

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЛИИ НЕОКОРТЕКСА У КРЫС В ПЕРИОД ИНТЕНСИВНОЙ МИЕЛИНИЗАЦИИ

© 2022 г. А. В. Вьюшина¹, А. В. Притворова¹ *, О. Г. Семенова¹, Н. Э. Ордян¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 16.12.2021 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 21.03.2022 г.

Исследовали влияние пренатального стресса на активность глутатионзависимых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса у крыс-самцов в возрасте 20 дней (в период интенсивной миелинизации). У пренатально стрессированных животных по сравнению с контрольными животными выявлены следующие изменения. Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) в цитозоле и ядерной фракции нейронов и нейроглии возрастала, а в митохондриальной фракции снижалась. Активность глутатионредуктазы (КФ 1.8.1.7) возрастала в цитозоле и фракции ядер нейроглии. Активность глутатионтрансферазы (КФ 2.5.1.18) увеличивалась в митохондриях нейронов и цитозоле нейроглии и снижалась в ядерной фракции нейронов и в митохондриях нейроглии. Высказано предположение, что изменения в активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса, выявленные у пренатально стрессированных крысят в возрасте 20 дней, негативно влияют на процессы миелинизации в неокортексе, и могут способствовать ускоренному старению и развитию нейродегенеративных заболеваний у взрослых животных.

Ключевые слова: пренатальный стресс, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза, нейроны, нейроглия, субклеточные фракции, миелинизация

DOI: 10.31857/S102781332203013X

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования стрессорных воздействий на нейроглиальные взаимосвязи выявили критически важные периоды в процессах нейрогенеза и глиогенеза. Нарушение формирования нейроглиальных комплексов в такие периоды, несомненно, сказывается и на функционировании взрослого организма. Последствием данного нарушения будут изменения дифференцировки коры в процессе пренатального онтогенеза [1]. Крыса является удобным модельным объектом для исследования этих процессов, поскольку у данного животного хорошо изучены критические периоды как пре- так и постнатального онтогенеза. Одним из таких периодов формирования неокортекса для крысы считается период второй и третьей недели постнатального развития. Отмечается, что к 20 дням у крысят фиксируется максимальная исследовательская активность [2]. В это же время вес неокортекса у крыс наряду с другими структура-

ми мозга достигает максимальных значений [2]. Показано, что рост тел нейронов в коре завершается к 17–20-му дням. В эти же сроки происходит интенсивная миелинизация в глубоких слоях коры, кроме того в первые 3 недели постнатального развития происходит интенсивный синаптогенез, а также к концу 3-ей недели постнатального развития устанавливается максимальное потребление кислорода в мозге [3].

Как известно, одним из последствий воздействия пренатального стресса (ПС) является генерация чрезмерного количества активных форм кислорода (АФК), осуществляемая различными механизмами. Орган-специфический ответ зависит от относительного баланса между генерацией АФК и антиоксидантными ресурсами клетки [4, 5]. В работе Флерова и соавт. [6] не было выявлено отличий в уровне диеновых конъюгатов и оснований Шиффа в неокортексе у пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней по сравнению с контрольной группой того же возраста. Однако, при исследовании нейронов и нейроглии, выделенных из неокортекса у пренатально стрессиро-

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6, e-mail: prityorovaav@infran.ru.

ванных крыс в возрасте 20 дней, уровни диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа оказались сниженными в нейроглии по сравнению с контрольной группой. В этом же исследовании было обнаружено повышение уровня окислительной модификации белков, как в нейронах, так и в нейроглии у пренатально стрессированных 20-дневных самцов крыс по сравнению с контролем. При этом активность такого антиоксидантного фермента как Cu-Zn-супероксиддисмутазы была ниже в нейронах, а в нейроглии не изменялась [7].

В предыдущем нашем исследовании [8] нами были выявлены изменения в активности глутатионзависимых антиоксидантных ферментов в нейронах и нейроглии у взрослых пренатально стрессированных крыс. Однако эти изменения, несомненно, являются результатом процессов, протекающих на более ранних стадиях пре- и постнатального онтогенеза, в особенности в критические периоды.

В связи с этим целью данной работы было изучение активности антиоксидантных глутатионзависимых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крысят в возрасте 20 дней, который является критически важным для процессов нейрогенеза и глиогенеза и формирования неокортекса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Работа проведена на животных из питомника Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Опыты проводили на крысах линии Wistar. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме и свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными проводили в период с 9 до 11 ч утра.

Для получения пренатально стрессированного потомства первородящих беременных самок (возраст 5 мес., вес 250–270 г) подвергали одностороннему иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности с 15-го по 19-й день гестации [9]. В эксперименте использовано 12 самок (6 самок – контрольная группа, 6 самок – группа, подвергавшаяся стрессу), к которым подсаживали самцов (1 самец к 3 самкам). У самок ежедневно брали мазки с целью определения фазы эстрального цикла. Нулевым днем беременности считали день, когда в вагинальном мазке самки, находящейся в стадии эструса, обнаруживались сперматозоиды. На 18-й день беременности самок рассаживали по отдельным клеткам, где они находились до родов и в процессе выкармливания потомства. Далее из каждого помета отбирали

случайным образом (без использования слепого метода) по 4 самца в возрасте 20 дней.

Крыс-самцов декапитировали, из черепной коробки извлекали мозг, из которого на льду выделяли неокортекс обоих полушарий от 4 особей в одну пробу, всего 6 проб ($n = 6$). Таким образом, в эксперименте использовалось 48 самцов крыс (24 крысы – контрольная группа, 24 крысы – пренатально стрессированная (ПС) группа).

Клеточные фракции, обогащенные нейронами и нейроглией, выделяли по методу Селлинджера в модификации Флерова [10]. Принцип метода заключается в получении клеточной суспензии с последующим выделением и очисткой нейрональной и нейроглиальной фракций ультрацентрифугированием (ультрацентрифуга VAC-60, ротор SWOUT 50×3, Германия) в градиенте плотности сахарозы и фиколла (сахароза, “Вектон”, Россия; Ficoll 400, “Merck”, Германия). При этом клеточную суспензию получали путем дезинтеграции ткани при пропускании ее через нейлоновые и металлические сита с последовательно уменьшающимся размером пор. Для облегчения дезинтеграции ткань предварительно обрабатывали раствором поливинилпирролидона (PVP-K30, “Merck”, Германия). После выделения фракции нейронов и нейроглии отмывали от сахарозы физиологическим раствором и затем центрифугировали в течение 10 минут в центрифуге при 3500g (центрифуга Eppendorf 5430R, Германия). Полученный осадок гомогенизировался (гомогенизатор Поттера, Sartorius, Германия), в 1 мл 0.25 М растворе сахарозы, содержащем 1 мМ ЭДТА (“Вектон”, Россия), pH 7,4 (для нейронов), или в эквивалентном объеме осадка объеме 0.25 М раствора сахарозы, содержащем 1 мМ ЭДТА, pH 7.4 (для нейроглии). Далее выделение субклеточных фракций производилось стандартным методом дифференциального центрифугирования как описано ранее [11].

Активность ферментов глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) определялась с помощью наборов (Glutathione Peroxidase Assay Kit CatNo:EGPX-100, Glutathione Reductase Kit CatNo:ECGR-100, Glutathione S-transferase Assay Kit CatNo:DGST-100, BioAssay Systems, USA) на фотометре Thermo Scientific multiscan fs, USA. За единицу активности исследованных ферментов принимали количество нмоль продукта реакции, образовавшегося за 1 мин в расчете на 1 мг белка (нмоль/мин/мг белка). Количество общего белка определялось по методу Лоури.

Статистическая обработка полученных результатов производилась с использованием критерия сравнения U (Манна–Уитни) в программе “IBM SPSS Statistics 21”. Проверку нормальности распределения значений рассматриваемых групп проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка

Таблица 1. Активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (нмоль/мин/мг белка) в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса контрольных крыс в возрасте 20 дней, Me(IQR), ($n = 6$ во всех группах)

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	27.7 (18.5–38.9)	ND	401.5 (229–574)	6.17 (1.8–9.7) [#]	21.3 (11.1–40.8) [#]	137.0 (114–229) [#]
ГР	ND	13.1 (8.8–17.6)	ND	14.3 (0–17.9) [#]	28.1 (25–31.2) [#]	ND
ГТ	7.9 (7.8–11.5)	2.1 (0–2.7)	ND	1.1 (1.06–1.19) [#]	9.2 (9.2–9.6) [#]	17.3 (13.8–34.6) [#]

Примечание: Me(IQR), где Me – медиана, IQR – интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей, Ц – цитозоль, Я – фракция ядер, М – фракция митохондрий, ND – активность не определялась, # отличие нейроглии от нейронов при $p < 0.05$

Таблица 2. Активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (нмоль/мин/мг белка) в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней, Me(IQR), ($n = 6$ во всех группах)

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	305.5 (305.5–496)*	9.2 (5.1–10.2)*	ND*	99.4 (66.9–121.6)*	85.1 (76.1–107.7)*	ND*
ГР	ND	11.6 (10.0–19.6)	ND	22.4 (16.1–29.5)*	35.4 (19.6–41.2)	ND
ГТ	8.6 (6.9–9.5)	ND*	27.7 (15.6–44.9)*	5.2 (4.8–5.9)*	9.9 (6.4–12.7)	5.2 (0–6.4)*

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. * Отличие группы пренатально стрессированных крыс от группы контроля при $p < 0.05$

(Shapiro–Wilks test). Проверку статистических гипотез проводили при уровне значимости $p < 0.05$. При описании количественных данных использовались следующие показатели: Me – медиана, IQR – интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные, полученные при исследовании активности ферментов глутатионового пула в цитозоле, фракциях ядер и митохондрий нейронов и нейроглии в контрольной группе крыс в возрасте 20 дней, представлены в табл. 1.

Из трех исследованных ферментов в цитозоле нейронов активность у ГР не проявлялась. Во фракции ядер была выявлена активность ГР и ГТ, а активность ГПО не проявлялась. В митохондриальной фракции нейронов не выявлена активность ГР и ГТ.

В цитозоле нейроглии активность ГПО и ГТ была ниже по сравнению с нейронами, кроме того была выявлена активность ГР в отличие от

нейронов ($p < 0.05$). В ядерной фракции нейроглии активность всех трех ферментов была более высокой по сравнению с активностью ферментов в ядерной фракции нейронов ($p < 0.05$). Во фракции митохондрий нейроглии активность ГПО была более низкой, чем у нейронов во фракции митохондрий ($p < 0.05$). Активность ГР во фракции митохондрий нейроглии не выявлена также, как и в митохондриальной фракции нейронов. Но была выявлена активность ГТ во фракции митохондрий нейроглии. Следует отметить на порядок более высокую активность ГПО в митохондриальной фракции как нейронов, так и нейроглии, по сравнению с активностью данного фермента во всех других фракциях. Также обращает на себя внимание отсутствие активности ГР в митохондриальной фракции как нейронов, так и нейроглии.

Изменение активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней показано в табл. 2.

У пренатально стрессированных животных в цитозоле нейронов активность ГПО повышалась

Таблица 3. Изменение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс по сравнению с контрольной группой

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↑	↑	↓	↑	↑	↓
ГР	—	—	—	↑	—	—
ГТ	—	↓	↑	↑	—	↓

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” снижение активности, “↑” увеличение активности, “—” отсутствие изменений.

в 10 раз по сравнению с контролем, активность ГР так же, как и в контроле, не проявлялась, а активность ГТ не изменялась по сравнению с контролем. Во фракции ядер нейронов в отличие от контроля выявлена активность ГПО, а активность ГР не имела достоверных отличий от контроля, тогда как активность ГТ выявлена не была. В митохондриальной фракции нейронов ПС животных активность ГПО и ГР не выявлялась, тогда как активность ГТ, в отличие от контроля, была определяема.

В нейроглии у пренатально стрессированных крыс активность всех исследованных ферментов в цитозоле увеличивалась по сравнению с контрольными крысами ($p < 0.05$). В ядерной фракции достоверно увеличивалась активность ГПО ($p < 0.05$), тогда как активности ГТ и ГР не отличались от этих показателей у контрольной группы. Во фракции митохондрий активность ГПО не проявлялась в отличие от контроля, активность ГТ снижалась по сравнению с контролем, а активность ГР, так же, как и у контрольных животных, была не определяема.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем предыдущем исследовании [8] мы выявили эффекты пренатального стресса на активность антиоксидантных ферментов глутатионового пула в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии в неокортексе у половозрелых самцов крыс. Нами был сделан вывод о том, что у взрослых крыс изменения в активности исследованных ферментов носят как компенсаторный, так и патологический характер. Однако, для поведенческих и когнитивных свойств и вероятности развития нейродегенеративных заболеваний у взрослых индивидов также имеет значение формирование нейроглиальных взаимоотношений в онтогенезе. Поэтому в настоящем исследовании были рассмотрены ювенильные крысы в возрасте 20 дней, когда наблюдается максимальная интенсивность процессов, связанных с миелинизацией [3]. В литературе отмечается тот факт, что мозг во время

раннего постнатального развития обладает значительным запасом низкомолекулярных антиоксидантов, тогда как концентрации антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и ГПО относительно низки [12]. Однако, следует отметить, что большее значение имеет именно активность антиоксидантных ферментов, а не их абсолютное количество. Результаты данного исследования показали, что у 20-дневных крысят в контрольной группе активность ферментов во фракции ядер нейроглии выше по сравнению с нейронами (табл. 1). Можно предположить, что для нейроглии наиболее важно поддержание необходимого уровня антиоксидантной активности глутатион-зависимых ферментов именно во фракции ядер. В то же время в нейронах активность ГПО в цитозоле и в митохондриальной фракции выше почти в 4 раза по сравнению с нейроглией. Эти данные позволяют предположить, что возможность поддерживать более низкий уровень АФК в нейронах, чем в нейроглии [13] на ранних стадиях онтогенеза осуществляется не только благодаря специфической организации комплекса 1 в митохондриях [14], но и благодаря повышенной активности ГПО. В то же время у 20-дневных крысят высокая активность ГПО по сравнению с остальными исследованными ферментами наблюдается во фракции митохондрий и в нейронах и в нейроглии. По-видимому, это важно для жизнеспособности и выживания развивающихся нейронов [15]. Активность ГТ в ядерной и митохондриальной фракциях значительно выше в нейроглии по сравнению с нейронами, в то время как активность ГТ в цитозоле нейронов выше, чем в нейроглии. ГТ является важным регулятором активности Nrf-2 (ядерный-эритроид-связанный фактор 2) [16], который в свою очередь через ARE (антиоксидант-респонсивный элемент) индуцирует экспрессию широкого спектра антиоксидантных ферментов, в том числе связанных с синтезом и метаболизмом глутатиона [17]. Такая картина в период усиленной миелинизации может объясняться необходимостью регуляции антиоксидантного статуса через Nrf-2 не только в нейроглии, но и в нейронах, поскольку непосредственно сами нейроны участвуют в регуляции процессов миелинизации как показано в исследовании Simons и соавт. [18].

Изменения активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у 20-дневных крысят в результате воздействия ПС в виде схемы представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, активность ГПО в митохондриальной фракции нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс ниже по сравнению с контрольной группой. И, если в нейронах это отчасти компенсируется появлением активности ГТ, то в нейроглии активность ГТ снижается в 3 раза. Вероятно, ПС создает сбой в энергетических процессах, что не может не сказаться на про-

Таблица 4. Сравнение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у контрольных крыс в возрасте 90 дней по сравнению с контрольными крысами в возрасте 20 дней

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↑ (27–274)	– (ND–7)	↓ (401–ND)	↑ (6–32)	– (21–29)	↑ (137–898)
ГР	– (ND–ND)	↓ (13–ND)	– (ND–ND)	↑ (14–41)	– (28–36)	– (ND–ND)
ГТ	↓ (7–ND)	↑ (2–6)	– (ND–ND)	↑ (1–13)	↑ (9–25)	↑ (17–79)

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” снижение активности, “↑” увеличение активности, “–” отсутствие изменений, в скобках указаны (А–В), А – значение активности фермента у крыс в возрасте 20 дней, В – значение активности фермента у крыс в возрасте 90 дней. Значения активности ферментов представлено в виде медиан (Ме).

Таблица 5. Сравнение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс в возрасте 90 дней по сравнению с группами пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↓ (305–23)	↑ (9–28)	↑ (ND–164)	↑ (99–197)	↓ (85–62)	↑ (ND–244)
ГР	– (ND–ND)	↑ (11–29)	– (ND–ND)	↑ (22–77)	– (35–43)	– (ND–ND)
ГТ	↓ (8–ND)	↑ (ND–6)	↑ (28–63)	↑ (5–18)	↑ (9–20)	↑ (5–74)

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” снижение активности, “↑” увеличение активности, “–” отсутствие изменений, в скобках указаны (А–В), А – значение активности фермента у крысы в возрасте 20 дней, В – значение активности фермента у крысы в возрасте 90 дней, значения активности ферментов представлено в виде медиан (Ме).

цессах миелинизации у ювенильных крысят и может способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний [19]. При этом в цитозоле нейроглии после ПС активность всех трех исследованных ферментов повышается, а в цитозоле нейронов возрастает только активность ГПО. Можно предположить, что в нейроглии активизируются антиоксидантные механизмы, позволяющие компенсировать негативные последствия ПС в неокортексе. Это подтверждается полученными ранее результатами о неизменном уровне перекисного окисления липидов и окислительных модификаций белка в нейронах и нейроглии [7], а также о менее эффективной глутатионовой системе детоксикации пероксидов нейронов [20] и данными о большей устойчивости к ишемии ювенильных олигодендроцитов [21].

Во фракции ядер нейронов после ПС активность ГТ не выявляется, в то время, как выявляется активность ГПО, что возможно имеет компенсаторный характер. Следует отметить, что и у пренатально стрессированных крысят и у контрольных крысят во фракции ядер нейроглии активность исследованных ферментов выше по сравнению с нейронами (см. табл. 1 и 2). Сходное с контрольными животными распределение активности исследованных ферментов во фракции ядер нейроглии у пренатально стрессированных крыс может свидетельствовать о сохранности механизмов антиок-

сидантной защиты генетического материала этой клеточной популяции.

Чтобы проследить влияние изменений активности исследованных ферментов в критическом для постнатального формирования нейроглиальных взаимоотношений в возрасте (20 дней) на активность данных ферментов у взрослых животных, мы сравнили возрастные изменения отдельно у контрольных и у пренатально стрессированных крыс с использованием полученных нами ранее данных [8], что показано в табл. 4 (контроль) и табл. 5 (ПС).

Как видно из представленных в табл. 4 данных, для контрольных животных характерно значительное снижение с возрастом активности исследованных ферментов в нейронах, за исключением ГПО в цитозоле. Тогда как в нейроглии, напротив, с возрастом увеличивается активность всех изученных антиоксидантных ферментов. Особенно заметно это увеличение для ГПО в цитозоле (в 5 раз) и в митохондриальной фракции (в 6 раз). В работах Галкиной и соавт. [22, 23] было показано, что активность антиоксидантных ферментов глутатионового пула у 20-дневных крысят в мозге ниже, чем у взрослых животных. Авторы связывают это с влиянием данных ферментов на соотношение GSH/GSSG, полагая, что это может являться фактором “переключения” фазы пролиферации и фазы дифференцировки нервных клеток. Одновременно, это может быть связано с

формированием специфических суперкомплексов из комплекса I в митохондриях нейронов и выработке большого количества АФК в глиальных клетках [14].

При рассмотрении возрастной динамики у пренатально стрессированных крыс (табл. 5) обращает на себя внимание снижение у 90-дневных животных активности ГПО в цитозоле нейронов (в 13 раз) и появление активности этого фермента в митохондриальной фракции нейронов (164 нмоль/мин/мг белка), тогда как у пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней активность данного фермента не выявлена. Кроме того, у взрослых (90 дней) пренатально стрессированных животных повышалась активность ГТ во фракции митохондрий нейронов, в то время как в контроле активность этого фермента не выявлялась на обоих сроках развития (см. табл. 4). Таким образом, в нейронах у пренатально стрессированных крыс в процессе созревания наблюдаются разнонаправленные изменения по сравнению с контрольными животными в активности ГПО в цитозоле и митохондриальной фракции.

В цитозоле нейроглии у пренатально стрессированных крыс с возрастом происходит увеличение активности всех изученных ферментов также, как у контрольных крыс. Однако, следует отметить, что, как в возрасте 20, так и 90 дней у пренатально стрессированных крыс в цитозоле нейроглии уровень активности всех исследованных ферментов выше, чем у контрольных животных. При рассмотрении изменений от 20 к 90 дням в нейроглии у контрольных животных видно, что активность ГПО в митохондриальной фракции увеличивается в 6 раз до 898 нмоль/мин/мг белка (табл. 4), тогда как активность этого фермента у пренатально стрессированных животных изменяется от неопределяемых величин до 244 нмоль/мин/мг белка (табл. 5). Одновременно активность ГТ во фракции митохондрий нейроглии у пренатально стрессированных животных достигает значений, сравнимых с контрольными животными в возрасте 90 дней (табл. 5), возрастая в 14.8 раза, тогда как у контрольных животных активность этого фермента, имея более высокий уровень на 20-й день, вырастает к 90-му дню лишь в 4.6 раза (табл. 4). По-видимому, ПС не изменяет программу формирования нейроглиальных комплексов, но обуславливает изменение скорости морфогенетических процессов, что возможно связано с одновременно протекающими процессами дифференцировки, патологическими изменениями и компенсаторными процессами. Как указывается в опубликованных нами ранее работах [6, 7] ПС оказывает наибольшее влияние на свободнорадикальное окисление белков и перекисное окисление липидов в нейронах и нейроглии у 20-дневных животных по сравнению с взрослыми животными. Однако такая перестройка возрастной

динамики окислительной модификации биомолекул может свидетельствовать о процессах адаптации ткани, вынужденной развиваться в условиях многочисленных десинхронозов. При этом драматические перестройки метаболизма в процессе онтогенеза у пренатально стрессированных крыс в результате взаимодействия субклеточных популяций приводят к компенсации патологических изменений по показателям перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в неокортексе у взрослых крыс. Приведенные выше сравнительные данные могут указывать на то, что у пренатально стрессированных животных в значительной степени включаются компенсаторные механизмы антиоксидантной активности как в нейронах, так и в нейроглии. Однако при рассмотрении масштабов этой компенсации можно предположить нарушение функционирования митохондрий у пренатально стрессированных животных, которое не позволяет исследованным антиоксидантным ферментам достичь уровня активности, определяемой у контрольных животных. Постоянное включение компенсаторных механизмов подобного уровня, вероятно, может приводить к более быстрой “изнашиваемости” антиоксидантной системы и, как следствие, к ускоренному старению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что пренатальный стресс приводит к изменению уровня активности глутатионзависимых антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса у крыс в возрасте 20 дней. Анализ таких изменений позволяет сделать вывод о негативном влиянии ПС на процессы постнатального онтогенеза в неокортексе, и предположить, что одной из причин повышенной склонности пренатально стрессированных животных к нейродегенеративным заболеваниям и ускоренному старению являются изменения в активности глутатионзависимых ферментов как в нейронах, так и в нейроглии неокортекса. Для понимания патологических механизмов негативного влияния ПС на ЦНС необходимы исследования функций митохондрий у пренатально стрессированных животных. Дальнейшие исследования в этом направлении могут иметь важное значение для клинической практики при профилактике нейродегенеративных заболеваний и при их лечении митохондриально ориентированной терапией.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, тема № 0134-2019-0002 (65.1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Вклад авторов. Каждый из авторов в равной степени участвовал в планировании эксперимента, анализе литературы, работе с животными, биохимических исследованиях, статистической обработке и обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.*, Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. СПб.: "Десятка", 2007. 240 с.
2. *Дмитриева Н.И.* // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 1981. Т. 17. № 3. С. 287–292.
3. *Rice D., Barone S.* // Environmental Health Perspectives. 2000. V. 108. P. 511–533.
4. *Dennerly P.A.* // Fr. Rad. Biol. & Med. 2010. V. 49. P. 1147–1151.
5. *Thompson L.P. & Al-Hasan Y.* // Journal of Pregnancy. 2000. V. 2012. P. 1–8.
6. *Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В.* // Нейрохимия. 2005. Т. 22. № 2. С. 102–107.
7. *Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В., Притворова А.В.* // Рос. физиол. журнал. 2008. Т. 94. № 4. С. 406–413.
8. *Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Ордян Н.Э.* // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 2. С. 148–152.
9. *Ордян Н.Э., Пивина С.Г.* // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 84. № 1. С. 52–59.
10. *Флеров М.А.* // Вопр. мед. химии. 1978. Т. 24. № 2. С. 174–180.
11. *Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Ордян Н.Э.* // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 4. С. 347–351.
12. *Rao A.R., Quach H., Smith Ed., Vatassery G.T., Rao R.* // Neurosci. Lett. 2014. V. 568. P. 67–71.
13. *Rae C.D., Williams S.R.* // Analytical Biochemistry. 2017. V. 529. P. 127–143.
14. *Vicente-Gutierrez C., Bonora N., Bobo-Jimenez V., Jimenez-Blasco D., Lopez-Fabuel I., Fernandez E., Josephine C.* // Nature Metabolism. 2019. V. 1. P. 201–211.
15. *Lopez-Fabuela I., Le Douceb J., Loganc A., Jamesc A.M., Bonventob G., Murphyc M.P., Almeidad A., Bolañosa J.P.* PNAS. 2016. V. 113. № 46. P. 13063–13068.
16. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* // 2009. Биомед. химия. Т. 155. Вып. 3. С. 255–277.
17. *Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolanos J.P.* // 2012. Biochem. J. V. 443. P. 3–12.
18. *Simons M., Trajkovic K.* // 2006. Journal of Cell Science. V. 119. № 21. P. 4381–4389.
19. *Barateiro A., Brites D., Fernandes A.* // Curr. Pharm. Des. 2016. V. 22. № 6. P. 656–679.
20. *Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J., Hamprecht B.* // J. of Neurochemistry. 1999. V. 72. № 6.
21. *Ahrendsen J.T., Grewal H.S., Hickey S.P., Culp C.M. et al.* // Glia. 2016. V. 64. № 11. P. 1972–1986.
22. *Бахтюков А.А., Галкина О.В., Ещенко Н.Д.* // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 3. С. 215–221.
23. *Галкина О.В., Бахтюков А.А., Ахметшин М.О., Прокопенко В.М., Ещенко Н.Д.* // Нейрохимия. 2017. Т. 34. № 4. С. 263–269.

The Effect of Prenatal Stress on Glutathione-Associated Antioxidant Enzyme Activity in Subcellular Fractions of Neocortical Neurons and Neuroglia of Rats during the Period of Intensive Myelination

A. V. Vyushina^a, A. V. Pritvorova^a, O. G. Semenova^a, and N. E. Ordyan^a

^a Pavlov Institute of Physiology of the RAS, St. Petersburg, Russia

The effect of prenatal stress on the activity of glutathione-associated enzymes in subcellular fractions of neurons and neuroglia from the neocortex of 20-day old male rats (during the period of intensive myelination) was studied. The following changes have been observed in prenatally stressed animals compared to the control. The activity of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in the cytosol and the nuclear fraction of neurons and neuroglia increased but decreased in the mitochondrial fraction. The activity of glutathione reductase (EC 1.8.1.7) increased in the cytosol and in the nuclear fraction of the neuroglia. The activity of glutathione transferase (EC 2.5.1.18) increased in the mitochondrial fraction of neurons and in the cytosol of neuroglia but decreased in the nuclear fraction of neurons and in the mitochondrial fraction of neuroglia. It suggests, that the changes in the activity of the studied enzymes in the subcellular fractions of neocortical neurons and neuroglia in prenatally stressed rats observed at the age 20 days negatively affect the processes of myelination in the neocortex, and may contribute to accelerated aging and development of neurodegenerative diseases in later life.

Keywords: prenatal stress, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, neurons, glia, subcellular fractions, myelinisation