УДК 612.397:159.944.4

Н. А. БАБЕНКО[1], В. М. ШЕВЕРЕВА[1], В. В. ГАРЬКАВЕНКО[1]

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО НЕЙРОГЕННОГО СТРЕССА НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС И СОДЕРЖАНИЕ СФИНГОЛИПИДОВ В МОЗГУ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

Поступила 22.07.15

Изучали содержание церамида и сфингомиелина (СФМ) в гиппокампе, неокортексе и периферических тканях крыс и поведение этих животных в открытом поле в различные периоды после окончания действия хронического нейрогенного стресса. Эксперименты выполнялись на молодых крысах линии Вистар массой 180–220 г со средним уровнем подвижности. В условиях стресса и в постстрессорный период у животных снижались или существенно тормозились проявления двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, усиливались вегетативные проявления страха и тревоги (с задержкой выхода из центра поля). Через сутки после окончания действия стресса содержание церамида в гиппокампе повышалось на фоне снижения уровня СФМ, но этого не происходило в неокортексе, печени и сыворотке крови. Содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в мозгу животных, подвергнутых воздействию стресса, не изменялось. Через восемь суток после окончания действия стресса уровень церамида в изученных структурах мозга и сыворотке крови значительно увеличивался. Полученные данные позволяют полагать, что действие хронического нейрогенного стресса приводит к активации обмена сфинголипидов и усилению продукции церамида в мозгу и сыворотке крови. Накопление церамидов в сыворотке крови в отдаленный период после окончания действия стресса может служить маркером устойчивого развития состояния эмоционального напряжения с характерными признаками поведения, подобного депрессивному.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейрогенный стресс, открытое поле, церамиды, сфингомиелин, гиппокамп, неокортекс, сыворотка крови, печень.

ВВЕДЕНИЕ

Сфинголипиды – один из основных компонентов биологических мембран; кроме реализации барьерной функции, эти соединения играют важную роль в процессах сигнальной трансдукции. Важнейшими представителями сфинголипидов являются церамид и сфингомиелин (СФМ). Церамид (вернее – церамиды) включает в себя группу очень близких по структуре, свойствам и функциям соединений; это сложные эфиры высшего алифатического спирта сфингозина и ряда жирных кислот. СФМ представляет собой фосфолипид, структурными компонентами молекул которого церамиды и фосфорилхолин. Сфинголипиды участвуют в формировании мембранных рафтов и более крупных мембранных платформ и макродоменов, с которыми связаны мембранные белки и рецепторы. Изменение липидного состава рафтов может непосредственно модифицировать аффинность, процессы сигналинга и интернализацию рецепторов [1]. Действие различных стимулов на клетку может вызывать транслокацию лизосомальной кислой сфингомиелиназы (кСФМазы) в плазматические мембраны, деградацию СФМ и накопление другого важного компонента макродоменов – упомянутого выше церамида. Содержание и соотношение СФМ и церамида в клеточных мембранах (в том числе мембранах нейронов) весьма динамичны и могут существенно меняться при действии на орга-

[1] Научно-исследовательский институт биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина (Украина).
Эл. почта: babenko@univer.kharkov.ua (Н. А. Бабенко).

низм различных факторов. Увеличение содержания церамида в мембранах клеток гиппокампа и префронтальной коры на фоне снижения уровня СФМ происходит в условиях действия на организм хронического непредсказуемого стресса (unpredictable stress) [2]. Инъекции в дорсальный гиппокамп С16-церамида имитируют данный эффект непредсказуемого хронического стресса [3]. У трансгенных животных с аномально усиленной экспрессией кСФМазы и повышенной продукцией церамида в гиппокампе наблюдается подавление процессов нейрогенеза, созревания и выживания нейронов [3], что характерно для депрессияподобного состояния (ДПС). Такое состояние в настоящее время выделяется как самостоятельная нозологическая единица и дифференцируется от состояния истинной депрессии, хотя следует признать, что критерии подобного разделения в достаточной степени расплывчаты [4, 5]. В то же время у мышей с дефицитом кСФМазы отмечаются пониженный уровень церамида в гиппокампе и менее выраженные тревожность и характерное для депрессивного состояния поведение [3]. Введение трансгенным животным антидепрессантов (многие из которых являются ингибиторами кСМАазы [6, 7]), отменяет эффекты непредсказуемого хронического стресса [3]. Эти данные указывают на важную роль лизосомальной кСФМазы в накоплении церамида в гиппокампе и формировании вызванного стрессом ДПС у подопытных крыс. В то же время специфический ингибитор нейтральной сфингомиелиназы (нСФМазы) сфинголактон-24 в определенной степени имитирует действие антидепрессантов на организм. Так, подавление активности нСФМазы в Т-клетках ингибирует захват серотонина, индуцированного α-интерфероном [8].

Известно, что важную роль в изменениях уровня церамида в клетках, наряду с СФМазами, играют церамидазы – ферменты, катализирующие деградацию церамида до сфингозина. Однако подавление активности кислой церамидазы с помощью специфичного по отношению к данному энзиму ингибитора LCL385 не влияло на поведение мышей, характерное для ДПС [9]. В то же время у мышей со сниженной экспрессией церамидазы наблюдались подавление процессов нейрогенеза и созревания нейронов и снижение их выживаемости на фоне усиления ДПС [3]. Повышение активности церамидазы может приводить к повышению содержания не только сфингозина, но и его фосфорилированного продукта – сфингозин-1-фосфата (СФ-1Ф). Последний является мощным индуктором нейрогенеза в мозгу [10]. При действии иммобилизационного стресса (restraint stress) в сыворотке крови крыс повышается уровень СФ-1Ф, но не сфингозина [11]. СФ-1Ф может реализовать свое действие, попадая внутрь клетки или связываясь с рецепторами клеточных мембран. Рецепторы 2 СФ-1Ф локализованы в мозгу исключительно в пирамидных и гранулярных нейронах гиппокампа. Для мышей, у которых не экспрессируются эти рецепторы, характерны значительная частота спонтанных судорожных припадков, поведенческие реакции, свидетельствующие о высокой тревожности, и выраженный когнитивный дефицит [12].

Как можно предположить с учетом всего сказанного выше, активация продукции церамида под действием стресса и соответствующие изменения композиции клеточных мембран являются одним из факторов, индуцирующих развитие поведенческих реакций, которые характерны для депрессивного состояния, а последующая активация церамидаз может обусловливать адаптивное снижение уровня церамида и подавление образования СФ-1Ф.

Учитывая важную роль церамида в формировании ДПС у животных и развитии у них когнитивной дисфункции, мы изучали содержание церамида в тканях гиппокампа, неокортекса и периферических тканях крыс, сопоставляя эти показатели с поведением экспериментальных животных в тесте открытого поля в различные периоды после окончания действия хронического нейрогенного стресса.

МЕТОДИКА

Опыты проводили на молодых крысах линии Вистар с массой тела 180–220 г; отобранные экспериментальные животные характеризовались средним уровнем подвижности. Для определения индивидуальных характеристик поведения животных использовали стандартную методику теста открытого поля [13]. Тестирование в открытом поле осуществляли в весенне-летний период в утренние часы (с 9:30 до 10:30); длительность тест-периода составляла 5 мин. Поведение в открытом поле оценивали по показателям горизонтальной (количество пересеченных квадратов) и вертикальной (количество стоек) двигательной активности, количествам «эмоциональных» проявлений (актов дефекации и уринации), количеству выходов в центр поля в пределах периода наблюдения и латентному периоду выхода

из центра поля. У использованных в опытах среднеактивных крыс минимальное и максимальное суммарные количества пересеченных квадратов и стоек за 5 мин тестирования составляли 41 и 79.

Для индукции эмоционально-стрессового состояния применяли несколько модифицированную методику, описанную нами ранее [14]. С целью оценки данного состояния привлекались результаты нейрофизиологических исследований (ЭЭГ с использованием регистрации и классических методов изучения эмоций у животных) [14].

Для индукции нейрогенного стресса крыс на протяжении семи дней подвергали ежедневным сеансам ноцицептивной электростимуляции конечностей в камере с электрифицированным полом (длительность сеанса 1 ч). Использовали переменный ток индустриальной частоты (50 Гц); раздражение проводили по «жестковременно́й» схеме, применяя повторяющиеся эпизоды электростимуляции длительностью по 10 с, разделенные интервалами аналогичной длительности. Интенсивность раздражения подбирали индивидуально для каждого животного; она несколько превышала порог ноцицепции, о чем судили по поведенческим проявлениям.

Содержание липидов в мозгу и периферических тканях животных определяли через 24 ч и восемь суток после окончания действия стресса (количество животных в группе n = 6). Наркотизированных крыс декапитировали, печень и мозг быстро извлекали, зоны гиппокампа и неокортекса выделяли на льду. Экстракцию липидов из печени, сыворотки крови и структур мозга проводили по методу Блая и Даэра [15]. Разделение липидов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil (АО "Сорбполимер", РФ). Для разделения фосфоглицеро- и сфинголипидов использовали системы 1 ($CH_3CH_2OCH_2CH_3$) и 2 ($CHCl_3$:CH_3OH:H_2O, 40:10:1 по объему). Зоны различных липидов на хроматограммах проявляли в парах йода и идентифицировали, сравнивая со стандартами. Содержание фосфолипидов в пробах определяли по методу Бартлета [16]. Для количественного определения содержания церамида в тканях зоны липидов на хроматограммах переносили в пробирки и элюировали смесью хлороформа с метанолом (объемные соотношения 1:1) с последующим элюированием метанолом [17]. Объединенные элюаты выпаривали в вакууме и подвергали гидролизу в 0.5 М растворе HCl в метаноле при 65 °С в течение 15 ч. Содержание церамида определяли согласно высвобождению длинноцепочечных оснований в ходе гидролиза липидов.

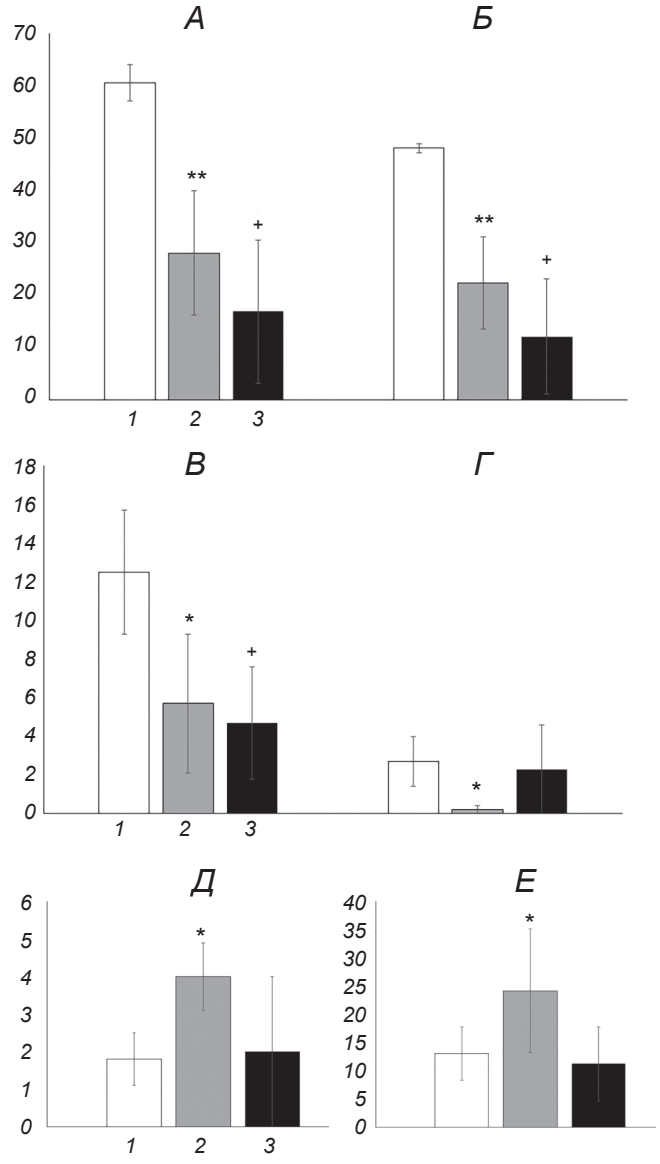
Расчитывали средние значения показателей в группах ± ошибка среднего. Межгрупповые различия оценивали с использованием критериев Стьюдента (*t*) и Вилкоксона–Манна–Уитни (U).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что продолжительный неизбегаемый эмоциональный стресс, который обычно сопровождается состоянием интенсивной тревоги и страха, может приводить к развитию различных соматовегететативных и аффективных нарушений, в том числе выраженного ДПС [14, 18, 19]. Вместе с тем показано, что проявления тех или иных симптомов и синдромов при реактивных состояниях зависят не только от тяжести и продолжительности конфликта, но и от индивидуально-типологических характеристик тестируемых субъектов и экспериментальных животных [18, 20]. Существует мнение, что у крыс со средним уровнем моторной/эмоциональной активности отсутствует определенная заранее заданная стратегия поведения в непривычной для них ситуации, в силу чего данные животные более восприимчивы к стрессу по сравнению с крысами крайних типов поведения (низко- и высокоактивных) [21]. Учитывая сказанное выше, наши эксперименты были выполнены на животных со средним уровнем подвижности.

Результаты исследования поведения крыс в открытом поле через сутки после прекращения периода стрессирования показали, что у части животных, выделенных в отдельную группу, семидневный нейрогенный стресс обусловливал существенное снижение двигательной активности (уменьшалось количество и горизонтальных перемещений, и стоек) (рис. 1, *А*) или даже приводил к почти полному торможению моторики (горизонтальной и вертикальной) (*Б, В*). У данных крыс отмечались выраженные тенденции к уменьшению количества выходов в центр поля (*Г*) и повышению уровня «эмоциональных» феноменов (числа актов дефекации и уринации) (*Д*). Следствием стресса также было умеренное увеличение времени выхода из центра поля (*Е*).

На восьмой день после прекращения стрессирования поведение крыс в открытом поле в целом существенно не отличалось, согласно соответствующим показателям, от их поведения через сутки после прекращения действия стресса. В ходе это-

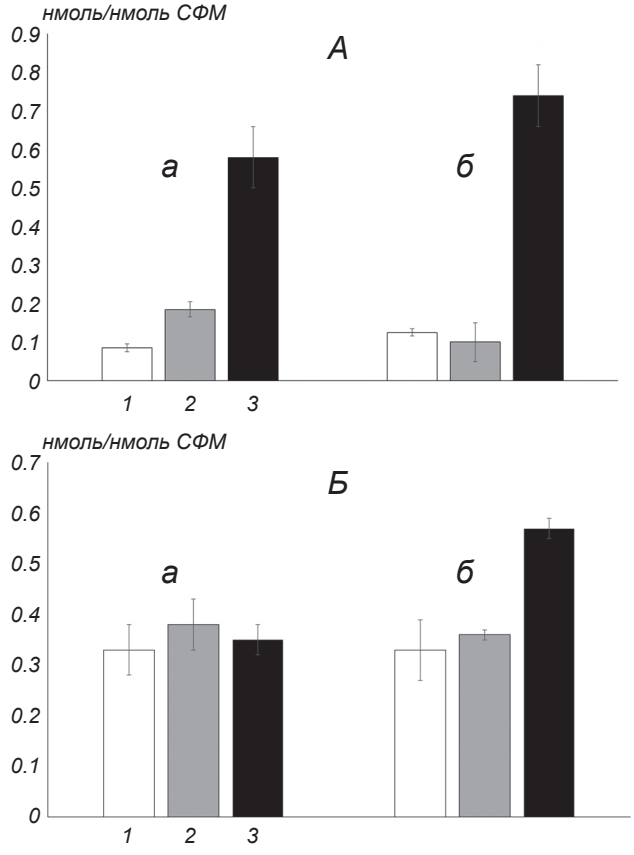


Р и с. 1. Изменения показателей поведения крыс в тесте открытого поля после хронического нейрогенного стресса.
А – общая моторная активность (количество пересеченных квадратов + количество стоек в пределах периода наблюдения); *Б* – количество пересеченных квадратов; *В* – количество стоек; *Г* – количество выходов в центр поля; *Д* – количество эмоциональных проявлений (актов дефекации и уринации); *Е* – латентный период выхода из центра поля. *1* – контрольное значение (до начала стрессирования), *2* – показатели через одни сутки и *3* – на восьмой день после прекращения стрессирования. Показаны средние значения ± среднеквадратическое отклонение. Звездочками отмечены случаи достоверных различий между значениями в группах 1 и 2, крестиками – в группах 2 и 3 (* и $^{+}P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Р и с. 1. Зміни показників поведінки щурів у тесті відкритого поля після хронічного нейрогенного стресу.

го (восстановительного) периода показатели двигательной активности (горизонтальных перемещений и стоек) (рис. 1, *А–В*) почти совпадали с таковыми непосредственно после стресса. Число актов дефекации и уринации (*Д*), число выходов в центр поля (*Г*) и время выхода из центра поля (*Е*) в той или иной степени приближались к значениям, наблюдаемым через 24 ч после окончания стрессирования, и отличия от упомянутых выше характеристик не достигали уровня достоверности.

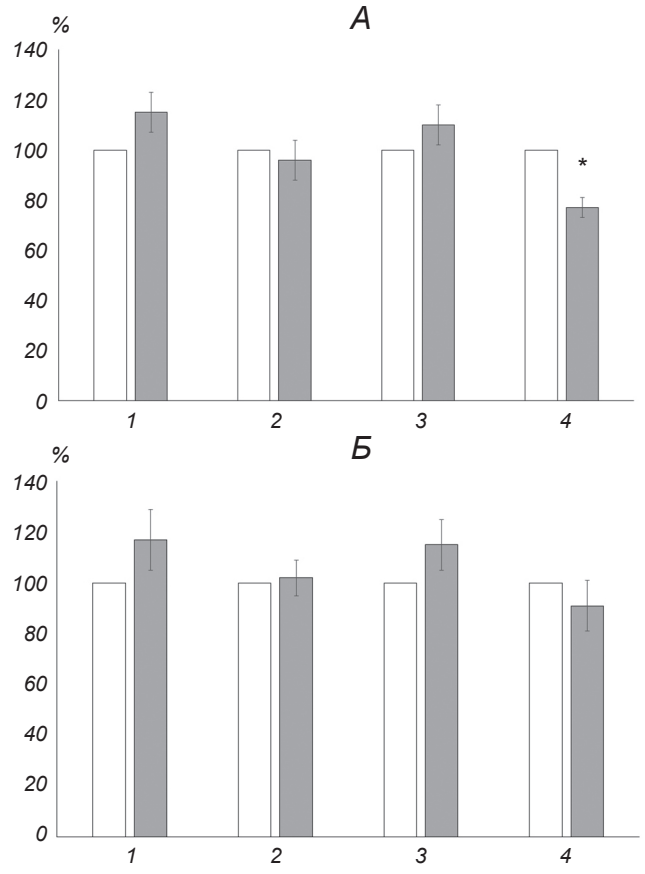
Мы измеряли содержание липидов в мозгу и периферических тканях через сутки и на восьмой день после прекращения действия стресса. Опре-



Р и с. 2. Влияние хронического нейрогенного стресса на содержание церамидов в структурах мозга – *А* (*а* – в гиппокампе, *б* – в неокортексе) и периферических тканях – *Б* (*а* – в печени, *б* – в сыворотке крови) крыс.
Приведены значения среднего ± ошибка среднего. Звездочками отмечены случаи статистически значимых различий при сравнении с контролем ($P < 0.05$). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Вплив хронічного нейрогенного стресу на вміст церамідів у структурах мозку – *А* (*а* – в гіпокампі, *б* – у неокортексі) і периферичних тканинах – *Б* (*а* – в печінці, *б* – у сироватці крові) щурів.

деления проводили в тканях изолированных гиппокампа, неокортекса и печени и в сыворотке крови крыс. Оказалось, что на следующий день после прекращения действия стресса существенных изменений содержания общих фосфолипидов (ОФЛ), фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в гиппокампе (рис. 2, *А*) и неокортексе (*Б*) по сравнению с соответствующими показателями у контрольных животных не происходило. В то же время в пределах восстановительного периода у животных отмечались значительное повышение содержания церамида (рис. 3, *А*) и снижение уровня СФМ (рис. 2, *А*) в гиппокампе. Содержание этих сфинголипидов в неокортексе (рис. 3, *А)* и содержание церамида в печени и сыворотке крови (рис. 2б *Б*) не демонстрировали значительных отклонений. На восьмой день после прекращения действия стресса уровень церамида как в гиппокампе, так и в неокортексе повышался в шесть раз (*А*), а в сыворотке крови – на 70 %. В то же время данный показатель в печени (*Б*) не демонстрировал достоверных отличий от такового у контрольных животных.



Р и с. 3. Влияние хронического нейрогенного стресса на нормированные значения содержания фосфоглицеролипидов и сфингомиелина в гиппокампе (*А*) и неокортексе (*Б*) крыс.
Белые столбцы – контроль (до стрессирования), серые – через одни сутки после прекращения действия семидневного стресса; за 100 % во всех случаях приняты контрольные значения. *1–4* – общие уровни фосфолипидов, уровни фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина соответственно. Звездочкой отмечен случай статистически значимого различия при сравнении с контролем ($P < 0.05$).

Р и с. 3. Вплив хронічного нейрогенного стресу на нормовані значення вмісту фосфогліцероліпідів і сфінгомієліну в гіпокампі (*А*) та неокортексі (*Б*) щурів.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стресс является важным фактором риска для развития различных патологических состояний, в частности болезни Альцгеймера и депрессивных состояний. При хроническом воздействии стресса происходят существенные нарушения памяти, способности к обучению, эмоциональных реакций и развитие состояния, квалифицируемого как ДПС. На модели такого состояния, вызванного хроническим воздействием на мышей непредсказуемого стресса, было установлено, что наряду с изменением поведения животных при этом происходят существенные нарушения содержания важных липидных компонентов мембран церебральных нейронов [2, 22]. Индуцированные стрессом изменения композиции липидов, в первую очередь, касаются липидов, участвующих в процессах сигнальной трансдукции, – фосфатидилинозитола и церамида, а также основных фосфолипидов мембран – ФХ и ФЭА. Снижение в мозгу соотношения ФХ/ФЭА, индуцированное влиянием фолатдефицитной диеты, приводит к когнитивной дисфункции [23]. Увеличение уровня церамида в структурах мозга после интрагиппокампального введения экзогенного церамида имитирует эффекты стресса [3]. В экспериментах на животных подавление деградации СФМ и снижение продукции церамида в мозгу, обусловленное действием антидепрессантов и ингибиторов кСФМазы, в частности амитриптилина и флуокситина, препятствовало развитию ДПС. Авторы цитированной работы приходят к заключению, что кСФМаза играет ключевую роль в накоплении церамида и развитии ДПС, индуцированных непредсказуемым стрессом.

В настоящей работе особенности поведения животных в открытом поле непосредственно после хронического стрессирования и в постстрессорный

восстановительный период (снижение или полное торможение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, усиление вегетативных проявлений страха и тревоги, отражающееся в задержках выхода из центра поля) свидетельствовали об устойчивом развитии у данных крыс состояния эмоционального напряжения и перенапряжения с характерными признаками поведения, свойственными ДПС [14, 18, 19].

У животных с поведенческими проявлениями отмеченного выше типа в тесте открытого поля мы изучали особенности содержания сфинголипидов и фосфоглицеролипидов в тканях гиппокампа, неокортекса и печени и в сыворотке крови.

Как оказалось, через 24 ч после прекращения действия стресса содержание церамида в гиппокампе было существенно повышенным по сравнению с таковым у контрольных животных, но подобных резких сдвигов в неокортексе и периферических тканях не происходило. Уровни ОФЛ, ФХ и ФЭА в изученных структурах мозга в группе опытных крыс в общем мало отличались от соответствующих индексов у контрольных животных. В то же время содержание СФМ в гиппокампе стрессированных крыс явно падало по сравнению с контролем, тогда как в коре мозга оно почти не изменялось.

Полученные данные свидетельствуют о том, что примененный в данной работе вид хронического стресса оказывает специфическое влияние на композицию липидов в мембранах клеток гиппокампа, причем эти изменения касаются преимущественно сфинголипидов. Учитывая то, что СФМ является субстратом СФМаз, активация которых приводит к гидролизу сфинголипидов и высвобождению церамида и фосфорилхолина, и тот факт, что увеличение отношения церамид/СФМ указывает на повышение активности СФМаз, можно предположить, что в настоящих условиях эксперимента под действием стресса происходила активация СФМаз, причем это происходило в значительной мере специфически в такой структуре мозга, как гиппокамп. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о том, что через 24 ч после прекращения действия стресса резких изменений содержания церамида в печени и сыворотке крови не наблюдалось. Эти данные позволяют исключить возможность активации под действием стресса продукции церамида в печени и его транспорта вместе с липопротеинами в мозг. В то же время в отдаленный период после прекращения действия стресса содержание церамида в гиппокампе, неокортексе и сыворотке крови было существенно повышенным; при этом в печени подобного сдвига не наблюдалось.

Известно, что индуцированное хроническим стрессом повышение уровня катехоламинов и глюкокортикоидов сопровождается развитием в организме оксидативного стресса и прогрессирующим развитием ДПС [24], а также усилением продукции провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1β и фактора некроза опухолей α [25]. Последние агенты активируют в клетках как кислую, так и нейтральную СФМазу (нСФМазу) [26–28]. В условиях действия непредсказуемого стресса, при котором животные подвергаются продолжительному воздействию стрессоров различной природы, развивается стойкое депрессивное состояние. Это происходит на фоне снижения отношения окисленный/восстановленный глутатион и усиления перекисного окисления липидов как в мозгу, так и в периферических тканях [22]. Известно, что глутатион является сильным эндогенным ингибитором нСФМазы; снижение его содержания в ткани гиппокампа и неокортекса может приводить к активации нСФМазы и повышению уровня церамида в тканях мозга [29]. В то же время введение старым животным предшественника глутатиона N-ацетилцистеина вызывает повышение в мозгу содержания глутатиона, а также подавление активности нСФМазы в коре и гиппокампе [29]. При этом когнитивные функции у крыс существенно улучшаются [30]. С учетом приведенных данных можно полагать, что под действием хронического нейрогенного стресса происходит активация нСФМазы, а это обусловливает существенное изменение отношения церамид/СФМ в гиппокампе.

Под действием оксидативного стресса на клетки происходят транслокация лизосомальной кСФМазы на наружную поверхность плазматических мембран данных клеток, интенсификация гидролиза СФМ и усиление продукции церамида [31]. Строгие доказательства ключевой роли лизосомальной кСФМазы в реализации действия различных стрессорных факторов на клетки и ткани были получены в экспериментах на нокаутных по кСФМазе мышах [31]. Установлено, что животные, у которых не экспрессируется кСФМаза, резистентны к действию таких стрессорных стимулов, как Fas-лиганд, ионизирующее облучение, липополисахариды, противоопухолевые препараты и фактор некроза опухолей α. Важным обстоятельством представляется то, что для генетической модели недостаточно-

сти кСФМазы характерно отсутствие экспрессии как лизосомальной, так и секретируемой в кровь кСФМазы. Мишенью секретируемой СФМазы является СФМ липопротеинов крови. Активность этого пула СФМазы в сыворотке крови повышается в условиях развития ряда патологических состояний (диабета, патологий миокарда), под действием ионизирующей радиации и провоспалительных цитокинов. Активность секретируемой СФМазы и содержание церамида в сыворотке крови пациентов существенно повышаются в условиях посттравматического стресса, который часто приводит к развитию депрессии [32]. Учитывая упомянутые данные и результаты настоящей работы, можно предположить, что в отдаленный период после окончания действия стресса секреция кСФМазы и ее поступление в кровь усиливаются; это сопровождается возрастанием продукции церамидов и усилением их транспорта в мозг. Однако в более ранний период (через сутки после прекращения действия стресса) активация СФМаз в гиппокампе по-видимому усиливается, что и приводит к деградации СФМ и накоплению церамида в указанной структуре мозга.

Таким образом, было показано, что хронический нейрогенный стресс, примененный в настоящей работе, вызывает существенную активацию обмена сфинголипидов в гиппокампе и периферических тканях. Учитывая то, что у стрессированных животных повышается отношение церамид/СФМ и падает содержание субстрата СФМаз (СФМ), можно полагать, что в данных условиях эксперимента происходит активация СФМаз. Существенное накопление церамида (церамидов) в сыворотке крови и мозгу в отдаленный период после окончания действия стресса может служить одним из биохимических маркеров устойчивого развития значительного эмоционального напряжения с характерными признаками ДПС.

Авторы выражают благодарность Е. Г. Шаховой за техническую помощь в проведении экспериментов.

Все исследования на животных проводили с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1985), и национальных Общих этических принципов экспериментов на животных (Украина, 2001).

Авторы настоящей работы – Н. А. Бабенко, В. М. Шеверева и В. В. Гарькавенко – подтверждают, что в ходе исследования не возникали конфликты любого рода, касающиеся коммерческих или финансовых отношений, отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с исследованием, и взаимоотношений соавторов статьи.

Н. О. Бабенко[1], В. М. Шеверьова[1], В. В. Гарькавенко[1]

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО НЕЙРОГЕННОГО СТРЕСУ НА ПОВЕДІНКУ ЩУРІВ І ВМІСТ СФІНГОЛІПІДІВ У МОЗКУ ТА ПЕРИФЕРИЧНИХ ТКАНИНАХ

[1] Науково-дослідний інститут біології Харківського національного університету ім. В. М. Каразіна (Україна).

Р е з ю м е

Вивчали вміст цераміду та сфінгомієліну (СФМ) у гіпокампі, неокортексі і периферичних тканинах щурів та поведінку цих тварин у відкритому полі в різні періоди після закінчення дії хронічного нейрогенного стресу. Експерименти виконувалися на молодих щурах лінії Вістар масою 180–220 г із середнім рівнем рухливості. В умовах стресу і в постстресорний період у тварин знижувались або істотно гальмувалися прояви рухової та орієнтувльно-досліджувальної активності, посилювалися вегетативні прояви страху і тривоги (із затримкою виходу із центра поля). Через добу після закінчення дії стресу вміст цераміду в гіпокампі підвищувався на тлі зниження рівня СФМ, проте цього не відбувалось у неокортексі, печінці та сироватці крові. Вміст фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну в мозку тварин, яких піддавали дії стресу, не змінювався. Через вісім діб після закінчення дії стресу рівень цераміду у вивчених структурах мозку та сироватці крові значно збільшувався. Отримані дані дозволяють вважати, що дія хронічного нейрогенного стресу призводить до активації обміну сфінголіпідів і посиленню продукції цераміду в мозку та сироватці крові. Накопичення церамідів у сироватці крові у віддалений період після закінчення дії стресу може слугувати маркером стійкого розвитку стану емоційної напруги з характерними ознаками поведінки, подібної до депресивної.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Ramstedt and J. P. Slotte, “Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains,” *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, No. 12, 1945-1956 (2006).
2. T. G. Oliveira, R. B. Chan, F. V. Bravo, et al., “The impact of chronic stress on the rat brain lipidome,” *Mol. Psychiat.* (2015), doi:10.1038/mp.2015.14.
3. E. Gulbins, M. Palmada, M. Reichel, et al., “Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs,” *Nat. Med.,* **19**, No. 7, 934-938 (2013).
4. V. Krishnan and E. J. Nestler, “The molecular neurobiology of depression,” *Nature,* **455**, No. 7215, 894-902 (2008).

5. L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, et al., "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants," *Science,* **301**, No. 5634, 805-809 (2003).
6. J. Kornhuber, J. Muehlbacher, S. Trapp, et al., "Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase," *PloS One,* **6**, No. 8, e23852 (2011), doi:10.1371/journal.pone.0023852.
7. J. Kornhuber, P. Tripal, M. Reichel, et al., "Functional Inhibitors of acid sphingomyelinase (FIASMAs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications," *Cell. Physiol. Biochem.,* **26**, No. 1, 9-20 (2010).
8. H.-C. Su, C.-T. Ma, C.-F. Lin, et al., "The acid sphingomyelinase inhibitors block interferon-α-induced serotonin uptake via a COX-2/Akt/ERK/STAT-dependent pathway in T cells," *Int. Immunopharmacol.,* **11**, No. 11, 1823-1831 (2011).
9. Z. Nahas, Y. Jiang, Y. H. Zeidan, et al., "Anti-ceramidase LCL385 acutely reduces BCL-2 expression in the hippocampus but is not associated with an increase of learned helplessness in rats," *Behav. Brain Res.,* **197**, No. 1, 41-44 (2009).
10. G. Anderson and M. Maes, "Reconceptualizing adult neurogenesis: role for sphingosine-1-phosphate and fibroblast growth factor-1 in co-ordinating astrocyte-neuronal precursor interactions," *CNS Neurol. Disord. Drug Targets,* **13**, No. 1, 126-136 (2014).
11. S. Jang, S. H. Suh, H. S. Yoo, et al., "Changes in iNOS, GFAP and NR1 expression in various brain regions and elevation of sphingosine-1-phosphate in serum after immobilized stress," *Neurochem. Res*., **33**, No. 5, 842-851 (2008).
12. N. Akahoshi, Y. Ishizaki, H. Yasuda, et al., "Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2," *Epilepsy Behav.,* **22**, No. 4, 659-665 (2011).
13. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991).
14. В. М. Шеверева, "Особенности формирования и обратимости эмоциональных нарушений у крыс при нейрогенном стрессе", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **35**, № 2, 147-158 (2003).
15. E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A rapid method of total lipid extraction and purification," *Can. J. Biochem. Physiol.,* **37,** No. 8, 911-917 (1959).
16. G. R. Bartlett, "Phosphorus assay in column chromatography," *J. Biol. Chem*., **234**, No. 3, 466-468 (1959).
17. S. Sathishkumar, B. Boyanovsky, A. Karakashian, et al., "Elevated sphingomyelinase activity and ceramide concentration in serum of patients undergoing high dose spatially fractionated radiation treatment: implications for endothelial apoptosis," *Cancer Biol. Ther*., **4**, No. 9, 979-986 (2005).
18. Н. Н. Дубровина, "Угашение памяти о страхе в экспериментальных моделях депрессии", *Успехи физиол. наук*, **42**, № 1, 53-66 (2011).
19. Д. Ф. Августинович, О. В. Алексеенко, И. В. Бакштановская и др., "Динамические изменения серотонинергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование", *Успехи физиол. наук*, **35**, № 4, 19-40 (2004).
20. В. М. Шеверьова, "Вплив хронічного емоційного стресу на поведінку в тесті «відкритого поля» щурів із різним рівнем рухової активності", *Фізіол. журн*., **51**, № 1, 94-105 (2011).
21. В. Н. Семагин, А. В. Зухарь, М. А. Куликов, *Тип нервной системы, стрессоустойчивость и репродуктивная функция*, Наука, Москва (1988).
22. R. Faria, M. M. Santana, C. A. Aveleira, et al., "Alterations in phospholipidomic profile in the brain of mouse model of depression induced by chronic unpredictable stress," *Neuroscience,* **273**, 1-11 (2014).
23. A. M. Troen, W. H. Chao, N. A. Crivello, et al., "Cognitive impairment in folate-deficient rats corresponds to depleted brain phosphatidylcholine and is prevented by dietary methionine without lowering plasma homocysteine," *J. Nutr*., **138**, No. 12, 2502-2509 (2008).
24. T. M. Michel, D. Pülschen, and J. Thome, "The role of oxidative stress in depressive disorders," *Current Pharm. Des*., **18**, No. 36, 5890-5899 (2012).
25. A. H. Miller, "Depression and immunity: a role for T cells?" *Brain, Behav., Immunol*., **24**, No. 1, 1-8 (2010).
26. D. Wheeler, E. Knapp, V. V. Bandaru, et al., "Tumor necrosis factor-alpha-induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors," *J. Neurochem*., **109**, No. 5, 1237-1249 (2009).
27. N. Sanvicens and T. G. Cotter, "Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells," *J. Neurochem*., **98**, No. 5, 1432-1444 (2006).
28. N. A. Babenko, L. K. Hassouneh, V. S. Kharchenko, et al., "Vitamin E prevents the age-dependent and palmitate-induced disturbances of sphingolipid turnover in liver cells," *Age*, **34**, No. 4, 905-915 (2012).
29. N. A. Babenko and E. G. Shakhova, "Long-term food restriction prevents aging-associated sphingolipid turnover dysregulation in the brain," *Arch. Gerontol., Geriat*., **58**, No. 3, 420-426 (2014).
30. N. A. Babenko and O. G. Shakhova, "Effect of an inhibitor of sphingomyelinases, n-acetylcysteine, on cognitive functions in old rats," *Neurophysiology*, **46**, No. 2, 180-182 (2014).
31. R. W. Jenkins, D. Canals, and Y. A. Hannun, "Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase," *Cell. Signal.,* **21**, No. 6, 836-846 (2009).
32. S. M. Hammad, J. P. Truman, M. Al Gadban, et al., "Altered blood sphingolipidomics and elevated plasma inflammatory cytokines in combat veterans with post-traumatic stress disorder," *Neurobiol. Lipids*, **10**, 2 (2012).