

ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТИВНОСТЕЙ МОНОАМИНООКСИДАЗ И СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ЗАВЕРШЕНИЯ ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА

Аллилуев А.В.¹, Цейликман О.Б.², Лапшин М.С.², Комелькова М.В.², Деев Р.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Южноуральский государственный медицинский университет Минздрава России», Челябинск, e-mail: mkomelkova@mail.ru;

²ФАГОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национально-исследовательский университет), Челябинск, e-mail: vadimed@yandex.ru

У крыс спустя 3 суток после завершения повторных стрессорных воздействий, вызванных запахом хищника, наблюдаются нарушения поведенческой активности в виде снижения более чем в 2 раза количества вертикальных стоек и уровня анксиогенной дефекации. Кроме того, в этот период отмечено снижение активности моноаминооксидазы А (МАО-А) при одновременном снижении содержания молекулярных продуктов ПОЛ. В частности, отмечено снижение гептан-растворимых диеновых конъюгатов, а также кетодиенов и сопряженных триенов. В пределах общей выборки на основании теста крестообразный лабиринт выделены подгруппы животных с повышенной тревожностью и нормальной тревожностью. Оказалось, что только у животных с повышенной тревожностью наблюдалось снижение активности МАО-А при одновременном повышении ПОЛ в системе Fe²⁺/аскорбат. Одновременно наблюдалось снижение вертикальной активности и интенсивности реакции замирания. У животных со сниженной тревожностью подобные сдвиги отсутствовали.

Ключевые слова: стресс, тревожность, МАО, свободнорадикальное окисление.

CHARACTERISTICS OF THE MONOAMINE OXIDASES ACTIVITIES AND THE CONTENT OF FREE RADICAL OXIDATION PRODUCTS AFTER EMOTIONAL STRESS CESSATION

Alliluev A.V.¹, Tseilikman O.B.², Lapshin M.S.², Komelkova M.V.¹, Deev R.V.¹

¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: mkomelkova@mail.ru;

²South Ural State University, Chelyabinsk, e-mail: vadimed@yandex.ru

In rats after 3 days after completion of the repeated stress effects caused by odor predator activity observed behavioral disturbances in the form of reduced more than 2 times the number of vertical uprights and Anxiogenic defecation level. Furthermore, in this period, reduction of activity mentioned monoamine oxidase A (MAO-A) while reducing the content of molecular products. In particular, there was a decrease heptane-soluble conjugated diene and ketodienes and conjugated trienes. Within the total sample on the basis of test maze isolated subgroup of animals with increased anxiety and normal anxiety. It turned out that only in animals with increased anxiety observed decrease of MAO-A activity while increasing the LPO system Fe²⁺/ascorbate. Simultaneously, there was a decrease of activity and a vertical rate fading reaction. In animals with reduced anxiety such changes were absent.

Keywords: stress, anxiety, MAO, free radical oxidation.

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) является отдаленным последствием психической травмы [12]. Развитие ПТСР происходит через значительный промежуток времени после пребывания организма в экстремальных условиях. Для экспериментального моделирования ПТСР весьма удобна модель психоэмоционального стресса, вызванного сигналом о присутствии хищника [7]. Такая постановка стресса полностью исключает наличие у животных физических страданий. Поэтому данная ситуация имеет психотравмирующий характер и может характеризовать наличие ПТСР [13]. Однако далеко не все животные, подвергнутые психоэмоциональному стрессу, отличаются наличием

ПТСР симптоматики. Для идентификации наличия или отсутствия ПТСР симптомов среди животных широко распространен анализ уровня тревожности в открытых рукавах крестообразного лабиринта. Соответственно, высокотревожные животные (ВТ) имеют ПТСР симптоматику, а у животных с низкой тревожностью (НТ) она отсутствует. В основе биологических эффектов эндогенных медиаторов тревожности трибулинов лежит ингибирование моноаминоксидаз (МАО). Моноаминоксидазы (МАО) – А и В участвуют в окислительном дезаминировании биогенных аминов. Кроме того, копродуктом МАО-реакции является перекись водорода (H_2O_2), которая в присутствии металлов с переменной валентностью вовлекается в процессы свободнорадикального окисления [2, 8]. В ЦНС с активацией МАО связано развитие нейродегенеративных процессов. Однако до сих пор не изучена направленность изменений активности МАО после завершения психоэмоционального стресса у ВТ и НТ крыс. В данном исследовании мы изучали уровень активностей МАО-А и МАО-В и уровень основных звеньев свободнорадикального окисления: перикисного окисления липидов и карбонилирования белков в головном мозге ВТ и НТ крыс после завершения психоэмоционального стресса.

Материалы и методы

Работа выполнена на 32 белых беспородных лабораторных крысах. Психоэмоциональный стресс (n=16) моделировался запахом мочи кошки, ежедневно на протяжении 15 минут в течение 10 суток. Экспериментальная группа после 10-суточного воздействия стрессора содержалась в течение 3 суток в стандартных условиях. В контрольную группу вошли животные (n=16), которые не подвергались воздействию стрессора. Поведенческая активность животных определялась в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). По времени пребывания в открытых рукавах ПКЛ животных разделяли на ВТ и НТ.

В гомогенатах головного мозга исследовали активности ферментов МАО-А и МАО-В, содержание карбонилированных белков, как показателя окислительной деструкция белков, а также молекулярных продуктов ПОЛ [1]. Для определения МАО-активности использовали 12.5 % (вес: объём) гомогенат головного мозга на 0,067М Na-фосфатном буфере (pH = 7,4) на сахарозе 0,25М. Далее его центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и в течение 25 минут при 850 g центрифугировали. В полученной суспензии митохондрий определяли активности ферментов МАО-А и МАО-В. В качестве субстрата использовали серотонин и бензиламин гидрохлорид.

Для определения активности МАО-А в пробирку вносили 0,2 мл гомогената, который предварительно центрифугировали в течение 15 минут. Далее супернатант смешивали с 2,3 мл Na-фосфатным буфером (0,067М) и преинкубировали 30 минут при температуре 37 °С.

Затем в опытные пробы добавляли 0,5 мл серотонина (3 мкМ раствора) и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл раствора семикарбазида на хлорной кислоте (25 мМ). Одновременно, в качестве контроля была поставлена проба, в которую не вносили субстрат в фазу инкубации, а добавляли его после остановки реакции. Для определения активности MAO-B использовалась та же методика, но в качестве субстрата использовался бензиламингидрохлорид.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов оценивали спектрофотометрическим методом, предварительно экстрагируя липиды исследуемых тканей в смеси гептана и изопропанола [1]. Определение содержания конечных продуктов ПОЛ и интенсивность аскорбат-индуцированного ПОЛ осуществляли методом Львовской Е.И и соавт. [4]. Данные методики позволяют идентифицировать полярные липиды, растворимые в изопропиловом спирте, и неполярные липиды, растворимые в гептане; оценить содержание первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты), вторичных продуктов ПОЛ (кетодиены и сопряженные триены) и конечных продуктов ПОЛ (основания Шиффа). Показатели окислительной модификации белков (ОМБ) в изучаемых образцах оценивали по образованию динитрофенилгидразонов [3].

Результаты обрабатывались общепринятыми методами дескриптивной статистики и выражались в виде среднеарифметической (M) и её стандартной ошибки (m). Статистически значимые различия определяли с использованием критериев непараметрической статистики: Манна – Уитни (U).

Результаты и обсуждение

В общей выборке животных, уже спустя 3 суток после завершения повторных стрессорных воздействий, наблюдаются нарушения поведенческой активности в виде снижения более чем в 2 раза количества вертикальных стоек и уровня анксиогенной дефекации (таблица 1). Остальные показатели поведенческой активности не отличались статистически значимо от контроля. Кроме того, в этот период отмечено снижение активности MAO-A при наличии дисбаланса в содержании молекулярных продуктов ПОЛ. В частности, отмечено снижение гептан-растворимых диеновых конъюгатов и повышение содержания кетодиенов и сопряженных триенов.

Через 3 суток после завершения стрессорных воздействий у НТ животных наблюдалось снижение времени пребывания в открытых рукавах крестообразного лабиринта, при одновременном снижении вертикальной активности (таблица 2). При этом, у них не снизился уровень активности MAO-A. Уровень ПОЛ у них также находился в пределах контрольных значений. У ВТ животных, по сравнению с контролем в тесте открытого поля, снижена интенсивность реакции замирания. Одновременно у ВТ крыс, по

сравнению с контролем, снижена активность МАО-А. При этом наблюдались положительные корреляции между уровнем активности МАО-А и поведенческими показателями, характеризующими сниженную тревожность.

Таблица 1

Влияние психоэмоционального стресса на показатели поведенческой активности, уровень активности МАО-А и МАО-В и показатели свободнорадикального окисления головного мозга

Показатели	Контроль	Стресс
Время в открытых рукавах (сек)	40,25±7,08	66,50±10,22
Вертикальная активность (количество стоек)	9,5±0,4	4,1 ±0,1*
Количество фекальных болюсов	1,75±0,036	0,25±0,01*
Время в закрытых рукавах	484,25±52,84	437,38±84,45
Время в центре	75,5±17,16	96,125 ±28,04
Активность МАО-А (нМ/мин/мг белка)	1,44±0,07	0,94±0.012*
Активность МАО-В(нМ/мин/мг белка)	1,12±0,21	1,33±0,33
Диеновые конъюгаты Гептановая фаза (у.е.о)	0,85±0,07	0,81±0,06*
Кетодиены и сопряженные триены Гептановая фаза (у.е.о)	0,097±0,015*	0,12±0,019*
Fe ²⁺ /аскорбат индуцированное ПОЛ (у.е.о)	2,56±0,23	2,48±1,23
Карбонилированные белки (мМ/мкг белка)	0,0043±0,002	0,0041±0,003
Карбонилированные белки индуцированное (мМ/мкг белка)	0,0151±0,003	0,0184±0,002
Количество умываний	1,25±1,26	2,25±1,28
Количество свисаний	7,25± 0,93	8,62± 0,85
Примечания: Данные представлены в виде средней арифметической величины и ошибки средней (M±m), *статистически значимые различия по сравнению с контролем, у.е.о. – условные единицы окисления, выражаемые как отношение E232/E220 для диеновых конъюгатов и E278/E220 для кетодиенов и сопряженных триенов.		

В частности обнаружены корреляции между:

- МАО-А и временем проведения в светлом лабиринте ($r_s=0,833$);
- МАО-А и свисанием ($r_s=0,718$);
- МАО-А и процент времени в открытом поле ($r_s=0,833$);

-МАО-А и время проведения в центре арены ($r_s=0,755$).

Особенный интерес вызывает корреляционная зависимость между уровнем активности МАО-А и временем нахождения в открытых рукавах крестообразного лабиринта. Именно по этому показателю поведенческой активности проводилось разделение животных на восприимчивых и устойчивых к ПТСР. Соответственно просматривается закономерность – чем выше уровень активности МАО, тем больше времени животные проводят в открытых рукавах, то есть тем ниже будет общий уровень тревожности. Скорее всего нейрхимической основой подобной корреляционной связи является ключевая роль МАО в обмене биогенных аминов-нейротрансмиттеров. Соответственно на сниженном уровне МАО возможно повышение уровня серотонина, дофамина и норадреналина. В случае, если это будет сопровождаться угнетением ГАМК-ергической системы, вполне ожидаемо развитие тревожной симптоматики. В связи с этим стоит обратить внимание на положительную корреляцию между уровнем активности МАО-А и уровнем свисаний. Вполне возможно, что этот показатель характеризует склонность к реализации активных поведенческих стратегий в виде «реакции борьба-бегство». Интересно отметить, что ингибиторы МАО не нашли применения в психиатрии в качестве анксиолитиков, зато эффективно используются как антидепрессанты. По данным метаанализа ингибиторы МАО не проявили себя эффективными средствами в коррекции ПТСР, и представленные здесь результаты позволяют понять причину их неэффективности.

Кроме того, в головном мозге наблюдалось увеличение содержания гептан-растворимых вторичных продуктов ПОЛ (кетодиенов и сопряженных триенов), а также изопропанол-растворимых первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) после индукции в системе Fe^{2+} /аскорбат. У НТ животных, по сравнению с контролем, повышено время пребывания в светлом лабиринте и время пребывания в центре, по сравнению с контролем. Кроме того, у НТ животных повышено содержание гептан-растворимых кетодиенов и сопряженных триенов. Таким образом, спустя 3 дня после завершения повторных стрессорных воздействий наблюдается снижение активности МАО-А в головном мозге при одновременном повышении содержания молекулярных продуктов ПОЛ. Это свидетельствует о том, что активация ПОЛ в головном мозге осуществляется по МАО-независимому механизму.

Вполне возможно, что усиление ПОЛ при психоэмоциональном стрессе имеет цитокин-зависимый характер. Известно, что усиление ПОЛ является одной из составляющих трансдукции цитокинового сигнала, а на фоне сниженного уровня глюкокортикоидов создаются благоприятные возможности для развития гиперцитокинемии.

Постстрессорные показатели поведенческой активности,
уровень активности MAO-A и MAO-B, показатели свободнорадикального окисления
головного мозга у ВТ и НТ крыс

Показатели	Контроль	ВТ	НТ
Время в открытых рукавах (сек)	40,25±7,08	33,75±5,59	99,25±5,90*#
Вертикальная активность (количество стоек)	9,25±0,4	5,25±0,27	3,25±0,5*
Количество замираний	14,00±1,25	6,5±0,89*#	14,00±3,25
Активность MAO-A (нМ/мин/мг белка)	1,44±0,07	0,72±0,02*	1,17±0,11
Активность MAO-B (нМ/мин/мг белка)	1,12±0,21	1,04±0,36	1,21±0,49
Кетодиены и сопряженные триены (гептановая фаза)	0,097±0,015	0,14±0,01*	0,11±0,01
Fe ²⁺ /аскорбат индуцированное ПОЛ	2,48±0,23	2,64±0,08*	2,50±0,3
Примечания: Данные представлены в виде средней арифметической величины и ошибки средней (M±m), *статистически значимые различия по сравнению с контролем, # статистически значимые различия между ВТ и НТ крысами.			

Причиной сниженного уровня активности MAO может быть типичный для этой модели ПТСР сниженный уровень глюкокортикоидов. Известно, что глюкокортикоиды обладают способностью, как повышать, так и понижать каталитическую активность MAO.

В настоящее время расшифрованы молекулярные механизмы, с помощью которых глюкокортикоиды регулируют экспрессию MAO. В частности, на промоторе гена MAO-A имеются несколько сайтов связывания с глюкокортикоид-респонсивным элементом'-GGTACAnnnTGTTCT-3' и с транскрипционным фактором Sp1 [6 11]. Соответственно, связывание данного транскрипционного фактора приводит к подавлению экспрессии MAO-A. Открытый транскрипционный фактор R1(RAM2/CDCA7L), к примеру, связываясь с Sp1 сайтами, подавляет экспрессию гена MAO A [6]. Также, было установлено, что RAM2/CDCA7L ингибирует не только экспрессию гена MAO-A, но и угнетает экспрессию MAO-B. Регуляцию экспрессии MAO-B дополнительно осуществляет ещё один транскрипционный фактор – E2F ассоциированный фосфопротеин (EAPP). Выявлено, что супрессивный эффект глюкокортикоидов на экспрессию MAO-B обусловлен положительным влиянием EAPP [9]. Вместе с тем глюкокортикоиды характеризуются способностью угнетать

каталитическую активность моноаминоксидаз [10]. Это явление, скорее всего, связано с глюкокортикоид-зависимым влиянием на микроокружение MAO. MAO является митохондриальным ферментом, а глюкокортикоиды способны угнетать функциональную активность митохондрий. Помимо этого, экспрессия MAO-A угнетается путём глюкокортикоид-зависимой стимуляции транслокации R1 из цитоплазмы в ядро [5]. Однако, в условиях выполненного исследования, активность MAO может быть снижена вследствие блокады глюкокортикоид-зависимых механизмов усиления экспрессии MAO.

Наблюдаемые поведенческие и нейрохимические особенности общей выборки проявлялись асимметрично у ВТ и НТ животных. В этот период у НТ животных повысилось, по сравнению с контролем, время пребывания в светлых рукавах, а у ВТ животных отсутствовали статистически значимые различия. Таким образом, характерные для общей выборки анксиолитические изменения поведенческой активности появляются исключительно благодаря НТ животным. Причем НТ животным вовсе не свойственно снижение активности MAO-A. Более того, уровень активности MAO-B был снижен только у ВТ животных. Полученный результат можно интерпретировать как проявление связи между снижением активности MAO и ростом тревожности. В связи с этим стоит обратить внимание на наличие в органах эндогенных ингибиторов активности MAO, называемых трибулинами, которые рассматриваются в качестве медиаторов тревожности. Вполне возможно, что у ВТ животных снижение активности MAO-A связано с приростом трибулиновой активности. На сегодняшний день можно постулировать наличие двух основных механизмов снижения активности MAO. Первый механизм связан со снижением экспрессии MAO. Исходя из того, что глюкокортикоиды играют ключевую роль в усилении экспрессии MAO-A, на фоне их сниженного содержания представляется вполне допустимым снижение экспрессии MAO за счет снижения уровня целого ряда глюкокортикоид-зависимых транскрипционных факторов, таких как KLF-11 или E2F [9]. Для реализации второго механизма не обязательно снижение экспрессии MAO. Тут вполне достаточно усиления трибулиновой активности. В наших исследованиях сниженный уровень MAO активности может быть реализован как по первому, так и по второму механизму. Выяснение роли каждого из них в снижении активности MAO-A может послужить предметом для дальнейших исследований.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда: Грант № 17-15-013418.

Список литературы

1. Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка

адаптационных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников, В.Э. Цейликман. – Челябинск, 2000. – 167 с.

2. Горкин В.З. Система амноксидаз: современные достижения в исследованиях природы, функций и их нарушений/ В.З. Горкин, Л.Н. Овчинникова // Биомедицинская химия. – 1993. – Т. 39. – С. 2-10.

3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинко-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. – СПб.: Изд-во Медицинская пресса, 2006. – 397 с.

4. Львовская Е.И. Нарушение процессов липидной пероксидации при термической травме и патогенетическое обоснование лечения антиоксидантами из плазмы крови: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е.И. Львовская. – Челябинск, 1998. – 45 с.

5. Сеницкий А.И. Особенности свободнорадикального окисления при гипо- и гиперкортикоидных состояниях: дис. ... д-ра мед. наук / А.И. Сеницкий. – Челябинск, 2013. – 32 с.

6. Chen K. Transcription factor E2F-associated phosphoprotein (EAPP), RAM2/CDCA7L/JPO2 (R1), and simian virus 40 promoter factor 1 (Sp1) cooperatively regulate glucocorticoid activation of monoamine oxidase B / K. Chen, X.M. Ou, J.B. Wu, J.C. Shih // Mol. Pharmacol. 2011. Feb. 79(2). P. 308-317.

7. Cohen H. The neuropeptide Y (NPY) – ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder/ H. Cohen, T. Liu, N. Kozlovsky, Z. Kaplan, J. Zohar, A.A. Mathé // Neuropsychopharmacology. 2012. Jan. 37(2). P. 350-363.

8. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D.P. Jones // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2008. Vol. 295. P. 849-868.

9. Ou X.M. et al. A novel role for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and monoamine oxidase B cascade in ethanol-induced cellular damage/ X.M. Ou, C. Johnson, M.B.H. Youdim, M.C. Austin, J. Luo, A. Sawa // Biological psychiatry. 2010. Vol. 67. No. 9. P. 855-863.

10. Sergutina A.V. Differences in monoamine oxidase activity in the brain of wistar and august rats with high and low locomotor activity: a cytochemical study./ A.V. Sergutina, V.I. Rakhmanova // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. Jun. 161(2). P. 211-4.

11. Shih J.C. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes / J.C. Shih, J.B. Wu, K. Chen // J. Neural. Transm. 2011. Jul. 118(7). P. 979-86.

12. Yehuda R., Seckl J. Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis. Endocrinology. 2011. 152. P. 4496-4503.

13. Zoladz P.R., Fleshner M., Diamond D.M. () Psychosocial animal model of PTSD produces

a long-lasting traumatic memory, an increase in general anxiety and PTSD-like glucocorticoid abnormalities. *Psychoneuroendocrinology*. 2012. 37. P. 1531–1545.