshpalov M.M., Saarma M. GDNF family receptor complexes are emerging drug targets //Trends Pharmacol Sci.- 2007.- V.28, №2.- P.68-74.
181. Bestor T. H., Ingram V. M. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA //Proceedings of the National Academy of Sciences.- 1983.- V. 80, № 18.- P. 5559-5563.
182. Bhattacharya S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N., Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA //Nature.- 1999.- V. 397, № 6720.- P. 579-583.
183. Bi X. Heterochromatin structure: lessons from the budding yeast.//IUBMB Life.- 2014.- V.66, №10.- P.657-666.
184. Biemond C., Vieira C. Junk DNA as an evolutionary force.// Nature.-2006.- V.443.- P.521-524.
185. Bienvenu T., Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. //Nat. Rev. Genet.- 2006.- V.7, №6.-P.415-426.
186. Biessmann H., Mason J.M., Ferry K., d'Hulst M., Valgeirsdottir K., Traverse K.L., Pardue M.L. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in Drosophila.// Cell.- 1990.-V.61, №4.- P.663-673.
187. Biessmann H., Carter S.B., Mason J.M. Chromosome ends in Drosophila without telomeric DNA sequences. //Proc Natl Acad Sci U S A.- 1990.-V.87.- №5.-P.1758- 1761.
188. Bignami G. Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat.//Anim Behav. -1965.-V. 13, №2.- P.221-227.
189. Bilang-Bleuel A., Ulbrich S., Chandramohan Y., De Carli S., Droste S.K., Reul J.M. Psychological stress increases histone H3 phosphorylation in adult dentate gyrus granule neurons: involvement in a glucocorticoid receptor-dependent behavioral response//Eur.J.Neurosci.- 2005.- V.22.- P.1691-1700.
190. Binder E. B. , Bradley, R. G., Liu, W., Epstein M.P., Deveau T.C., Mercer K.B., Tang Y., Gillespie C.F., Heim C.M., Nemeroff C.B., Schwartz A.C., Cubells J.F., Ressler K.J. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults //Jama.- 2008.- V. 299, № 11. -P. 1291-1305.
191. Bird A. The essentials of DNA methylation//Cell. - 1992.- V.70.- P.5-8.

192. Bird A., Tate, P., Nan, X., Campoy J., Meehan R., Cross S., Tweedie S., Charlton J., Macleod D. Studies of DNA methylation in animals //Journal of Cell Science. -1995.- V. 19.- P. 37-39.
193. Bird A. P., Wolffe A. P. Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin //Cell.- 1999.- V. 99, № 5.- P. 451-454.
194. Bitterge B., Schneider R. Histone variants: key players of chromatin //Cell and tissue research.-. 2014.- V. 356,№ 3.- P. 457-466.
195. Bonaccorsi S., Gatti M., Pisano C., Lohe A. Transcription of a satellite DNA on two Y chromosome loops of Drosophila melanogaster.//Chromosoma.- 1990.-V.99, №4.- P.260-266.
196. Bonefeld B.E., Elfving B., Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue.//Synapse.- 2008.- V.62, № 4.- P.302-309.
197. Bradbury E.M. Nucleosome and chromatin structure and functions.// J.Cell Biochem.Suppl.-1998.- V.30-31.-P.177-184
198. Bradford H.F. Glutamate, GABA and epilepsy.//Prog.Neurobiol.- 1995.- V.47, №6.- P.477-511.
199. Braunstein M., Rose A.B., Holmes S.G., Allis C.D., Broach J.R. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation.//Genes Dev.- 1993.- V.7,№4.- P.592-604.
200. Bremner J.D. Hypotheses and controversies related to effects of stress on hippocampus : an argument for stress-induced damage to the hippocampus in patient with posttraumatic stress disorder// Hippocampus.- 2001.- V.11, №2.- P.75-81.
201. Bret L., Delverdier M., Fournie G. L'apoptose.// Rev.Med.Vet (Fr.).-1993.- V.4, №7.-P.579-589.
202. Brett P.M., Le Bourdelles B., See C.G., Whiting P.J., Attwood J., Woodward K., Robertson M.M., Kalsi G., Povey S., Gurling H.M. Genomic cloning and localization by FISH and linkage analysis of the human gene encoding the primary subunit NMDAR1 (GRIN1) of the NMDA receptor channel.//Ann. Hum. Genet.- 1994.- V.58, Pt 2.- P.95-100.
203. Broadhurst Pl., Bignami G. Correlative effects of psychogenetic selection : a study of the Roman High and Low avoidance strains of rats.// Behav.Res.Ther.-1965.-V.3.- P.273-280
204. Brownell J. E., Allis C. D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation //Current opinion in genetics & development.- 1996.- V. 6, № 2.- P. 176-184.

205. Buschdorf J. P., Strätling W. H. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome // *Journal of molecular medicine*.- 2004.- V. 82, № 2.- P. 135-143.
206. Buwe A., Steinlein C., Koehler M.R., Bar-Am I., Katzin N., Schmid M. Multicolor spectral karyotyping of rat chromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* -2003.- V.103, №1-2.- P.163-168.
207. Camats N., Ruiz-Herrera A., Parrilla J.J., Acien M., Paya P., Guilotto E., Egozail J., Garcia F., Garcia M. Genome instability in rat : breakpoints induced by ionising radiation and interstitial telomeric-like sequences // *Mutat. Res.*- 2006.- V.595.- P.156-166.
208. Cann K.L., Dellaire G. Heterochromatin and the dna damage response : the need to relax.// *Biochem.Cell Biol.*- 2011.-V.89, №1.- P.45-60.
209. Capy P., Gaspary G., Biemont C., Bazin C. Stress and transposable elements : co-evolution or useful parasites ?// *Heredity*.-2000.- V.85.-P.101-106.
210. Carmo-Fonseca M., Cunha C., Custódio N., Carvalho C., Jordan P., Ferreira J., Parreira L. The topography of chromosomes and genes in the nucleus.//*Exp. Cell Res.*- 1996.- V.229, №2.- P.247-252.
211. Carrasco J., Márquez C., Nadal R., Tobeña A., Fernández-Teruel A., Armario A. Characterization of central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the inbred Roman rat strains.// *Psychoneuroendocrinology*. -2008 .-V.33, №4.-P.437-445.
212. Carthew R. W. Gene silencing by double-stranded RNA // *Current opinion in cell biology*.- 2001.-V. 13, №. 2.- P. 244-248.
213. Cedar H., Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification : patterns and paradigms// *Nat.Rev.Genet.*- 2009.- V.10.- P.295-304.
214. Cerbone A., Pellicano M.P., Sadile A.G. Evidence for and against the Naples high- and low-excitability rats as genetic model to study hippocampal function// *Neurosci. Biobehav.Rev.*- 1993.-V.17, №3.-P.295-303.
215. Champagne F. A., Weaver, I. C., Diorio, J., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- $\alpha$ 1b promoter and estrogen receptor- $\alpha$  expression in the medial preoptic area of female offspring // *Endocrinology*. -2006.- V. 147, № 6.- P. 2909-2915.
216. Chahrour M., Jung, S. Y., Shaw, C., Zhou X., Wong S.T., Qin J., Zoghbi H.Y. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription // *Science*.- 2008.- V. 320, № 5880.- P. 1224-1229.



217. Chan R.K., Peto C.A., Sawchenko P.E. Fine structure and plasticity of barosensitive neurons in the nucleus of solitary tract.// *J.Comp.Neurol.*-2000.- V.422, №3.- P.338-351.
218. Chan M.F., Liang G., Jones P.A. Relationship between transcription and DNA methylation. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*- 2000.- V.249.- P.75-86.
219. Chang Q., Khare G., Dani V., Nelson S., Jaenisch R. The disease progression of MeCP2 mutant mice is affected by the level of bdnf expression.// *Neuron.*- 2006.- V.49, №3.- P.341-348.
220. Chandramohan Y., Droste S.K., Arthur J.S., Reul J.M. The forced swimming–induced behavioral immobility response involves histone H3 phospho-acetylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen-and stress-activated kinase signaling pathway// *Eur. J. Neurosci.* - 2008.- V.27.- P.2701-2713.
221. Chandramohan Y., Droste S.K., Reul J.M. Novelty stress induces phosphoacetylation of histone H3 in rat dentate gyrus granule neurons through coincident signaling via the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen-and stress-activated kinase signaling pathway// *Eur.J.Neurosci.* - 2007.- V.27.- P. 815-828.
222. Chapman A.G. Glutamate receptors in epilepsy. *Prog.Brain Res.*- 1998.- V.116.- P.371-383
223. Chen, F.W., Ioannou, Y.A. Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis.//*Int. Rev. Immunol.* -1999.- V.18, № 5-6.- P.429-443.
224. Chen W.G., Chang Q., Lin Y., Meissner A., West A.E., Griffith E.C., Jaenisch R., Greenberg M.E. Derepression of bdnf transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2.//*Science.*-2003.- V.302, №5646.- P.885-889.
225. Chen J., Evans, A. N., Liu, Y., Honda M., Saavedra J.M., Aguilera G. Maternal deprivation in rats is associated with corticotrophin-releasing hormone (CRH) transcriptional responses to stress in adulthood // *Journal of Neuroendocrinology.*- 2012.- V. 24, №. 7.- P. 1055-1064.
226. Chen R.Z., Akbarian S., Tudor M., Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG-binding protein 2 in CNS neurones results in a Rett-like phenotype in mice // *Nat.Genet.*-2001.- V.27.- P. 327-331.
227. Chen Y., Damayanti N.P., Irudayaraj J., Dunn K., Zhou F.C. Diversity of two forms of DNA methylation in the brain.//*Front. Genet.*- 2014.- V.5.- P.46.
228. Cheng T.L., Qiu Z. MeCP2: multifaceted roles in gene regulation and neural development. // *Neurosci Bull.* -2014.- V.30, №4.- P.601-609.

229. Chertkow-Deutsher Y., Cohen, H., Klein, E., Ben-Shachar D. DNA methylation in vulnerability to post-traumatic stress in rats: evidence for the role of the post-synaptic density protein Dlgap2 //The International Journal of Neuropsychopharmacology.- 2010.- V. 13, №3.- P. 347-359.
230. Comings D.E. The structure and function of chromatin.//Adv. Hum. Genet.- 1972.- V.3.-P.237-431.
231. Comings D.E., Harris D.C., Okada T.A., Holmquist G. Nuclear proteins. IV. Deficiency of non-histone proteins in condensed chromatin of *Drosophila virilis* and mouse. // Exp.Cell Res.- 1977.- V.105, №2.-P.349- 365.
232. Comings D. E., Comings, B. G., Muhleman, D., Dietz G., Shahbahrani B., Tast D., Knell E., Kocsis P., Baumgarten R., Kovacs B.W. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders //Jama.- 1991.- V. 266, №. 13.- P. 1793-1800.
233. Comings D. E., Muhleman D., Gysin R. Dopamine D 2 receptor (DRD2) gene and susceptibility to posttraumatic stress disorder: A study and replication //Biological psychiatry.- 1996.- V. 40, №. 5.- P. 368-372.
234. Committee of standardized karyotype of *Rattus norvegicus*. Standard karyotype of the norway rat, *Rattus norvegicus*. // Cytogen. Cell Genet.- 1973.- V.12.- P.199-205.
235. Cook K.R., Karpen G.H. A rosy future for heterochromatin // PNAS.- 1994.- V. 91, №12.- P. 5219 - 5221.
236. Coppens C.M., de Boer S.F., Steimer T., Koolhaas J.M. Impulsivity and aggressive behavior in Roman high and low avoidance rats: baseline differences and adolescent social stress induced changes.// Physiol Behav. -2012.-V.105, №5.- P.1156-60
237. Coppens C.M., de Boer S.F., Steimer T., Koolhaas J.M. Correlated behavioral traits in rats of the Roman selection lines.// Behav Genet. -2013 .-V.43, №3.- P.220-6.
238. Costa E., Dong, E., Grayson, D. R., Ruzicka W.B., Simonini M.V., Veldic M., Guidotti A. Epigenetic targets in GABAergic neurons to treat schizophrenia //Advances in Pharmacology.- 2006.- V. 54.- P. 95-117 .
239. Costain W.J., Rasquinha I., Graber T., Luebbert C., Preston E., Slinn J., Xie X., MacManus J.P. Cerebral ischemia induces neuronal expression of novel VL30 mouse retrotransposons bound to polyribosomes.// Brain Res.- 2006.- V.1094.-P.24-37.
240. Covington H.E. , Maze I., LaPlant Q.C., Vialou V.F., Ohnishi Y.N., Berton O., Fass D.M., Renthal W., Rush A.J. , Wu E.Y., Ghose S., Krishnan V., Russo S.J., Tamminga C., Haggarty S.J., Nestler E.J. Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. //J. Neurosci.- 2009 .- V.29, №37.- P.11451-11460.

241. Covington H.E. , Vialou V.F., LaPlant Q., Ohnishi Y.N., Nestler E.J. Hippocampal-dependent antidepressant-like activity of histone deacetylase inhibition.//*Neurosci. Lett.*- 2011 .- V.493, №3.-P.122-126.
242. Crane-Robinson C., Myers F.A., Hebbes T.R., Clayton A.L., Thorne A.W. Chromatin immunoprecipitation assays in acetylation mapping of higher eukaryotes.//*Methods Enzymol.*- 1999.- V.304.- P.533-547.
243. Crews D., Gillette R., Scarpino S.V., Manikkam M., Savenkova M.I., Skinner M.K. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* -2012.-V.109.- P.9143–9148.
244. Cross S. H., Bird A. P. CpG islands and genes //*Current opinion in genetics & development.*- 1995.- V. 5, №. 3.- P. 309-314.
245. Cruceanu C., Alda M., Nagy C., Freemantle E., Rouleau G.A., Turecki G. H3K4 trimethylation in synapsin genes leads to different expression patterns in bipolar disorder and major depression.//*Int. J. Neuropsychopharmacol.* -2013a.- V.16, №2.- P.289-299.
246. Cruceanu C., Freemantle E., Alda M., Rouleau G.A., Turecki G. Epigenetic regulation of synapsin genes in mood disorders.//*Neuropsychopharmacology.*- 2013b .- V.38, №1.- P.239-241.
247. Czéh B., Lucassen P.J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated?//*Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*- 2007 .- V.257, №5.- P.250-60.
248. Dai J., Xie W., Brady T.L., Gao J., Voytas D.F. Phosphorylation regulates integration of the yeast Ty5 retrotransposon into heterochromatin.//*Mol. Cell.*- 2007.- V.27, №2.- P.289- 299.
249. Dalton V.S., Kolshus E., McLoughlin D.M. Epigenetics and depression : return of the repressed// *J.Affect Disord.*-2014.- V.155.- P.1-12.
250. D'Ambrosio E., Waitzkin S.D., Witney F.R., Salemme A., Furano A.V. Structure of the highly repeated, long interspersed DNA family (LINE or L1Rn) of the rat. //*Mol. Cell Biol.*- 1986.- V.6, №2.- P.411–424.
251. Daskalakis N. P., Lehrner A., Yehuda R. Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment //*Endocrinology and metabolism clinics of North America.*- 2013a.- V. 42, № 3.- P. 503-513.
252. Daskalakis N. P., Yehuda R., Diamond D. M. Animal models in translational studies of PTSD //*Psychoneuroendocrinology.*- 2013b. -V. 38, № 9.- P. 1895-1911.

253. Devlin R.H., Bingham B., Wakimoto B.T. The organization and expression of the light gene , a heterochromatic gene of *Drosophila melanogaster*.// *Genetics*.-1990.- V.125, № 1.- P.129-140.
254. Deng V., Matagne V., Banine F., Frerking M., Ohliger P., Budden S., Pevsner J., Dissen G.A., Sherman L.S., Ojeda S.R. FXYD1 is an MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and MeCP2-null mice.// *Hum.Mol.Genet.*- 2007.- V.16, №6.- P.640-650.
255. Diaz M.O., Barsacchi-Pilone G., Mahon K.A., Gall J.G. Transcripts from both strands of a satellite DNA occur on lampbrush chromosome loops of the newt *Notophthalmus*.//*Cell*.- 1981.- V.24, №3.- P.649-659.
256. Díaz de León-Guerrero S., Pedraza-Alva G., Pérez-Martínez L. In sickness and in health : the role of methyl-CpG protein 2 in the central nervous system.// *Eur.J.Neurosci.*-2011.- V.33, №9.-P.1563-1574.
257. Díaz-Morán S., Palència M., Mont-Cardona C., Cañete T., Blázquez G., Martínez-Membrives E., López-Aumatell R., Tobeña A., Fernández-Teruel A. Coping style and stress hormone responses in genetically heterogeneous rats: comparison with the Roman ratstrains.// *Behav Brain Res.* -2012 .- V.228, №1.-P. 203-210.
258. Deaton A. M., Webb, S., Kerr, A. R., Illingworth R.S., Guy J., Andrews R., Bird A. Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system // *Genome research*.- 2011.- V. 21, №. 7.- P. 1074-1086.
259. Delattre M., Spierer A., Tonka C.H., Spierer P. The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: interaction between the heterochromatin-associated proteins Su(var)3-7 and HP1.// *J . Cell Sci.*- 2000 .- V.113, Pt 23.- P.4253-4261.
260. Dillon N. Heterochromatin structure and function. // *Biol Cell*.- 2004.- V.96, №8.- P.631-637.
261. Dimitrieva N., Gozzo S., Dimitriev Yu., Ammassari-Teule M. Mossy fiber distribution in four lines of rats : A correlative study with avoidance abilities and excitability thresholds// *Physiol. Psychol.*- 1984.- V.12.- P. 30-34.
262. Dimitri P., Corradini N., Rossi F., Verni F. The paradox of functional heterochromatin.// *Bioessays*.- 2005.- V.27, №1.-P.29-41.
263. Dimitri P., Caizzi R., Giordano E., Carmela Accardo M., Lattanzi G., Biamonti G. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences.// *Chromosoma*.- 2009.- V.118, №4.- P.419-435.

264. Dimitroglou E., Zafiropoulou M., Messini-Nikolaki N. DNA damage in a human population affected by chronic psychogenic stress// *Int. J. Hyg. Environ. Health.*- 2003.- V.206, №1.-P.39-44
265. Dingledine R., Kleckner N.W., McBain C.J. The glycine coagonist site of the NMDA receptor. // *Adv. Exp. Med. Biol.* -1990.- V.268.- P.17-26.
266. Domeyer B.E., Sladek N.E. Kinetics of cyclophosphamide biotransformation in vivo.// *Cancer Res.* -1980.- V.40, №1.- P.174-180.
267. Driscoll P., Battig K. Behavioral, emotional and neurochemical profiles of rats selected for extreme differences in active, two-way avoidance performance. *Genetics of the brain.* Amsterdam: Elsevier.- 1982.- P. 96-123.
268. Dunn A. J., Swiergiel A. H. Behavioral responses to stress are intact in CRF-deficient mice // *Brain research.*- 1999. -V. 845, №. 1.- P. 14-20.
269. Eberl D.F., Duyf B.J., Hilliker A.J. The role of heterochromatin in the expression of a heterochromatic gene, the rolled locus of *Drosophila melanogaster*.// *Genetics.*- 1993.- V.134, №1.- P.277-292.
270. Egan C.M., Sridhar S., Wigler M., Hall I.M. Recurrent DNA copy number variation in the laboratory mouse.// *Nat. Genet.*- 2007 .- V.39, №11.- P.1384-1389.
271. Eisen J.A., Sweder K.S., Hanawalt P.C. Evolution of the SNF2 family of proteins : subfamilies with distinct sequences and functions// *Nucleic Acids Res.*-1995.- V.23. -P. 2715-2723.
272. Eissenberg J.C., Elgin S.C. The HP1 protein family : getting a grip on chromatin.// *Curr. Opin.Genet. Dev.*- 2000.- V.10, №2.- P.204-210.
273. Eissenberg J.C., Elgin S.C. HP1a: a structural chromosomal protein regulating transcription.// *Trends Genet.*- 2014.- V.30, №3.- P.103-110.
274. Ehrlich M. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues and cells// *Nucleic Acids Res.*- 1982.- V.10. -P.2709-2721.
275. El-Khodori B.F., Flores G., Srivastava L.K., Boksa P. Effects of birth insult and stress at adulthood on excitatory amino acid receptors in adult rat brain.// *Synapse.* -2004.- V.54, №3.- P.138- 146.
276. Elliott E., Ezra-Nevo G., Regev L., Neufeld-Cohen A., Chen A. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the *Crf* gene in adult mice // *Nature neuroscience.*- 2010.- V. 13, №. 11. -P. 1351-1353.
277. Emde A., Hornstein E. miRNA at the interface of cellular stress and disease.// *EMBO J.*-2014.- V.33, №13.- P.1428-1437.

278. Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C. T. The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited // *Frontiers in neuroendocrinology*. - 2004.- V. 25, № 3.- P. 132-149.
279. Epstein L. M., Mahon K. A., Gall J. G. Transcription of a satellite DNA in the newt.// *J. Cell Biol.*- 1986.- V. 103.- P.1137–1144.
280. Evrony G.D., Cai X., Lee E., Hills L.B., Elhosary P.C., Lehmann H.S., Parker J.J., Atabay K.D., Gilmore E.C., Poduri A., Park P.J., Walsh C.A. Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain.//*Cell*.- 2012.-V. 151, №3.-P.483-496.
281. Fang L., Wuptra K., Chen D., Li H., Huang S.K., Jin C. Yokoyama K.K. Environmental-stress-induced chromatin regulation and its heritability // *J. Carcinog. Mutagen*.- 2014.- V. 5, №. 1.- P. 22058.
282. Farkas G., Leibovitch B.A., Elgin S.C. Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in *Drosophila*.//*Gene*.- 2000 .-V.253, №2.-P.117-36.
283. Ferland C.L., Schrader L.A. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats : a potential role of sirtuins// *Neuroscience*.- 2011.- V.174.-P.104-114.
284. Fiandaca M.J., Hyldig-Nielsen J.J., Gildea B.D., Coull J.M. Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis.// *Genome Res*.- 2001.-V.11, № 4.- P.609-613.
285. Fiori L.M., Gross J.A., Turecki G. Effects of histone modifications on increased expression of polyamine biosynthetic genes in suicide.//*Int. J. Neuropsychopharmacol*. -2012 .- V.15, №8.- P.1161-1166.
286. Fischer A. Epigenetic memory : the Lamarckian brain.// *EMBO J*. -2014.- V.33.- P.945-967.
287. Fishman H.K., Kelly D.D. Chromosomes and stress// *Int. J. Neurosci*.-1999.-V.99.- P.201-219.
288. Fishman H.K., Pero R.W., Kelly D.D. Psychogenic stress induces chromosomal and DNA damage// *Int.J.Neurosci*.- 1996.-V.84, №1-4.-P.219-227.
289. Fischle W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide B.M., Garcia B.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Funabiki H., Allis C.D. Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation //*Nature*. -2005.- V. 438, № 7071.- P. 1116-1122.
290. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicines, hypotonic citrate, citrate, squash sequence for mammalian chromosomes// *Strain technol*.- 1956.- V.31.-P.277

291. Forsberg K., Aalling N., Wörtwein G., Loft S., Møller P., Hau J., Hageman I., Jørgensen M.B., Jørgensen A. Dynamic regulation of cerebral DNA repair genes by psychological stress. // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* - 2015.- V.778.-P.37-43.
292. Francis D., Diorio, J., Liu, D., Meaney M.J. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat // *Science.* -1999.- V. 286, № 5442.- P. 1155-1158.
293. Francis J., Jung B., Zhang G., Cheng J., Ho W., Burnham W.M., Eubanks J.H. Kindling induces the mRNA expression of methyl-DNA-binding factors in the adult rat hippocampus// *Neuroscience.* - 2002. -V.113, №.1.- P. 79-87.
294. Frank D., Keshet I., Shani M., Levine A., Razin A., Cedar H. Demethylation of CpG islands in embryonic cells// *Nature.* - 1991.- V. 351.- P. 239-241.
295. Franková S., Mikulecká A. Ontogeny of social behavior of pups of laboratory rats genetically selected for activity level.// *Act Nerv Super (Praha).* - 1990.- V.32, №3.- P.167-73.
296. Frankova S., Tikal K. Responses to the change in the environment in pairs of male rats genetically selected for activity level// *Act.Nerv.Super.* - 1989.- V.31, №4.- P.241-247.
297. Fukudo S., Abe K., Hongo M., Utsumi A., Itoyama Y. Brain-gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats. // *Brain Res.* -1997.- V.757, №1.- P.146-148.
298. Fyffe S.L., Neul J.L., Samaco R.C., Chao H.T., Ben-Shachar S., Moretti P., McGill B.E., Goulding E.H., Sullivan E., Tecott L.H., Zoghbi H.Y. Deletion of *Mecp2* in *Sim1*-expressing neurons reveals a critical role for MeCP2 in feeding behavior, aggression, and the response to stress.// *Neuron.* -2008.- V.59, №6.- P.947-958.
299. Gao X., Hou Y., Ebina H., Levin H.L., Voytas D.F. Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin.// *Genome Res.* -2008.- V.18, №3.- P.359-369.
300. Gapp K., von Ziegler L., Tweedie-Cullen R.Y., Mansuy I.M. Early life epigenetic programming and transmission of stress-induced traits in mammals: how and when can environmental factors influence traits and their transgenerational inheritance?// *Bioessays.* - 2014.- V.36.- P.491–502.
301. Garcia-Dominguez M., Reyes J.C. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control.// *Biochim.Biophys.Acta.* - 2009. -V.1789.- P.451-459.
302. Garcia-Segura L.M., Berciano M.T., Lafarga M. Nuclear compartmentalization in transcriptionally activated hypothalamic neurons.// *Biol. Cell.* -1993.- V.77, №2.- P.143-54.
303. Gatti M., Smith D.A., Baker B.S. A gene controlling condensation of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*.// *Science.* - 1983.- V.221, №4605.- P.83- 85.

304. Gaubatz J.W., Cutler R.G. Mouse satellite DNA is transcribed in senescent cardiac muscle.// J.Biol.Chem.- 1990.- V.265, №29.- P.17753-17758.
305. Gehring M., Reik W., Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair //Trends in Genetics.- 2009.- V. 25, № 2.- P. 82-90.
306. Giap B.T., Jong C.N., Ricker J.H., Cullen N.K., Zafonte R.D. The hippocampus: anatomy, pathophysiology, and regenerative capacity.//J. Head Trauma Rehabil. -2000.- V.15, №3.- P.875-894.
307. Gilbertson M. W., Shenton, M. E., Ciszewski A., Kasai K., Lasko N.B., Orr S.P., Pitman R.K. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma //Nature neuroscience. -2002.- V. 5, № 11.- P. 1242-1247.
308. Glover D. A., Powers, M. B., Bergman L., Smits J.A., Telch M.J., Stuber M. Urinary dopamine and turn bias in traumatized women with and without PTSD symptoms //Behavioural brain research. -2003.- V. 144, №. 1.- P. 137-141.
309. Gold P. W., Chrousos G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states //Molecular psychiatry. -2002.- V. 7, №3.- P. 254-275.
310. Goldstein D. S., Kopin I. J. Evolution of concepts of stress //Stress: The International Journal on the Biology of Stress. - 2007.- V. 10, № 2.- P. 109-120.
311. Gonzalez-Lima F., Sadile A.G. Network operations revealed by brain metabolic mapping in a genetic model of hyperactivity and attention deficit: the naples high- and low-excitability rats.// Neurosci .Biobehav. Rev.- 2000 .- V.24,№ 1.- P.157-60.
312. Gottschling D. E. Summary: epigenetics—from phenomenon to field //Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, -2004.- V. 69.- P. 507-520.
313. Graff J., Kim D., Dobbin M.M., Tsai L.H. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes// Physiol.Rev.- 2011-. V.91-. P.603-649.
314. Graff J., Mansuy I.M. Epigenetic codes in cognition and behaviour// Behavioral Brain Research. -2008.- V.92.- P.70-87.
315. Grayson D. R. , Jia, X., Chen, Y., Sharma R.P., Mitchell C.P., Guidotti A., Costa E. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.- 2005.- V. 102, №. 26.- P. 9341-9346.
316. Grayson D. R., Chen, Y., Costa, E., Dong E., Guidotti A., Kundakovic M., Sharma R.P. The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (–) and the methylation switch (+/–) in schizophrenia //Pharmacology & therapeutics.- 2006.- V. 111, №. 1.- P. 272-286.



317. Grochow L.B., Colvin M. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide.// Clin.Pharmacokinet.-1979.- V.4, №5.-P.380-394.
318. Grygoriev S., Bulynko Y., Popova E. The end adjusts the means : Heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. // Chromosome Res.-2009.- V.14, №1.- P.53-69.
319. Gvozdev V.A. Regulatory small RNAs.//Biochemistry .- 2013 .- V.78, №6.- P.561.
320. Guy J., Cheval H., Selfridge J., Bird A. The role of MeCP2 in the brain.//Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.- 2011.- V.27.- P.631-52.
321. Hagihara H., Toyama K., Yamasaki N., Miyakawa T. Dissection of hippocampal dentate gyrus from adult mouse.//J. Vis. Exp.- 2009 .-V.33.- pii: 1543.
322. Hall I.M., Shankaranarayana G.D., Noma K., Ayoub N., Cohen A., Grewal S.I. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain.//Science.- 2002.- V.297, №5590.- P.2232–2237.
323. Hardy R.W., Tokuyasu K.T., Lindsley D.L. Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes.//Chromosoma.-1981.- V.83.-P.593-617.
324. Harro J. Animal models of depression vulnerability //Curr.Top Behav. Neurosci.- 2013.- V.14.- P. 29-54.
325. Hecht K., Treptov K., Choinowski S., Peschel M. Die raum-zeitliche organization der reiz-reactions beziehungen bedingt reflectorischer prozesse.-1972.- Yena: Fischer. -480 s.
326. Hegmann J.P. The response to selection for altered conduction velocity in mice.//Behav. Biol.- 1975.- V.13, № 4.- P.413-423.
327. Hegmann J.P. A gene-imposed nervous system difference influencing behavioral covariance.// Behav. Genet.- 1979.- V.9, №3.- P.165-175.
328. Heinzelmann M., Gill J. Epigenetic Mechanisms Shape the Biological Response to Trauma and Risk for PTSD: A Critical Review //Nursing research and practice.- 2013.- V. 2013, № 417010.
329. Heitz E. Das heterochromatin der moose. // I Jahrb.Wiss. Bot.-1928.- V.69.- P. 762-818.
330. Hendrich B., Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation //Current topics in microbiology and immunology.-2000.- V. 249.- P. 55-74.
331. Hendzel M. J., Nishioka W.K., Raymond Y., Allis C.D., Bazett - Jones D.P. Th, Ng J.P.H. Chromatin condensation is not associated with apoptosis // J. Biol. Chem.- 1998.- V.273 .- №38.- P. 24470 - 24478.

332. Henikoff S., Ahmad K. Assembly of variant histones into chromatin //Annu. Rev. Cell Dev. Biol.- 2005.- V. 21.- P. 133-153.
333. Hennig W. Heterochromatin. // Chromosoma.- 1999.- V. 108.- №1.- P.1 - 9.
334. Hilliker A.J. Genetic analysis of the centromeric heterochromatin of chromosome 2 of *Drosophila melanogaster* : deficiency mapping of EMS-induced lethal complementation groups.// Genetics.- 1976.- V.83, №4.- P.765-782.
335. Hinwood M., Tynan R.J., Day T.A., Walker F.R. Repeated social defeat selectively increases delta FosB expression and histone H3 acetylation in the intralimbic medial prefrontal cortex// Cereb.Cortex.- 2011.- V.21.- P.262-271.
336. Hirota T., Lipp, J. J., Toh, B. H., Peters J.M. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin //Nature.- 2005.- V. 438, №. 7071.- P. 1176-1180.
337. Hoivik E. A., Witsoe S. L., Bergheim I. R., Xu Y., Jakobsson I., Tengholm A., Døskeland S.O., Bakke M. DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms //PloS one.- 2013.- V. 8, №. 7.- P. e67925.
338. Holliday R., Pugh J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development// Science.- 1975.- V.187.- P.226-232.
339. Hollis F., Wang H., Dietz D., Gunjan A., Kabbaj M. The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague-Dawley rats// Psychopharmacology.-2010.- V.211.- P.69-77.
340. Hollis F., Duclot F., Gunjan A., Kabbaj M. Individual differences in the effect of social defeat on anhedonia and histone acetylation in the rat hippocampus.//Horm. Behav.- 2011.- V.59, №3.-P.331-337.
341. Holmquist G.P., Kapitonov V.V., Jurka J. Mobile genetic elements, chiasmata, and the unique organization of beta-heterochromatin.//Cytogenet. Cell Genet.- 1998.-V.80, №1-4.- P.113-116.
342. Horn P.J., Peterson C.L. Heterochromatin assembly : a new twist on an old model.// Chromosome Res.-2006.-V.14, №1.-P.83-94.
343. Houston I., Peter C. J., Mitchell A., Straubhaar J., Rogaev E., Akbarian S. Epigenetics in the human brain //Neuropsychopharmacology.- 2013.- V. 38, №. 1.- P. 183-197.
344. Hughes V. Epigenetics: The sins of the father. // Nature. -2014a.- V. 507, № 7490.- P. 22-24.
345. Hughes V. Sperm RNA carries marks of trauma. // Nature. -2014b.- V. 508, № 7496.- P. 296-297.

346. Hungerford D.A., Nowell P.C. Sex chromosome polymorphism and the normal karyotype in three strains of the laboratory rat. // J.Morphol. -1963.- V.113.- P.275-285.
347. Hunter R.G. Epigenetic effects of stress and corticosteroids in the brain. //Front. Cell Neurosci. -2012 .- V.6.- P.18.
348. Hunter R.G., Gagnidze K., McEwen B.S., Pfaff D.W. Stress and the dynamic genome : steroids, epigenetics and the transposome. // Proc.Natl.Acad.Sci.USA.- 2015.- V.112, №22.- P.6828-6833.
349. Hunter R.G., McCarthy K.J., Milne T.A., Pfaff D.W., McEwen B.S. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.- 2009.- V.106.- P.20912-20917.
350. Hunter R.G., Murakami G., Dewell S., Seligsohn M., Baker M.E., Datson N.A., McEwen B.S., Pfaff D.W. Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response.//Proc. Natl .Acad. Sci. U S A.- 2012 .- V.109, №43.- P.17657-17662.
351. Insel T.R. Disruptive insights in psychiatry: transforming a clinical discipline // Journal of clinical investigation.- 2009.- V.119, № 4.- P.700-705.
352. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Yurov Y.B. Aneuploidy in the normal, Alzheimer disease and ataxia-teleangiectasia brain : differential expression and pathological meaning.// Neurobiology of Disease.- 2009.- V.34, №2.- P.212-220.
353. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. Somatic genome variations in health and disease.//Curr.Genet.-2010.- V.11, №6.- P.387-396.
354. Irmis F., Radil-Weiss T., Lát J., Krekule I. Habituation of hippocampal theta activity in rats with different levels of non-specific excitability.//Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.- 1969a.- V.26, №2.- P.235.
355. Irmis F., Radil-Weiss T., Lát J. Individual differences in the frequency of hippocampal theta activity in relation to the nonspecific (constitutional) excitability level in rats.//Act. Nerv. Super. (Praha).- 1969b.-V.11,№4.- P.261-262.
356. Irmis F., Radil-Weiss T., Lát J. Vigilance changes in rats with different levels of nonspecific excitability.//Act Nerv Super (Praha).- 1969c.- V.11, №2.- P.156-160
357. Irwin L.N. Gene expression in the hippocampus of behaviorally stimulated rats : analysis by DNA microarray// Brain Res. Mol. Brain Res.- 2001.- V.96, №1-2.-P.163-169.
358. Ito S., D'Alessio A. C., Taranova O. V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification //Nature. -2010. -V. 466, №. 7310.- P. 1129-1133.

359. Itoh M., Tahimic, C. G., Ide, S., Otsuki A., Sasaoka T., Noguchi S., Oshimura M., Goto Y., Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2\_e2 is dispensable for Rett syndrome phenotypes but essential for embryo viability and placenta development //Journal of Biological Chemistry.- 2012.- V. 287, № 17.- P. 13859-13867.
360. Iwadare Y., Usami M., Suzuki Y., Ushijima H., Tanaka T., Watanabe K., Kodaira M., Saito K. Posttraumatic symptoms in elementary and junior high school children after the 2011 Japan earthquake and tsunami: symptom severity and recovery vary by age and sex.//J Pediatr. - 2014.- V.164, №4.- P.917-921
361. Jaenisch R., Beard C., Lee J., Marahrens Y., Panning B. Mammalian X chromosome inactivation.//Novartis Found Symp.- 1998.-V.214.-P.200-209.
362. Jedlicka P., Hoon M., Papadopoulos T., Vlachos A., Winkels R., Pouloupoulos A., Betz H., Deller T., Brose N., Varoqueaux F., Schwarzacher S.W. Increased dentate gyrus excitability in neuroligin-2-deficient mice in vivo.// Cereb. Cortex. -2011.- V.21, №2.- P.357-367.
363. Jegda T., Salkoff L. Molecular evolution of K<sup>+</sup> chanells in primitive eukaryotes// Soc. Gen. Physiol. Ser.- 1994.-V.49.-P.213-222.
364. Jepson J., Sheldon A., Shahidullah M., Fei H., Koh K., Levitan I.B. Cell-specific fine-tuning of neuronal excitability by differential expression of modulator protein isoforms // J. Neurosci.- 2013.- V.33, №42.- P.16767-77.
365. Jia J., Pekowska A., Jaeger S., Benoukraf T., Ferrier P., Spicuglia S. Assessing the efficiency and significance of Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) assays in using in vitro methylated genomic DNA.//BMC Res Notes.- 2010.- V.3.- P.240.
366. Jiricny J., Menigatti M. DNA Cytosine demethylation: are we getting close?//Cell. - 2008.- V.135, №7.- P.1167-1169.
367. Jolly C., Morimoto R.I. Stress and the cell nucleus: dynamics of gene expression and structural reorganization.//Gene Expr.- 1999.- V.7, №4-6.- P.261-270.
368. Jones H.E., Ruscio M.A., Keyser L.A., Gonzalez C., Billack B., Rowe R., Hancock C., Lambert K.G., Kinsley C.H. Prenatal stress alters the size of the rostral anterior commissure in rats.// Brain Res. Bull.- 1997.-V.42, №5.-P.341-346.
369. Jones D.O., Cowell I.G., Singh P.B. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. //Bioessays.- 2000 .- V.22, №2.- P.124-137.
370. Jones P. L., Veenstra G. C. J., Wade P. A., . Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J., Wolffe A.P.Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription //Nature genetics.- 1998.- V. 19, № 2.- P. 187-191.

371. Jung B.P., Jugloff D.G., Zhang G., Logan R., Brown S., Eubanks J.H. The expression of methyl-DNA-binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation on the developing rat brain and in cultered cell//J.Neurobiol.- 2003.- V.55, № 1.- P.86-96.
372. Jung B.P., Zhang G., Ho W., Francis J., Eubanks J.H. Transient forebrain ischemia alters the mRNA expression of methyl-DNA-binding factors in the adult rat hippocampus// Neurosci.-2002. -V. 115, № 2.- P. 515-524.
373. Jung S., Bang M., Kim B.S., Lee S., Kotov N.A., Kim B., Jeon D. Intracellular gold nanoparticles increase neuronal excitability and aggravate seizure activity in the mouse brain//PLoS One.- 2014.- V.9, №3.- e91360
374. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. JAVA WEB tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. // Genomics.-2011.-V.98, №2.- P.137-144.
375. Kapasi P., Chaudhuri S., Vyas K., Baus D., Komar A.A., Fox P.L., Merrick W.C., Mazumder B. L13 a blocks 48S assembly : role of a general initiation factor in MRNA-specific translational control// Mol.Cell.- 2007.- V.25, №1.-P.113-126.
376. Kaufer D., Friedman A., Seidman S., Soreq H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression.// Nature.- 1998.- V.393,№6683.- P.373-377.
377. Khorasanizadeh S. Recognition of methylated histones: new twists and variations //Current opinion in structural biology.- 2011.- V. 21, № 6.- P. 744-749.
378. Kenworthy C.A., Sengupta A., Luz S.M., Ver Hoeve E.S., Meda K., Bhatnagar S., Abel T. Social defeat induces changes in histone acetylation and expression of histone modifying enzymes in the ventral hippocampus, prefrontal cortex, and dorsal raphe nucleus.//Neuroscience. - 2014.- V.264.- P.88-98.
379. Kerkis Jul. Some problems of spontaneous and induced mutagenesis in mammals and man // Mut. Res.- 1975.- V. 29.- P. 271–277.
380. Kilpatrick D., Koenen K., Ruggiero K., Acierno R., Galea S., Resnick H.S., Roitzsch J., Boyle J., Gelernter J. The serotonin transporter genotype and social support and moderation of posttraumatic stress disorder and depression in hurricane-exposed adults //American Journal of Psychiatry.- 2007. -V. 164, № 11.- P. 1693-1699.
381. Kirkpatrick H. A., Heller G. M. Post-Traumatic Stress Disorder: Theory and Treatment Update //The International Journal of Psychiatry in Medicine.- 2014.- V. 47, № 4.- P. 337-346.
382. Kirsch S., Weiss B., Zumbach K., Rappold G. Molecular and evolutionary analysis of the growth-controlling region of the human Y chromosome.// Hum.Genet.-2004.- V.114, №2.- P.173-181.

383. Kishi N., Macklis J.D. Dissecting MeCP2 function in the central nervous system. //J. Child Neurol. -2005 .- V.20, №9.- P.753-759.
384. Klengel T., Mehta D., Anacker C., Rex-Haffner M., Pruessner J.C., Pariante C.M., Pace T.W., Mercer K.B., Mayberg H.S., Bradley B., Nemeroff C.B., Holsboer F., Heim C.M., Ressler K.J., Rein T., Binder E.B. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions //Nature neuroscience.- 2013.- V. 16, № 1.- P. 33-41.
385. Klengel T., Pape, J., Binder, E. B., et al. The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders //Neuropharmacology.- 2014.- V. 80.- P. 115-132.
386. Klose R.J., Sarraf S.A., Schmiedeberg L., McDermott S.M., Stancheva I., Bird A.P. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG.// Mol .Cell. -2005 .-V.19, №5.-P.667-678.
387. Klose R.J., Zhang Y. Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation// Nat.Rev.Mol.Cell Biol.- 2007.- V.8.- P. 307-318.
388. Koenen K. C., Aiello A. E., Bakshis E., Amstadter A.B., Ruggiero K.J., Acierno R., Kilpatrick D.G., Gelernter J., Galea S.. Modification of the association between serotonin transporter genotype and risk of posttraumatic stress disorder in adults by county-level social environment //Am. Journal of Epidemiology.- 2009.- V.169, № 6.- P. 704-711.
389. Kononen J., Koistinaho J., Alho H. Circadian Rhythm in c-fos-like immunoreactivity in the rat brain.// Neurosci.Lett.-1990.-V.120.-№1.-P.105-108.
390. Kolassa I. T., Ertl, V., Eckart, C., Kolassa I.T., Ertl V., Eckart C., Glöckner F., Kolassa S., Papassotiropoulos A., de Quervain D.J., Elbert T. Association study of trauma load and SLC6A4 promoter polymorphism in posttraumatic stress disorder: evidence from survivors of the Rwandan genocide //Journal of Clinical Psychiatry.- 2010a. -V. 71, №. 5.- P. 543.
391. Kolassa I. T., Kolassa, S., Ertl, V., Papassotiropoulos A., De Quervain D.J. The Risk of Posttraumatic Stress Disorder After Trauma Depends on Traumatic Load and the Catechol-O-Methyltransferase Val (158) Met Polymorphism //Biological Psychiatry.- 2010b.- V. 67, №. 4.- P. 304-308.
392. Komitowski D., Muto S., Weiss J., Schmitt B., Taylor G.T. Structural changes in nuclear chromatin in rat pituitary after chronic stress of low intensity// Anat. Rec.- 1988.- V.220.- P. 125-131.
393. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function.//Cell. -2007 .- V.128, №4.- P.693-705.
394. Krishnan V., Han M. H., Graham D. L., Berton O., Renthal W., Russo S.J., Laplant Q., Graham A., Lutter M., Lagace D.C., Ghose S., Reister R., Tannous P., Green T.A., Neve

R.L., Chakravarty S., Kumar A., Eisch A.J., Self D.W., Lee F.S., Tamminga C.A., Cooper D.C., Gershenfeld H.K., Nestler E.J. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions //Cell. -2007.- V. 131, № 2. P.- 391-404.

395. Kubiura M., Okano M., Kimura H., Kawamura F., Tada M. Chromosome-wide regulation of euchromatin-specific 5-mC to 5-hmC conversion in mouse ES cells and female human somatic cells.// Chromosome Res.- 2012.- V.20.-P.837-848.

396. Kuramoto T., Maihara T., Masu M., Nakanishi S., Serikawa T. Gene mapping of NMDA receptors and metabotropic glutamate receptors in the rat (*Rattus norvegicus*).//Genomics. - 1994.- V.19, №2.- P.358-361.

397. Labonté B., Azoulay N., Yerko V., Turecki G., Brunet A. Epigenetic modulation of glucocorticoid receptors in posttraumatic stress disorder //Translational psychiatry.- 2014. -V. 4, №. 3.- P. e368.

398. Lagemaat L.N., Landry J.R., Mager D.L., Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. //Trends Genet. -2003.- V.19, №10.- P.530-536.

399. Lai H., Singh N.P. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. //Int. J. Radiat. Biol.- 1996.- V.69, №4.- P.513-521.

400. Lamond A.I, Earnshaw W.C. Structure and function in the nucleus.// Science.-1998.- V.280, №5363.- P.547-553.

401. Lange U. C., Schneider R. What an epigenome remembers //Bioessays.- 2010.-V. 32, № 8.- P. 659-668.

402. Lát J. The analysis of habituation.//Acta Neurobiol. Exp (Wars). -1973.- V.33, №4.- P.771-789.

403. Lát J. The theoretical curve of learning and of arousal //Act. Nerv. Super (Praha).- 1976.- V.18, №1-2.- P.36-43.

404. Lát J. The law of activation and psychosis//Act. Nerv. Super (Praha).- 1978.- V.20, №1.- P.34-35.

405. Lát J., Gollová-Hémon E. Permanent effects of nutritional and endocrinological intervention in early ontogeny on the level of nonspecific excitability and on lability (emotionality).//Ann N Y Acad Sci.- 1969.-V.159, №3.- P.710-720.

406. Lát J., Pavlík A., Jaboubek B. Interrelations between individual differences in excitability levels, habituation-rates and in the incorporation of <sup>14</sup>C-leucine into brain and nonbrain proteins in rats.//Physiol Behav.- 1973.- V.11, №2.- P.131-137.

407. Lát J., Holecková E. The effect of intermittent feeding and fasting on the non-specific excitability level of the central nervous system in the rat.//*Physiol. Bohemoslov.*- 1971.- V.20, №5.- P.441-445.
408. Latham J. A., Dent S. Y. R. Cross-regulation of histone modifications //*Nature structural & molecular biology.* 2007.- V. 14, №. 11.- P. 1017-1024.
409. Lee H. J., Lee M. S., Kang R. H., Kim H., Kim S.D., Kee B.S., Kim Y.H., Kim Y.K., Kim J.B., Yeon B.K., Oh K.S., Oh B.H., Yoon J.S., Lee C., Jung H.Y., Chee I.S., Paik I.H. Influence of the serotonin transporter promoter gene polymorphism on susceptibility to posttraumatic stress disorder //*Depression and anxiety.*- 2005.- V. 21, №. 3.- P. 135-139.
410. Lee J. Y., Lee Y. M., Kim M. J., Choi J.Y., Park E.K., Kim S.Y., Lee S.P., Yang J.S., Kim D.S. Methylation of the mouse *Dlx5* and *Osx* gene promoters regulates cell type-specific gene expression //*Molecules and cells.* -2006.- V. 22, №. 2.- P. 182-188.
411. Lee C., Wevrick R., Fisher R.B., Ferguson-Smith M.A., Lin C.C. Human centromeric DNAs.// *Human Genet.*- 1997.-V.100, № 3-4.-P.291-304.
412. LeGreves P., Sharma H.S., Westman J., Alm P., Nyberg F. Acute heat stress induces edema and nitric oxide syntase upregulation and down-regulates mRNA levels of the NMDAR1, NMDAR2A and NMDAR2B subunits in the hippocampus . // *Acta Neurochir. Suppl.*- 1997.- V.70.- P.275-278.
413. Luikenhuis S., Giacometti E., Beard C.F., Jaenisch R. Expression of MeCP2 in postmitotic neurons rescues Rett syndrome in mice.// *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*-2004.-V.101, №16.- P.6033-6038.
414. Levenson J.M., Sweatt J.D. Epigenetic mechanisms : a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation// *Cell. Mol. Life Sci.* -2006.- V.63.- P. 1009-1016.
415. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality//*Cell.*- 1992.- V.69.- P.915.
416. Li B., Carey M., Workman J. L. The role of chromatin during transcription //*Cell.*- 2007. -V. 128, №. 4.- P. 707-719.
417. Li H., Zhong X., Chau K. F., Williams E.C., Chang Q. Loss of activity-induced phosphorylation of MeCP2 enhances synaptogenesis, LTP and spatial memory //*Nature neuroscience.* -2011.- V. 14, №. 8.- P. 1001-1008.
418. Li L.C. Chromatin remodeling by the small RNA machinery in mammalian cells.//*Epigenetics.* -2014.- .-V.9, №1.- P.45-52.



419. Li J. , Wang F. , Mamon H., Kulke M.H, Harris L., Maher E., Wang L., Makrigiorgos G.M. Antiprimer quenching-based real-time PCR and its application to the analysis of clinical cancer samples. //Clin. Chem . -2006.- V.52.- P. 624-633
420. Lin M. J., Lee, T. L., Hsu, D. W., Shen C.K. One-codon alternative splicing of the CpG MTase Dnmt1 transcript in mouse somatic cells //FEBS letters.- 2000.- V. 469, № 1.- P. 101-104.
421. Litt M.D., Simpson M., Recillas-Targa F., Prioleau M.N., Felsenfeld G. Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci.//EMBO J.- 2001a.- V.20, №9.- P.2224-2235.
422. Litt M.D., Simpson M., Gaszner M., Allis C.D., Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. //Science.- 2001b.- V. 293, №5539.- P. 2453–2455.
423. Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. . Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress //Science.- 1997.- V. 277, № 5332.- P. 1659-1662.
424. Liu Q. R., Lu L., Zhu X. G., Gong J.P., Shaham Y., Uhl G.R. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine //Brain research.- 2006.- V. 1067, № 1.- P. 1-12.
425. Liyanage V.R.B., Jarmasz J.S., Murugesau N., DelBigio M.R., Rastegar M., Davie J.R. DNA modifications : function and applications in normal and disease states.// Biology.-2014.- V.3.-P.670-723.
426. Lopez-Larraz D.M., Bianchi N.O. DNA response to bleomycin in mammalian cells with variable degrees of chromatin condensation.// Environ.Mol.Mutagen.-1993.-V.21, №3.-P.258-264.
427. Lordi B., Protais P., Mellier D., Caston J. Acute stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring.//Physiol.Behav.- 1997.- V.62, №5.- P.1087- 1092.
428. Lourtch R., Sassone-Corsi P. Histone phosphorylation: how to proceed// Methods.- 2003.- V.2003.- P.40-48.
429. Love S., Barber R., Wilcock G.K. Apoptosis and expression of DNA repair proteins in ischaemic brain injury in man.//Neuroreport. -1998 .- V.9, №6.- P.955-959.
430. Lubin F.D., Roth T.L., Sweatt J.D. Epigenetic regulation of Bdnf gene transcription in the consolidation of fear memory.// J. Neurosci.- 2008.- V.28, №42.- P.10576-10586.

431. Lucassen P.J., Vollmann-Honsdorf G.K., Gleisberg M., Czéh B., De Kloet E.R., Fuchs E. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew.//*Eur. J. Neurosci.*- 2001.- V.14, №1.- P.161-166.
432. Lucki N.C., Sewer M.B. Nuclear sphingolipid metabolism.//*Annu. Rev. Physiol.*- 2012.- V.74.-P.131-151.
433. Lyon M. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*)//*Nature*, - 1961.- V.190.- P.372-373.
434. Ma D. K., Guo J. U., Ming G. L., Song H. DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation // *Cell cycle*.- 2009.- V. 8, № 10.- P. 1526-1531.
435. Malan - Müller S., Seedat S., Hemmings S. M. J. Understanding posttraumatic stress disorder: insights from the methylome // *Genes, Brain and Behavior*.- 2014.- V. 13, №. 1.- P. 52-68.
436. Monaghan D.T., Cotman C.W. Identification and properties of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain synaptic plasma membranes.//*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* -1986. - V.83, №19.-P.7532-7536.
437. Mahgoub M., Monteggia L.M. Epigenetics and psychiatry.//*Neurotherapeutics*.- 2013 .- V.10, №4.- P.734-741.
438. Maragos W.F., Penney J.B., Young A.B. Anatomic correlation of NMDA and 3H-TCP-Labeled receptors in rat brain.// *J. Neurosci.*- 1988 .- V.8, №2.- P.493-501.
439. Marinova Z., Maercker A. Biological correlates of complex post-traumatic stress disorder-state of research and future directions// *Eur.J.Psychotraumatol.*- 2015, №6.- 25913.
440. Margoob M. A., Mushtaq D. Serotonin transporter gene polymorphism and psychiatric disorders: Is there a link? // *Indian journal of psychiatry*.- 2011.- V. 53, № 4.- P. 289.
441. Martinowich K., Hattori D., Wu H., Fouse S., He F., Hu Y., Fan G., Sun Y.E. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation.//*Science*. – 2003.-V.302, №5646.- P.890-893.
442. Masneuf S., Lowery-Gionta E., Colacicco G., Pleil K.E., Li C., Crowley N., Flynn S., Holmes A., Kash T. Glutamatergic mechanisms associated with stress-induced amygdala excitability and anxiety-related behavior // *Neuropharmacology*.- 2014.- V.85.- P.190-197.
443. Matthews S.G., Phillips D.I. Transgenerational inheritance of stress pathology. // *Exp. Neurol.* 2012.- V.233.- P.95–101.
444. Matsukuma S., Utakoji T. Non-histone protein associated with centromeric heterochromatin in the mouse chromosome.// *Exp. Cell Res.*- 1977.- V.105, №1.- P.217-222.

445. Matzke M.A., Birchler J.A. RNAi-mediated pathways in the nucleus //Nature Reviews Genetics.- 2005.- V. 6, №. 1. -P. 24-35.
446. Mazarakis N., Michalovich D., Karis A., Grosveld F., Galjart N. Zfp-37 is a member of the KRAB zinc finger gene family and is expressed in neurons of the developing and adult CNS.//Genomics.-1996.- V.33, №2.- P.247-57.
447. Mazumder B., Sampath P., Seshadri V., Maitra R.K., DiCorleto P.E., Fox P.L. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. //Cell. -2003 .- V.115, №2.- P.187- 198.
448. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge.// Science.- 1984.-V.226.- P.792-801.
449. McEwen B.S., Gray J.D., Nasca C. 60 years of neuroendocrinology : redefining neuroendocrinology : stress, sex and cognitive and emotional regulation.// J. of Endocrinol.-2015.- V.226.- T.67-T.83.
450. McGowan P. O., Sasaki A., D'Alessio A.C., Dymov S., Labonté B., Szyf M., Turecki G., Meaney M.J.Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse //Nature Neuroscience.- 2009.- V. 12, №. 3.- P. 342-348.
451. Mehler M. F. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease //Progress in Neurobiology.- 2008.- V. 86, №. 4. -P. 305-341.
452. Meister G., Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA //Nature.- 2004.- V. 431, №. 7006.- P. 343-349.
453. Merenlender-Wagner A., Dikshtein Y., Yadid G. The  $\beta$ -Endorphin Role in Stress-Related Psychiatric Disorders //Current Drug Targets. -2009.- V. 10, №. 11.- P. 1096-1108.
454. Meyerhoff D. J., Mon, A., Metzler T., Neylan T.C. Cortical Gamma-Aminobutyric Acid and Glutamate in Posttraumatic Stress Disorder and Their Relationships to Self-Reported Sleep Quality //Sleep.- 2014.- V. 37, №. 5.- P. 893-900.
455. Michel C.I., Holley C.L., Scruggs B.S., Sidhu R., Brookheart R.T., Listenberger L.L., Behlke M.A., Ory D.S., Schaffer J.E. Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress. //Cell Metab. -2011.- V.14, №1.- P.33-44.
456. Miller C. A., Sweatt J. D. Covalent modification of DNA regulates memory formation. //Neuron.- 2007.- V. 53, №. 6.- P. 857-869.
457. Miller D.A., Dev V.G., Barek C., Miller O.J. The Quinacrine fluorescent and giemsa banding karyotype of the rat *Rattus norvegicus* and banded chromosome analysis of transformed and malignant rat liver cell lines.// Cancer Res.- 1972.- V.32.- P. 2375-2382.

458. Mitelman F., Johansson B., Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. // *Nature Rev. Cancer.* – 2007.- V.7.- P. 233—245.
459. Miyahara M., Sumiyoshi H., Yamamoto M., Endo H. Strand specific transcription of satellite DNA I in rat ascites hepatoma cells.//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1985.- V.130,№2.- P.897-903.
460. Mizoguchi K., Kunishita T., Chui D.H., Tabira T. Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. //*Neurosci. Lett.*- 1992.-V.138, №1.- P.157-60.
461. Moisan M. P., Le Moal M. Overview of acute and chronic stress responses//*Medicine sciences: M/S.* 2011.- V. 28, № 6-7.- P. 612-617.
462. Monaghan D.T., Cotman C.W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain.//*J.Neurosci.*- 1985.- V.5, №11.- P.2909-2919.
463. Moreno M, Cardona D., Gómez M.J., Sánchez-Santed F., Tobeña A., Fernández-Teruel A., Campa L., Suñol C., Escarabajal M.D., Torres C. Impulsivity characterization in the Roman High- and Low-avoidance rat strains : behavioral and neurochemical differences.// *Neuropsychopharmacology.*-2010.-V.35, №5.-P.1198-1208.
464. Mori T., Wakabayashi T., Ogawa H., Hirahara Y., Koike T., Yamada H. Increased histone H3 phosphorylation in neurons in specific brain structures after induction of status epilepticus in mice.// *PLoS One.*-2013.- V.8, №10.- e77710.
465. Muotri A.R., Gage F.H. Generation of neuronal variability and complexity.// *Nature.*- 2006.- V.441.-P.1087-1093.
466. Muotri A.R., Marchetto M.C.N., Coufal N.G., Gage F.H. The necessary junk : new functions for transposable elements.// *Human Mol.Genet.*-2007.-V.16(R2).-P.R159-R.167.
467. Muotri A.R., Zhao C., Marchetto M.C.N., Gage F.H. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus.// *Hippocampus.*-2009.-V.19, №10.-P.1002-1010.
468. Murgatroyd C., Patchev, A. V., Wu, Y., Micale V., Bockmühl Y., Fischer D., Holsboer F., Wotjak C.T., Almeida O.F., Spengler D. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress //*Nature neuroscience.* -2009. -V. 12, №. 12.- P. 1559-1566.
469. Nair A., Vadodaria, K. C., Banerjee, S. B., Benekareddy M., Dias B.G., Duman R.S., Vaidya V.A. Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus //*Neuropsychopharmacology.*- 2007.- V. 32, №. 7.- P. 1504-1519.

470. Nan X., Ng H.H., Johnson C.A., Laherty C.D., Turner B.M., Eisenman R.N., Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex// *Nature*.- 1998.- V.393.- P.386-389.
471. Nan X., Meehan R.R., Bird A. Dissection of the Methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2.// *Nucleic Acids Res.*- 1993.- V.21, №21.- P. 4886-4892.
472. Nan X., Tate P., Li E., Bird A. DNA methylation specifies chromosomal localization MeCP2// *Mol.Cell Biol.*-1996.- V.16 , №1.- P.414-421.
473. Neitzel H., Kalscheuer V., Henschel S., Digweed M., Sperling K. Beta-heterochromatin in mammals: evidence from studies in *Microtus agrestis* based on the extensive accumulation of L1 and non-L1 retroposons in the heterochromatin. // *Cytogenet. Cell. Genet.*- 1998.-V.80,№1-4.- P.165-172.
474. Nelson E. C., Agrawal A., Pergadia M. L., Lynskey M.T., Todorov A.A., Wang J.C., Todd R.D., Martin N.G., Heath A.C., Goate A.M., Montgomery G.W., Madden P.A. Association of childhood trauma exposure and GABRA2 polymorphisms with risk of posttraumatic stress disorder in adults // *Molecular psychiatry*. -2009.- V. 14,№. 3.- P. 234.
475. Ner S.S., Harrington M.J., Grigliatti T.A. A role for the *Drosophila* SU(VAR)3-9 protein in chromatin organization at the histone gene cluster and in suppression of position-effect variegation.// *Genetics*.- 2002.- V.162,№4.- P.1763-1774.
476. Nesbitt A.M., McCurdy R.D., Bryant S.M. Total levels of hippocampal histone acetylation predict normal variability in mouse behavior// *PLoS One*.- 2014.- V.9,№ 5.-e94224.
477. Nersesyan A.K., Boffetta P., Sarkisyan T.F., Zalinian G.G., Arutyunyan R.M. Chromosome aberrations in lymphocytes of persons exposed to an earthquake in Armenia.// *Scand. J. Work. Environ. Health*.- 2001.- V.27, №2.-P.120-124.
478. Neumann I.D., Veenema A.H., Beiderbeck D.I. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links// *Front. Behav. Neurosci.*-2010.- V.4,№12.-P.1-16
479. Nishi M. Imaging of corticosteroid receptors in live cells // *Methods Enzymol.*- 2012.- V. 505.-P. 347-361.
480. Nishibuchi G., Nakayama J. Biochemical and structural properties of heterochromatin protein 1: understanding its role in chromatin assembly. // *J. Biochem.*- 2014 .- V.156,№1.- P.11-20.
481. Noma K., Allis C.D., Grewal S.I. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries.// *Science*.- 2001.-V.293,№5532.- P.1150- 1155.

482. Nuber U.A., Kriaucionis S., Roloff T.C., Guy J., Selfridge J., Steinhoff C., Schulz R., Lipkowitz B., Ropers H.H., Holmes M.C., Bird A. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome.//Hum. Mol. Genet.- 2005.-V.14,№15.- P.2247- 2256.
483. Oberlander T. F. , Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau R., Misri S., Devlin A.M. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses //Epigenetics.- 2008.- V. 3,№. 2.- P. 97-106.
484. Odagiri K., Abe H., Kawagoe C., Takeda R., Ikeda T., Matsuo H., Nonaka H., Ebihara K., Nishimori T., Ishizuka Y., Hashiguchi H., Ishida Y. Psychological prenatal stress reduced the number of BrdU immunopositive cells in the dorsal hippocampus without affecting the open field behavior of male and female rats at one month of age. //Neurosci. Lett.-2008.- V.446,№1.- P.25-29.
485. Ohno S., Kaplan W.D., Kinoshita R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*// Exp.Cell Res.- 1959.- V.15.- P.415-418.
486. Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development// Cell.- 1999.- V.99.- P.247-257.
487. Okano M., Xie S., Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. //Nature Genet.- 1998.- V.19,№.3.- P. 219-220.
488. Oliverio A., Eleftheriou B.E., Bailey D.W. A gene influencing active avoidance performance in mice.//Physiol. Behav.- 1973.- V.11,№4.- P.497-501.
489. Papa M., Pellicano M.P., Cerbone A., Lamberti-D'Mello C., Menna T., Buono C., Giuditta A., Welzl H., Sadile A.G. Immediate early genes and brain DNA remodeling in the Naples high- and low-excitability rat lines following exposure to a spatial novelty.// Brain Res. Bull.- 1995.- V.37,№2.- P.111-118.
490. Pascual A., Hidalgo-Figueroa M., Piruat J.I., Pintado C.O., Gómez-Díaz R., López-Barneo J. Absolute requirement of Gdnf for adult catecholaminergic neuron survival//Nat. Neurosci.- 2008.- V.11,№7.- P. 755-761.
491. Passarge E. Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago.//Am. J. Hum. Genet.- 1979.- V.31,№2.- P.106-15.
492. Pattaroni C., Jacob C. Histone methylation in the nervous system: functions and dysfunctions //Molecular neurobiology.- 2013.- V. 47,№. 2.- P. 740-756.
493. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. Ac. Press.- 2007.

494. Payen E., Verkerk T., Michalovich D., Dreyer S.D., Winterpacht A., Lee B., De Zeeuw C.I., Grosveld F., Galjart N. The centromeric/nucleolar chromatin protein ZFP-37 may function to specify neuronal nuclear domains.//J. Bio.l Chem.- 1998 .- V.273,№15.- P.9099-9109.
495. Peaston A., Rossant J., Li L., Knowles B.B. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. // Dev. Cell.- 2004.- V.7.- P.597-606.
496. Peddada S., Yasui D.H., LaSalle J.M. Inhibitors of differentiation (ID1, ID2, ID3 and ID4) genes are neuronal targets of MeCP2 that are elevated in Rett syndrome.//Hum. Mol. Genet.- 2006.-V.15,№12.- P.2003-2014.
497. Pellicano M.P., Sadile A.G. Differential alcohol drinking behaviour and dependence in the Naples low- and high-excitability rat lines.// Behav Brain Res.- 2006.- V.171,№2.-P.199-206.
498. Peña C. J., Bagot R. C., Labonté B., Nestler E.J. Epigenetic Signaling in Psychiatric Disorders //Journal of molecular biology. - 2014.- V. 426, №. 20.- P. 3389-3412
499. Peters A. H. F. M., Schübeler D. Methylation of histones: playing memory with DNA //Current opinion in cell biology.- 2005. -V. 17,№. 2.- P. 230-238.
500. Peterson K., Wang G., Horsley D., Richardson J.C., Sapienza C., Latham K.E., Singh P.B. The M 31 gene has a complex developmentally regulated expression profile and may encode alternative protein products that possess diverse subcellular localisation patterns // J. Exp. Zool.- 1998.- V.280 ,№4.- P.288 - 303.
501. Pezer Z., Brajković J., Feliciello I., Ugarkovć D. Satellite DNA-mediated effects on genome regulation.//Genome Dyn. -2012.- V.7.- P.1531-69.
502. Perrin L., Demakova O., Fanti L., Kallenbach S., Saingery S., Mal'ceva N.I., Pimpinelli S., Zhimulev I, Pradel J. Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in Drosophila. // J. Cell Sci.- 1998 .- V.111 , Pt 18.- P.2753-2761.
503. Pfefferbaum B., Tucker, P., Jeon-Slaughter, H., Allen J.R., Hammond D.R., Whittlesey S.W., Vinekar S.S., Feng Y. A pilot study of physiological reactivity in children and maternal figures who lost relatives in a terrorist attack //Death studies. -2013.- V. 37,№. 5.- P. 395-412.
504. Pimpinelli S., Sullivan W., Prout M., Sandler L. On biological functions mapping to the heterochromatin of Drosophila melanogaster.//Genetics.- 1985.-V.109,№4.-P.701-724.
505. Piras G., Giorgi O., Corda M.G. Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions.// Psychopharmacology (Berl).- 2010.- V.211,№4.- P.403-14

506. Piras G., Piludu M.A., Giorgi O., Corda M.G. Effects of chronic antidepressant treatments in a putative genetic model of vulnerability (Roman Low-avoidance rats) and resistance (Roman High-avoidance rats) to stress-induced depression.// *Psychopharmacology (Berl)*.- 2014.-V. 231,№1.- P.43-53
507. Preston R.R., Hammond J.A. Long-term adaptation of Ca<sup>2+</sup>-dependent behaviour in *Paramecium tetraurelia*.//*J. Exp. Biol.*- 1998.- V.201,Pt 11.- P.1835-46.
508. Provençal N., Binder E. The effects of early life stress on the epigenome: from the womb to adulthood and even before //*Experimental Neurology*. -2014.- V.10.- S0014-4886
509. Pusarla R. H., Bhargava P. Histones in functional diversification //*FEBS Journal*.- 2005.- V. 272,№. 20.- P. 5149-5168.
510. Raabe F. J., Spengler D. Epigenetic risk factors in PTSD and depression //*Frontiers in psychiatry*. -2013.- V. 4.- P. 80.
511. Racioppi L., Means A.R. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology.//*J. Biol. Chem.*- 2012.- V.287,№38.-P.31658-31665.
512. Radonić A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR.//*Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 2004.- V.313,№4.- P.856-862.
513. Rai K., Huggins I.J., James S.R., Karpf A.R., Jones D.A., Cairns B.R. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45.//*Cell*.- 2008.- V.135, №7.- P.1201-1212.
514. Razin A., Cegar H. DNA methylation and gene expression//*Microbiol Rev.*- 1991.- V.55.- P.451-458.
515. Ramoino P., Gallus L., Beltrame F., Diaspro A., Fato M., Rubini P., Stigliani S., Bonanno G., Usai C. Endocytosis of GABAB receptors modulates membrane excitability in the single-celled organism *Paramecium*//*J. Cell Sci.*- 2006.- V.119,Pt. 10.- P.2056-2064.
516. Renault S., Rouleux-Bonnin F., Periquet G., Bigot Y. Satellite DNA transcription in *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera).// *Insect Biochem.Mol. Biol.*-1999.- V. 29.- P.103–111.
517. Reilly M.T., Faulkner G.J., Dubnau J., Ponomarev I., Gage F.H. The Role of Transposable Elements in Health and Diseases of the Central Nervous System.//*J. Neurosci.* -2013.- V.33,№45.-P. 17577–17586.
518. Reul J.M., Hesketh S.A., Collins A., Mécinas M.G. Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation.//*Epigenetics*. -2009.- V.4,№7.- P.434-439.



519. Reul J.M., Bilang-Bleuel A., Droste S., Linthorst A.C., Holsboer F., Gesing A. New mode of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation: significance for stress-related disorders // *Zeitschrift für Rheumatologie*.- 2000. - V. 59, №. 2. - P. 22-25.
520. Reul J.M., deKloet E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation // *Endocrinology*. - 1985.- V. 117, №. 6.- P. 2505-2511.
521. Richards E.J., Elgin S.C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects.// *Cell*.- 2002.- V.108,№4.- P.489-500.
522. Riggs A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation // *Cytogenetic and Genome Research*. - 1975.- V. 14, №. 1.- P. 9-25.
523. Riggs A.D., Martienssen R.A., Russo V.E.A. Introduction. In” *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*” (Ed. Russo V.E.A. et al.) pp. 1-4. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1996.
524. Rizzi N., Denegri M., Chiodi .I, Corioni M., Valgardsdottir R., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock.// *Mol Biol Cell*. -2004.- V.15, №2.- P.543-551.
525. Robertson K. D., Keyomarsi K., Gonzales F. A., et al. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells // *Nucleic acids research*.- 2000.- V. 28, №. 10.- P. 2108-2113.
526. Roche S.E., Rio D.C. Trans-silencing by P elements inserted in subtelomeric heterochromatin involves the *Drosophila* Polycomb group gene, Enhancer of zeste.// *Genetics*.- 1998.- V.149,№4.- P.1839-1855.
527. Roloff T. C., Ropers H. H., Nuber U. A. Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins // *BMC genomics*.- 2003.- V. 4,№. 1.- P. 1.
528. Rosenheck R. Impact of posttraumatic stress disorder of World War II on the next generation // *The Journal of nervous and mental disease*.- 1986.- V. 174, №. 6.- P. 319-327.
529. Rosenheck R., Fontana A. Transgenerational effects of abusive violence on the children of Vietnam combat veterans // *Journal of Traumatic Stress*. -1998.- V. 11, №. 4.- P. 731-742.
530. Rosenkranz J.A., Venheim E.R., Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents.// *Biol Psychiatry*.- 2010 .-V.67,№12.-P.1128-36.
531. Rossetto D., Avvakumov N., Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events // *Epigenetics*. -2012.- V. 7,№. 10.- P. 1098-1108.

532. Rossinia P.M., Ferreri F. Neurophysiological techniques in the study of the excitability, connectivity and plasticity of the human brain// *Suppl. Clin. Neurophysiol.*-2013.- V.62.-P.1-17.
533. Rouleux-Bonnin F., Renault S., Bigot Y., Periquet G. Transcription of four satellite DNA subfamilies in *Diprion pini* (Hymenoptera, Symphyta, Diprionidae) // *Eur.J.Biochem.*-1996.- V.238,№ 3.- P.752-759.
534. Roth M., Neuner F., Elbert T. Transgenerational consequences of PTSD: risk factors for the mental health of children whose mothers have been exposed to the Rwandan genocide.// *Int. J. Ment Health Syst.* -2014.- V.8.- P.12.
535. Roth T. L. , Lubin F. D., Funk A. J., Sweatt J.D. Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene // *Biological psychiatry.*- 2009.- V. 65,№. 9.- P. 760-769.
536. Roth T. L., Zoladz P. R., Sweatt J. D., Diamond D.M. Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder // *Journal of psychiatric research.* -2011.- V. 45,№. 7. -P. 919-926.
537. Rudenko A., Tsai L. H. Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments // *Neuropharmacology.*- 2014.- V. 80. -P. 70-82.
538. Rudert F., Bronner S., Garnier J.M., Dollé P. Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development.// *Mamm. Genome.* 1995.- V.6,№2.-P.76-83.
539. Ruocco L.A., Di Pizzo A., Carnevale U.A., Murolo M., Sadile A.G., Arra C., Topo E., D'Aniello A., Curcio A., Melisi D., Rimoli M.G. Excitatory amino acids in the forebrain of the Naples high-excitability rats: neurochemical and behavioural effects of subchronic D-aspartate and its diethyl ester prodrug.// *Behav. Brain Res.* -2009a.- V.198,№1.-P.37-44.
540. Ruocco L.A., Gironi Carnevale U.A., Sadile A.G., Sica A., Arra C., Di Maio A., Topo E., D'Aniello A. Elevated forebrain excitatory L-glutamate, L-aspartate and D-aspartate in the Naples high-excitability rats. // *Behav Brain Res.* -2009b.- V.198,№1.- P.24-28
541. Ruocco L.A., Romano E., Treno C., Lacivita E., Arra C., Gironi-Carnevale U.A., Travaglini D., Leopoldo M., Laviola G., Sadile A.G., Adriani W. Emotional and risk seeking behavior after prepuberal subchronic or adult acute stimulation of 5-HT<sub>7</sub>-Rs in Naples High Excitability rats.// *Synapse.*- 2014a.-V. 68,№4.- P.159- 167
542. Ruocco L.A., Treno C., Carnevale U.A., Arra C., Boatto G., Nieddu M., Pagano C., Illiano P., Barbato F., Tino A., Carboni E., Laviola G., Lacivita E., Leopoldo M., Adriani W., Sadile A.G. Prepuberal stimulation of 5-HT<sub>7</sub>-R by LP-211 in a rat model of hyper-activity and

attention-deficit: permanent effects on attention, brain amino acids and synaptic markers in the fronto-striatal interface.//*PLoS One*.- 2014b.-V. 9,№4.- P.e83003.

543. Ruocco L.A., Treno C., Gironi Carnevale U.A., Arra C., Mattern C., Huston J.P., de Souza Silva M.A., Nikolaus S., Scorziello A., Nieddu M., Boatto G., Illiano P., Pagano C., Tino A., Sadile A.G. Prepuberal intranasal dopamine treatment in an animal model of ADHD ameliorates deficient spatial attention, working memory, amino acid transmitters and synaptic markers in prefrontal cortex, ventral and dorsal striatum.// *Amino Acids*.- 2014b.- V. 46,№9.- P.2105-2122.

544. Rusiecki J. A. , Byrne C., Galdzicki Z., Srikantan V., Chen L., Poulin M., Yan L., Baccarelli A. PTSD and DNA methylation in select immune function gene promoter regions: a repeated measures case-control study of US military service members //*Frontiers in Psychiatry*.- 2013.- V. 4.- P.56

545. Rusiecki J. A., Chen L., Srikantan V., Zhang L., Yan L., Polin M.L., Baccarelli A. DNA methylation in repetitive elements and post-traumatic stress disorder: a case-control study of US military service members //*Epigenomics*.- 2012.- V. 4, №. 1.- P. 29-40.

546. Sabariego M., Gómez M.J., Morón I., Torres C., Fernández-Teruel A., Tobeña A., Cañete T., Martínez-Conejero J.A., Horcujadas J.A., Esteban F.J. Differential gene expression between inbred Roman high- (RHA-I) and low- (RLA-I) avoidance rats.// *Neurosci Lett*.- 2011 .- V.504,№3.- P.265-70.

547. Sadile A.G., Pellicano M.P., Sagvolden T., Sergeant J.A. NMDA and non-NMDA sensitive [L-3H]glutamate receptor binding in the brain of the Naples high- and low-excitability rats: an autoradiographic study.//*Behav. Brain Res*.- 1996.- V.78, №2.- P.163-174.

548. Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner B.M., Zink D. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. //*J. Cell Biol*.- 1999 .-V.146,№6.- P.1211-26.

549. Santos J.L., Saus E., Smalley S.V., Cataldo L.R., Alberti G., Parada J., Gratacòs M., Estivill X. Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: implications in human nutrition research.//*J. Nutrigenet.Nutrigenomics*.- 2012.-V.5,№3.- P.117-31.

550. Sapolsky R.M. Stress, glucocorticoids and damage of the nervous system : the current state of confusion.// *Stress*.- 1996.-V.1.-P.1-19.

551. Sapolsky R.M. Atrophy of hippocampus in posttraumatic stress disorder : how and when.//*Hippocampus*.- 2001.- V.11,№2.- P.90-91.

552. Sarma K., Reinberg D. Histone variants meet their match //*Nature reviews Molecular cell biology*.- 2005.- V. 6,№. 2.- P. 139-149.

553. Sathanoori M., Dias B. G., Nair A. R., Banerjee S.B., Tole S., Vaidya V.A. Differential regulation of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in the postnatal and adult rat hippocampus during development, and in response to kainate administration //Molecular brain research.- 2004.- V. 130,№. 1.- P. 170-177.
554. Satinder K.P. Sensory responsiveness and avoidance learning in rats.// J. Comp. Physiol. Psychol.- 1976 .-V.90,№10.-P.946-957.
555. Satinder K.P., Hill K.D. Effects of genotype and postnatal experience on activity, avoidance, shock threshold, and open-field behavior of rats.// J. Comp. Physiol. Psychol.- 1974 .- V.86, №2.- P.363-374.
556. Satoh H., Yoshida M. S., Sasaki M. 1989. Resolution chromosome banding in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. // Cytogenet. Cell Genet.-1989.- V. 50.- P. 151—154.
557. Savvateeva E.V., Kamyshev N.G. Behavioral effects of temperature sensitive mutations affecting metabolism of cAMP in *D.melanogaster* .// Pharmacol. Biochem. Behav. - 1981.-V.14.- P.603-611.
558. Sawicka A., Seiser C. Sensing core histone phosphorylation—A matter of perfect timing //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms.- 2014.- V. 1839.- №. 8 -P. 711-718.
559. Schafer R., Boltz E., Becker A., Bartels F., Epplen J. T. The expression of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in mouse tissues. Chromosoma.-1986.-V. 93.- P. 496–501.
560. Schneider J., Shilatifard A. Histone demethylation by hydroxylation: chemistry in action //ACS chemical biology. -2006.- V. 1,№. 2.- P. 75-81.
561. Schroder K., Spille M., Pilz A., Lattin J., Bode K.A., Irvine K.M., Burrows A.D., Ravasi T., Weighardt H., Stacey K.J., Decker T., Hume D.A., Dalpke A.H., Sweet M.J. Differential effects of CpG DNA on IFN-beta induction and STAT1 activation in murine macrophages versus dendritic cells: alternatively activated STAT1 negatively regulates TLR signaling in macrophages.//J. Immunol. -2007.- V.179,№6.- P.3495-3503.
562. Sharma R.P., Gavin D.P., Chase K.A. Heterochromatin as an incubator for pathology and treatment nonresponse: implication for neuropsychiatric illness.// Pharmacogenomics J.- 2012.- V. 12,№5.- P. 361–367.
563. Shen L., Wu H., Diep D., Yamaguchi S., D'Alessio A.C., Fung H.L., Zhang K., Zhang Y. Genome-wide analysis reveals TET and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics.// Cell.- 2013.- V.153.- P.692-706.

564. Shilatifard A. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation.//Curr. Opin. Cell. Biol. -2008. - V.20,№3.- C.341-348.
565. Singer T., McConnell M.J., Marchetto M.C.N., Coufal N.G., Gage F.H. LINE-1 Retrotransposons: Mediators of Somatic Variation in Neuronal Genomes?//Trends Neurosci. - 2010.- V.33,№8.-P.345–354.
566. Seeler J.S., Marchio A., Sitterlin D., Transy C., Dejean A. Interaction of SP100 with HP1 proteins : a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment.// Proc.Natl.Acad.Sci.USA.- 1998.- V.23.- V.95,№13.- P.7316-7321.
567. Segman R. H., Cooper-Kazaz, R., Macciardi, F., Goltser T., Halfon Y., Dobroborski T., Shalev A.Y.. Association between the dopamine transporter gene and posttraumatic stress disorder //Molecular psychiatry.- 2001.- V. 7,№ 8.- P. 903-907.
568. Selye H. The physiology and pathology of exposure to stress. Montreal : Acta Med. Publ. 1950. P. 203.
569. Senba E. , Veyama T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat.// Neurosci. Res.- 1997.- V.29,№3.- P.183-207.
570. Shahbazian M.D., Zoghbi H.Y. Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function.//Am. J. Hum. Genet.- 2002a.-V.71, №6.- P.1259- 1272.
571. Shahbazian M.D., Antalffy B., Armstrong D.L., Zoghbi H.Y. Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation.//Hum. Mol. Genet.- 2002b.- V.11,№2.-P.115-24.
572. Shahbazian M.D., Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation// Annual review of biochemistry.- 2007.- V. 76.- P.75–100.
573. Shen L., Wu H., Diep D., Yamagushi S., D'Alessio A.C., Fung H.L., Zhang K., Zhang Y. Genome-wide analysis reveals TET and TDG –dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics.// Cell.- 2013.- V.153.- P.692-706.
574. Shiio Y., Eisenman R.N. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression// Proc.Natl.Acad.Sci. USA.-2003.- V.100.- P.13225-13230.
575. Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression //Annu. Rev. Biochem.- 2006.- V. 75.- P. 243-269.
576. Shiryaeva N.V ., Vshivtseva V.V., Mal'tsev N.A., Sukhorukov V.N., Vaido A.I. Neuron density in the hippocampus in the rat strains with contrasting nervous system excitability after prolonged emotional-pain stress.// Neurosci Behav Physiol.- 2008.- V.38, №4.- P.355-357.
577. Sinclair D.A. Crossing over between closely linked markers spanning the centromere of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*.//Genet. Res.- 1975.- V.26,№2.-P.173-85.

578. Singal R., Ginder G. D. DNA methylation //Blood. -1999.- V. 93, №. 12.- P. 4059-4070.
579. Simmons M.J., Peterson M.P., Thorp M.W., Buschette J.T., DiPrima S.N., Harter C.L., Skolnick M.J. piRNA-mediated transposon regulation and the germ-line mutation rate in *Drosophila melanogaster* males. //Mutat. Res.- 2015 .- V.773.- P.16-21.
580. Sissoëff I., Grisvard J., Guillé E. Studies on metal ions-DNA interactions : specific behavior of reiterative DNA sequences.// Prog. Biophys.Mol.Biol.- 1976.-V.31,№2.- P.165-199.
581. Skelton K., Ressler K. J., Norrholm S.D., Jovanovic T., Bradley-Davino B. PTSD and gene variants: new pathways and new thinking //Neuropharmacology.- 2012.- V. 62, №. 2.- P. 628-637.
582. Skene P.J., Illingworth R.S., Webb S., Kerr A.R., James K.D., Turner D.J., Andrews R., Bird A.P. Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state.//Mol. Cell.- 2010 .- V.37,№ 4.-P.457-68.
583. Skinner M.K., Anway M.D., Savenkova M.I., Gore A.C., Crews D. Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. //PLoS One. -2008.-V.3.- P.e3745.
584. Skinner M.K. Environmental stress and epigenetic transgenerational inheritance.//BMC Med.- 2014 .- V.12.-P.153.
585. Solomon Z. Combat Stress Reaction: The Enduring Toll of War. 1993. New York: Plenum. 435 p.
586. Spivak B., Vered, Y., Graff E., Blum I., Mester R., Weizman A. Low platelet-poor plasma concentrations of serotonin in patients with combat-related posttraumatic stress disorder //Biological psychiatry. - 1999.- V. 45, №. 7.- P. 840-845.
587. Stam R., Bruijnzeel A.W., Wiegant V.M. Long-lasting stress sensitisation.//Eur. J. Pharmacol. 2000.- V.405, №1-3.- P.217-224.
588. Stam R., van Laar T.J., Akkermans L.M., Wiegant V.M. Variability factors in the expression of stress-induced behavioural sensitisation.//Behav. Brain Res. 2002 .-V.132,№1.- P.69-76.
589. Stankiewicz A.M., Swiergiel A.H., Lisowski P. Epigenetics of stress adaptations in the brain // Brain Res. Bull.- 2013 .- V. 98. -P. 76-92.
590. Steimer T., Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A., Driscoll P. Long-term behavioural and neuroendocrine changes in Roman high-(RHA/Verh) and low-(RLA-Verh) avoidance rats following neonatal handling.// Int. J. Dev. Neurosci.- 1998 .-V.16,№3-4.-P.165-74.

591. Stein M. B., Jang, K. L., Taylor, S., Vernon P.A., Livesley W.J. Genetic and environmental influences on trauma exposure and posttraumatic stress disorder symptoms: a twin study //American Journal of Psychiatry.- 2002. -V. 159,№. 10.- P. 1675-1681.
592. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A.C., Mucke L. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- $\beta$ .//Nat.Neurosci. -2013.-V.16,№5.- P.613-621.
593. Sucher N.J., Awobuluyi M., Choi Y.B., Lipton S.A. NMDA receptors: from genes to channels.//Trends Pharmacol Sci.- 1996.-V.17,№10.- P.348-355.
594. Suganuma T., Workman J.L. Signals and combinatorial functions of histone modifications // Annual review of biochemistry.- 2011.- V. 80.- P. 473–499.
595. Sumner T.A. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.// Exp.Cell.Res.- 1972.- V.75.-P.304-306.
596. Sun F.L. , Elgin S.C. Putting boundaries on silence. //Cell.-1999.- V. 99.- P.459–462.
597. Swijsen A., Nelissen K., Janssen D., Rigo J.M., Hoogland G. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies in the dentate gyrus after experimental febrile seizures.//BMC Res. Notes.- 2012 .- V. 13,№5.- P.685.
598. Szyf M. Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics.//Trends Mol. Med. -2015.- V.21, №2.- P.134-144.
599. Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1 //Science.- 2009.- V. 324,№ 5929.- P. 930-935.
600. Takizawa T., Meshorer E. Chromatin and nuclear architecture in the nervous system.// Trends Neurosci.- 2008,-V.31,№7,-343-352.
601. Talbert P. B., Henikoff S. Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome //Nature reviews Molecular cell biology.- 2010.- V. 11, №. 4.- P. 264-275.
602. Tan S.C., Carr C.A., Yeoh K.K., Schofield C.J., Davies K.E., Clarke K. Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors.//Mol. Biol. Rep.- 2012.- V.39,№4.- P.4857-4867
603. Tanaka H., Ma J., Tanaka K.F., Takao K., Komada M., Tanda K., Suzuki A., Ishibashi T., Baba H., Isa T., Shigemoto R., Ono K., Miyakawa T., Ikenaka K. Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal

neuron-glia interactions and decreased conduction velocities.//J. Neurosci.- 2009.- V.29, №26.- P.8363-8371.

604. Tamagnini F., Scullion S., Brown J.T., Randall A.D. Low concentrations of the solvent dimethyl sulphoxide alter intrinsic excitability properties of cortical and hippocampal pyramidal cells.//PLoS One.- 2014.-V.9, №3.- P.e92557.

605. Tate P. H., Bird A. P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression //Current opinion in genetics & development.- 1993.- V. 3, №. 2.- P. 226-231.

606. Tazi J., Bird A. Alternative chromatin structure at CpG islands //Cell.- 1990. -V. 60, № 6.- P. 909-920.

607. Terzoudi G.I., Pantelias G.E. Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation.// Mutagenesis.- 1997.-V.12, №4.-P.271-276.

608. Tian F., Hu X.Z., Wu X., Jiang H., Pan H., Marini A.M., Lipsky R.H. Dynamic chromatin remodeling events in hippocampal neurons are associated with NMDA receptor-mediated activation of Bdnf gene promoter 1.//J .Neurochem.-. 2009.- V.109, №5.- P.1375-88

609. Tijsterman M., Plasterk R. H. A. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi //Cell.- 2004. -V. 117, № 1. - P. 1-3.

610. Tochigi M., Iwamoto K., Bundo M., Komori A., Sasaki T., Kato N., Kato T. Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients //Biological psychiatry.- 2008.- V. 63, № 5. -P. 530-533.

611. Tomilin N.V. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. // Bioessays. -2008. - V.30. - P. 338-348.

612. Trievel R. C. Structure and function of histone methyltransferases //Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression. -2004.- V. 14, № 3.- P. 147-169.

613. Trojer P., Reinberg D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?//Mol. Cell.- 2007.- V.28, №1.- P.1-13.

614. Thorne A.W., Myers F.A., Hebbes T.R. Native chromatin immunoprecipitation.// Methods Mol. Biol.- 2004.- V.287.- P.21-44.

615. Tsankova N. M. , Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R.L., Nestler E.J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action //Nature neuroscience.- 2006. -V. 9, №. 4.- P. 519-525.

616. Tsankova N., Renthal W., Kumar A., Nestler E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders //Nature Reviews Neuroscience.- 2007.- V. 8, № 5.- P. 355-367.



617. Tudor M., Akbarian S., Chen R.Z., Jaenisch R. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain.//Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.- 2002.- V.99, №24.-P.15536-15541.
618. Tulin A.V., Kogan G.L., Filipp D., Balakireva M.D., Gvozdev V.A. Heterochromatic Stellate gene cluster in *Drosophila melanogaster*: structure and molecular evolution.//Genetics.- 1997.- V.146, №1.-P.253-262.
619. Tulin A.V., Naumova N.M., Aravin A.A., Gvozdev V.A. Repeated, protein-encoding heterochromatic genes cause inactivation of a juxtaposed euchromatic gene. //FEBS Lett.- 1998. – V.425, №3.- P.513-516.
620. Turner B.M. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. //Cell Mol. Life Sci. -1998 .- V.54, №1.- P.21-31.
621. Turek-Plewa J., Jagodzinski P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression //Cellular and Molecular Biology Letters.- 2005. -V. 10, № 4.- P. 631-647.
622. Tyrka A. R. , Price L. H., Marsit C., Walters O.C., Carpenter L.L. Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults //PLoS One.- 2012.- V. 7, № 1.- P. e30148.
623. Uchida S., Hara K., Kobayashi A., Otsuki K., Yamagata H., Hobara T., Suzuki T., Miyata N., Watanabe Y. Epigenetic Status of *gdnf* gene in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events //Neuron.- 2011.- V. 69, № 2.- P. 359-372.
624. Uddin M., Aiello, A. E., Wildman, D. E., Koenen K.C., Pawelec G., de Los Santos R., Goldmann E., Galea S. Epigenetic and immune function profiles associated with posttraumatic stress disorder //Proceedings of the National Academy of Sciences.- 2010. -V. 107, №20. -P. 9470-9475.
625. Uno H., Tarara R., Else J.G, Suleman M.A., Sapolsky R.M. Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates //J. Neurosci.- 1989.- V.9, №5.-P.1705-1711.
626. Vaido A.I., Mokrushin A.A. LTD/LTP of olfactory cortex slices of rat lines selected for different nervous system excitability// Abstr.Forum of Europ.Neurosci.- 1998.-Berlin.- V.10,Suppl.10.-P.63.
627. Valgardsdottir R. , Chiodi I., Giordano M., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. Structural and functional characterization of noncoding repetitive RNAs transcribed in stress human cells.// Mol. Biol.Cell.-2005.-V.16, №6.-P.2597-2604.

628. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.//Genome Biol.- 2002.-V.3, №7.-RESEARCH0034.
629. Vaydo A.I., Shiryayeva N.V., Lopatina N.G. Divergency of reactivity to long-term stressing of rat lines selected to the functional states of the nervous system// Behav.Genet.-1993.- V.23.-P.499-503.
630. Vecsei L., Szalardy L., Fulop F., Toldi J. Kynurenines in the CNS : recent advances and new questions//Nat. Rev.Drug Discov. – 2013.- V.12, №1.- P. 64-82.
631. Veenema, A. H., Neumann I. D. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines.// Brain Behav. Evol. – 2007.- V.70.- P. 274–285.
632. Vellucci S.V., Parrott R.F. Vasopressin and oxytocin gene expression in the porcine forebrain basal conditions and following acute stress. // Neuropeptides.- 1997.- V.31, №5.- P.431-438.
633. Viggiano D., Vallone D., Welzl H., Sadile A.G. The Naples High- and Low-Excitability rats: selective breeding, behavioral profile, morphometry, and molecular biology of the mesocortical dopamine system.// Behav Genet.- 2002 .-V.32, №5.- P.315-333.
634. Viggiano D., Vallone D., Ruocco L.A., Sadile A.G. Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder.// Neurosci. Biobehav. Rev.- 2003 .- V.27, №7.-P.683-689.
635. Vijg J., Uitterlinden A.G. A search for DNA alterations in the aging mammalian genome: an experimental strategy.//Mech. Ageing Dev.- 1987.- V.41, №1-2.- P.47-63.
636. Virok D.P., Kis Z., Szegedi V., Juhász G., Zvara A. Jr, Müller G., Lévy G., Hársing L.G., Rajkó R., Penke B., Janka Z., Janáky T., Puskás L.G. Functional changes in transcriptomes of the prefrontal cortex and hippocampus in a mouse model of anxiety.//Pharmacol Rep.- 2011.- V.63, №2.- P.348-361.
637. Vitiello B., Stoff D. M. Subtypes of aggression and their relevance to child psychiatry.// J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.-1997.-V. 36.- P. 307–315.
638. Voisey J., Swagell, C. D., Hughes, I. P., Morris C.P., van Daal A., Noble E.P., Kann B., Heslop K.A., Young R.M., Lawford B.R. The DRD2 gene 957C> T polymorphism is associated with posttraumatic stress disorder in war veterans //Depression and anxiety.- 2009.- V. 26, № 1.- P. 28-33.

639. Vollmann-Honsdorf G.K., Flügge G., Fuchs E. Chronic psychological stress does not affect the number of pyramidal neurons in three shrew hippocampus //Neurosci.Lett.- 1997.- V.233, №2-3.- P.121-124.
640. Waddington C.H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters// Nature.- 1942.- V.150, №. 3811.- P. 563-565.
641. Waddington C.H. The strategy of the genes.London: Geo Allen&Unwin. 1957.262 p.
642. Wallrath L.L. Unfolding the mysteries of heterochromatin.//Curr. Opin. Genet. Dev.- 1998.- V.8, №2.-P.147-153.
643. Wang J., Lawry S.T., Cohen A.L., Jia S. Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. //Cell Mol. Life Sci.- 2014- V.71, №24. - P.841- 4852.
644. Wang H., Meyer K., Korz V. Stress induced hippocampal mineralocorticoid and estrogen receptor  $\beta$  gene expression and long-term potentiation in male adult rats is sensitive to early-life stress experience //Psychoneuroendocrinology. 2013.- V. 38, № 2.- P. 250-262.
645. Wang X., Mozhui K., Li Z., Mulligan M.K., Ingels J.F., Zhou X., Hori R.T., Chen H., Cook M.N., Williams R.W., Lu L. A promoter polymorphism in the Per3 gene is associated with alcohol and stress response.//Transl. Psychiatry. -2012.-V.2.-P.e73.
646. Warters R.L., Lyons B.W. Variation in radiation-induced formation of DNA double-strand breaks as a function of chromatin structure.//Radiat. Res. -1992.-V.130, №3.- P.309-18.
647. Watkins-Chow D.E., Pavan W.J. Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain.//Genome Res.- 2008.- V.18, №1.-P. 60-66.
648. Weake V.M., Workman J.L. Histone ubiquitination: triggering gene activity//Mol.Cell.- 2008.- V.29.- P.653-663.
649. Weber C. M., Henikoff S. Histone variants: dynamic punctuation in transcription //Genes & development.- 2014.- V. 28, №. 7.- P. 672-682.
650. Weiler K.S., Wakimoto B.T. Heterochromatin and gene expression in Drosophila. //Annu. Rev. Genet. -1995.- V.29.- P.577-605.
651. Weissmann F., Lyko F. Cooperative interactions between epigenetic modifications and their function in the regulation of chromosome architecture.//Bioessays.- 2003.-V.25, №8.- P.792-797.
652. Weaver I. C. G. , Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J.Epigenetic programming by maternal behavior //Nature neuroscience.- 2004.- V. 7, №. 8.- P. 847-854.
653. Weaver I. C. G. , Champagne, F. A., Brown, S. E., Dymov S., Sharma S., Meaney M.J., Szyf M. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through

methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life// The Journal of Neuroscience.- 2005.- V. 25, № 47.- P.11045–11054

654. Weaver I. C. G. , D'Alessio, A. C., Brown, S. E, Hellstrom I.C., Dymov S., Sharma S., Szyf M., Meaney M.J. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes //The Journal of Neuroscience.- 2007.- V. 27, № 7.- P. 1756-1768.

655. Weaver I. C. G. Epigenetic effects of glucocorticoids//Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.-2009 .-V.14 .- P. 143–150

656. Weissmann F., Muyrers-Chen I., Musch T., Stach D., Wiessler M., Paro R., Lyko F.DNA hypermethylation in Drosophila melanogaster causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications //Molecular and cellular biology.- 2003.- V. 23, № 7.- P. 2577-2586.

657. Wilkinson M.B., Xiao G., LaPlant Q., Renthall W., Sikder D., Kodadek T.J., Nestler E.J.Imipramine treatment resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models//J.Neurosci. -2009.- V.29.- P.7820-7832.

658. Williams M.T., Hennessy M.B., Davis H.N. Stress during pregnancy alters rat offspring morphology and ultrasonic vocalizations.//Physiol. Behav. -1998.- V.63, №3.- P.337-343.

659. Winter H., Irle E. Hippocampal volume in adult burn patients with and without posttraumatic stress disorder.//Am. J .Psychiatry.- 2004.- V.161, №12.- P.2194-2200.

660. Witzmann S. R. , Turner, J. D., Mériaux, S. B., Meijer O.C., Muller C.P.Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor promoter 17 in adult rats //Epigenetics.- 2012.- V. 7, № 11.- P. 1290-1301.

661. Wood J.G., Helfand S.L. Chromatin structure and transposable elements in organismal aging. // Front. In Genetics.- 2013.- V.4, Art.274.- P.1-12.

662. Wolman S.R., Phillips T.F., Becker F.F. Banding patterns of rat chromosomes in normal cells and primary hepatocellular carcinomas.// Science.- 1972.- V.175.- P. 1267-1269.

663. Wu Z. G., Murphy C., Gall J. G. A transcribed satellite DNA from the bullfrog *Rana catesbeiana*.// Chromosoma.- 1986.- V. 93.- P.291–297.

664. Wu Y., Patchev, A. V., Daniel, G., Almeida O.F., Spengler D. Early-life stress reduces DNA methylation of the *Pomc* gene in male mice //Endocrinology.- 2014. -V. 155, №. 5.- P. 1751-1762.

665. Wu Y.L., Savelli S.L., Yang Y., Zhou B., Rovin B.H., Birmingham D.J., Nagaraja H.N., Hebert L.A., Yu C.Y. Sensitive and specific real-time polymerase chain reaction assays to accurately determine copy number variations (CNVs) of human complement C4A, C4B, C4-long,

C4-short, and RCCX modules: elucidation of C4 CNVs in 50 consanguineous subjects with defined HLA genotypes.//J. Immunol. -2007. - V.179, №5.- P.3012-3025.

666. Xian H., Chantarujikapong, S. I., Scherrer, J. F., . Eisen S.A., Lyons M.J., Goldberg J., Tsuang M., True W.R. Genetic and environmental influences on posttraumatic stress disorder, alcohol and drug dependence in twin pairs //Drug and alcohol dependence. -2000. -V. 61, № 1.- P. 95-102.

667. Xie P., Kranzler H. R., Poling J., Stein M.B., Anton R.F., Farrer L.A., Gelernter J. Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder //Neuropsychopharmacology.- 2010.- V. 35, № 8.- P. 1684-1692.

668. Yamawaki Y., Fuchikami M., Morinobu S., Segawa M., Matsumoto T., Yamawaki S. Antidepressant-like effect of sodium butyrate (HDAC inhibitor) and its molecular mechanism of action in the rat hippocampus.//World J. Biol .Psychiatry. -2012. - V.13, №6.- P.458-467.

669. Yamamoto S., Morinobu S., Fuchikami M., Kurata A., Kozuru T., Yamawaki S. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD.//Neuropsychopharmacology.- 2008.-V.33, №9.-P.2108-2116.

670. Yamanishi K ., Doe N ., Sumida M ., Watanabe Y., Yoshida M ., Yamamoto H., Xu Y., Li W ., Yamanishi H., Okamura H., Matsunaga H. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha is a key factor related to depression and physiological homeostasis in the mouse brain .// PLoS One.- 2015. -V.10, №3.- P.e0119021.

671. Yasui D.H., Peddada S., Bieda M.C., Vallero R.O., Hogart A., Nagarajan R.P., Thatcher K.N., Farnham P.J., Lasalle J.M. Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes.//Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.- 2007.- V.104, №49.- P.19416-19421.

672. Yehuda R., Daskalakis, N. P., Desarnaud, F., Makotkine I., Lehrner A.L., Koch E., Flory J.D., Buxbaum J.D., Meaney M.J., Bierer L.M. Epigenetic biomarkers as predictors and correlates of symptom improvement following psychotherapy in combat veterans with PTSD.//Frontiers in psychiatry.- 2013. -V. 4.- P.118.

673. Yehuda R., Engel, S. M., Brand, S. R., Seckl J., Marcus S.M., Berkowitz G.S. Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the World Trade Center attacks during pregnancy. //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.- 2005. -V. 90, № 7.- P. 4115-4118.

674. Yehuda R., Schmeidler, J., Giller, E. L., Siever L.J., Binder-Brynes K. Relationship between posttraumatic stress disorder characteristics of Holocaust survivors and their adult offspring //American Journal of Psychiatry. -1998.- V. 155, № 6.- P. 841-843.
675. Yehuda R., Southwick S., Giller, E. L. Ma X., Mason J.W. Urinary catecholamine excretion and severity of PTSD symptoms in Vietnam combat veterans // J. of Nervous and Mental Disease.- 1992.- V. 180, № 5.- P. 321-325.
676. Yehuda R., Vermetten E., McFarlane A. Understanding depression as it occurs in the context of post-traumatic stress disorder //Depression research and treatment. -2012. - V. 2012.- ID178261.-2 p.
677. Young R. M. D., Lawford B. R., Noble E. P., Kann B., Wilkie A., Ritchie T., Arnold L., Shadforth S. Harmful drinking in military veterans with post-traumatic stress disorder: association with the D2 dopamine receptor A1 allele //Alcohol and Alcoholism.- 2002.- V. 37, № 5.- P. 451-456.
678. Zhang T. Y., Hellstrom, I. C., Bagot, R. C., Wen X., Diorio J., Meaney M.J. Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus //The Journal of Neuroscience.- 2010.- V. 30, № 39.- P. 13130-13137.
679. Zhao J., Qi X.R., Gao S.F., Lu J., van Wamelen D.J., Kamphuis W., Bao A.M., Swaab D.F. Different stress-related gene expression in depression and suicide.// J. Psychiatr. Res.- 2015.- V.68.- P.176-185.
680. Zheng Y., Thomas P.M., Kelleher N.L. Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites.//Nat Commun.- 2013.- V. 4.- P. 2203.
681. Zhimulev I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation.//Adv. Genet.- 1998.- V.37.- P.1-566.
682. Zhu C.C., Bornemann D.J., Zhitomirsky D., Miller E.L., O'Connor M.B., Simon J.A. Drosophila histone deacetylase-3 controls imaginal disc size through suppression of apoptosis.// PLoS Genet.- 2008.- V.4, №2.- e1000009.
683. Zovkic I. B., Paulukaitis, B. S., Day, J. J., Etikala D.M., Sweatt J.D. Histone H2A. Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory //Nature.- 2014.- V.515, №13707.-P.582-586.