КАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНИКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

БАЛАЦЬКИЙ ВІТАЛІЙ АНДРІЙОВИЧ

УДК 577.23:616.891.6:159.944.4]:619:612.1:599.323.41(043.5)

Дисертація

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ОКСИДАТИВНИМ СТРЕСОМ І ЗАПАЛЕННЯМ У МИШАЧІЙ МОДЕЛІ ПОСТТРАВМАТИЧНОГО СТРЕСОВОГО РОЗЛАДУ

Спеціальність 091 Біологія
Галузь знань 09 Біологія

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____В.А. Балацький

Науковий керівник: Лущак Володимир Іванович доктор біологічних наук, професор.

Івано-Франківськ – 2026

АНОТАЦІЯ

Балацький В.А. Взаємозв'язок між оксидативним стресом і запаленням у мишачій моделі посттравматичного стресового розладу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Карпатський національний університет імені Василя Стефаника, Міністерство освіти і науки України, Івано-Франківськ, 2026.

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) – це хронічний психічний розлад, що виникає внаслідок впливу травматичних стресових чинників і супроводжується стійкими порушеннями емоційного стану, поведінкових реакцій та когнітивних функцій. ПТСР є поширеним розладом близько 3,9% населення світу пережили цей розлад, а загалом шанс його розвитку після переживання травматичної події становить за різними даними близько 10%. ПТСР є серйозною медико-соціальною проблемою, зокрема серед осіб, які зазнали насильства, техногенних катастроф, бойових дій або інших екстремальних подій.

Для вивчення патофізіологічних основ ПТСР широко застосовуються тваринні моделі, що дозволяють відтворювати різні типи стресових чинників і досліджувати їхній вплив на поведінкові реакції, нейробіологічні процеси, запалення та оксидативний стрес. У таких моделях використовують різні стресори фізичної, психологічної та комбінованої природи, які імітують травматичний досвід.

Водночас, незважаючи на значну кількість експериментальних досліджень, механізми розвитку ПТСР залишаються недостатньо з’ясованими. Зокрема, досі не повністю досліджено, які саме біохімічні та поведінкові зміни індукуються травматичними чинниками різної природи, а також яким чином ці зміни залежать від типу, інтенсивності та часу стресового впливу.

Дисертація присвячена вивченню поведінкових, біохімічних та молекулярно-біологічних змін, які виникають у мишей під впливом різних типів

стресових чинників, дія яких імітує розвиток симптомів ПТСР. З огляду на зростання поширеності ПТСР внаслідок збільшення кількості екстремальних подій, таких як війни, пандемії та соціальні кризи, вивчення механізмів цього розладу набуває особливої актуальності.

Метою роботи було дослідити взаємозв'язок між оксидативним стресом, запальними процесами та поведінковими змінами у мишачих моделях посттравматичного стресового розладу, індукованого різними типами стресових чинників.

Для моделювання ПТСР застосовували низку стресорів: тривалу соціальну ізоляцію (5 місяців), імобілізацію (2 години, гострий стрес), електростимуляцію стопи, звук хижака та одноразовий тривалий стрес, який включав комбінацію знерухомлення (2 години) та примусового плавання (10 хвилин), після яких миші піддавались впливу диетилового ефіру до втрати свідомості. Мишей евтаназували через два місяці після дії стресу. Поведінкові та біохімічні показники оцінювали у мишей через короткі (2 тижні) та тривалі (до 5 місяців) інтервали після впливу стресору. Комплексний підхід дав змогу проаналізувати довготривалі наслідки дії різних стресових чинників з врахуванням вікових та статевих особливостей тварин.

Поведінкові порушення у мишей оцінювали за допомогою тесту відкритого поля, піднесеного плюс лабіринту, тесту на перевагу сахарози та тесту спонтанного чергування в Т-лабіринті. Біохімічні аналізи охоплювали визначення активності антиоксидантних ферментів (каталази, супероксиддисмутази, глютатіонпероксидази тощо), рівнів пероксидів ліпідів, а також маркерів запалення у крові, печінці та мозку. Окрім того, визначали активність параоксонази (ПОН) та мієлопероксидази (МПО) та рівень інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β) у крові. Додатково застосовували методи ПЛР у реальному часі для аналізу експресії генів, які пов'язані зі стресом, запаленням і редокс-гомеостазом у корі головного мозку.

На першому етапі дослідження було проаналізовано довготривалі ефекти фізичних, соціальних і психологічних стресорів, зокрема знерухомлення, впливу

звуку хижака та соціальної ізоляції, з оцінкою наслідків у віддалені терміни (до 5 місяців). Показано, що найбільш виражені поведінкові зміни, подібні до симптомів посттравматичного стресового розладу, формуються за дії соціальної ізоляції та звуку хижака і проявляються зниженням дослідницької активності, підвищеною тривожністю та уникненням відкритих просторів.

Встановлено, що ці зміни супроводжуються активацією запальної відповіді (зростання рівня ІЛ-1β), змінами гематологічних показників та пригніченням антиоксидантної системи, що проявляється зниженням активності відповідних ферментів у крові (МПО, ПОН). При цьому хронічний соціальний стрес викликає більш виражені імунні зрушення порівняно з гострими впливами, тоді як усі типи стресорів супроводжуються зниженням редокс-потенціалу організму та ознаками оксидативного стресу. Окрім того показано що у корі головного мозку жодної різниці у активності ферментів антиоксидантного захисту та кількості пероксидів ліпідів виявлено не було. Аналіз експресії генів у корі головного мозку методом ПЛР у реальному часі показав, що стресові впливи супроводжуються специфічними змінами транскриптів генів, пов’язаних із регуляцією стресової відповіді, запалення та метаболізму. Зокрема, виявлено підвищення рівнів мРНК генів *SGK1*, *PPARGC1A* та *SHANK1*, які залучені до глюкокортикоїдної сигналізації та енергетичного метаболізму, а також збільшення експресії *FKBP5* за умов хронічного соціального стресу. Водночас спостерігалося зниження експресії генів, пов’язаних з імунною відповіддю та детоксикаційними процесами, зокрема *CCL2* і *CYP1A1*. Отримані дані свідчать, що стрес індукує довготривалі зміни транскрипційної регуляції, пов’язані з активацією глюкокортикоїд-залежних механізмів та перебудовою метаболічних і запальних процесів у мозку.

На другому етапі роботи досліджено вікові та статеві особливості впливу одноразового тривалого стресу на поведінкові, гематологічні та біохімічні показники у мишей. Показано, що реакція на стрес суттєво залежить від віку та статі тварин: молоді самці демонструють виражену тривожну поведінку, тоді як у молодих самок і старих самців більшою мірою порушуються когнітивні

функції, зокрема пам’ять. Отримані результати свідчать про диференційовану чутливість поведінкових і метаболічних систем до стресу, що визначає варіабельність проявів ПТСР-подібних станів. Це вказує на існування різних механізмів нейробіологічної адаптації до стресу, які залежать від вікових та статевих особливостей організму і можуть визначати індивідуальну чутливість до розвитку ПТСР-подібних станів.

На третьому етапі роботи вивчено поведінкові та метаболічні ефекти стресу, індукованого електричною стимуляцією, якої тварини могли уникнути. Цей експеримент проводився за наступним протоколом: на 0 та 1 дні експерименту миші піддавались ударам лап електричним струмом, які передавались через підключену до генератора електричних стимулів металеву сітчасту підлогу. Сила струму становила 0.8 мА, тривалість процедури з адаптацією мишей до клітки становила 8 хвилин. Кількість ударів струмом 15, тривалість та інтервали між ударами становили 10 секунд. Окрім того камера була обладнана двома паралельно розташованими ізоляційними планками для надання мишам можливості уникнення частини стимулів. Встановлено, що навіть короткочасний вплив такого стресора призводить до незначних порушень метаболічного гомеостазу, зокрема змін рівнів глюкози, триацилгліцеролів і білка, які супроводжуються розвитком поведінкових порушень. Проте ці порушення не настільки сильно виражені як при неконтрольованих стресах, тому можна зробити висновок, що можливість уникання стресу позитивно впливає на загальний стан організму.

Таким чином, протестовані моделі ПТСР у мишей показують не лише поведінкові, а й глибокі метаболічні та молекулярні порушення. Отримані результати свідчать, що ключову роль у формуванні ПТСР-подібних станів відіграє взаємодія між оксидативним стресом і запальними процесами, які можуть взаємно потенціювати один одного. Виявлені зміни мають системний характер і охоплюють як периферичні тканини, так і центральну нервову систему. Результати роботи підтверджують важливу роль порушення редокс-гомеостазу у патогенезі ПТСР та можуть слугувати основою для подальших

досліджень механізмів нейропротекції та адаптації організму до дії стресових чинників.

Ключові слова: посттравматичний стресовий розлад (ПТСР), миші, поведінкові тести, тривожність, запалення, оксидативний стрес, антиоксидантні ферменти, експресія генів, головний мозок, енергетичний метаболізм, біохімія крові, гематологія, карбонільні групи білків, відповідь на стрес, статеві та вікові відмінності.

ANNOTATION

Balatskyi V.A. The relationship between oxidative stress and inflammation in a mouse model of post-traumatic stress disorder. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 Biology. – Vasyl Stefanyk Carpathian National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Ivano-Frankivsk, 2026.

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a chronic mental disorder that arises as a result of exposure to traumatic stressors and is accompanied by persistent disturbances in emotional state, behavioral reactions, and cognitive functions. PTSD is a common disorder; approximately 3.9% of the world's population has experienced it, and overall, the likelihood of developing it after experiencing a traumatic event is approximately 10%, according to various sources. PTSD is a serious medical and social problem, particularly among individuals who have experienced violence, man-made disasters, combat, or other extreme events.

Animal models are widely used to study the pathophysiological basis of PTSD, as they allow for the recreation of various types of stressors and the investigation of their impact on behavioral responses, neurobiological processes, inflammation, and oxidative stress. These models employ various physical, psychological, and combined stressors that mimic traumatic experiences.

At the same time, despite a significant number of experimental studies, the mechanisms underlying PTSD development remain poorly understood. In particular, it

has not yet been fully investigated which specific biochemical and behavioral changes are induced by traumatic factors of various types, nor how these changes depend on the type, intensity, and duration of the stressor.

This dissertation is dedicated to studying the behavioral, biochemical, and molecular biological changes that occur in mice under the influence of various types of stressors, the effects of which mimic the development of PTSD symptoms. Given the rising prevalence of PTSD due to an increase in extreme events such as wars, pandemics, and social crises, studying the mechanisms of this disorder is of particular relevance.

The aim of this study was to investigate the relationship between oxidative stress, inflammatory processes, and behavioral changes in mouse models of post-traumatic stress disorder induced by various types of stressors.

To model PTSD, a series of stressors were applied: prolonged social isolation (5 months), immobilization (2 hours, acute stress), foot electrostimulation, predator sounds, and a single prolonged stressor involving a combination of immobilization (2 hours) and forced swimming (10 minutes), after which the mice were exposed to diethyl ether until loss of consciousness. The mice were euthanized two months after the stressor was applied. Behavioral and biochemical parameters were assessed in the mice at short (2 weeks) and long (up to 5 months) intervals following stressor exposure. This comprehensive approach allowed us to analyze the long-term effects of various stressors, taking into account the animals' age and sex.

Behavioral abnormalities in the mice were assessed using the open-field test, the elevated plus maze, the sucrose preference test, and the spontaneous alternation test in the T-maze. Biochemical analyses included the determination of antioxidant enzyme activity (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, etc.), lipid peroxide levels, and markers of inflammation (IL-1β) in blood and liver. In addition, the activity of paraoxonase (PON) and myeloperoxidase (MPO) in the blood was determined. Furthermore, real-time PCR methods were used to analyze the expression of genes associated with stress, inflammation, and redox homeostasis in the cerebral cortex.

In the first phase of the study, the long-term effects of physical, social, and psychological stressors—specifically immobilization, predator sounds, and social isolation—were analyzed, with an assessment of the long-term consequences (up to 5 months). It was shown that the most significant behavioral changes, similar to symptoms of post-traumatic stress disorder, develop under the influence of social isolation and predator sounds and manifest as reduced exploratory activity, increased anxiety, and avoidance of open spaces.

It was established that these changes are accompanied by activation of the inflammatory response (increased IL-1β levels), changes in hematological parameters, and suppression of the antioxidant system, manifested by a decrease in the activity of the corresponding enzymes in the blood (MPO, PON). At the same time, chronic social stress causes more pronounced immune shifts compared to acute stressors, while all types of stressors are accompanied by a decrease in the body's redox potential and signs of oxidative stress. Furthermore, it was shown that no differences in the activity of antioxidant defense enzymes or the levels of lipid peroxides were detected in the cerebral cortex. Analysis of gene expression in the cerebral cortex using real-time PCR revealed that stressors are accompanied by specific changes in the transcripts of genes involved in the regulation of the stress response, inflammation, and metabolism. In particular, increased levels of mRNA for the *SGK1*, *PPARGC1A*, and *SHANK1* genes – which are involved in glucocorticoid signaling and energy metabolism – were detected, as well as increased expression of *FKBP5* under conditions of chronic social stress. At the same time, a decrease in the expression of genes associated with the immune response and detoxification processes was observed, specifically *CCL2* and *CYP1A1*. The data indicate that stress induces long-term changes in transcriptional regulation associated with the activation of glucocorticoid-dependent mechanisms and the reorganization of metabolic and inflammatory processes in the brain.

In the second stage of the study, age- and sex-specific features of the effects of a single prolonged stressor on behavioral, hematological, and biochemical parameters in mice were investigated. It was shown that the stress response significantly depends

on the age and sex of the animals: young males exhibit pronounced anxiety-like behavior, whereas in young females and older males, cognitive functions, particularly memory, are more severely impaired. The results indicate a differentiated sensitivity of behavioral and metabolic systems to stress, which accounts for the variability in the manifestations of PTSD-like states. This points to the existence of different mechanisms of neurobiological adaptation to stress, which depend on the organism's age- and sex-specific characteristics and may determine individual susceptibility to the development of PTSD-like states.

In the third stage of the study, we examined the behavioral and metabolic effects of stress induced by electrical stimulation, which the animals could avoid. This experiment was conducted according to the following protocol: on days 0 and 1 of the experiment, the mice were subjected to electric shocks to their paws, which were transmitted through a metal mesh floor connected to an electrical stimulus generator. The current strength was 0.8 mA, and the duration of the procedure, including the mice's adaptation to the cage, was 8 minutes. The number of electric shocks was 15, with a duration and interval of 10 seconds between shocks. Additionally, the chamber was equipped with two parallel insulating bars to allow the mice to avoid some of the stimuli. It was found that even brief exposure to such a stressor leads to minor disturbances in metabolic homeostasis, specifically changes in glucose, triacylglycerol, and protein levels, which are accompanied by the development of behavioral disturbances. However, these disturbances are not as pronounced as in uncontrolled stress conditions, so it can be concluded that the ability to avoid stress has a positive effect on the overall condition of the organism.

Thus, the tested PTSD models in mice reveal not only behavioral but also profound metabolic and molecular disturbances. The results indicate that the interaction between oxidative stress and inflammatory processes, which can mutually potentiate each other, plays a key role in the development of PTSD-like states. The identified changes are systemic in nature and affect both peripheral tissues and the central nervous system. The results of this study confirm the important role of redox homeostasis disruption in the pathogenesis of PTSD and may serve as a basis for

further research into the mechanisms of neuroprotection and the body's adaptation to stressors.

Keywords: post-traumatic stress disorder (PTSD), mice, behavioral tests, anxiety, inflammation, oxidative stress, antioxidant enzymes, gene expression, brain, energy metabolism, blood biochemistry, hematology, protein carbonyl groups, stress response, sex and age differences.

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті у наукових журналах, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Balatskyi V., Gospodaryov D., Abrat O., Strilbytska O., Demianchuk O., Tkachyk A., Vasylyshyn O., Lushchak O., Lushchak V.I., Bayliak M. Differential long-term effects of physical, social, and psychological stressors in male mice: down-regulation of inflammatory markers and unresponsiveness of the antioxidant system. Physiology & Behavior. 2025. № 301. 115065. Q2

DOI: https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2025.115065

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105013491606?origin=resultslist

2. Balatskyi V., Strilbytska O., Abrat O., Tkachyk A., Lylyk M., Lushchak V., Bayliak M. Behavioral and metabolic effects of escapable electric foot shock stress in male mice. BMC Research Notes. 2025. № 18(1). 127. Q3

DOI: https://doi.org/10.1186/s13104-025-07189-0

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105001325260?origin=resultslist

3. Balatskyi V.A., Dmytriv T.R., Divnych A., Lushchak V.I. Kefir enhances stress resilience and mitigates PTSD-related behavioral and hematological changes in mice. Frontiers in Physiology. 2025. № 16. 1682807. Q2

DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1682807

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105023698852?origin=resultslist

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

4. Балацький В., Байляк М., Господарьов Д., Лущак В. Довготривалі зміни в організмі мишей після викликання симптомів, схожих до ПТСР // XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 18–20 квітня 2024 р.). – Львів: Сполом, 2024. – С. 314–315.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024-2.pdf

5. Berezovskyi V., Balatskyi V., Demianchuk O. Influence of physical stressors on the levels of lipid peroxides // XX International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology» (Lviv, April 18–20, 2024). – Lviv: Spolom, 2024. – P. 339–340.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024-2.pdf

6. Балацький В.А., Лущак В.І., Байляк М.М., Господарьов Д.В. Довготривалі метаболічні зміни в організмі мишей після впливу різних травматичних стресів // XXII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 75-річчю з дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава Степановича Федорука (м. Львів, 19–20 вересня 2024 р.). – Львів, 2024. – С. 131.

URL:https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2024/3/AB_2024_26_3_6_CYS.pdf

7. Балацький В.А., Лущак В.І., Байляк М.М. Розробка мишиної моделі для дослідження посттравматичного стресового розладу // XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (м. Львів, 2023 р.) // The Animal Biology. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 50.

URL:https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2023/2/AB_2023_25_2_8_conference.pdf

8. Ткачик А., Балацький В., Байляк М. Взаємозв'язок між зміною поведінки та антиоксидантним статусом мозку мишей після одноразового тривалого стресу // VII Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (м. Дніпро, 3–4 жовтня 2024 р.) / за заг. ред. Г.О. Ушакової. – Дніпро: Ліра, 2024. – С. 37–39.

URL:https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2024/10/zbirnyk-Dnipro-3_4-Oct-2024.pdf

9. Василишин О., Абрат О., Балацький В., Байляк М. Параметри крові мишей з експериментально викликаними симптомами посттравматичного стресового розладу // VII Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (м. Дніпро, 3–4 жовтня 2024 р.) / за заг. ред. Г.О. Ушакової. – Дніпро: Ліра, 2024. – С. 41–43.

URL:https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2024/10/zbirnyk-Dnipro-3_4-Oct-2024.pdf

10. Strilbytska O., Balatskyi V., Lushchak V., Gospodaryov D., Abrat O., Tkachyk A., Vasylyshyn O., Bayliak M. Stressor-dependent effects in a mouse model of post-traumatic stress disorder: down-regulation of immune response with minimal impact on the antioxidant system // FEBS Open Bio. – 2025. – Vol. 15, Suppl. 2. – P. 420 (Meeting Abstract P-41-002).

DOI: https://doi.org/10.1002/2211-5463.70071

URL: https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.70071

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 16
ВСТУП 19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 26
1.1. Вступ до проблеми посттравматичного стресового розладу 26
1.1.1. Патофізіологія ПТСР 26
1.1.2. Визначення та діагностичні критерії посттравматичного стресового розладу 27
1.2. Тваринні моделі ПТСР 28
1.2.1. Лабораторна миша як модель для дослідження ПТСР 30
1.2.2. Поведінкові тести для визначення симптомів ПТСР у мишей 32
1.3. Типи стресорів і їхній вплив на психоемоційний стан 42
1.3.1. Обмеження рухів (імобілізація): як хронічний соціальний і фізичний стрес 42
1.3.2. Стрес від хижака: природні сигнали загрози в експериментах 43
1.3.3. Стрес, який пов’язаний з ударами електричним струмом 47
1.3.4. Одноразовий тривалий стрес 49
1.4. Взаємозв’язок між ПТСР та запаленням 50
1.5. ПТСР та оксидативний стрес 51
1.6. Метаболічні порушення на фоні ПТСР 55
1.6.1. Порушення метаболізму глюкози 57
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 60
2.1. Утримання лабораторних мишей 60
2.2. Дизайн експериментів 61
2.2.1. Вивчення довгострокових ефектів фізичних, соціальних і психологічних стресорів у мишей 61
2.2.2. Вивчення впливу одноразового тривалого стресу на поведінкові, гематологічні та біохімічні параметри у мишей *C57BL/6J* різного віку та статі 63
2.2.3. Вивчення поведінкових та метаболічних ефектів стресу, викликаного стимуляцією електричним струмом якої можна уникнути 65
2.3. Поведінкові тести 66
2.3.1. Тест відкритого поля 66

2.3.2. Тест піднесеного плюс лабіринту 67
2.3.3. Тест спонтанного чергування у Т-подібному лабіринті 67
2.3.4. Тест на перевагу сахарози 68
2.4. Забір крові та евтаназія 69
2.5. Визначення гематологічних показників 69
2.6. Нативний електрофорез у поліакриламідному гелі 71
2.7. Визначення активності ферментів антиоксидантного захисту та вмісту пероксидів ліпідів 72
2.8. Визначення біохімічних та імунологічних показників у плазмі крові 74
2.9. Визначення вмісту карбонільних груп білків. 78
2.10. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі 78
2.11. Статистична обробка результатів 80
РОЗДІЛ 3. ДОВГОТРИВАЛІ ЕФЕКТИ ФІЗИЧНИХ, СОЦІАЛЬНИХ ТА ПСИХОЛОГІЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ 83
3.1. Результати дослідження 83
3.1.1. Результати тестів відкритого поля проведених на мишах, які піддавались впливу різних стресорів 83
3.1.2. Вплив стресу соціальної ізоляції, звуків хижака та знерухомлення на імунологічні, гематологічні та біохімічні показники крові мишей 85
3.1.3. Вплив стресу на активність антиоксидантних ферментів, та рівні мРНК генів, пов’язаних із сигналами стресу та запаленням у корі головного мозку 89
3.1.4. Аналіз головних компонентів 95
3.2. Обговорення та узагальнення отриманих результатів 100
3.2.1. Аналіз поведінкових реакцій у тесті відкритого поля мишей, які піддавались впливу різних видів стресу 101
3.2.2. Звук хижака впливає на гематологічні та біохімічні показники крові мишей більше, ніж інші стресові фактори 103
3.2.3. Вплив різних видів стресу на імунну відповідь, стресові реакції і метаболічні показники у корі головного мозку мишей 106
3.2.4. Узагальнення результатів отриманих з експерименту 109
3.3. Підсумок 110
РОЗДІЛ 4. ВІКОВІ ТА СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ОДНОРАЗОВОГО ТРИВАЛОГО СТРЕСУ НА ПОВЕДІНКОВІ,

ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ У МИШЕЙ *C57BL/6J* 112

4.1. Вплив одноразового тривалого стресу на поведінкові реакції та пам’ять у мишей різного віку та статі 113

4.2. Залежність впливу ОТС на гематологічні показники мишей від статі та віку 118

4.3. ОТС викликає незначні зміни в параметрах оксидативного стресу в корі головного мозку та проміжному мозку мишей 128

4.4. Підсумок 130

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СТРЕСУ СТИМУЛЯЦІЄЮ ЕЛЕКТРИЧНИМ СТРУМОМ, ЯКОГО МОЖНА УНИКНУТИ, НА ПОВЕДІНКОВІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ПОКАЗНИКИ МИШЕЙ 133

5.1. Результати дослідження 134

5.1.1. Тести поведінки 134

5.1.2. Маса органів 135

5.1.3. Гематологічні показники 136

5.1.4. Біохімічні параметри плазми крові 137

5.1.5. Біохімічні параметри органів 138

5.2. Аналіз та обговорення отриманих результатів 139

5.3. Обмеження результатів досліджень 142

5.4. Підсумок 144

РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 146

ВИСНОВКИ 150

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 152

ДОДАТКИ 187

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AhR – арилгідрокарбоновий рецептор

BDNF – нейротрофічний фактор мозку

CCL2 (ліганд з мотивом C-C 2), або MCP-1 (моноцитарний хемотаксичний білок) – хемокін

CXCL1 – ліганд хемокіну з мотивом C-X-C 1

CXCL2 – ліганд хемокіну з мотивом C-X-C 2

CYP1A1 – цитохром родини P450 1 підродини A член 1

FKBP5 – FK506 зв'язуючий білок 5

IL-6 – інтерлейкін 6

KEAP1 – Kelch-подібний білок 1, пов’язаний з ECH

NLR – співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів

NF-κB – підсилювач легкого ланцюга ядерного фактора каппа активованих B-клітин

Nrf2 – ядерний фактор еритроїдний 2-споріднений фактор 2

NR3C1 (GR) – підродина ядерних рецепторів 3 група C член 1; ген, який кодує глюкокортикоїдний рецептор

NUR77 – ядерний рецептор NR4A1

PPARGC1A – рецептор, активований проліфератором пероксисом, гама-коактиватор 1 альфа

RPL27 – рибосомний білок L27

SGK1 – серин/треонін-протеїнкіназа 1

SHANK1 – SH3 та множинні анкеринові повторювані домени 1

S100A10 – S100 кальційзв’язуючий білок A10

АГК – аналіз головних компонентів

АФК – активні форми кисню

БСА – бичачий сироватковий альбумін

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа

ГГН вісь – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркова вісь

ГК – глюкокортикоїди

ГКР – глюкокортикоїдний рецептор

ГлуР – глютаматний рецептор

ГП – глютатіонпероксидаза

GSH – відновлений глютатіон

GSSG – окислений глютатіон

GST – глютатіон-S-трансфераза

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДНФГ – 2,4-динітрофенілгідразин

ДСП – Діагностичний і статистичний посібник з психічних розладів

ДХФІФ – дихлорфеноліндофенол

ЕДТА – етилендиамінтетраоцтова кислота

ІЛ – інтерлейкін

кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота

МДА – малоновий диальдегід

МПО – мієлопероксидаза

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

НАД(Ф)$^+$ – нікотинамідаденіндинуклеотид(фосфат) окислений

НАД(Ф)Н – нікотинамідаденіндинуклеотид(фосфат) відновлений

НХО1 – НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктаза 1

ОТС – одноразовий тривалий стрес

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ПЛ – пероксиди ліпідів

ПОН – параоксоназа

ПСЗХ – психосоціальний стрес, зумовлений хижаком

ПТСР – посттравматичний стресовий розлад

СЗЗХ – стрес, зумовлений запахом хижака

СОД – супероксиддисмутаза

ТАГ – триацилгліцероли

ТВП – тест відкритого поля

ТМТ – триметилтіазолін

ТППЛ – тест піднесеного плюс лабіринту

ФНП-α – фактор некрозу пухлини альфа

ХДНБ – 1-хлор-2,4-динітробензен

ХС-ЛПВЩ – холестерин ліпопротеїдів високої щільності

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат

ЦНС – центральна нервова систем

ВСТУП

Актуальність дослідження. Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) є одним з найпоширеніших психічних розладів, який виникає внаслідок дії екстремальних або тривалих стресових чинників. У контексті сучасних глобальних викликів, зокрема воєнних дій, пандемій і соціально-економічних криз, зростає кількість осіб, які зазнають психологічної травми, що підвищує актуальність досліджень, спрямованих на вивчення патогенетичних механізмів ПТСР. Цей розлад супроводжується широким спектром симптомів, включаючи тривожність, депресивність, порушення сну, агресивну поведінку, а також значні когнітивні та нейробіохімічні зміни. Попри наявність клінічних критеріїв діагностики та різноманітних терапевтичних підходів, молекулярні механізми ПТСР залишаються до кінця не з’ясованими, що ускладнює розробку ефективних методів лікування та профілактики.

Одним із ключових інструментів для дослідження ПТСР є експериментальні моделі на лабораторних тваринах, зокрема на мишах. Дія на тварин факторів, які імітують травматичний досвід, таких як соціальна ізоляція, тривале знерухомлення та електростимуляція, дозволяє надійно відтворити клінічну картину ПТСР. Соціальна ізоляція, зокрема призводить до розвитку поведінкових порушень, аналогічних до тих, що спостерігаються у пацієнтів із ПТСР: зростання тривожності, агресивності, імпульсивності, а також порушення згасання реакцій страху і зниження чутливості до бензодиазепинів. Це підтверджується сучасними дослідженнями, в яких соціальна ізоляція мишей призводила до зниження експресії нейростероїду алопрегнанолону, який є модулятором гама-аміномасляної кислоти (ГАМК) в мозку, що асоціюється з тривожними й афективними розладами [1].

Крім поведінкових змін, у стресових моделях ПТСР виявляються значні порушення у біохімічному гомеостазі, зокрема активуються системи запалення й оксидативного стресу в мозку. У мишей, які зазнавали хронічного стресу, відзначається підвищення рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-6, ФНП-α) у

крові та мозку, а також активність пов’язаних з окиснювальним пошкодженням систем, включаючи підвищення рівнів малонового диальдегіду (МДА) та карбонільних груп білків. Аналогічні зміни спостерігаються і в пацієнтів з ПТСР, що свідчить про залучення спільних патогенетичних механізмів [2].

Особливої значущості набуває застосування сучасних молекулярно-біологічних методів, зокрема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), для аналізу експресії генів, пов’язаних із запаленням, стресовою реакцією та антиоксидантним захистом. Завдяки цим підходам можна виявити специфічні зміни у функціонуванні гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової (ГГН) осі, маркерів нейрозапалення, а також регуляторів редокс-гомеостазу (наприклад, ферментів супероксиддисмутази, глютатіонпероксидази та каталази). Згадані вище аспекти ПТСР на сьогоднішній день недостатньо вивчені, а дані доволі суперечливі. Поєднання таких методів з класичними поведінковими тестами (відкрите поле, піднесений плюс лабіринт, тест вимушеного плавання тощо) створює комплексну модель, що дозволяє не лише глибше зрозуміти біологічні основи ПТСР, а й апробовувати нові потенційні терапевтичні мішені.

Таким чином, з’ясування молекулярних та біохімічних змін, що виникають в організмі за дії травматичних стресорів, надзвичайно актуальне з огляду на сучасні потреби нейробіології. У цьому плані мишачі моделі травматичного досвіду дозволяють дослідити взаємозв’язок між поведінковими змінами та молекулярними перебудовами у мозку. Отримані результати мають не лише теоретичне значення для розуміння патогенезу ПТСР, але й практичну цінність для розробки нових стратегій діагностики, профілактики та лікування посттравматичних стресових розладів.

Зв’язок цієї роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу проводили з 2022 до 2025 р. на кафедрі біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника, і вона є частиною наукової тематики кафедри «Пошук маркерів посттравматичного стресового розладу на основі показників оксидативного стресу та запалення» (№ держреєстрації –

0123U101790, з 27 березня 2023 по 31 грудня 2025 року). Дисертант був співвиконавцем проєкту та проводив частину досліджень.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи була перевірка відомих валідних експериментальних моделей посттравматичного стресового розладу (ПТСР) у мишей і комплексна оцінка зумовлених ними поведінкових, запальних, оксидативних, імунних і метаболічних змін, а також з'ясування механізмів перебігу цього розладу.

Завдання роботи:

1. Перевірити експериментальні моделі ПТСР у мишей шляхом дії соціальної ізоляції, знерухомлення, електричної стимуляції стопи та звуків хижака. Порівняти поведінкові характеристики у мишей до і після дії стресових чинників за допомогою валідованих поведінкових тестів (відкритого поля, піднесеного плюс лабіринту, тесту на завмирання та тест на уподобання споживання сахарози, тест закопування кульок, тест спрощеного Т-лабіринту).
2. Визначити рівень біохімічних маркерів запалення (ІЛ-1β, ІЛ-6), основних метаболітів плазми крові (глюкози, загального білку та холестерину) та показників оксидативного стресу (рівень пероксидів ліпідів, активність антиоксидантних ферментів) у корі головного мозку мишей.
3. Визначити зміни рівнів транскриптів генів, які пов'язані з запаленням, оксидативним стресом та метаболічною адаптацією методом ПЛР у реальному часі у тканинах головного мозку мишей з симптомами ПТСР.
4. Оцінити взаємозв'язок між поведінковими та метаболічними змінами.

Об'єкт дослідження – лабораторні миші (*Mus musculus*), які зазнавали експериментального травматичного стресу.

Предмет дослідження – поведінкові реакції, рівень експресії генів і біохімічні показники, пов'язані з запальною відповіддю та оксидативним стресом, у мозку мишей після дії стресових чинників.

Методи дослідження включали фізіологічні (гематологічні методи, оцінка поведінки мишей у тесті відкритого поля, піднесеного плюс лабіринту, тест на перевагу сахарози, спрощений Т-лабіринт), біохімічні (визначення вмісту

метаболітів – глюкози, триацилгліцеролів і загального білку), активностей антиоксидантних і пов'язаних з ними ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глютатіонпероксидази, глютатіон-S-трансферази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1), маркерів оксидативного стресу (рівнів пероксидів ліпідів), молекулярно-біологічні методи (оцінка транскрипції генів методом кількісної ПЛР, гель-електрофорез білків) та методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше встановлено, що як гострі (обмеження руху, звук хижака (нявкання кота), удари електричним струмом в стопу (футшок)), так і хронічні (соціальна ізоляція) травматичні фактори викликають довготривалі зміни в імунній та метаболічній реакції самців мишей. Поведінкові зміни у мишей за таких видів індукції стресу не були довготривалими, на відміну від біохімічних. Показано, що специфічні типи стресу модулюють експресію ключових генів стресової (*SGK1*, *PPARGC1A*, *FKBP5*) та імунної (*CCL2*, *CYP1A1*, *IL-1β*) відповіді в корі головного мозку. Вперше виявлено, що стрес від звуку хижака достовірно підвищує кількість лейкоцитів, а соціальна ізоляція – рівень прозапальних маркерів навіть через п'ять місяців після впливу. Окрім того нами була запропонована параоксоназа як потенційний маркер ПТСР, було показано що активність цього ферменту була нижчою за індукції стресу.

Вперше продемонстровано, що вплив одноразового тривалого стресу призводить до змін, які залежать від віку та статі: молоді самці після експозиції демонструють підвищену тривожність, а старі миші обох статей – погіршення пам'яті. У старих самок спостерігались більш виражені оксидативні порушення, – лімфопенія та нейтрофілія. Також продемонстровано що даний вид стресу неоднозначно впливає на поведінкові реакції мишей. Наприклад у тесті відкритого поля лише у молодих самців спостерігались відхилення у тесті відкритого поля (знижена рухова активність та час проведений у внутрішній зоні лабіринту), а у молодих самок спостерігались лише тенденції до таких змін. Сарі ж миші не демонстрували жодних змін у цьому тесті.

Вперше виявлено, що можливість уникнення стимуляції стоп електричним струмом послаблює деякі негативні фізіологічні та метаболічні наслідки, незважаючи на збереження тривожних поведінкових реакцій.

Отримані результати поглиблюють розуміння молекулярних механізмів ПТСР та відкривають нові підходи для оцінки ризиків розвитку та патофізіології цього розладу.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати мають важливе практичне значення для фундаментальної та прикладної нейробіології, психіатрії й фармакології.

Комплексна оцінка поведінкових реакцій у поєднанні з біохімічними та молекулярно-біологічними маркерами запалення й оксидативного стресу дозволяє сформувати мультифакторну характеристику ПТСР-подібного стану у мишей. Це відкриває можливості для апробації нових фармакологічних і нефармакологічних засобів корекції постстресових розладів, включно зі спрямованими на модуляцію редокс-гомеостазу, запальної відповіді та нейропластичності.

Також важливо зазначити що визначення активності параоксонази та мієлопероксидази у крові потенційно можуть бути запроваджені як додаткові маркери посттравматичного стресового розладу, що беззаперечно може мати певне медичне значення.

Окрім того, дані цієї роботи можуть бути використані при розробці експериментальних протоколів для вивчення нейропротекторної дії перспективних сполук, дієтичних добавок або адаптогенів, а також при викладанні курсів нейрофізіології, біохімії мозку, психофармакології та патологічної фізіології.

Результати цього дослідження були введені у курси занять з психофармакології та молекулярної нейробіології.

Таким чином, результати дослідження мають як наукову, так і потенційну клінічну цінність для моделювання, діагностики та профілактики психоемоційних розладів, зокрема ПТСР.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота виконана під науковим керівництвом доктора біологічних наук, професора кафедри біохімії та біотехнології Володимира Лущака. Дисертант самостійно здійснив пошук й опрацювання наукової літератури за тематикою дослідження, провів експериментальну частину роботи, виконав статистичну обробку, валідацію та візуалізацію отриманих результатів, а також сформулював основні наукові положення та підготував усі розділи дисертації. Планування експериментів, інтерпретація результатів і підготовка рукописів публікацій відбувалися у тісній співпраці з науковим керівником проф. В. Лущаком і за консультативної підтримки доктора біологічних наук, професорки Марії Байляк. Технічну допомогу під час виконання експериментальної частини дослідження надавали співробітники та студенти кафедри біохімії та біотехнології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Участь закордонних партнерів, студентів і співробітників кафедри у виконанні окремих етапів дослідження відображена у спільних наукових публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на конференціях: XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (Львів, 2023), XXII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава Федорука (Львів, 2024), XX міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2024), VII Міжнародній науковій конференції (Дніпро, 2025), XXI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2025), щорічних звітних наукових конференціях Карпатського національного університету ім. Василя Стефаника.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковані 10 праць, зокрема три статті – у міжнародних наукових виданнях, які індексуються наукометричними базами даних Scopus та Web of Science та відносяться до другого і третього

квартилів (Q2 і Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal, та 7 тез доповідей наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається розділів: вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел. Робота викладена на 191 сторінці, містить 27 рисунків і 6 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вступ до проблеми посттравматичного стресового розладу

1.1.1. Патофізіологія ПТСР

Механізми розвитку посттравматичного стресового розладу зумовлені глибокими змінами у функціонуванні нейроендокринної системи, що відбуваються внаслідок травматичного впливу. Центральне значення має система гіпоталамус-гіпофіз-наднирники, яка контролює синтез кортизолу – головного стресового гормону, а також адреналіну. У хворих на ПТСР виявляють аномальну секрецію кортизолу, що спричиняє хронічну тривогу, надмірну чутливість до стресових чинників і послаблення адаптаційних можливостей організму [3,4].

З нейробіологічної точки зору ПТСР супроводжується надмірною активністю мигдалини – структури мозку, що керує реакціями страху й емоційною пам'яттю. Це виявляється посиленою відповіддю на загрозливі стимули та травматичні спогади. Паралельно знижується функціональна активність префронтальної кори, відповідальної за емоційну регуляцію та пригнічення небажаних імпульсів. Гіпокамп, який забезпечує процеси запам'ятовування, також функціонує неправильно, що призводить до фіксації травматичного досвіду та нездатності розмежувати минуле й теперішнє [3,5].

До патогенетичних чинників ПТСР належать порушення нейромедіаторного обміну. Зростає активність норадреналіну, що підсилює тривожність і стан постійної пильності. Знижується секреція серотоніну, сприяючи депресивним проявам. Змінюється гомеостаз дофаміну, що впливає на мотиваційні процеси та відчуття задоволення [6]. На психологічному рівні формуються стійкі зв'язки між травматичними переживаннями та емоційними відповідями, що спричиняє нав'язливі спогади, кошмарні сновидіння, уникнення тригерних ситуацій і підвищену настороженість. Це порушує нормальні

механізми стрес-відповіді та підвищує ймовірність хронічної тривоги, депресії й соціальної дезінтеграції [5].

Отже, ПТСР є наслідком поєднання травматичного стресу з нейробіологічними, психологічними та нейрохімічними змінами, що підтримують симптоматику розладу та пригнічують природні механізми стресової адаптації [5,7,8].

1.1.2. Визначення та діагностичні критерії посттравматичного стресового розладу

Посттравматичний стресовий розлад (ПТСР) – це складний психічний розлад, що розвивається у відповідь на дію гострого або тривалого впливу подій, які загрожують життю, серйозних тілесних ушкоджень або сексуального насильства [9]. ПТСР є поширеним розладом близько 3,9% населення світу пережили цей розлад, а загалом шанс його розвитку після переживання травматичної події становить за різними даними близько 10%.

У 1980 році з виходом третього видання американського «Діагностичного і статистичного посібника з психічних розладів» (ДСП-3) ПТСР було вперше включено як окремий діагноз [10]. У ДСП-3 він визначався як реакція на надзвичайну стресову подію, що викликала інтенсивний страх або відчуття безпорадності. Основними критеріями були повторне переживання травми, уникнення пов’язаних з нею стимулів та симптоми надзбудження. У подальших версіях ДСП визначення ПТСР поточнювалося. У ДСП-4 (1994) діагностичні критерії були впорядковані у три кластери симптомів: нав’язливість, уникнення та надзбудження. Також було визнано, що спостереження за травматичними подіями може призводити до розвитку ПТСР [11]. Найбільш сучасне трактування подане в опублікованому у 2013 році ДСП-5. Там ПТСР було виділено в окрему категорію – «травматичні та асоційовані зі стресом розлади» [9].

Для систематики та діагностики ПТСР у 5-му виданні Діагностичного та статистичного посібника з психічних розладів (ДСП-5) було виділено кілька основних критеріїв даного розладу, які позначені від А до Н [9,12].

Критерій **А**: наявність фактичної загрози або реальної небезпеки для життя, серйозних травм чи сексуального насильства, а також безпосереднє свідчення такої події, яка трапилась з іншою особою, – так званий синдром свідка.

Критерій **В**: нав'язливість – наявність таких симптомів, як нічні кошмари, спогади, нав'язливі думки та фізіологічні реакції на нагадування про травму.

Критерій **С**: уникнення пов'язаних з травмою стимулів – наявність таких симптомів, як уникнення думок, людей, місць, розмов, діяльності, предметів або ситуацій, що викликають тривожні спогади.

Критерій **D**: негативні зміни когнітивних функцій та настрою, наприклад, дисоціативна амнезія (втрата пам'яті про певні події зі збереженням сприйняття нової інформації), емоційне пригнічення (відсутність або значне зниження емоцій, апатія), когнітивні порушення, соціальна ізоляція й ангедонія (нездатність відчувати задоволення від речей які зазвичай його приносять).

Критерій **Е**: зміни збудливості, наприклад, дратівливість і агресивна поведінка, саморуйнівна поведінка, надмірна пильність, проблеми з концентрацією уваги та порушення сну.

Критерій **F**: тривалість симптомів понад один місяць.

Критерій **G**: функціональні порушення, наприклад, соціальні або професійні.

Критерій **Н**: розлад не повинен бути пов'язаний із впливом речовин або медичними станами.

1.2. Тваринні моделі ПТСР

Хоча спостереження за людьми з психічними розладами дозволяє оцінити загальну симптоматику та перебіг хвороби, є дуже багато обмежень і бар'єрів у

дослідженнях. Саме тому були розроблені моделі ПТСР на тваринах, зокрема на гризунах [13,14].

Наразі не існує одного загальноприйнятого методу моделювання ПТСР у тварин, проте є кілька методів, які найчастіше використовуються, і будуть описані детальніше нижче. Єгуда та Альтерман [15] запропонували п’ять критеріїв, яким повинні відповідати моделі ПТСР у гризунів.

Критерій **1**: стресор повинен викликати подібні до ПТСР біологічні та поведінкові симптоми.

Основною визначальною характеристикою стресового фактору є не його фактична тривалість, а ступінь травматичності, достатній для викликання основних симптомів ПТСР. З цієї причини корисною моделлю ПТСР у тварин є така, в якій довгострокові поведінкові або нейрохімічні кореляти можуть бути індуковані стресором, що діє на організм протягом не більше декількох секунд або хвилин. Моделі, що залежать виключно від дії тривалих стресорів або тренування чи навчання тварин, не є релевантними для індукції ПТСР. Слід зазначити, що тривалі, або повторювані стресори зазвичай викликають сильніші ефекти, аніж короткочасні.

Критерій **2**: стресор повинен викликати симптоми залежно від дози.

У людей ПТСР, як вважається, виникає під впливом порогової дози стресу, що виходить за межі нормального досвіду або, принаймні, є достатньо травматичною, щоб викликати необхідні симптоми ПТСР. Окрім того, існують свідчення зв’язку між інтенсивністю стресогенного фактору та тяжкістю симптомів ПТСР після встановлення діагнозу. Відповідно, стресор повинен бути таким, щоб залежно від інтенсивності міг спричинити як адаптацію, так і інтенсифікацію симптомів.

Критерій **3**: стресор повинен викликати зміни, які зберігаються або стають більш вираженими протягом часу.

Навіть якщо основні симптоми можуть з’явитися відразу після травми, діагноз ПТСР встановлюється лише тоді, коли основні симптоми зберігаються щонайменше протягом одного місяця. Таким чином, біологічні зміни, що

виникають одразу після травми і повертаються до вихідного рівня, не виявляючи ознак стійкості або повторної появи, не мають значення для подальших досліджень.

Критерій **4**: стресор повинен викликати двонаправлені зміни.

Як відомо, основними симптомами ПТСР є як надмірне збудження (нав'язливі спогади про травму, нічні кошмари тощо), так і пригнічення (уникнення місць, що нагадують про травму тощо), які проявляються одночасно. Відповідно, стресор повинен викликати обидва ці стани. У тварин це можна визначити за допомогою поведінкових тестів таких як закопування кульок (збудливість, компульсивна поведінка), тест на аверсивний контекст (уникнення), тощо. Також науковці використовують детектори які показують дані імпульсів нервової системи мишей у реальному часі як у стані сну так і бадьорості для постійного контролю за станом.

Критерій **5**: реакція на дію стресору повинна мати міжіндивідуальну та генетичну варіабельність.

Як відомо, кожна окрема особа має різну стійкість до розвитку симптомів ПТСР, адже цей розлад з'являється лише у 7-9% людей, які пережили травму. Відповідно, стресор також повинен діяти залежно від індивідуальної чутливості кожної особини.

1.2.1. Лабораторна миша як модель для дослідження ПТСР

У сучасних доклінічних дослідженнях посттравматичного стресового розладу (ПТСР) як модельні організми широко застосовуються лабораторні тварини, зокрема миші. Використання мишей у вивченні ПТСР зумовлене рядом переваг, серед яких – висока генетична однорідність, добре охарактеризовані лінії, короткий життєвий цикл, відносна легкість утримання та можливість генетичної модифікації [16]. Завдяки цим характеристикам ці тварини забезпечують відтворюваність і контрольованість експериментальних умов, що критично важливо для дослідження патофізіологічних механізмів ПТСР [17].

У моделюванні ПТСР на мишах використовуються різноманітні протоколи, які імітують вплив сильного або хронічного стресу. До таких моделей належать експозиція хижаку або його запаху чи голосу, соціальна ізоляція, хронічний непередбачуваний стрес, примусове плавання, тремор або моделі соціального домінування (наприклад, метод соціальної поразки) [18,19]. Особливої популярності набули парадигми, що базуються на моделі соціального стресу, оскільки вони дозволяють відтворити складні міжособистісні взаємодії, подібні до людських [20]. Після впливу травмувального чинника у мишей спостерігаються зміни, що відповідають критеріям ПТСР у людини: підвищена тривожність, гіперактивність, уникнення, порушення соціальної поведінки та сну [14].

Крім поведінкових проявів, у мишей з експериментально індукованим ПТСР виявляються характерні нейробіологічні зміни: дисбаланс у роботі гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі, зміни рівня кортикостерону, активація мікроглії та запальних каскадів у мозку, порушення функціонування гіпокампу, префронтальної кори та мигдалеподібного тіла [21,22]. Молекулярні дослідження дозволяють виявити зміну експресії генів, що беруть участь у передачі сигналів стресу, синаптичній пластичності, нейрозапаленні, апоптозі та клітинному метаболізмі [23].

Суттєвою перевагою мишачих моделей є можливість вивчення не лише механізмів розвитку ПТСР, а й оцінки ефективності потенційних фармакологічних засобів і немедикаментозних підходів (наприклад, пробіотиків, фізичної активності чи поведінкових втручань) [24]. Генетично модифіковані миші також використовуються для ідентифікації функції окремих генів у розвитку симптоматики ПТСР, що відкриває перспективи персоналізованого підходу до лікування.

Окрім дослідження патофізіологічних механізмів ПТСР, мишачі моделі також застосовуються для оцінки потенційних засобів підвищення стресостійкості та корекції стрес-індукованих поведінкових і гематологічних змін. Використання таких підходів дозволяє досліджувати вплив

нутрицевтичних і мікробіот-модулюючих інтервенцій без втручання у базові механізми індукції травматичного стресу [25].

Таким чином, лабораторна миша є цінним і високоефективним інструментом для вивчення патогенезу посттравматичного стресового розладу, розробки нових методів терапії та поглиблення розуміння нейробіологічної основи цього складного розладу. Однак при інтерпретації отриманих результатів слід враховувати міжвидові відмінності у психологічній, соціальній і когнітивній сферах, що обмежує пряме перенесення висновків на людину [26].

1.2.2. Поведінкові тести для визначення симптомів ПТСР у мишей

1.2.2.1. Тести для виявлення ознак тривожності

Вивчення тривожності у лабораторних тварин, зокрема мишей, базується на поведінкових тестах, що моделюють природні конфліктні ситуації між прагненням до дослідження навколишнього середовища та уникненням потенційної загрози. Такий підхід дозволяє виявити не лише базові механізми регуляції тривожності, а й оцінити ефективність фармакологічних агентів або вплив генетичних факторів та середовища на емоційну поведінку. З огляду на високу консервативність реакцій уникання в еволюції ссавців, тести на тривожність мають добру конструктивну, прогностичну та біологічну валідність [27].

Одним з найширше застосовуваних методів є тест піднесеного плюс лабіринту, де використовується конструкція у вигляді хреста, у якій два протилежні рукави відкриті (без стінок), а два інші – закриті з усіх боків [28]. Конструкція розташовується на висоті приблизно 50 см від підлоги, що створює додатковий фактор тривожності у вигляді потенційного ризику падіння. Мишу розміщують у центрі лабіринту і протягом 5-10 хвилин фіксують кількість входів у кожен тип рукавів і тривалість перебування в них. Оскільки миші інстинктивно уникають відкритих просторів і висоти, зростання частоти входів і часу

перебування у відкритих рукавах інтерпретується як зниження тривожності [29]. Водночас для точного аналізу необхідно враховувати загальну рухову активність тварин, адже зменшення мобільності може хибно свідчити про підвищену тривожність [29]. Дослідження свідчать, що на результати у цьому тесті суттєво впливають такі фактори, як рівень освітлення (оптимальні значення становлять 100-300 люкс), колір і прозорість стінок закритих рукавів, а також попередній досвід тварини (наприклад, участь в інших тестах або попереднє знайомство з конструкцією). Встановлено, що препарати з анксіолітичною або протитривожною дією, тобто здатністю певних речовин, зокрема транквілізаторів, зменшувати почуття страху, тривоги, неспокою та емоційної напруги, зокрема, бензодіазепіни, збільшують частоту входів у відкриті рукави, що підтверджує фармакологічну валідність цього підходу [28,29].

Іншим популярним методом є тест відкритого поля, у якому миша розміщується в квадратній або круглій рівномірно освітленій арені і її поведінку реєструють протягом 5-15 хвилин [30]. Основними показниками, що оцінюються, є загальна пройдена тваринами дистанція, швидкість руху, кількість входів у центральну зону, тривалість перебування в центрі й уздовж периферії (так званий «thigmotaxis» – поведінкова реакція на дію тактильних подразників) [31]. Миші природно уникають відкритих центрів, вважаючи їх потенційно небезпечними зонами, тому зростання часу, проведеного в центрі, розцінюється як показник зменшення тривожності. Окрім того, у межах цього тесту часто фіксують частоту рирингу (моменти коли миші встають вертикально на задні лапки для дослідження навколишнього середовища) та поведінку типу «stretch-attend» – обережне витягування тіла вперед з наступним відступом, що вказує на конфлікт між дослідницьким інстинктом і униканням загрози. Важливо зазначити, що тест відкритого поля дозволяє водночас оцінити рівень тривожності та загальну моторну активність, що особливо корисно при інтерпретації результатів інших поведінкових тестів. За умов недостатнього (сутінкового) освітлення (до 300 люкс) тварини демонструють більшу активність

і зменшений рівень уникання центру порівняно з помірно або яскраво освітленим середовищем (>500 люкс) [30].

Ще одним валідованим методом виявлення тривожності є тест «світло-темна коробка», що базується на притаманній мишам поведінковій перевазі темного безпечного простору порівняно з яскраво освітленим відкритим середовищем [32]. У класичній конфігурації камера складається з двох з'єднаних відсіків: темного (закритого, непрозорого) та світлого (освітленого джерелом світла інтенсивністю до 500 люкс). Після розміщення миші у світлому відсіку протягом 5-10 хвилин реєструють латентність переходу в темну камеру, кількість переміщень між відсіками, а також тривалість перебування в кожному з них. Більша тривалість перебування у світлій частині інтерпретується як зниження тривожності або подолання страху. Додатковими критеріями є частота рирингу (підйом на задні лапки) та локомоторна активність, що також можуть залежати від емоційного стану [33]. На результати тесту впливають конструкційні характеристики камери, інтенсивність освітлення, початкова позиція тварини, а також індивідуальні особливості (лінія, стать, вік). Наприклад, миші лінії *C57BL/6*, зазвичай, демонструють вищу дослідницьку активність і менший рівень тривожності порівняно з *DBA/2*, що має враховуватись при виборі моделей [33].

Додатковим поведінковим тестом, що використовується для оцінки тривожності або обсесивно-компульсивної поведінки (повторюваних, часто безцільних або надмірних дій) у мишей, є тест закопування кульок [34]. У цьому тесті мишу розміщують у клітці з шаром підстилки, на поверхні якої рівномірно розкладають 15-20 скляних кульок. Протягом 30 хвилин оцінюють кількість частково або повністю закопаних кульок [34]. Вважається, що підвищена кількість закопаних об'єктів свідчить про посилення тривожної або компульсивної поведінки, хоча інтерпретація цього тесту залишається дискусійною [35]. Деякі дослідники пов'язують закопування з підвищеним рівнем емоційного збудження або з оборонною мотивацією, тоді як інші вбачають у цій поведінці адаптивну дослідницьку активність. Тест чутливий до

дії анксіолітичних засобів, таких як діазепам, а також до модуляторів серотонінергічної та ГАМК-ергічної систем [35].

Загалом, застосування кількох комплементарних тестів дозволяє отримати більш репрезентативну картину емоційного стану тварин. Тест піднесеного плюс лабіринту переважно відображає страх відкритого простору і висоти, тест відкритого поля – реакцію на незнайоме середовище, тест «світло-темна коробка» – конфлікт між дослідженням і світлочутливим уникненням, а тест закопування кульок – потенційно компульсивні або захисні стратегії. Стандартизація експериментальних умов (освітлення, час доби, адаптація тварин, попередній досвід), контроль моторної активності та використання надійних алгоритмів аналізу поведінки є критично важливими чинниками для забезпечення відтворюваності результатів. Таким чином, поведінкові тести залишаються основним інструментом дослідження тривожності у мишей і широко застосовуються в нейробіології, фармакології та токсикології.

1.2.2.2. Тести для виявлення порушень пам’яті

Дослідження пам’яті у лабораторних мишей передбачає використання специфічних поведінкових парадигм, що охоплюють різні її аспекти: просторову, робочу, асоціативну й об’єктну пам’ять. Найчастіше застосовуються тести зі спонтанною або навчально-загальною структурою, які дозволяють оцінювати ефективність когнітивних процесів, вплив генетичних маніпуляцій, фармакологічних інтервенцій або вплив старіння чи стресових факторів.

Водний лабіринт Морріса – класичний тест для вивчення просторового навчання та довгострокової пам’яті. Мишей поміщають у круглий басейн з каламутною водою, де вони мають знайти платформу, заховану під поверхнею. Тренувальна фаза охоплює декілька днів, під час яких показником навчання є латентність і шлях до платформи [36]. У пробному тесті платформа вилучається, і аналізують, скільки часу тварина проводить у цільовому квадранті або скільки разів проходить через місце платформи. Цей тест є визнаним інструментом

оцінки пам’яті з високою конструктивною валідністю, хоча ступінь стресу, пов’язаний з водою, може впливати на результати [36].

Лабіринт Барнса – суха альтернатива водного лабіринту Морріса, що також оцінює просторову пам’ять, але без стресу від плавання [37]. Центральна платформа із рядом отворів веде до укриття під одним із них. Миші навчаються знаходити вихід, використовуючи сигнали навколишнього середовища. Оцінюється час пошуку отвору в тренувальній фазі та пріоритет цільового отвору в пробному тесті. Лабіринт Барнса менш стресогенний, ніж водний лабіринт Морріса, і дозволяє досліджувати когнітивну гнучкість (наприклад, зміна положення виходу) – це важливо для моделювання порушень у нейропсихіатричних станах [38].

Y-подібний лабіринт – швидкий тест для оцінки робочої просторової пам’яті. Миша вільно рухається трьома рукавами. Природне прагнення дослідити новий рукав призводить до чергування входів. Частота спонтанного чергуваннння слугує показником здатності зберігати короткочасну інформацію про пройдений шлях [39]. У модифікованих варіантах тесту застосовується блокування одного з рукавів з подальшою оцінкою проведеного в новому рукаві часу, що дозволяє оцінити показники довготривалої пам’яті та когнітивної гнучкості.

Тест розпізнавання нових об’єктів ґрунтується на природній схильності гризунів досліджувати нові об’єкти та дає змогу оцінити об’єктну (декларативну) або неасоціативну пам’ять. Після фази ознайомлення з ідентичними об’єктами, тварину повертають через відтермінування (наприклад, 24 години) у тестову арену, де один об’єкт замінений новим. Перевага у вивченні нового об’єкту свідчить про успішне кодування та відтворення пам’яті. Розраховуються такі показники, як індекс розрізнення або відносна тривалість досліджень нового проти знайомого об’єкту. Тест розпізнавання нового об’єкту має перевагу легкого виконання та високого трансляційного потенціалу [38].

Тест контекстуального страху – асоціативний тест, де запроваджується умовний стимул (зазвичай звук певного тону) у супроводі слабкого електричного

удару. За певний період часу (зазвичай 24 години) мишу повертають в умови тесту, після чого вмикають той самий тон, який використовували під час процедури кондиціонування страху, але переважно без стимуляції струмом. Далі вимірюють кількість завмирань як маркер пам’яті про травму (це можна розцінювати як тест на аверсивний контекст, де контекстом виступає тон та середовище, в якому відбувалось викликання стресу). Цей підхід дозволяє одночасно оцінити контекстуальну пам’ять (залежну від амігдали/гіпокампу) й автономну пам’ять на асоціацію зі стимулом [40].

Поведінкові тести, спрямовані на оцінку пам’яті у мишей і широко застосовуються для дослідження когнітивних порушень, які супроводжують стресові розлади, зокрема посттравматичний стресовий розлад (ПТСР). Класичні просторові парадигми, такі як водний лабіринт Морріса та лабіринт Барнса, дозволяють виявити порушення пам’яті, яка часто страждає при тривалому впливі стресу. Під час викликання подібних до ПТСР симптомів за допомогою деяких експериментальних методів (наприклад, одноразового тривалого стресу) тварини демонструють уповільнене навчання, зниження точності просторової орієнтації та погіршення пам’яті.

Тест Y-подібного лабіринту забезпечує швидку й чутливу оцінку короткотривалої (робочої) пам’яті, яка також може бути селективно порушена внаслідок індукованих стресом змін у префронтальній корі. Тест розпізнавання нового об’єкту – інформативний інструмент для аналізу дефіцитів у розпізнаванні та дискримінації об’єктів, що може свідчити про зниження функціональної інтеграції між гіпокампом і корою. Особливо значущим у контексті ПТСР є тест контекстуального страху, який дає змогу оцінити гіперреактивність на умовні сигнали та контекстуальні тригери – ключові симптоми розладу. Посилення реакції «завмирання» при повторному відтворенні травматичного контексту відображає порушення механізмів згасання страху й надмірну консолідацію емоційно заряджених спогадів, що є типовим для ПТСР. Часто як аналог Y-подібного лабіринту використовують Т-подібний лабіринт, проте є низка нюансів, такий варіант трішки поступається у валідності, оскільки

прямі кути є менш природними та ускладнюють мишам проходження лабіринту, оскільки вони не відразу бачать що там є прохід, а бачать лише стінку у протилежному кінці коридору.

Таким чином, використання каскаду когнітивних тестів дозволяє не лише охарактеризувати загальні порушення пам’яті, а й диференціювати типи когнітивної дисфункції, що виникають внаслідок впливу хронічного або гострого стресу. Це відкриває широкі можливості для апробації нових терапевтичних підходів до корекції ПТСР, зокрема фармакологічного згасання страху, стимуляції нейрогенезу або нейрозапалення, а також для дослідження генетичних та епігенетичних чинників чутливості до стресу.

1.2.2.3. Тести для виявлення ангедонії

Дослідження ангедонії – втрати здатності відчувати задоволення та порушень мотивації до винагороди в лабораторних тварин є ключовим напрямом у моделюванні афективних розладів (захворювання пов’язані з порушеннями настрою). У мишей ці стани ідентифікують за допомогою поведінкових тестів, які відображають зменшення реактивності до приємних стимулів або зниження прагнення до їх отримання. Найчастіше такі тести застосовують у дослідженнях індукованої стресом депресії, ефектів хронічного запалення чи вивчення механізмів дії антидепресантів.

Одним із найпоширеніших методів оцінки ангедонії є тест переваги сахарози, в якому тваринам пропонують вибір між водою та слабким розчином сахарози (1-2%). За відсутності порушень миші чітко надають перевагу солодкому розчину, тоді як при ангедонії цей показник знижується [41]. Тест переваги сахарози чутливий до хронічного непередбачуваного стресу, соціальної ізоляції, введення прозапальних цитокінів та інших депресогенних впливів. Стандартизований протокол включає період адаптації до питної системи, базову реєстрацію споживання і тестування протягом 24-48 годин. Результати виражаються у відсотках спожитої сахарози від загального об’єму рідини [42].

Перевагою методу є неінвазивність, простота та висока прогностична валідність, проте його чутливість може залежати від умов годівлі, освітлення, порядку тестування та лінії тварин [42].

Парадигма умовної переваги місця – це ще один цікавий тест, який може використовуватись для вивчення корисних та негативних ефектів препаратів, а також ангедонії [43]. Основна задумка цього тесту полягає в створенні асоціації певного середовища з обробкою препаратом, а потім асоціацію іншого середовища з відсутністю препарату. Поширений варіант цієї конструкції складається з трисекційної камери, зовнішні відсіки якої спроектовані з різними характеристиками (наприклад, різні кольори стінок у камері, різна підстилка). Центральний відсік не має особливих характеристик і не пов'язаний з препаратом, а ворота між відсіками можна відкрити, щоб тварина могла вільно проходити між ними. Під час навчання тварині (зазвичай щуру або миші) роблять ін'єкцію препарату з потенційно корисними або шкідливими властивостями, а потім її поміщають в один із зовнішніх відсіків на кілька хвилин. Наступного дня тварині вводять воду, а потім поміщають в протилежний відсік. Зазвичай ці щоденні сеанси чергуються між препаратом та водою протягом 2 або 3 днів кожен. Після цього проводиться тестовий сеанс, який полягає в розміщенні тварини в центральному відсіку, а потім, після відкриття воріт до обох зовнішніх відсіків, записі часу, який тварина проводить у кожному із зовнішніх відсіків протягом сеансу [43].

1.2.2.4. Тести для виявлення спогадів про травму

У доклінічних дослідженнях ПТСР одним із ключових аспектів є вивчення збереження та відтворення спогадів про травматичну подію. Миші, як модельні організми, демонструють здатність до формування стабільних аверсивних асоціацій, які можна виявити поведінково за допомогою низки валідованих тестів. Основна увага в експериментальних протоколах зосереджується на оцінці

асоціативного навчання, контекстуальної пам’яті та стійкості умовного страху, що разом відображають нейробіологічну основу спогадів про травму.

Найпоширенішим методом є тест на контекстуальний страх. У цій парадигмі миша поміщається в камеру, де їй подається поєднання умовного стимулу (зазвичай звукового тону або самого контексту візуального середовища, а також запаху) та безумовного стимулу – короткого удару електричним струмом. Після формування асоціації між контекстом і неприємним стимулом, миша демонструє поведінкову відповідь, так зване «завмирання», при повторному поверненні в ту саму камеру без жодного болісного подразника. Реєстрація частоти та тривалості реакції завмирання дозволяє об’єктивно оцінити збереження травматичного спогаду [44,45].

Окремо виділяють тест аверсивного контексту, який є модифікованою формою тесту на контекстуальний страх. У ньому тварину повторно поміщають у середовище, пов’язане з раніше отриманим ударом струму, через кілька днів або тижнів після експозиції. Якщо тварина демонструє високу частоту завмирання навіть без підкріплення, це свідчить про довготривале збереження патологічної пам’яті про загрозу, що є аналогом нав’язливих спогадів у людей із ПТСР [46]. Така поведінка вказує на дисфункцію згасання страху, характерну для ПТСР, а також підвищену чутливість до сигналів небезпеки.

Ще одним широко вживаним методом є тест згасання умовного страху, що передбачає багаторазову експозицію умовного стимулу без болісного підкріплення. Зниження частоти завмирання при повторних експозиціях інтерпретується як ефективне згасання асоціації, тоді як збереження реакції вказує на дефіцит процесів згасання, притаманний патологічним спогадам при ПТСР [47]. У генетично модифікованих або стрес-індукованих мишей часто спостерігається порушене згасання, що корелює зі зниженням активності префронтальної кори та підвищеною активністю мигдалеподібного тіла.

У всіх зазначених тестах поведінкова відповідь тварини є об’єктивним показником формування, тривалості й емоційного забарвлення спогаду про загрозливу ситуацію. Дані методи дозволяють досліджувати ефекти травми,

фармакологічного втручання, генетичної модифікації або терапевтичних впливів на процеси кодування та згасання страху. Зокрема, нещодавні дослідження вказують, що вплив певних пробіотиків або протизапальних агентів може зменшувати кількість завмирань у тесті аверсивного контексту, що інтерпретується як зниження емоційної сили травматичного спогаду [48,49].

Таким чином, тести на контекстуальний і умовний страх є ключовими інструментами для дослідження пам'яті про травму в мишей. Вони забезпечують експериментально контрольований підхід до вивчення нейроповедінкових механізмів ПТСР, дозволяючи виявити як специфічні симптоми, так і потенційні шляхи їхньої терапевтичної корекції.

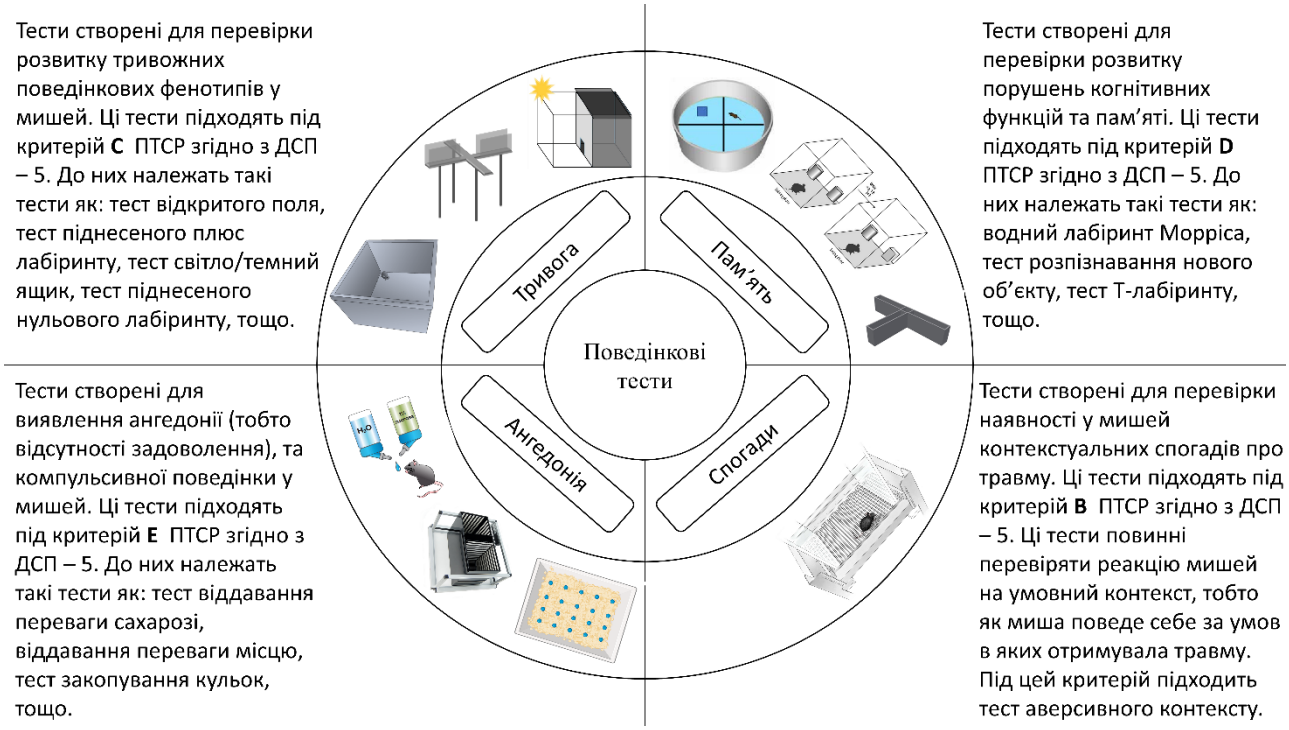

Рис. 1.1. Узагальнююча схема розподілу методів поведінкового тестування згідно їх розподілу за критеріями 5-го видання діагностичного та статистичного посібника з психічних розладів.

1.3. Типи стресорів і їхній вплив на психоемоційний стан

1.3.1. Обмеження рухів (імобілізація): як хронічний соціальний і фізичний стрес

Зумовлений обмеженням рухів стрес, або імобілізація, включає утримання гризунів у замкнених камерах з метою обмеження їхньої рухливості протягом тривалого часу. Стресовий вплив через обмеження рухів, зазвичай, здійснюють шляхом розміщення тварин у трубках з плексигласу або дротяної сітки [50]. Імобілізаційний стрес досягається шляхом поміщення тварин у спеціальні мішки для імобілізації гризунів (часто це так звані Декапікони) [51] або фіксації кінцівок і голови тварини в лежачому положенні на дерев'яних дошках [52]. На сьогоднішній день чітке розмежування між протоколами обмеження та імобілізації відсутнє, і ці терміни часто використовуються як синоніми. Хоча обидва види стресу мають спільну основу – обмеження рухів, важливо розрізняти їх: обмеження лише зменшує рухливість кінцівок, тіла та голови тварини, але не унеможливлює її повністю. Натомість імобілізація повністю позбавляє здатності рухатися, і тому викликає сильніші стресові реакції.

Станом на 2025 рік не опубліковано порівняльних досліджень, які б віддавали перевагу якомусь одному протоколу гострого стресу. Окрім того, є лише кілька досліджень, присвячених впливу імобілізаційного стресу з врахуванням статі тварин [53,54]. В одному з них виявлено, що у самців *Long-Evans* після гострого імобілізаційного стресу підвищується орієнтація на місце отримання харчової винагороди (англ. goal-tracking), тоді як у самок – на пов'язані з винагородою сигнали (англ. sign-tracking). Це свідчить про статеві відмінності у процесах мотивації, які можуть бути пов'язані з втратою ініціативності, енергії та здатності отримувати задоволення [55].

Інше дослідження [56], що узгоджується з однією з підгруп ендокринних реакцій у людей, показало, що імобілізаційний стрес викликає довготривале зниження чутливості гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової (ГГН) системи.

Тобто при повторному впливі того самого (гомотипного) ГГН вісь пригнічується, а при впливі нового (гетеротипного) стресору навпаки активується. Цей ефект був більше виражений у самок щурів лінії *Sprague-Dawley*. Деякі дослідження також відзначали відтерміноване (через 10 днів після стресу) формування поведінки уникання та зміни у щільності дендритних шипиків у базолатеральній мигдалині – чутливій до стресу ділянці мозку.

Сучасні дослідження фокусуються на молекулярних механізмах, що лежать в основі реакцій на імобілізаційно-обмежувальний стрес у гризунів. Наприклад, було показано, що гострий імобілізаційний стрес підвищує експресію прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1β та ІЛ-6, у гіпокампі та мигдалику, що супроводжується активацією мікроглії [57,58]. Одночасно спостерігалося зниження рівня нейротрофічного фактору мозку (англ. BDNF – brain derived neurotrophic factor), що свідчить про зменшення нейропластичності – ймовірну причину тривалих порушень у навчанні, пам’яті та настрої. Ці зміни виявилися більш вираженими у самок, що частково може пояснювати їх вищу вразливість до афективних розладів після стресу. Крім того, поведінкові тести (відкрите поле, тест примусового плавання) демонструють розвиток тривожної або депресивної поведінки впродовж 1-2 тижнів після стресу, що співвідноситься з морфологічними змінами в дендритах нейронів [59]. Таким чином, інтеграція поведінкових, гормональних і молекулярних показників дозволяє глибше аналізувати наслідки різних типів стресу та їх статеву специфічність.

1.3.2. Стрес від хижака: природні сигнали загрози в експериментах

Моделі зумовленого хижаками стресу, які вирізняються високою екологічною валідністю, передбачають піддавання гризунів впливу хижаків або їх запахів, що є природно релевантними для цього виду. Розрізняють кілька варіантів цього стресору: стрес від безпосереднього впливу хижака, зумовлений хижаком психосоціальний стрес (ПСЗХ), і зумовлений запахом хижака стрес (СЗЗХ) [60].

У моделі стресу від впливу хижака гризуни спочатку перебувають у замкненому просторі без можливості втечі протягом 5 хв, а далі – від 5 до 60 хв тварини піддаються впливу хижака, кота [61], або тхора [62], з якими вони мають або прямий контакт, або спостерігають їх через захисний бар'єр, також це може бути запах або інші види контакту наприклад звук. У перших дослідженнях короткочасного впливу кота оцінювали загальну поведінку тварин у тестах тривожності, збудження та оцінки ризику [61]. У подальших роботах виявили уникання контексту, пов'язаного з травмою, у тесті відкритого поля, а також порушення просторової пам'яті в лабіринтах Морріса та з радіальними рукавами [63]. Крім того, короткочасний контакт з тхором спричиняв порушення сенсомоторики у піддослідних тварин [62]. У 25,3% підданих впливу хижака самців щурів лінії *Sprague-Dawley* спостерігали поведінкові й ендокринні порушення, подібні до ПТСР [63]. Статеві відмінності у вразливості до стресу виявлялися в тестах піднесеного плюс лабіринту, відкритого поля та в реакції переляку. Їх також зафіксовано в тестах «дірчастої дошки» та «світло-темної коробки», які не змінювалися під впливом, але демонстрували статеву специфіку [19]. Тривалі поведінкові зміни, що зберігалися щонайменше три тижні, супроводжувалися змінами в мигдалеподібному тілі, медіальній префронтальній корі й гіпокампі – залучених до патофізіології ПТСР структурах [64]. Однак у таких методів є обмеження, враховуючи непередбачувану взаємодію гризунів з хижаками під час подібних тестів, слід враховувати непередбачувану агресію та оцінювати поведінку хижаків перед тестом та привчати їх не атакувати.

Модель ПСЗХ (зумовлений хижаком психосоціальний стрес) включає гострий і хронічний компоненти. Вона поєднує годинну імобілізацію протягом впливу кота на 1-й (у світлий час) та 11-й (у темний час) дні, а також 31 день перебування в нестабільних умовах утримання. Це створює синергічний ефект чинників ризику. Спостереження, що гризуни намагаються відвернутися від хижаків, даючи собі відчуття контролю, зумовили включення імобілізації як моделі безпорадності – однієї з ключових ознак ПТСР. Повторний вплив кота застосовували з кількох причин: (1) моделювання ПТСР після багаторазових

травм; (2) імітація нав’язливих нагадувань про травму; (3) непередбачуваність повторного стресу (світла/темна фаза) та (4) посилення стресового ефекту. Щоб підвищити частоту проявів симптомів, включено щоденні рандомізовані зміни умов утримання, що моделює хронічний легкий стрес і дефіцит соціальної підтримки [65]. Через три тижні після другого впливу всі щури лінії *Sprague-Dawley* виявляли подібні до ПТСР зміни. ПСЗХ також спричиняв зниження темпів росту, маси тимусу, рівнів базальних глюкокортикоїдів (ГК), а також підвищення маси наднирників і посилену фізіологічну реакцію на гострий стрес [65,66]. Деякі ефекти зберігалися більше, ніж через чотири місяці після початку стресу [67]. Зміни рівнів нейромедіаторів (збільшення концентрації норадреналіну та зниження концентрації серотоніну в гіпокампі та префронтальній корі) щурів відповідають спостереженням у дослідженнях ПТСР у людей [68]. ПСЗХ також спричиняв залежні від статі серцево-судинні порушення, зокрема підвищену чутливість міокарду до ішемії у самців та овариектомованих (з видаленими яєчниками) самок. Незалежно від стадії естрального циклу, самки проявляли тривожну поведінку в тестах відкритого поля та піднесеного плюс лабіринту. Водночас фізіологічні зміни в них були обмежені зниженням темпів росту [69].

Модель стресу, зумовленого запахом хижака (СЗЗХ), передбачає 5-15-хвилинну експозицію тварин до стимулів природного або синтетичного походження, зокрема сечі лисиці чи рисі [70], використаного котячого наповнювача [71], нашийників або тканини з запахом кота чи тхора [72], а також синтетичного компонента триметилтіазоліну (ТМТ), який міститься у фекаліях лисиці. Повторна експозиція до запахів кота і тхора підтверджує відсутність адаптації до стресора, а різні дози викликають дозозалежну поведінку, пов'язану зі страхом. Встановлено значну міжлінійну варіабельність у відповіді на запах хижака: від 14 до 21,8% щурів лінії *Sprague-Dawley* демонструють надмірну чутливість до ТМТ. При використанні котячого наповнювача ПТСР-подібну поведінку виявляють 50% щурів Lewis, 10% – Fischer F344 та 25% – *Sprague-Dawley* [71]. Водночас, статевих відмінностей у сприйнятливості до цих

стресорів не виявлено, принаймні у лінії *Sprague-Dawley* [73]. Дослідження нейробіологічних механізмів моделі виявили ключову роль глюкокортикоїдної системи у формуванні посттравматичної відповіді. Введення високої дози кортикостерону за годину до експозиції використаного котячого наповнювача знижує частку тварин з ПТСР-подібною поведінкою з 50% до 8% [71]. Схожий протективний ефект спостерігається при введенні кортикостерону через годину після впливу, що проявляється зменшенням ПТСР-подібних симптомів на поведінковому, молекулярному та морфологічному рівнях у гіпокампі [74]. Це свідчить про існування так званого "вікна можливостей" для терапевтичного втручання на ранніх стадіях після травматичного впливу. Альтернативний підхід до вторинної профілактики продемонстрований у дослідженні з позбавленням сну: обмеження сну протягом 6 годин у перший період відпочинку після стресу зменшує ПТСР-подібну поведінку та знижує експресію глюкокортикоїдних рецепторів у гіпокампі. Функціональна магнітно-резонансна томографія виявила тривалу нейроадаптацію у функціональних зв'язках між мигдалиною та медіальною префронтальною корою у щурів *Long-Evans* після впливу котячого нашийника [72]. Подальші дослідження показали, що базальна функціональна зв'язність у нюховій та стресовій нейронних мережах може служити предиктором індивідуальної вразливості до ПТСР. Сприйнятливі тварини характеризуються меншою кількістю реакцій завмирання, проте більш вираженим уникненням запаху лисиці, пролонгованою відповіддю кортикостерону та посиленою тривожністю у віддалений період після травми. Через здатність запаху хижака проникати в приміщення та впливати на контрольних тварин, експерименти рекомендують проводити під витяжною шафою [17]. Дозування запахів складно контролювати, оскільки нюх є індивідуальним і залежить від сприйняття. Проте перевагою СЗЗХ-моделі є її екологічна валідність, адже нюх є ключовим сенсорним механізмом виживання у гризунів [17].

1.3.3. Стрес, який пов’язаний з ударами електричним струмом

Електричний шок є одним з найпоширеніших методів індукції посттравматичних розладів у лабораторних тварин, зокрема в мишей і щурів [75]. Цей підхід використовується для моделювання таких психоневрологічних станів, як тривожні розлади, депресія та ПТСР. Травматичний вплив реалізується шляхом подачі електричних імпульсів через лапи або хвіст тварини за допомогою металевої решітки, що вбудована в підлогу експериментальної камери. Зазвичай, для індукції тривалих патологічних змін використовують струм високої інтенсивності (1,0-3,0 мА) тривалістю від 2 до 20 секунд, на відміну від класичного умовного навчання страху, де застосовуються короткочасні та менш інтенсивні імпульси (0,5-1,5 мА, 0,5-2 с). Незважаючи на відсутність чіткого розмежування між «травматичними» та «нетравматичними» шоками, сучасні протоколи дедалі частіше враховують здатність тварини до адаптації та відновлення після стресу [75].

Однією з найперспективніших моделей ПТСР є парадигма підсиленого навчання страху (англ. SEFL – stress-enhanced fear learning), яка передбачає попереднє багаторазове піддавання тварин інтенсивним електричним ударам струму в первинному контексті (контекст А), а згодом – одноразові помірні електростимуляції в новому середовищі (контекст В) [76]. У результаті тварини демонструють надмірну реакцію страху в другому контексті, яка зберігається протягом тривалого часу (до 90 днів) навіть після згасання первинної реакції у контексті А. Це свідчить про розвиток неасоціативної сенситизації, що типове для ПТСР і характеризується стійкістю до експозиційної терапії. Поведінкові прояви включають тривале завмирання, притискання до стінок камери, підвищену частоту дихання й дефекації, що відображає симптоми гіперарозації та інвазій у людей [77].

З нейробіологічної точки зору, модель електрошоку дозволяє відтворити ключові зміни в структурах мозку, які залучені до формування і підтримки спогадів про травму. До них належать мигдалина, гіпокамп і префронтальна

кора. Зокрема, було продемонстровано підвищену експресію субодиниці ГлуР1 (глютаматний рецептор 1) AMPA-рецепторів (рецептор α-аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонової кислоти) у базолатеральній мигдалині, що відповідає за зростання збудливості нейронних контурів страху у щурів *Sprague-Dawley* [78–80]. На молекулярному рівні встановлено роль епігенетичних механізмів, таких як зміни ацетилювання гістонів (наприклад, H3K9me2) у ділянках, що регулюють експресію нейротрофічного фактору мозку (англ. BDNF) [81]. Порушення експресії BDNF у гіпокампі та префронтальній корі асоціюється з морфологічними змінами нейронів (втрата дендритної складності, зміна довжини відростків), що підтримують дисфункцію пам’яті та емоційної регуляції [81].

Окрім того, встановлено значущу участь гену *FKBP5* в регуляції реакції на стрес: його варіант rs1360780 асоційований зі зниженим контролем над глюкокортикоїдною системою, що сприяє розвитку гіперактивності гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі та порушенню згасання страху [82,83]. Цей генетичний фактор, як і епігенетичні модифікації, є перспективною мішенню для персоналізованої терапії. У цьому контексті важливою є також участь нейромедіаторних систем, зокрема, глютаматергічної, дофамінергічної та серотонінергічної систем, у модуляції страху, тривоги та процесів згасання. Активація рецепторів типу NMDA (іонотропний рецептор глютамату, що селективно зв'язує N-метил-D-аспартат), мГлуР5 (метаботропний глютаматний рецептор 5), а також ендоканабіноїдної системи (наприклад, через агоністи CB1) модулює ефекти стресу й потенційно дозволяє зменшити патологічні наслідки травми [21].

Основними перевагами моделі електрошоку, як інструменту дослідження ПТСР, є її висока відтворюваність, точний контроль над параметрами впливу (інтенсивність, тривалість, частота, інтервали), можливість комбінації з поведінковими, нейрофізіологічними та фармакологічними методами аналізу. Крім того, ця модель демонструє високу конструктивну, предиктивну та проривну валідність, оскільки чутливо реагує на застосування сучасних

психотропних засобів, таких як антидепресанти, анксіолітики (лікарські засоби що знижують тривогу), епігенетичні модулятори та препарати, що впливають на рецептори страху й пам’яті [84].

Таким чином, модель електричного шоку, особливо у варіанті підсиленого навчання страху, є універсальним та інформативним інструментом для дослідження патофізіології ПТСР. Її застосування дозволяє не лише моделювати ключові симптоми цього розладу, але й вивчати молекулярні механізми, що лежать в основі його розвитку, та розробляти нові, науково обґрунтовані підходи до терапії – як фармакологічної, так і поведінкової [84].

1.3.4. Одноразовий тривалий стрес

Одноразовий тривалий стрес (ОТС) передбачає послідовне застосування трьох стресогенних факторів: 2-годинне обмеження рухів, 20-хвилинне примусове плавання та анестезію диетиловим ефіром. Поведінкове тестування проводять через 7 або 14 днів після стресу, оскільки для прояву ПТСР-подібних симптомів необхідний інкубаційний період. [85]. Дослідження показали, що максимальна вираженість поведінкових і клітинних змін спостерігається через сім днів після одноразового або повторного стресу, що підтверджує часову залежність розвитку ПТСР-подібних симптомів [86]. Відповідно до результатів досліджень пацієнтів з ПТСР, апоптоз нейронів і порушення регуляції аутофагії в гіпокампі, мигдалині та префронтальній корі з’явилися через день після стресу, що свідчить про те, що морфологічні зміни передують поведінковим змінам [87]. Для відтворення фенотипу ПТСР необхідна комбінація всіх трьох стресорів, оскільки поєднання будь-яких двох не призводить до повного спектру ефектів, які спостерігаються у моделі ОТС [88]. Як і у випадку підводної травми, інтерпретація результатів примусового плавання та лабіринту Морріса ускладнюється повторним впливом водного середовища.

Хоча вплив віку на сприйнятливість до ОТС досі не оцінювався, було виявлено, що відокремлення від матері посилює викликане ОТС підвищення

тривожності та контекстуального страху в дорослих [89]. Ранній життєвий вплив ОТС спричиняв тривожно-депресивну поведінку на 32-у післяпологову добу (що відповідає ранньому підлітковому віку людини), тривожну поведінку на 60-у добу (пізній підлітковий вік), а на 90-у добу (дорослий вік) – або депресивну поведінку у чутливих до стресу тварин, або її відсутність у резистентних тварин, що свідчить про наявність адаптацій, зокрема поведінкових та когнітивних перебудов, на 60-й день постнатального розвитку.

Два дослідження статевих відмінностей у збереженні згасання страху після ОТС дають суперечливі результати: в одному не спостерігається жодного ефекту [90], а в іншому відзначаються порушення [91]. Виявлено, що самки щурів демонструють страх переважно через різке пересування (англ. darting), а не через завмирання (англ. freezing), що ставить під сумнів інтерпретацію результатів досліджень з використанням лише останнього маркеру в самок [92].

Одноразовий тривалий тест призводив до збільшення часу латентності який був потрібен щурам щоб познайомитись з іншою особиною у самок лінії що утримувались попарно *Sprague-Dawley* у тесті соціальної переваги/уникнення. Такі дані свідчать про наявність у цих самок тривожних фенотипів. Натомість у самок, які утримувались в умовах соціальної ізоляції, час латентності до знайомства навпаки скорочувався, що може свідчити про пошук соціальної підтримки [93]. Також цікаво, що у тесті з дексаметазоном у самців цієї лінії, підданих ОТС, виявлено надмірний негативний зворотний контроль ГГН осі, тоді як у самок цей ефект був відсутній [93].

Незважаючи на обмежену екологічну валідність і неможливість варіювати інтенсивність стресорів, перевагою ОТС як моделі ПТСР є синергічний ефект комбінації кількох стресорів.

1.4. Взаємозв’язок між ПТСР та запаленням

Останні роки характеризуються зростаючою зацікавленістю до вивчення біологічних механізмів посттравматичного стресового розладу (ПТСР), зокрема

ролі імунної системи у його патогенезі. Поряд з класичними нейробіологічними аспектами (дисфункція гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі, зміни в дофамінергічній і серотонінергічній нейротрансмісії), все більше даних свідчить про тісний зв'язок між ПТСР та нейрозапаленням [94,95].

Хронічний стрес, який є ключовим етиологічним чинником ПТСР, може призводити до глибоких порушень регуляції імунної системи. У багатьох дослідженнях виявлено підвищення рівнів прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ФНП-α, ІЛ-1β) у крові пацієнтів з ПТСР, що вказує на активацію вродженого імунітету [96,97]. Ці цитокіни не лише беруть участь у запуску системного запалення, але також здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр і модулювати активність нейронів у чутливих до стресу структурах головного мозку.

Активація мікроглії, головних імунних клітин центральної нервової системи (ЦНС), є центральним елементом нейрозапалення. У доклінічних моделях ПТСР показано, що стресові впливи індукують довготривалу активацію мікроглії, яка супроводжується надмірною продукцією ІЛ-1β та ФНП-α в мозку [98]. Це, своєю чергою, порушує синаптичну передачу та нейропластичність, особливо в гіпокампі та префронтальній корі – відповідальних за когнітивні функції та контроль емоцій регіонах.

Накопичені дані свідчать, що хронічне запалення спричиняє зниження рівнів нейротрофічного фактору мозку (англ. BDNF), що критично для підтримки нейропластичності [99]. Зниження рівня BDNF у поєднанні з надлишком цитокінів може викликати надзбудження, тривожність, порушення пам'яті, тобто притаманні ПТСР симптоми. Окрім того, прозапальні речовини можуть впливати на експресію відповідальних за синаптичну функцію та стресову адаптацію генів [100].

1.5. ПТСР та оксидативний стрес

Зв'язок між оксидативним стресом і розвитком посттравматичного стресового розладу (ПТСР) останніми роками привертає зростаючу увагу в

нейробіологічних і психіатричних дослідженнях [101]. Згідно з сучасними уявленнями, хронічне порушення редокс-балансу відіграє важливу роль у патогенезі ПТСР, опосередковуючи низку патологічних змін у ЦНС, зокрема у структурах, які відповідальні за формування пам’яті, емоційне регулювання та поведінкові реакції [102].

Під дією сильного або тривалого психоемоційного стресу, характерного для ПТСР, активується система гіпоталамус-гіпофіз-надниркові залози (ГГН вісь), що супроводжується надмірною секрецією ГК і адреналіну [101]. Надмірна активація цієї системи призводить до зниження ефективності ендогенного антиоксидантного захисту, посилення утворення активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА), а також до дисфункції мітохондрій – ключових джерел клітинного енергетичного обміну та регуляторів клітинної смерті [103]. В основному це відбувається через надмірне вивільнення адреналіну, який стимулює вироблення енергії в організмі шляхом активації гліколізу та циклу трикарбонових кислот. Надмірна кількість проміжних продуктів гліколізу, зокрема метилгліоксалю, може сприяти розвитку карбонільного стресу, а згодом і оксидативного. Активація циклу Кребса відповідно сприяє посиленню роботи дихального ланцюга мітохондрій, у ході перетворення енергії у мітохондріях утворюється супероксиданіон радикал, звідси і розвиток оксидативного стресу. Як наслідок, підвищення стаціонарного рівня АФК спричиняє окисне пошкодження білків, ліпідів і ДНК, запускаючи каскад прозапальних і нейродегенеративних процесів [104].

Експериментальні дослідження на тваринних моделях ПТСР, зокрема на моделях одноразового тривалого стресу (ОТС), впливу хижака або пренатального стресу, демонструють суттєве зростання рівнів малонового диальдегіду (МДА), супероксид-аніону, а також зниження активності супероксиддисмутази (СОД), каталази, глютатіонпероксидази й інших компонентів антиоксидантного захисту [105]. Особливо виражені зміни спостерігаються у гіпокампі, префронтальній корі та мигдалеподібному тілі – залучених до емоційного процесингу та регуляції стресової відповіді регіонах

[106]. Крім того, встановлено, що оксидативний стрес тісно корелює з нейрозапальними реакціями, активацією мікроглії, порушенням нейротрофічного забезпечення (наприклад, BDNF) та характерними для ПТСР поведінковими змінами [107].

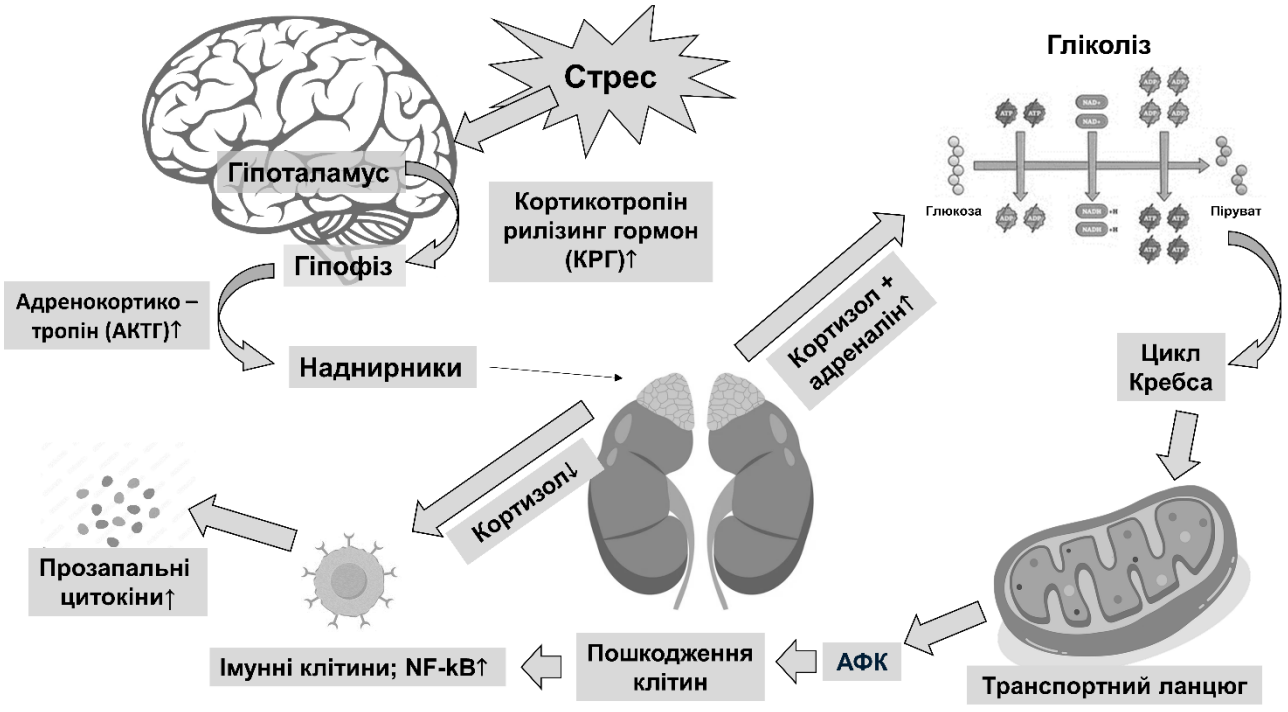

Рис. 1.2. Схема розвитку оксидативного стресу та запалення після отримання стресу. Починаючи від активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі (вивільнення відповідних гормонів) до активації гліколізу, електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, вивільнення вільних радикалів та активації шляху NF-kB з подальшим вивільненням прозапальних цитокінів таких як ІЛ-1β, ІЛ-6 та ФНП-α.

Клінічні дослідження на людях також підтверджують зв’язок між оксидативним стресом та ПТСР. У пацієнтів з діагностованим ПТСР виявлені підвищені рівні циркулюючих біомаркерів оксидативного стресу, таких як МДА, 8-гідроксидезоксигуанозин (англ. 8-OHdG) та модифікованих продуктами

ліпопероксидації білків. Окрім того, значне зростання концентрацій прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-6, ФНП-α), що додатково стимулюють утворення АФК, свідчить про наявність системного запального фону [108]. Генетичні асоціаційні дослідження вказують на роль варіантів у генах, що кодують антиоксидантні ферменти або регулятори редокс-гомеостазу (зокрема ALOX12, ALOX15, RORA, СОД2), у схильності до розвитку ПТСР після психотравмувальних подій.

Ключову роль у формуванні антиоксидантної відповіді організму відіграє транскрипційний фактор Nrf2 (англ. nuclear factor erythroid 2-related factor 2). У фізіологічних умовах його дія пригнічена білком KEAP1 (англ. Kelch-like ECH-associated protein 1), який утримує його в цитоплазмі та сприяє деградації через убіквітин-протеосомний шлях [109]. При оксидативному або електрофільному стресі KEAP1 зазнає конформаційних змін, що унеможливлює його взаємодію з NRF2. В результаті останній транслокуватися в ядро і зв’язується з елементами антиоксидантної відповіді (ARE) у промоторах багатьох генів. До таких генів належать НАД(Ф)Н:хінононоксидоредуктаза 1 (НХО1), гемоксигеназа 1 (ГО-1), глютатіонредуктаза (ГР), глютатіон-S-трансфераза (GST), ферменти біосинтезу глютатіону (GCLC – каталітична субодиниця глутаматцистеїнлігази та GCLM – регуляторна/модифікуюча субодиниця глутаматцистеїналігази) тощо [110].

У контексті ПТСР активність сигнального шляху NRF2 зазнає порушень. Дані з моделей ПТСР на тваринах демонструють зниження експресії генів-мішеней NRF2 у головному мозку, особливо у гіпокампі, що супроводжується зменшенням потужності антиоксидантного захисту, посиленням запалення та зростанням вразливості нейронів активними формами кисню (АФК) і їх пошкодженню [111]. У клінічних дослідженнях на людях спостерігається зниження експресії NRF2 у мононуклеарах периферійної крові, що супроводжується підвищенням експресії KEAP1 [112]. Крім того, епігенетичні модифікації, зокрема метилювання промоторів генів NRF2 і ГО-1, можуть знижувати транскрипційну активність NRF2-каскаду, сприяючи хронічному оксидативному дисбалансу [113].

Порушення функціонування залежної від NRF2 антиоксидантної системи спричиняє активацію транскрипційного фактору NF-κB, який посилює експресію прозапальних цитокінів, формуючи замкнене коло між оксидативним стресом і запаленням [114]. Також виявлене залучення GSK-3β (3β кінази глікогенсинтази) до негативної регуляції NRF2 та одночасної активації апоптотичних каскадів [115]. Таким чином, зниження активності NRF2 призводить не лише до послаблення клітинного захисту, а й до підвищення вразливості нейронів, що потенційно сприяє розвитку характерних для ПТСР когнітивних та афективних розладів [116].

На цьому фоні активний інтерес викликає потенційна терапевтична модифікація шляху NRF2. У преклінічних дослідженнях встановлено, що активація NRF2 фармакологічними індукторами (наприклад, сульфорафаном, тетрагідрокуркуміном, диетилдітокарбаматом) супроводжується зниженням рівнів АФК, нормалізацією функціонування мітохондрій, зменшенням запального фону та покращенням поведінкових показників. Ці ефекти відкривають нові перспективи для застосування у профілактиці та лікуванні ПТСР сполук, які активують NRF2 [109,114].

Отже, оксидативний стрес є ключовим компонентом патофізіологічного ланцюга ПТСР. Його взаємодія з прозапальними процесами, нейрональною дисфункцією та епігенетичними змінами формує складну мережу порушень, що лежать в основі тривалих психічних розладів після травматичного досвіду. Система NRF2-KEAP1 постає не лише як маркер оксидативного стану, а й як перспективна мішень для патогенетично обґрунтованого лікування.

1.6. Метаболічні порушення на фоні ПТСР

Наразі ПТСР є досить поширеним захворюванням серед населення. Доведено, що в людей, у яких діагностували ПТСР, були виявлені порушення низки систем, зокрема нейроендокринній, симпатичній, метаболічній і нейробіологічній. Крім того, ПТСР часто супроводжується іншими психічними

(такими як депресія, зловживання психоактивними речовинами) і соматичними захворюваннями, наприклад, патологією серцево-судинної системи [117]. Нещодавні дослідження також вказують на зв'язок між ПТСР та розвитком ожиріння й супутньої метаболічної дисфункції. Серед імовірних механізмів цього взаємозв'язку розглядають порушення функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової (ГГН) осі, що впливає на регуляцію асоційованих з апетитом гормонів і нейронну активність, з подальшими змінами харчової поведінки [118].

Ожиріння, аутоімунні та метаболічні розлади, зокрема діабет другого типу, тісно пов'язані з ПТСР. Наприклад, метаболічний синдром визначається як наявність щонайменше трьох з таких клініко-біохімічних проявів: абдомінальне ожиріння (підвищений обхват талії, надмірна маса тіла), порушення вуглеводного обміну, яке зазвичай проявляється гіперглікемією (наприклад, підвищеним рівнем глюкози натще), артеріальна гіпертензія, гіпертригліцеридемія й знижена концентрація ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) у плазмі крові [104,117]. Оскільки ПТСР впливає також на регуляцію ліпідного обміну [119], то тяжкість симптомів цього розладу позитивно корелює з рівнем лептину. Це дає підстави розглядати даний гормон як потенційний нейроендокринний маркер стану гіпервігілантності (підвищеної пильності або настороженості) у вразливих осіб з ПТСР. Лептин може інгібувати транскрипцію гену інсуліну та знижувати його секрецію, а також опосередковано сприяти розвитку оксидативного стресу через збільшення імунними клітинами продукції прозапальних цитокінів, таких як ІЛ-6, ІЛ-2 і фактор некрозу пухлини альфа (ФНП-α) [104,120].

Запальні процеси відіграють важливу роль у патогенезі ПТСР. Центральним елементом активації імунної реакції у відповідь на травматичні події вважаються складні взаємодії між гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової (ГГН) віссю та адренергічною системою. Під час гострого або хронічного стресу глюкокортикоїди, які секретуються корою надниркових залоз як кінцеві ефекторні гормони гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі, відіграють ключову

роль у модуляції та регуляції імунної відповіді. В умовах стресу ці гормони виступають як потужні імуносупресори: зміни їх концентрації в крові супроводжуються зниженням рівнів прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-6 та фактору некрозу пухлини [104,117].

ПТСР супроводжується порушеннями когнітивних функцій, які, своєю чергою, можуть зумовлювати зміни у споживчій поведінці. Результати попередніх досліджень послідовно демонстрували структурні зміни в головному мозку осіб з ПТСР, зокрема в гіпокампі та мигдалеподібному тілі, причому ці зміни корелюють з вираженістю симптоматики [121]. Найстабільнішим когнітивним дефіцитом при ПТСР є порушення вербальної пам’яті, зокрема автобіографічної. Окрім цього, описано й інші морфологічні зміни, зокрема в мозолистому тілі, премоторній корі, а також у різних зонах префронтальної кори. Важливо зазначити, що ці структури беруть участь у регуляції реакцій на харчові стимули, що може впливати на харчову поведінку [118,122].

Отже, незважаючи на те, що зв’язок між ПТСР і такими станами, як ожиріння, діабет, та метаболічний синдром, уже активно досліджується [118,123], подальші роботи мають бути спрямовані на уточнення механізмів цих взаємозв’язків і розробку цільових терапевтичних підходів для пом’якшення метаболічних наслідків.

Останні дослідження також вказують на можливу роль кишково-мозкової осі у формуванні поведінкових та гематологічних змін за умов травматичного стресу, що відкриває перспективи використання методів корекції ПТСР-подібних станів спрямованих на мудуляцію кишкового мікробіому [25].

1.6.1. Порушення метаболізму глюкози

Ключовим компонентом гострої реакції на стресор, що лежить в основі патогенезу посттравматичного стресового розладу, є негайна та масштабна мобілізація енергетичних субстратів для забезпечення відповіді організму на стрес. Цей процес ініціюється активацією гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової

осі та подальшим вивільненням катехоламінів, зокрема адреналіну [124]. Адреналін, взаємодіючи з адренорецепторами на поверхні гепатоцитів та м'язових клітин, запускає внутрішньоклітинний сигнальний каскад, що призводить до активації ключового ферменту глікогенфосфорилази. Це ініціює процес глікогенолізу – катаболічного розщеплення глікогену [125].

У результаті глікогенолізу відбувається стрімке вивільнення з печінки глюкози в системний кровотік, що призводить до розвитку транзиторної гіперглікемії. Це й стан є фізіологічно доцільним, оскільки забезпечує мозок та скелетні м'язи легкодоступним енергетичним субстратом [126]. Глюкоза, що надходить до клітин, негайно включається у процес гліколізу.

Кінцевий продукт гліколізу, піруват, транспортується в мітохондріальний матрикс, де він зазнає окисного декарбоксилювання та вступає в цикл трикарбонових кислот (ЦТК), а згодом – в електронно-транспортний ланцюг мітохондрій (ЕТЛ) для синтезу переважної більшості клітинного АТФ шляхом окисного фосфорилювання. Однак, інтенсифікація роботи ЕТЛ в умовах індукованого стресом гіперметаболізму неминуче супроводжується «витоком» електронів та їхньою взаємодією з молекулярним киснем. Цей побічний процес призводить до надлишкового утворення АФК [127]. Таким чином, спрямована на екстрену мобілізацію енергіїфізіологічна відповідь водночас запускає оксидативний стрес, який розглядається як один з ключових факторів у розвитку довгострокових клітинних пошкоджень та нейрональної дисфункції при ПТСР [125].

Обгрунтування роботи

Аналіз літературних джерел свідчить, що посттравматичний стресовий розлад формується внаслідок комплексної дії різних стресових факторів і супроводжується поєднанням поведінкових, нейроімунних, оксидативних та метаболічних порушень. Водночас більшість досліджень зосереджена на окремих типах стресу або ізольованих показниках, що ускладнює цілісну оцінку довготривалих наслідків стресового впливу.

Недостатньо вивченим залишається порівняльний вплив фізичних, соціальних і психологічних стресорів у межах єдиної експериментальної моделі, а також їхній взаємозв’язок з гематологічними, імунологічними, біохімічними та молекулярними змінами. Літературні дані вказують на важливу роль запалення, оксидативного стресу та метаболічної дисфункції, однак характер цих змін значною мірою залежить від типу стресу, тривалості впливу, віку та статі.

Окрім того, зв’язок між поведінковими проявами та біохімічними показниками часто залишається описовим і потребує застосування інтегративних статистичних підходів, зокрема багатовимірного аналізу даних. Окремий інтерес становить дослідження довготривалих ефектів одноразового тривалого стресу та стресу, пов’язаного зі стимуляцією електричним струмом, з урахуванням вікових і статевих особливостей.

У зв’язку з цим актуальним є комплексне дослідження впливу різних типів стресу на поведінкові, гематологічні, імунологічні, біохімічні та молекулярні показники у мишей, результати якого наведено в наступних розділах роботи.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Утримання лабораторних мишей

Лабораторні миші лінії *C57BL/6J* були отримані з Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна, і надалі розмножувалися у віварії кафедри біохімії та біотехнології Карпатського національного університету імені Василя Стефаника. Миші знаходилися в середовищі з контрольованими параметрами: температурний режим підтримувався на рівні 22 ± 2°C, вологість становила 50-60%, а освітлення забезпечувалося за схемою 12 годин світла (06:00-18:00) і 12 годин темряви. Обмін повітря у приміщенні підтримувався на рівні 10-15 циклів повітрообміну на годину.

Тварин утримували групами по 4-5 особин (за винятком експериментів, де використовувався метод викликання стресу соціальною ізоляцією) у стандартних поліпропіленових клітках (365 × 207 × 140 мм), обладнаних металевими сітчастими кришками. Як підстилка використовувалася стерильна дрібна деревна тирса, який замінювали двічі на тиждень. Групове утримання враховувало соціальну поведінку мишей та сприяло зниженню рівня стресу.

Усі тварини мали вільний доступ до води та стандартного корму для лабораторних гризунів «Віта» (м. Обухів, Україна), що містив 20% білка, 4,8% жиру, 70% вуглеводів, 4,7% клітковини та мав енергетичну цінність 310 ккал на 100 г. Крім того, миші отримували у воду додаткові вітаміни та мікроелементи (які додавались до питної води, у кількості 50 мкл на 100 мл): склад вітамінної добавки на 1 мл препарату: A – 5000 МО; D3 – 1000 МО; E – 4 мг; B1 – 3,5 мг; B2 – 4 мг; B5 – 20 мг; PP – 15 мг; B6 – 15 мг; B12 – 10 мкг; C – 25 мг. Склад добавки мікроелементів на 1 мл препарату: цинк – 3,2 мг; мідь – 0,45 мг; марганець – 4,1 мг; магній – 2,4 мг; йод – 0,38 мг; кобальт – 0,1 мг. Харчування та надання чистої води здійснювалися в режимі *ad libitum*.

Стан здоров’я мишей регулярно перевірявся шляхом візуального огляду (оцінювалися зовнішній вигляд шерсті, зміни у масі тіла та наявність ознак

хвороб). Усі маніпуляції проводилися відповідно до затверджених протоколів етичної комісії ПНУ і відповідали встановленим етичним вимогам до досліджень на тваринах. Утримання тварин здійснювалося з дотриманням принципів гуманного поводження, що відповідають концепції 3R, а також згідно з Директивою 2010/63/ЄС Європейського парламенту та Ради щодо охорони тварин, які використовуються для наукових цілей.

2.2. Дизайн експериментів

Для забезпечення комплексного та об'єктивного вивчення досліджуваної проблематики у даній науковій роботі було проведено три незалежні експерименти, спрямовані на дослідження впливу різних типів стресорів на організм мишей. Кожен експеримент був зосереджений на окремому стресорі та відповідних реакціях організму, а їх узагальнений аналіз забезпечив більш глибоке розуміння механізмів стрес-індукованих змін і підвищив наукову обґрунтованість зроблених висновків.

2.2.1. Вивчення довгострокових ефектів фізичних, соціальних і психологічних стресорів у мишей

Шестимісячних самців мишей випадковим чином розділяли на чотири групи (Рис. 2.1): 1) контрольна група (n = 6 мишей у групі), яка не піддавалася дії стресових факторів, та три дослідні групи, позначені як 2) знерухомлення (n = 8 мишей у групі), 3) звук хижака (n = 7 мишей у групі) та 4) соціальна ізоляція (n = 8 мишей у групі). Мишей контрольної групи розмістили у двох клітках по три миші в кожній. Одна клітка слугувала контрольною групою для груп знерухомлення та впливу звуку хижака, а друга клітка використовувалася як контрольна для групи соціальної ізоляції, оскільки миші контрольних груп як і очікувалось не демонстрували жодної різниці у поведінці, ми об'єднали їх у одну групу.

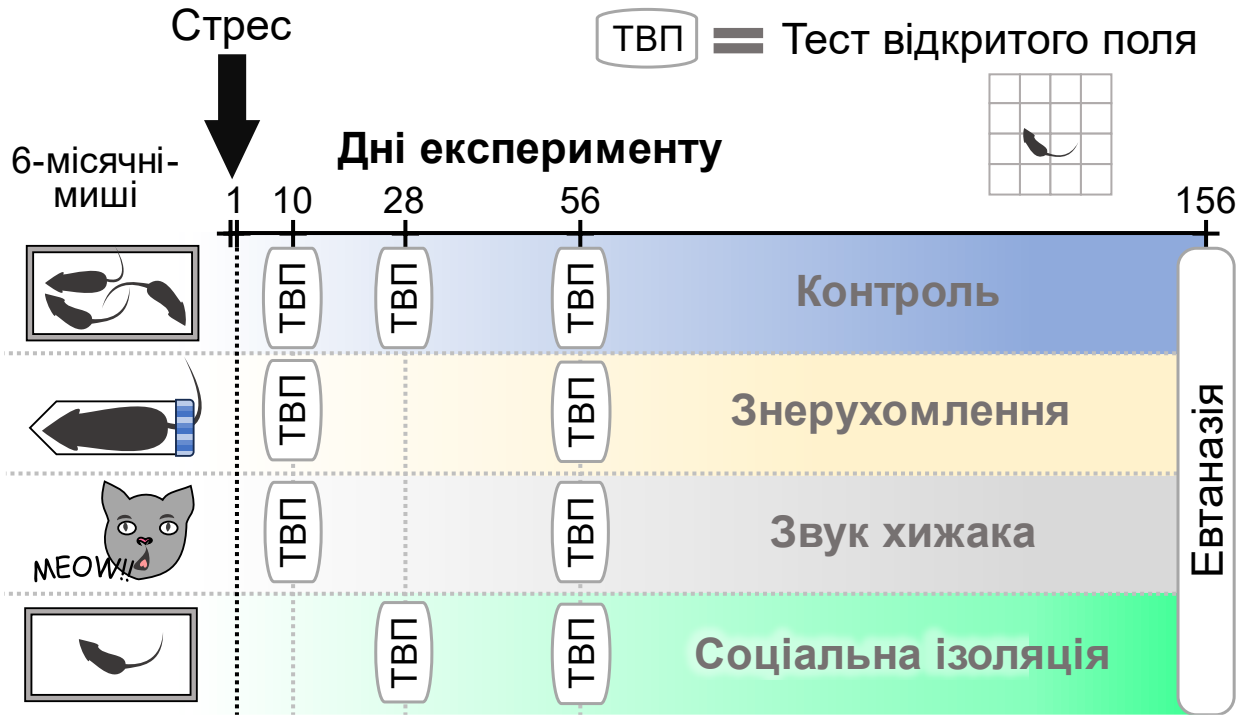

Рис. 2.1. Довгострокові ефекти фізичних, соціальних і психологічних стресорів у мишей. Шестимісячних самців мишей *C57BL/6J* було розділено на чотири групи: контрольна, знерухомлення, вплив звуку хижака та соціальна ізоляція. Мишей піддавали впливу стресових факторів, як описано вище. На 10-й день мишей з контрольної групи, знерухомлення та впливу звук хижака піддали тестуванню у тесті відкритого поля. На 28-й день миші з груп соціальної ізоляції та контрольної групи пройшли тест відкритого поля. На 56-й день експерименту тест у відкритому полі було проведено на мишах всіх груп. На 156-й день експерименту мишей було евтаназовано, а органи відібрано для подальших біохімічних досліджень.

Миші з групи соціальної ізоляції утримувалися окремо (по одній миші в клітці) протягом п’яти місяців. Миші з групи знерухомлення поміщалися в 50-мілілітрові пластикові пробірки, щоб обмежити їхні рухи на дві години. Після процедури обмеження рухів миші переносились у домашні клітки. Мишей з групи впливу звуку хижака піддавали звуку котячого нявкання протягом 15 хвилин. Звук був взятий з відеоролика на YouTube (https://youtu.be/8xSxRVH-

jjM), з якого було вибрано відповідний фрагмент і адаптовано до тривалості 15 хвилин. Процедури знерухомлення та вплив звуку хижака проводилися в окремій експериментальній кімнаті з однаковими кліматичними умовами до віварію. Однак миші, що піддавалися соціальній ізоляції, знаходилися в стандартній кімнаті для утримання мишей. Соціально ізольованих мишей тримали на окремій полиці, де вони не могли бачити одна одну. Перед тестуванням впливу стресу та поведінковими тестами мишам дали 30 хвилин на адаптацію в експериментальній кімнаті. Процедури індукції стресу та поведінкові дослідження проводилися різними людьми.

2.2.2. Вивчення впливу одноразового тривалого стресу на поведінкові, гематологічні та біохімічні параметри у мишей *C57BL/6J* різного віку та статі

Молоді (2-3 місяці) та старі миші (10-12 місяців) обох статей були випадково розподілені на дві групи: контрольну та експериментальну. Всього було сформовано 8 груп. Кожна група складалася з 9-12 тварин. Миші в контрольних групах продовжували утримуватися в стандартних умовах. Миші в експериментальній групі піддавалися впливу протоколу ОТС відповідно до [128] з деякими модифікаціями. Протокол стресу складався з наступних 4 послідовних етапів (Рис. 2.2). Перший етап – обмеження рухів. Для проведення процедури мишей поміщали на дві години в спеціальні флакони з отворами для дихання, що обмежували їхні рухи. Потім мишей піддавали примусовому плаванню протягом 10 хвилин, що слугувало фізичним стресом. Після витирання рушником тваринам давали 15 хвилин на відпочинок, а потім піддавали впливу звуків котячого нявкання (вплив звуків хижака) протягом 10 хвилин для індукції слухового емоційного стресу. На останньому етапі тварин піддавали впливу парів диетилового ефіру до втрати свідомості. Після закінчення процедури викликання стресу, мишей поміщали в клітки й утримували протягом двох місяців. Після цього тварин тестували на поведінкові реакції (Рис. 2.2.В).

Використані експериментальні підходи відповідають сучасним протоколам моделювання ПТСР у мишей, які застосовуються як для дослідження патогенезу, так і для оцінки потенційних засобів підвищення стресостійкості [25].

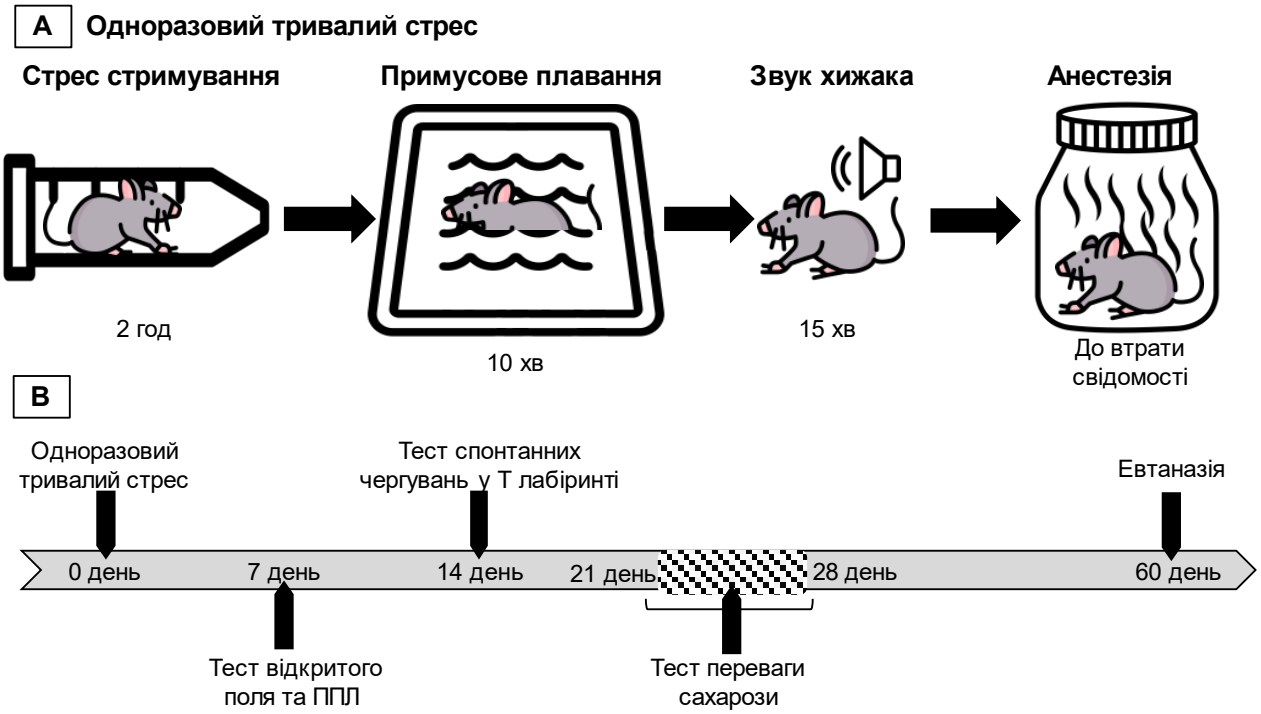

Рис. 2.2. Дизайн експерименту по впливу одноразового тривалого стресу на поведінкові, гематологічні та біохімічні параметри у мишей залежно від віку та статі. (А) Протокол ОТС передбачає послідовне піддавання тварин стресовим факторам: 2 години обмеження рухів, 10 хвилин примусового плавання, 15 хвилин піддавання звуку хижака, а потім анестезія до втрати свідомості. (В) Тестування поведінки проводилося в різні моменти часу після впливу стресу: на 7-й день – тести відкритого поля та піднесеного плюс лабіринту; на 14-й день – тест Т-лабіринту; з 21-го по 28-й день – тест на перевагу сахарози. Тварин евтаназували на 60-й день після процедури ОТС.

2.2.3. Вивчення поведінкових та метаболічних ефектів стресу, викликаного стимуляцією електричним струмом якої можна уникнути

Дво-тримісячних самців мишей випадковим чином розділяли на контрольну й експериментальну групи. Експериментальних мишей помістили в камеру з двома стінками та кришкою з прозорого оргскла, а також двома стінками з білого оргскла з металевою сітчастою підлогою, підключеною до генератора стимулів. Ми також розмістили дві ізолюючі планки поперек металевих планок підлоги в клітці. Це було зроблено для того, щоб миші могли уникнути деяких електричних ударів струму (Рис. 2.3). У 0-й і 1-й дні мишей піддавали 15 електричним стимулам (інтенсивність 0,8 мА; тривалість 10 с; інтервал між сеансами 10 с) протягом 8 хвилин загалом [60]. Електричний удар струму поєднували з контекстуальним нагадуванням про травму шляхом повторного поміщення в камери з електростимуляцією, відома як процедура аверсивного контексту. Для цього на 2-й і 7-й дні після впливу електричного струму мишей поміщали в камеру, де вони перед тим отримували стимуляції на 8 хвилин, але без застосування струму. Завмирання визначалося як відсутність рухів, крім дихання, протягом щонайменше 3 секунд. Контрольну групу мишей поміщали в камеру без електричних стимулів на 0-й, 1-й, 2-й і 7-й дні на 8 хвилин. На 9-й день експерименту було проведено тест у відкритому полі, а на 11-й день – тест у піднесеному плюс лабіринті для самців контрольної й експериментальної груп. Перед поведінковими процедурами мишам дали 30 хвилин на адаптацію до експериментальної кімнати. На 14-й день тварин умертвили за допомогою легкої анестезії вуглекислим газом у камері з подальшим ручним вивихом шийних хребців [129].

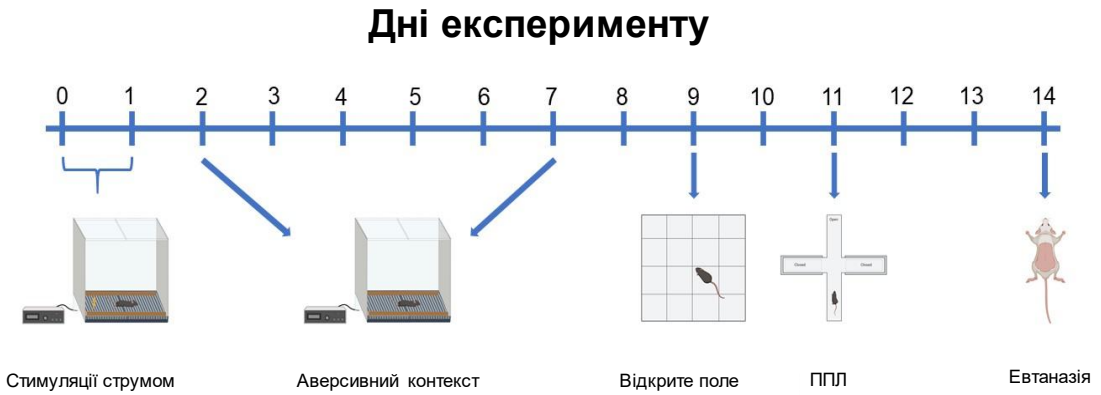

Рис. 2.3. Поведінкові та метаболічні ефекти стресу, викликаного стимуляцією електричним струмом якої можна уникнути.

2.3. Поведінкові тести

2.3.1. Тест відкритого поля

Тест у відкритому полі (ТВП) проводили в білій камері з полівінілхлориду (40 × 40 см), яка була розділена на 16 квадратів (10 × 10 см) і розташована в окремій кімнаті для поведінкових тестів з тими ж умовами, що і в приміщенні для розведення. Мишей розміщували в центрі камери і їх поведінку спостерігали протягом 10 хвилин за допомогою відеокамери, встановленої над ареною. Для аналізу рухової активності, а також поведінки схожої до тривоги [25,30] з попередньо записаного 10-хвилинного відео ми використовували програмне забезпечення ToxTrac (версія 2.98), розроблене командою Магнуса Андерсона (кафедра фізики, університет Умео, Швеція) [130], https://sourceforge.net/projects/toxtrac/). Для оцінки тривожної поведінки реєстрували пройдену мишею загальну відстань, час перебування у центральних квадратах (внутрішня зона), кількість завмирань та виділених мишею

екскрементів [30]. Перед проведенням поведінкового тесту тваринам давали 30 хвилин на адаптацію до умов кімнати. Після кожної миші клітку обробляли 70% етанолом і висушували протягом 2 хвилин. Після завершення тесту мишу повертали в домашню клітку.

2.3.2. Тест піднесеного плюс лабіринту

Тест піднесеного плюс лабіринту (ТППЛ) належить до експериментальних психіатричних тестів і використовується для аналізу пов'язаної з тривогою поведінки у модельних організмах. Піднесений плюс лабіринт – це хрестоподібний лабіринт, зроблений з дерева, піднятий над підлогою на висоту 50 см, він складається з двох закритих рукавів, які мають стінки, та двох відкритих рукавів, що не мають стінок. Рукави розташовані протилежно, тобто один навпроти одного. Довжина кожного з рукавів складає 30 см, висота стінок закритих рукавів складає 20 см, центральний квадрат (перетин всіх рукавів 5 × 5 см). Ми визначали, скільки часу тварина проводить у закритих і відкритих рукавах протягом 10 хвилин [29]. Миша поміщається у центр лабіринту, направлена носом до відкритого рукава протилежного від дослідника, після цього запускається таймер. Після завершення тестування миша повертається у домашню клітку, а лабіринт обробляється 70% спиртом. Після висихання кладемо наступну мишу. Ми визначаємо час, проведений у відкритих рукавах, кількість входів у відкриті рукави та кількість переходів у закритих рукавах [25].

2.3.3. Тест спонтанного чергування у Т-подібному лабіринті

Тест спонтанного чергування проводиться у Т-подібному лабіринті, який складається зі стартового рукава та двох бічних, які розходяться у різні боки і нагадують літеру «Т». Довжина кожного рукава 30 см, висота бічних стінок 20 см. Кожен рукав лабіринту, включаючи стартовий і бічні, обладнано гільйотинними дверцятами, що дає змогу закривати мишу в обраному рукаві. Це

дозволяє контролювати її пересування під час тестування. Тест спонтанного чергування – це тест на просторову пам’ять, який базується на бажанні мишей відвідувати менш досліджений рукав. Для проведення тесту ми поміщаємо мишу в стартовий рукав, головою до південного кінця лабіринту. Потім ми дозволяємо тварині вільно досліджувати лабіринт. Коли миша повернула голову до центральної зони, ми запускаємо таймер. Після того, як миша повністю увійшла в одне з відгалужень, включаючи хвіст, ми закриваємо за нею дверцю гільйотини і тримаємо її в обраному рукаві протягом 30 секунд. Далі фіксуємо рукав, в який увійшла миша, і час, який вона витратила на вхід. Після цього тварину повертаємо в стартовий рукав і тест повторюється. Цю процедуру проводили для кожної миші п’ять разів, після чого тварин переносили в їхню домашню клітку, а лабіринт очищали 70% етанолом [131].

2.3.4. Тест на перевагу сахарози

Тест на перевагу сахарози застосовувався для оцінки ангедонії – зниження здатності відчувати задоволення, що є однією з ключових ознак депресивноподібної поведінки мишей. Метод базувався на протоколі, описаному в дослідженні [132], із деякими модифікаціями, адаптованими до умов нашої лабораторії.

На першому етапі дослідження було проведено оцінку базового рівня споживання рідини протягом 24 годин. Це було зроблено для розуміння того, скільки миші загалом споживають рідини протягом доби. Після цього тварини пройшли період водного обмеження, який тривав 4 години, з метою підвищення мотивації до пиття без викликання значного стресу чи дегідратації. Далі мишам було запропоновано дві пляшки з різною рідиною: одна містила чисту питну воду, а інша – 1% (маса/об’єм) розчин сахарози у тій самій воді. Пляшки встановлювали на однаковій висоті в різних частинах клітки. Протягом наступних трьох днів поспіль проводився основний тест, під час якого фіксувалася кількість рідини, спожитої з кожної пляшки щодня.

2.4. Забір крові та евтаназія

Кров у тварин брали в кінці експерименту. Перед забором крові миші голодували протягом 12 годин (але з вільним доступом до води) для забезпечення стабільності метаболічних показників. Тварину обережно поміщали в анестезійну камеру після чого поступово вводили вуглекислий газ, зі збільшенням концентрації, щоб уникнути дискомфорту. Експозиція тривала 1-2 хвилини, до досягнення несвідомого стану (відсутність рефлексів). Стан тварини постійно візуально контролювали [133]. Для забору зразка крові негепаринізованим скляним капіляром (діаметром 1,0 мм) проколювали праву заочну пазуху. Забір проводили швидко стерильним інструментом. Якщо тварину не планували повертати до експерименту, евтаназію проводили без виведення з анестезії. Для цього подачу газу продовжували ще 2-3 хвилини, щоб повністю зупинити серцеву діяльність. Потім ми проводили вивих шийного відділу хребта (маніпуляція з метою перелому шийних хребців) для надійного припинення всіх життєвих функцій [134]. Зразки крові розділяли на дві частини. Першу частину збирали в пробірки з гепарином і центрифугували (1500×g, 15 хв, 4 °C) для відділення плазми та клітин. Отриману плазму крові зберігали на льоді (0-4 °C) до аналізу біохімічних показників. Другу частину зразку крові використовували негайно для гематологічних аналізів. Після евтаназії та забору крові мишей обезголовлювали. Мозок виділяли та зважували. Кору головного мозку відокремлювали від інших частин мозку, заморожували в рідкому азоті та зберігали при -80 °C.

2.5. Визначення гематологічних показників

Загальну концентрацію гемоглобіну визначали спектрофотометричним методом з використанням реагенту Драбкіна за допомогою комерційного набору (#001.01, Genesis LLC, Світловодськ, Україна; https://www.genesislab.com.ua/), як

описано раніше [135]. Аліквоти крові змішували з реагентом Драбкіна у співвідношенні 1:250, інкубували протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Принцип методу полягає у тому що гемоглобін у присутності окисника і ціанід-аніонів утворює ціанметгемоглобін, а його поглинання вимірювали при 540 нм за допомогою спектрофотометра ULAB 102 (Shanghai Metash Instruments Co., Ltd., Шанхай, Китай). Дані виражені в грамах гемоглобіну на літр цільної крові (г/л).

Для визначення гематокриту (співвідношення об'єму еритроцитів до загального об'єму крові) 100 мкл крові відразу після відбору переносили в мікрокапілярні пробірки, які потім ретельно герметично закривали з обох боків і центрифугували (2000×g, 20 хв, 4 °C). Значення гематокриту розраховували як відношення об'єму осілих еритроцитів до загального об'єму крові, взятої мікрокапіляром.

Для підрахунку клітин крові аліквоти крові розводили у співвідношенні 1:40 у 3 % розчині NaCl для підрахунку еритроцитів та у співвідношенні 1:20 у 5 % розчині оцтової кислоти з додаванням метиленового синього для підрахунку загальної кількості лейкоцитів. Еритроцити та лейкоцити підраховували вручну під світловим мікроскопом за допомогою гемоцитометра, а результати виражали у вигляді кількості клітин на мілілітр крові [135].

Диференційний підрахунок лейкоцитів проводили шляхом дослідження забарвленого мазка периферичної крові. Невеликі краплі цільної крові наносили безпосередньо на скло для мікроскопіювання, а потім висушували на повітрі. Далі мазки фіксували й забарвлювали за методом Романовського, а потім – еозином і метиленовим синім методом Май-Грюнвальда-Гімза [136]. Метод базується на диференційному забарвленні клітинних компонентів за допомогою еозину, метиленового синього та інших барвників, що забезпечує чітке розрізнення типів лейкоцитів. Двісті клітин у кожному з двох мазків на зразок підраховували при збільшенні ×1000 за допомогою мікроскопа MICROmed (MICROmed Evolution LUM LS-8530; Ningbo Zhanjing Optical Instruments Co. Ltd), а клітини класифікували за стандартними методами [137]. Потім

розраховували відсотковий вміст різних типів лейкоцитів. Аналіз гематологічних показників проводили відповідно до стандартних підходів, що використовуються в експериментальних моделях ПТСР у мишей [25].

2.6. Нативний електрофорез у поліакриламідному гелі

Для аналізу активності ізоформ **супероксиддисмутази** (СОД) було застосовано метод нативного електрофорезу в поліакриламідному гелі відповідно до модифікованої методики Девіса [138], використовуючи 9% розділяючий гель без денатуруючих агентів.

Зразки готували шляхом гомогенізації тканин у співвідношенні 1:10 (об'єм/об'єм) у буферному розчині, який складався з 50 мМ KH_2PO_4 (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ). Отримані гомогенати центрифугували при 16 100 g протягом 15 хвилин при температурі 4 °C на мікроцентрифузі Eppendorf 5415 R (Гамбург, Німеччина). Супернатанти обережно відбирали та змішували у співвідношенні 1:1 з буфером, який містив 20% гліцеролу та 0,2% бромфенолового синього, після чого в комірку гелю вносили зразки, що містили по 40 мкг загального білку.

Ідентифікацію ізоформ проводили згідно з протоколом Beauchamp і Fridovich [139], що ґрунтується на специфічному забарвленні після інкубації гелю. Спочатку гель витримували протягом 20 хвилин у 36 мМ фосфатному буфері (pH 7,0), що містив 0,1% нітросинього тетразолію (NBT) при легкому струшуванні. Потім гель переносили в розчин, що містив 36 мМ фосфатний буфер (pH 7,0), 0,2% тетраметилетилендіаміну (ТЕМЕД) та 28 мкМ рибофлавіну, інкубували 10 хвилин при повільному перемішуванні. Після цього гель експонували під ультрафіолетовим освітленням до появи прозорих смуг на синьому фоні, що свідчило про наявність активних форм СОД. Прозорі смуги на гелі з'являються внаслідок інгібування відновлення нітросинього тетразолію супероксидними радикалами у ділянках, що містять активні ізоформи СОД, які дисмутизують супероксид і запобігають утворенню синього формазану.

Для кількісної оцінки активності СОД-смуг використовували програму ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/index.html) згідно з описом Schneider та ін. [140]. Інтенсивність кожної смуги аналізували окремо, і результати виражали у відсотковому відношенні, беручи за 100% загальну суму інтенсивностей смуг ізоформ СОД в зразку (по одній на кожну експериментальну групу). Для об'єктивності використовували зображення з чотирьох незалежних повторів.

2.7. Визначення активності ферментів антиоксидантного захисту та вмісту пероксидів ліпідів

Для визначення активності антиоксидантних ферментів заморожені зразки кори та проміжного мозку гомогенізували у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм) у середовищі, що містило 50 мМ калій фосфатного буферу (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ інгібітору протеаз фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ). Гомогенати центрифугували (16100 g, 15 хв, 4 °C), супернатанти збирали та зберігали на льоду.

Активність **глютатіон-S-трансферази** (GST) вимірювали шляхом моніторингу утворення адукту глютатіону та 1-хлор-2,4-динітробензену (ХДНБ) при 340 нм [141]. Для розрахунку активності GST використовували коефіцієнт екстинкції адукту глютатіону та ХДНБ, що становив 9,6 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$.

Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ GSH і дистильовану воду, ХДНБ і супернатант додавали безпосередньо перед початком реакції. Реакцію ініціювали додаванням ХДНБ і супернатанту, після чого зміну оптичної густини реєстрували при 340 нм протягом 90 с з інтервалом 10 с за допомогою спектрофотометра ULAB-102UV. Паралельно проводили вимірювання в бланковій пробі без супернатанту, а концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [141].

Активність **НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1** (НХО1) вимірювали шляхом моніторингу відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу (ДХФІФ) при 600 нм [141]. Суміш для визначення активності НХО1 містила 25 мМ Трис-HCl (pH

7,5), 0,7 мг бичачого сироваткового альбуміну (БСА), 0,2 мМ НАДН, 0,01% Твін-20, 40 мкМ ДХФІФ і 5 мкл супернатанту в кінцевому об'ємі 1 мл. Реакцію розпочинали додаванням ДХФІФ, а через дві хвилини після реєстрації зменшення рівня ДХФІФ додавали 10 мкМ дикумаролу для інгібування специфічної активності ДХФІФ. Активність НХО1, що інгибується дикумаролом, розраховували за коефіцієнтом екстинкції 21,0 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$ для ДХФІФ. Одиниця активності ферменту була визначена як кількість ферменту, що утворює 1 мкмоль продукту за хвилину; активність виражається в міжнародних одиницях або міліодиницях на міліграм розчинного білку. Концентрації білку визначали за методом Бредфорда [142].

Активність **глютатіонпероксидази** (ГП) визначали непрямим методом у спряженій реакції з глютатіонредуктазою (ГР). У процесі відновлення гідропероксидів глютатіонпероксидазою відновлений глютатіон (GSH) окиснюється до GSSG. Далі окислений глютатіон (GSSG) за участю ГР відновлюється до GSH з використанням НАДФН як кофактора. Швидкість окиснення НАДФН, що пов'язана з циклічним перетворенням GSH і GSSG, є прямо пропорційною активності глютатіонпероксидази та реєстрували за зменшенням оптичної густини при 340 нм.

Реакційна суміш містила 50 мМ калій-фосфатний буфер, 0,5 мМ ЕДТА, 4 мМ NaN_3, 0,25 мМ НАДФН, 15 мМ GSH, 1 О/мл ГР і дистильовану воду. Азид натрію додавали для інгібування каталази. Реакцію ініціювали послідовним додаванням ГР, пероксиду водню (кінцева концентрація 0,2 мМ) та супернатанту. Зміну оптичної густини вимірювали протягом 90 секунд з інтервалом 10 секунд при 340 нм за допомогою спектрофотометра ULAB-102UV. Паралельно проводили вимірювання в холостій пробі без супернатанту для корекції неспецифічного окиснення НАДФН.

Активність **глюкозо-6-фосфатдегідрогенази** (Г6ФДГ) визначали за швидкістю утворення відновленої форми НАДФН у ході ферментативної реакції, що супроводжується відновленням $НАДФ^+$ у присутності іонів Mg^{2+}. Реакцію

реєстрували спектрофотометрично за зміною оптичної густини при довжині хвилі 340 нм, характерній для НАДФН.

Для проведення аналізу готували реакційну суміш, яка містила 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,2 мМ НАДФ та дистильовану воду. У кювету вносили 920 мкл підготовленої суміші та 80 мкл супернатанту. Зміну оптичної густини реєстрували протягом 90 секунд з інтервалом 10 секунд за допомогою спектрофотометра ULAB-102UV.

Крім того, у дослідних зразках визначали концентрацію загального білка методом Бредфорда для подальшого розрахунку питомої активності ферменту.

Рівень **пероксидів ліпідів** (ПЛ) вимірювали, як описано раніше [143]. Тканини гомогенізували в холодному 96% етанолі з подальшим центрифугуванням (13200 об/хв, 10 хв, 4°C). Реакційна суміш містила 100 мкМ ксиленолу оранжевого, 25 мМ H_2SO_4, 4 мкМ $FeSO_4$ і 20 мкл супернатанту. Як стандарт для калібрувальної кривої використовували гідропероксид кумену у кінцевих концентраціях від 1 до 16 мкМ. Метод базується на окисненні Fe^{2+} ліпідними гідропероксидами з подальшим утворенням забарвленого комплексу Fe^{3+} з ксиленоловим оранжевим. Оптичну густину зразків при 580 нм вимірювали за допомогою спектрофотометра ULAB-102UV (Китай).

2.8. Визначення біохімічних та імунологічних показників у плазмі крові

Концентрації глюкози та глікогену визначали з використанням діагностичного набору («Реагент», Дніпро, Україна) відповідно до інструкцій виробника. Вільну **глюкозу** оцінювали за окисненням глюкози глюкозооксидазою з утворенням пероксиду водню, який у реакції з пероксидазою формує рожевий комплекс. Інтенсивність забарвлення, пропорційна концентрації глюкози, вимірювали при 500 нм. Для аналізу 10 мкл супернатанту змішували з 90 мкл дистильованої води та 500 мкл робочого розчину; калібрувальні проби готували з робочого розчину глюкози (0,2 мг/мл).

Проби інкубували 15 хв при 37°С, після чого додавали по 500 мкл води та перемішували.

Визначення **глікогену** проводили шляхом гідролізу ферментом амілоглюкозидазою: 10 мкл супернатанту змішували з 10 мкл амілоглюкозидази, 1 мкл 0,09% NaN_3 і доводили об'єм до 100 мкл дистильованою водою. Проби інкубували 2 години при 37°С, після чого додавали 500 мкл робочого розчину та вимірювали глюкозу. Вміст глікогену обчислювали як різницю між концентрацією глюкози після та до обробки амілоглюкозидазою. Поглинання визначали при 500 нм, калібрувальний графік будували за стандартним розчином глюкози, а концентрацію зразків обчислювали з використанням коефіцієнта лінійної регресії.

Рівень **водорозчинних білків** у плазмі крові визначали за методом Бредфорда після розведення зразка дистильованою водою у співвідношенні 1:9 (об'єм/об'єм).

Для аналізу вмісту **триацилгліцеролів** (ТАГ) заморожені зразки гомогенізували у фосфатно-буферному розчині (ФБР, pH 7,4), що містив 0,05% Triton X-100, у співвідношенні 1:50 (маса/об'єм). Отримані гомогенати інкубували при 70 °С протягом 10 хвилин з метою інактивації ендогенних ферментів.

Кількісне визначення ТАГ здійснювали за допомогою ферментативного методу, який включає послідовні реакції гідролізу та кольорового детектування. Під дією ліпази ТАГ гідролізуються до гліцеролу та жирних кислот. Утворений гліцерол фосфорилюється гліцерокіназою з утворенням гліцерол-3-фосфату, який надалі окиснюється гліцерофосфатоксидазою з утворенням пероксиду водню. Останній вступає в реакцію з 4-амінофеназоном і 4-хлорфенолом у присутності пероксидази з формуванням забарвленої хінонімінової сполуки. Інтенсивність утвореного забарвлення, пропорційну концентрації ТАГ у зразку, вимірювали фотометрично при довжині хвилі 505 нм.

Вміст **загального холестерину** визначали з використанням комерційного діагностичного набору «Реагент» відповідно до інструкцій виробника. У ході

аналізу естерифікований холестерин під дією холестеролестерази гідролізується з утворенням вільного холестерину та жирних кислот. Надалі вільний холестерин окиснюється холестеролоксидазою у присутності молекулярного кисню з утворенням 4-холестенону та пероксиду водню. Пероксид водню вступає в подальшу реакцію з 4-амінофеназоном і фенолом з формуванням забарвленої хінонімінової сполуки.

Для аналізу використовували 10 мкл супернатанту. Одночасно з дослідними зразками готували калібрувальні проби для побудови калібрувальної кривої з використанням стандартного розчину холестерину з концентрацією 5,2 ммоль/л. До калібрувальних і дослідних проб додавали по 250 мкл робочого реактиву, після чого зразки ретельно перемішували та інкубували протягом 10 хвилин при температурі +37 °C. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 540 нм за допомогою мікропланшетного фотометра.

Суміш для визначення активності **параоксанази** (ПОН) містила 50 мМ Tpic-HCl (pH 7,0), 1 мМ $CaCl_2$, 3,2 мМ нітрофенілацетату та 5 мкл плазми крові, розведеної в 10 разів до загального об’єму 1,25 мл [144]. Реакцію ініціювали додаванням 25 мкл 160 мМ 4-нітрофенілацетату як субстрату для ПОН. Зміну поглинання світла утвореним п-нітрофенолом реєстрували при довжині хвилі 405 нм, а для розрахунку активності використовували його молярний коефіцієнт поглинання 14000 M^{-1} $см^{-1}$. [144]

Активність **мієлопероксидази** (МОП) визначали шляхом окислення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину пероксидом водню з утворенням коричневого 3,3',5,5'-тетраметилбензидину дііміну. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2 М H_2SO_4. Оптичну густину зразків вимірювали при 450 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра зі світлофільтрами. Для розрахунку активності використовували молярний коефіцієнт екстинкції 3,3',5,5'-тетраметилбензидину дііміну, що становить 59 000 $М^{-1}$ $см^{-1}$ [145].

Відносний рівень **інтерлейкіну-1β** (ІЛ-1β) у плазмі оцінювали методом ELISA. Плазму крові розводили у 5 разів у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) і 100 мкл розведеної плазми вносили в комірки мікропланшету для кожного зразка

та інкубували протягом ночі при 4 °C для іммобілізації білку. Після промивання ФСБ кожну комірку мікропланшету блокували 200 мкл 4% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім до зразків додавали первинне антитіло анти-інтерлейкін-1β (#ab9722) і інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Розчин антитіла проти інтерлейкіну-1β спочатку розводили дистильованою водою до концентрації 100 мкг/мл, а потім у 4% БСА (1:100). Далі мікроплашки інкубували з антитілами (antirabbit antibody)(CellSignaling, #7074S, розведеними у 4% БСА, 1:2000 протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після промивання до зразків додавали 80 мкл дигідрохлориду 3,3',5,5'-тетраметилбензидину, який є субстратом для пероксидази хреню на вторинних антитілах. Потім зразки інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин до появи синього кольору. Після інкубації реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2 М H_2SO_4 і визначали поглинання світла при 450 нм. Результати виражали як відносний рівень ІЛ-1β порівняно з середнім рівнем контрольної групи.

Рівень **кортикостерону** вимірювали в плазмі крові за допомогою комерційно доступного набору для конкурентного імуноферментного аналізу (ELISA) (Corticosterone ELISA Kit, Cat. No. EM1721, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., China; https://www.fn-test.com/product/em1721/), відповідно до інструкцій виробника (FineTest (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.). (n.d.). Corticosterone ELISA Kit (EM1721). Отримано з https://www.fn-test.com/product/em1721/). Коротко кажучи, 50 мкл плазми та стандартів додавали до 46-лункової мікропластинки, попередньо покритої антитілами, специфічними до кортикостерону. Потім до кожної лунки додавали 50 мкл реагенту кортикостерону, кон'югованого з пероксидазою хрону (HRP), і планшет інкубували при 37 °C протягом 45 хвилин, щоб забезпечити конкурентне зв'язування між вільним кортикостероном у зразку та антигеном, міченим HRP.

Після інкубації лунки тричі промивали промивним буфером, що входив до комплекту, щоб видалити незв'язані реагенти. Потім до кожної лунки додавали 50 мкл розчину субстрату TMB (3,3′,5,5′-тетраметилбензидин), що ініціювало

колориметричну реакцію, каталізовану HRP. Реакцію зупиняли через 15 хвилин додаванням 50 мкл стоп-реагенту, що призводило до зміни кольору з синього на жовтий. Оптичну щільність вимірювали при 450 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра (HiPo MPP-96, Biosan, Латвія). Стандартну криву будували за допомогою відомих концентрацій кортикостерону, що входили до набору, а концентрації в експериментальних зразках розраховували методом інтерполяції.

2.9. Визначення вмісту карбонільних груп білків.

Рівень **карбонільних похідних білків** визначали на основі їх взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ) з утворенням відповідних динітрофенілгідразонів. Осад, отриманий із ТХО-екстрактів (екстракти, отримані з використанням трихлороцтової кислоти), інкубували з 1 мл 10 мМ розчину ДНФГ у 2 М HCl, тоді як у контрольні проби замість ДНФГ додавали 2 М HCl. Інкубацію проводили протягом 1 години при кімнатній температурі, після чого зразки центрифугували при 5000 g упродовж 5 хвилин за температури 21 °C.

Після відділення надосадової рідини осад тричі промивали сумішшю етанолу з бутилацетатом (1:1) для видалення непрореагованого ДНФГ. Надалі осад розчиняли у 6 М гуанідин-HCl та повторно центрифугували для усунення нерозчинних домішок. Кількість карбонільних груп у супернатантах визначали спектрофотометрично при 370 нм із використанням коефіцієнта молярної екстинкції 22 000 $M^{-1} \cdot см^{-1}$. У тих самих зразках концентрацію загального білка визначали методом Бредфорда.

2.10. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (англ. RT-qPCR) проводили за допомогою ампліфікаційної системи AriaMx (Agilent

Technologies, Inc.). Загальну РНК із кори головного мозку мишей (приблизно 12 мг тканини) екстрагували з застосуванням набору Zymo research direct-zol RNA miniprep kit 2052 згідно з інструкціями виробника.

Таблиця 2.1.

Послідовності олігонуклеотидів (праймери), використані в дослідженні для аналізу рівнів мРНК за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

Ген	Прямий праймер (5′ → 3′)	Зворотній праймер (5′ → 3′)
CCL2	CAGCCAGATGCAGTTAACGC	TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC
CXCL1	CCAAACCGAAGTCATAGCCAC	GTGTTGTCAGAAGCCAGCG
CXCL2	CTGCCAAGGGTTGACTTCAAG	GCCCTTGAGAGTGGCTATGA
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	CCACGATTTCCCAGAGAACATG
NUR77	TCATCACTGATCGACACGGG	TCAGACAGCTAGCAATGCGA
CYP1A1	CCCACAGCACCACAAGAGAT	TTCAGGCCGGAACTCGTTT
S100A10	GGCGACAAAGACCACTTGAC	GAAGCCCACTTTGCCATCTC
NR3C1 (GR)	ACTGCTTCTCTCCTCAGTTCC	TCTGACTGGAGTTTCCTTCCC
PPARGC1A	CTCTGGAACTGCAGGCCTAA	GCCTTGGGTACCAGAACACT
SGK1	GAACCACGGGCTCGATTCTA	CAGATACTCAGGCGTGCCA
SHANK1	GCAGACCATCAGTGCAAGTG	AGCCCCGATAGATTTCTGCC
FKBP5	AGTCAATCCTCAGAACAGGGC	CTTTGCTGGCTTCCTCCTTTG
RPL27	TCAGGGACCCAGCTTTGAAG	TTCCCTGTCTTGTATCGCTCC

Кількісний вміст та якість ізольованої РНК оцінювали за допомогою спектрофотометра DeNovix® DS-11 FX+ (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). Після вимірювання концентрації ми нормували кількість мРНК у зразках до

однакових значень (тобто якщо вміст РНК був вищим зразки розводили водою без нуклеаз) приблизно 150-300 нг/мкл для подальшого використання.

Синтез кодуючої ДНК (кДНК) здійснювали за допомогою набору ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (E6560, New England Biolabs) відповідно до стандартного протоколу з застосуванням суміші випадкових праймерів, що входить до складу набору. Для ампліфікації використовували 1/16 частину отриманої реакційної суміші кДНК у поєднанні з реагентом Luna® Universal qPCR Master Mix (E3003, New England Biolabs).

Протокол термоциклювання складався з початкової денатурації при 95 °C протягом 1 хв, після чого виконували 45 циклів ампліфікації: по 15 секунд при 95 °C (денатурація) та 34 секунди при 60 °C (гібридизація/елонгація з реєстрацією флюоресценції). Після завершення основної реакції проводили аналіз кривих плавлення у стандартному передбаченому налаштуваннями приладу режимі.

Флуоресцентне зчитування проводили через канали 6-FAM (основний сигнал) і ROX (пасивний референсний барвник), при цьому рівень сигналу нормалізували відносно зафіксованої в ROX-каналі флюоресценції.

Для визначення відносного рівня експресії мРНК використовували метод 2^–ΔΔCq [228], застосовуючи Cq-значення гена *RPL27* (що кодує 60S рибосомний білок L27) як референсного гену.

Нуклеотидні праймери для ампліфікації цільових генів (див. таблицю 2.1.) були отримані від компанії Metabion International AG (Штайнкірхен, Німеччина).

2.11. Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз та візуалізація у першому експерименті (описаний в розділі 3) були виконані за допомогою програми GraphPad Prism (версія 10.0.0 для Windows, GraphPad Software, Бостон, Массачусетс, США, www.graphpad.com) та R (версія 4.3.1). Статистичний аналіз включав оцінку

нормальності розподілу для всіх наборів даних за допомогою тесту Шапіро-Уілка, також оцінювалась рівність дисперсій за допомогою тесту Брауна-Форсайта, розрахованих за допомогою пакету R DescTools. Кількість повторів - 6-8. Усі нормально розподілені дані піддавали односторонньому аналізу відхилень за узагальненими моделями найменших квадратів. Після аналізу проводили множинні порівняння з використанням оцінених граничних середніх. Негомоскедастичні дані піддавали оберненій трансформації. Дані, що не мали нормального розподілу, були проаналізовані за допомогою тесту Крускала-Уолліса з подальшим парним порівнянням за допомогою тесту Манна-Уїтні з коригуванням p-значень за методом Бенджаміні-Хохберга. Для розрахунків використовували функції з пакетів «nlme» (узагальнені найменші квадрати), «car» (аналіз відхилень) та «emmeans» (оцінені граничні середні).

Аналіз головних компонентів було проведено з використанням пакетів «pcaMethods», «ggfortify», «ggpubr» та «ggplot2» (версія 4.3.1). Для розрахунку головних компонентів було використано нелінійний ітеративний алгоритм найменших квадратів. Криві характеристик приймача було побудовано в GraphPad Prism.

Для другого експерименту (описаний в розділі 4) проводився двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з подальшим тестом множинних порівнянь Тюкі застосовувався до всіх нормально розподілених даних. Кількість повторів становить 9-12. Ненормально розподілені дані аналізували за допомогою тесту Крускала-Уолліса як і для першого експерименту (статистика H) з подальшим тестом множинних порівнянь Данна. Результати тесту на перевагу сахарози аналізували за допомогою двофакторного ANOVA з подальшим некоригованим тестом Фішера LSD.

У третьому експерименті (описаний в розділі 5) дані аналізували за допомогою непарного t-критерію Стьюдента з $p < 0,05$ як статистично значущої різниці. Кількість повторів становить 7. Вибраний розмір вибірки базувався на розрахунках аналізу потужності (https://wnarifin.github.io/ssc/ssanimal.html) та

функції pwr.t.test у пакеті R «pwr» (з розміром ефекту 1,75, що означає сильний ефект, та потужністю 0,8).

РОЗДІЛ 3. ДОВГОТРИВАЛІ ЕФЕКТИ ФІЗИЧНИХ, СОЦІАЛЬНИХ ТА ПСИХОЛОГІЧНИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

3.1. Результати дослідження

3.1.1. Результати тестів відкритого поля проведених на мишах, які піддавались впливу різних стресорів

Для перевірки спричинених стресовими факторами симптомів ПТСР у мишей використовують кілька поведінкових тестів, серед яких найпоширенішим є тест відкритого поля [30,146]. У ході його виконання оцінювалися такі параметри: пройдена мишами загальна відстань, час перебування у внутрішній зоні та кількість дефекацій. Тест проводився у двох повторах. Спочатку проводили тестування мишей з груп знерухомлення та впливу звуку хижака на 10-й день після дії стресу, тоді як тварин з групи соціальної ізоляції оцінювали на 28-й день (Рис. 2.1). Різні терміни тестування були обрані тому, що гострі травматичні стресори (знерухомлення та вплив звуку хижака) викликають миттєві зміни поведінки, які досягають піку протягом декількох днів, що вимагає тестування на 10-й день. Натомість хронічний стрес (соціальна ізоляція) призводить до поступових, довготривалих поведінкових порушень, які повністю проявляються щонайменше через 3-4 тижні, що виправдовує тестування на 28-й день [146–148]. Поведінковий аналіз контрольних тварин проводили на 10-й день (3 миші) і 28-й день (інші 3 миші) після початку експерименту. Оскільки не було значних відмінностей у поведінкових показниках контрольних мишей, протестованих на 10-й і 28-й дні, їхні дані були об’єднані в одну групу. Слід зазначити, що миші з групи соціальної ізоляції перебували в індивідуальних клітках) протягом всього експерименту, тоді як тварини з інших експериментальних груп після впливу стресу поверталися до стандартних умов утримання. Таким чином, ми порівняли ефекти хронічного стресу (соціальна ізоляція) та гострого стресу (знерухомлення та вплив звуку хижака).

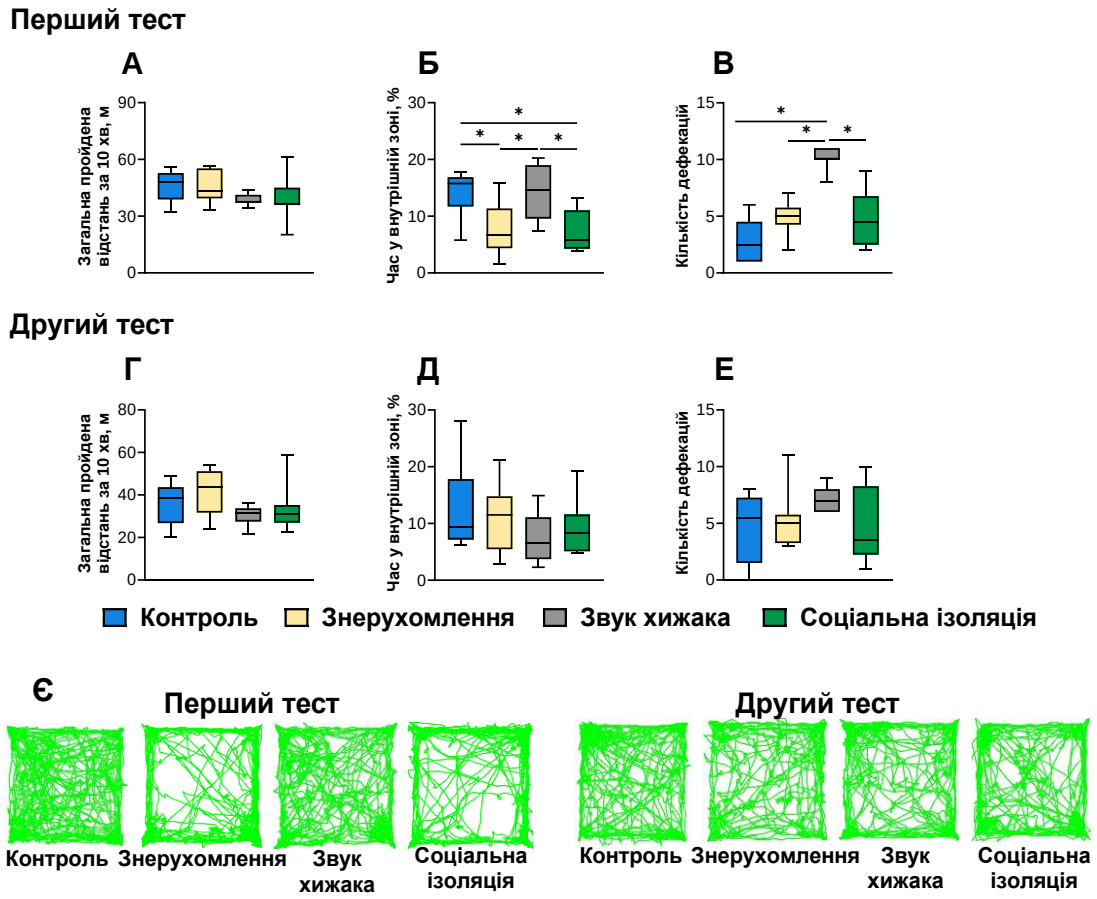

Рис. 3.1. Поведінкові характеристики мишей контрольної та стресованих груп. (А, Г), Загальна відстань, пройдена мишами, та час (Б, Д), проведений у центральних квадратах або внутрішній зоні відкритого поля (В, Е) кількість дефекацій та (Є) траєкторії руху мишей (для яких відсоток перебування в центрі був найближчим до середнього по групі) у часі під час 1-го та 2-го тестів відкритого поля. Параметри на панелях А, Б, В взяті з 1-го тестування тесту відкритого поля, а параметри на панелях Г, Д, Е – з 2-го тестування. Зірочки (*p < 0,05) позначають значущі відмінності між контрольною та експериментальними групами відповідно до тесту Крускала-Уолліса, а потім парних порівнянь за тестом Манна-Уїтні з поправкою Бенджаміні-Хохберга для багаторазових порівнянь.

Не було виявлено значущої різниці між групами за загальною відстанню, пройденою в тесті відкритого поля (ТВП), проте була тенденція до зменшення у

групі яка піддавалась впливу нявкання кота (Рис. 3.1.А). Миші з груп соціальної ізоляції та знерухомлення проводили в два рази менше часу у внутрішній зоні відкритого поля порівняно з контрольною групою (Рис. 3.1.Б). Звук хижака не вплинув на час перебування тварин у внутрішній зоні відкритого поля (Рис. 3.1.Б). Проте миші, які зазнавали такого впливу, випорожнювалися в чотири рази частіше, ніж тварини контрольної групи (Рис. 3.1.В).

Щоб дослідити довгострокові ефекти впливу стресу другий тест відкритого поля провели через чотири тижні після першого випробування, (Рис. 2.1.). Було показано, що загальна відстань, пройдена мишами, час перебування у внутрішній зоні та кількість дефекацій у контрольних і дослідних мишей істотно не відрізнялися (Рис. 3.1.Г-Е).

3.1.2. Вплив стресу соціальної ізоляції, звуків хижака та знерухомлення на імунологічні, гематологічні та біохімічні показники крові мишей

Більшість основних висновків про стан здоров’я базуються на результатах аналізів крові. З метою виявлення маркерів стресу в крові мишей були оцінені деякі гематологічні показники. Ми зосередилися на показниках, які пов’язані з імунною системою та запаленням, а також на загальних показниках кровотворення та рівнях метаболітів, які можуть бути важливими для здоров’я серцево-судинної системи, таких як рівень глюкози, холестеролу та загальний вміст білку. Вміст гемоглобіну та кількість еритроцитів не відрізнялися між експериментальною та контрольними групами (табл. 3.1). Проте миші, які піддавалися впливу звуку хижака та соціальної ізоляції, мали на 13-15% вищий гематокрит порівняно з контрольною групою. Загальна кількість лейкоцитів у тварин з групи впливу звуку хижака була на 52% вищою, ніж у контрольної групи (табл. 3.1). Окрім того, миші цієї групи мали на 55% більше незрілих нейтрофілів у периферійній крові, ніж контрольна група (табл. 3.2).

Таблиця 3.1.

Гематологічні параметри периферійної крові мишей контрольної та дослідних груп

Параметр	*Контроль*	*Стримування*	*Звук хижака*	*Соціальна ізоляція*
Гемоглобін, г/л	120±8	138±7	141±3	135±6
Гематокрит, %	40,1±1,8	42,9±1,0	47,0±1,3*	46,0±0,9*
Кількість еритроцитів, 10^6/мл	3,65±0,36	2,81±0,12	2,53±0,19	4,10±0,42
Кількість лейкоцитів, 10^3/мл	3,98±0,39	4,90±0,53	6,07±0,92*	4,30±0,33

Дані представлені у вигляді середніх значень ± SEM, n = 6–8. Зірочки (*p < 0,05) позначають значущі відмінності між контрольною та експериментальними групами відповідно до узагальнених моделей суми найменших квадратів з подальшим розрахунком граничних середніх значень для множинних порівнянь.

Таблиця 3.2.

Лейкоцитарна формула периферійної крові мишей контрольної та експериментальних груп

Тип лейкоцитів, %	*Контроль*	*Стримування*	*Звук хижака*	*Соціальна ізоляція*
Юні форми	3,33±0,45	4,00±0,40	5,17±0,44*	5,00±0,91
Паличкоядерні нейтрофіли	2,17±0,44	3,14±0,43	1,83±0,40	2,29±0,69
Сегментоядерні нейтрофіли	19,0±0,8	19,6±2,5	17,5±1,1	18,9±2,0
Базофіли	НВ	НВ	НВ	НВ
Еозинофіли	НВ	НВ	НВ	НВ
Лімфоцити	74,0±1,1	72,0±2,5	74,2±0,9	72,1±2,6
Моноцити	1,33±0,39	1,00±0,40	1,33±0,30	1,71±0,56

Дані представлені у вигляді середніх значень ± SEM, n = 6–8. Зірочки (*p < 0,05) позначають значущі відмінності між контрольною та експериментальними групами відповідно до узагальнених моделей суми найменших квадратів, а потім – оцінених граничних середніх значень для множинних порівнянь. НВ – не виявлено.

У мишей під дією різних стресових факторів не змінювався рівень глюкози та білку в плазмі крові (Рис. 3.2.А-Б). Рівень загального холестерину був на 14% нижчим у тварин з груп впливу звуку хижака та соціальної ізоляції порівняно з контролем (Рис. 3В). Відносний рівень інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β) був на 73% вищим у мишей з групи соціальної ізоляції, ніж у контрольної групи (Рис. 3.2.Г). Активність параоксонази була нижчою на 28%, 39% та 25% у тварин з груп знерухомлення, впливу звуку хижака та соціальної ізоляції, відповідно, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.2.Д). Ми також спостерігали значно нижчу активність МПО у мишей з груп впливу звуку хижака та соціальної ізоляції, відповідно на 59% та 63%, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.2.Е).

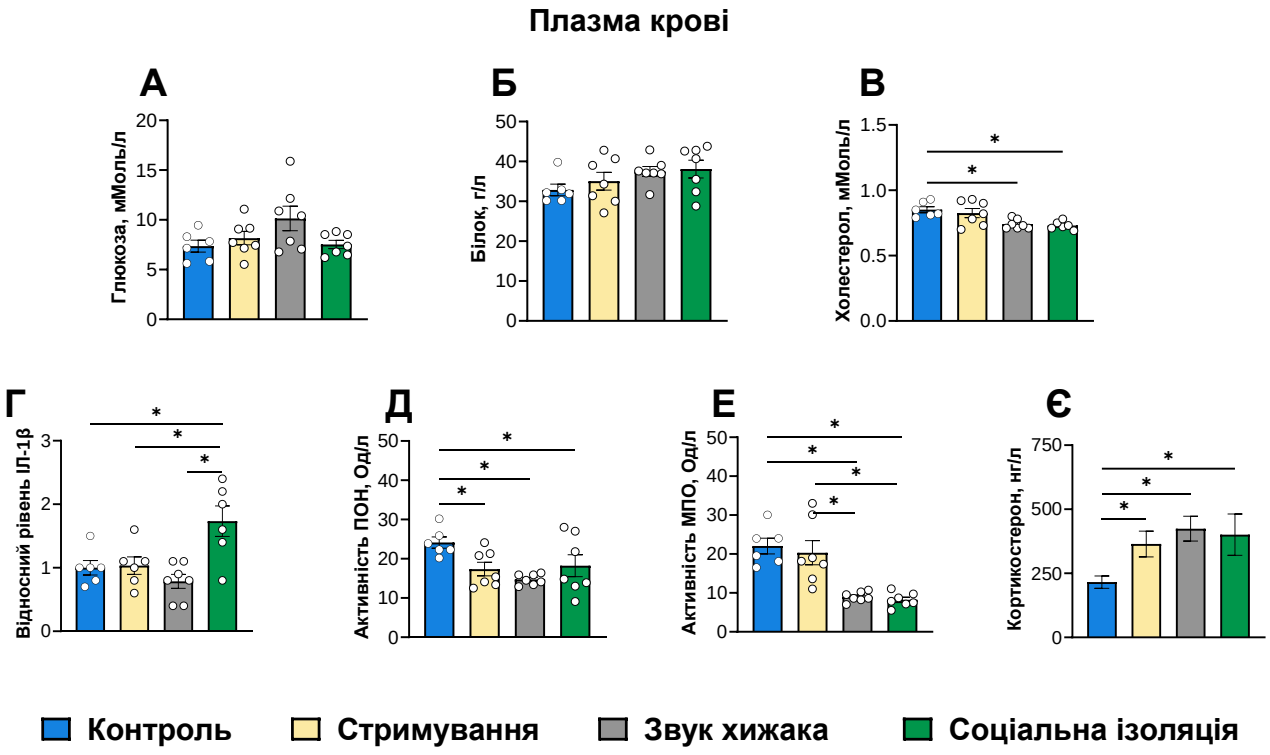

Рис. 3.2. Біохімічні параметри плазми крові мишей, підданих різним стресам. (А) Рівні глюкози, (Б) загального білку, (В) загального холестерину та (Г) інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β), (Д) активність параоксонази (ПОН), (Е) мієлопероксидази (МПО) та (Є) рівень кортикостерону у плазмі крові. Дані представлені як середнє ± SEM, n = 6-8. Зірочки (*$p < 0,05$) позначають значущі відмінності між контрольною та експериментальними групами відповідно до узагальнених моделей найменших квадратів з подальшим розрахунком граничних середніх значень для множинних порівнянь.

Щоб дослідити розвиток потенційної нейроендокринної реакції на стрес, ми виміряли рівень кортикостерону в плазмі крові мишей. Було виявлено значне підвищення рівня кортикостерону в плазмі (на 69–97 %) у мишей груп «Обмеження», «Звук хижака» та «Соціальна ізоляція» порівняно з контрольною групою (Рис. 3.2.Є).

3.1.3. Вплив стресу на активність антиоксидантних ферментів, та рівні мРНК генів, пов'язаних із сигналами стресу та запаленням у корі головного мозку

Кора головного мозку відіграє вирішальну роль у регуляції когнітивних процесів, включаючи емоційний контроль і пам'ять, які порушуються при ПТСР. Щоб оцінити можливі асоційовані стресом довготривалі молекулярні зміни в корі головного мозку, через п'ять місяців після впливу були визначені біохімічні та молекулярні параметри. Вибір маркерів оксидативного стресу грунтувався на показниках, які є найбільш чутливими до змін.

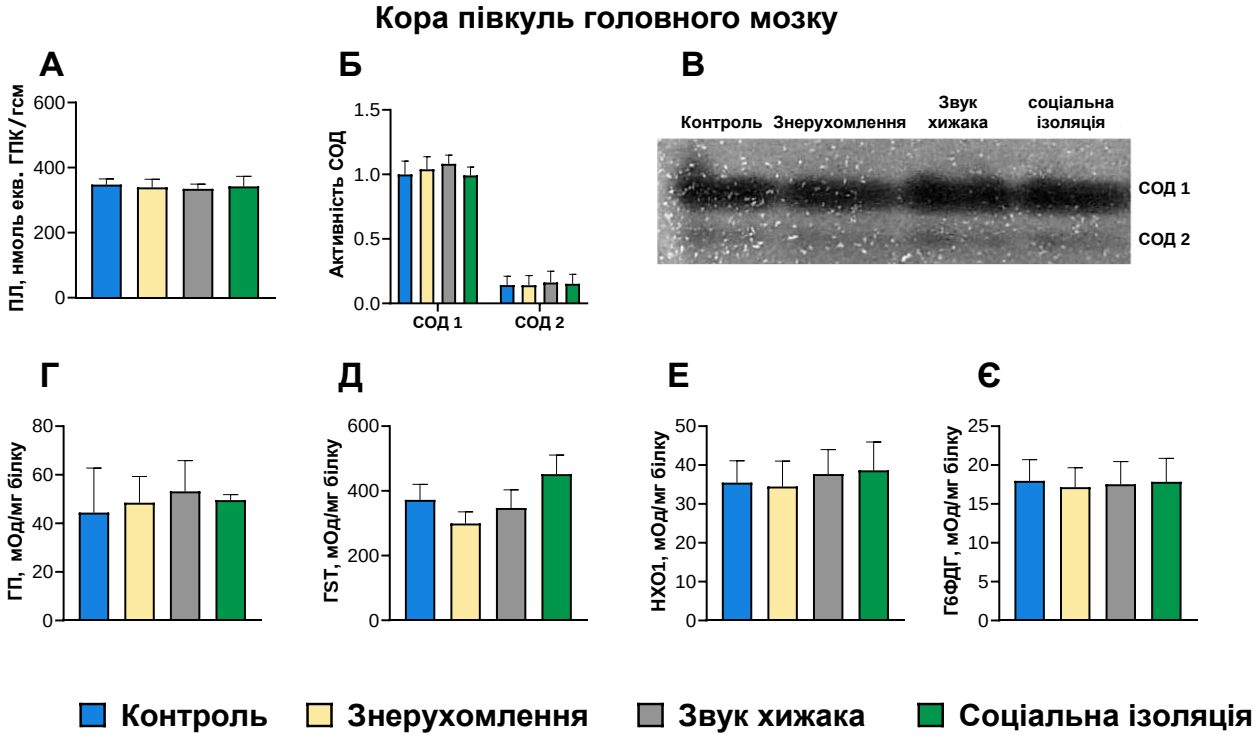

Рис 3.3. Маркери оксидативного стресу та активність антиоксидантних ферментів у мишей, підданих різним стресам. (А) Рівень пероксидів ліпідів (ПЛ), (Б) активність ізоформ супероксиддисмутази (СОД) та (В) репрезентативна електрограма активності ізоформ СОД, активність (Г) глютатіонпероксидази (ГП), (Д) глютатіон-S-трансферази (GST), (Е) НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 (НХО1) та (Є) глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ). Дані представлені як середнє ± SEM, n = 3-6.

Маркери оксидативного стресу визначали як рівні пероксидів ліпідів ПЛ та активність антиоксидантних і пов’язаних з ними ферментів, включаючи супероксиддисмутазу (СОД), глютатіонпероксидазу (ГП), глютатіон-S-трансферазу (GST), НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктазу 1 (НХО1) та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу (Г6ФДГ) в корі головного мозку мишей. Різниці циз параметрів між групами виявлено не було (Рис. 3.3. А-Є).

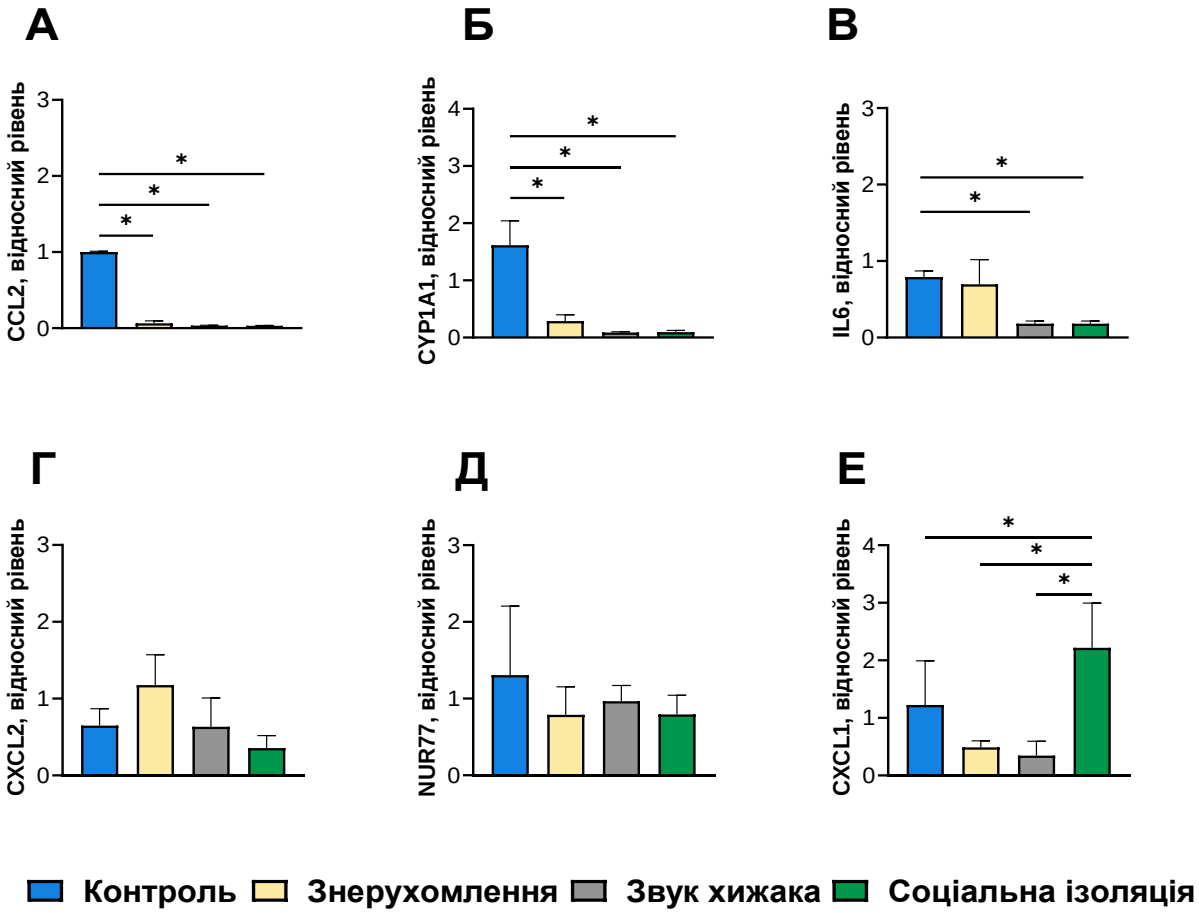

Рис. 3.4. Рівні мРНК-транскриптів (А) *CCL2*, (Б) *CYP1A1*, (В) *IL-6*, (Г) *CXCL2*, (Д) *NUR77*, (Е) *CXCL1* у корі головного мозку мишей, підданих різним стресам. Дані представлені як середнє ± SEM, n =3-5.

CCL2 кодує хемокін MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), який є одним з ключових регуляторів міграції моноцитів, Т-лімфоцитів пам’яті та дендритних клітин через взаємодію з рецептором CCR2. У центральній нервовій

системі *CCL2* активно експресується астроцитами та мікроглією у відповідь на дію стресових стимулів й ушкодження, сприяючи рекрутуванню периферійних імунних клітин та активації нейрозапальних процесів. Підвищення рівня *CCL2* у мозковій тканині асоціюється з порушенням проникності гематоенцефалічного бар'єру та дисфункцією нейрональних мереж при індукованих стресом розладах, зокрема ПТСР [149].

CXCL1 (GROα; KC у мишей) кодує CXC-хемокін, який є потужним хемоатрактантом нейтрофілів і реалізує свої ефекти через рецептори CXCR2. У нервовій системі *CXCL1* продукується гліальними клітинами у відповідь на пошкодження нейроналів або запалення та сприяє судинній активації, міграції імунних клітин і формуванню гострої запальної відповіді. Посилена експресія *CXCL1* розглядається як ранній маркер нейроімунної активації за умов стресу та травматичного впливу [150].

CXCL2 кодує макрофагальний запальний білок-2 (MIP-2), який взаємодіє переважно з CXCR2 і індукує інфільтрацію поліморфноядерних лейкоцитів. У ЦНС *CXCL2* залучений до регуляції судинної проникності та розвитку гострих нейрозапальних реакцій. Його надекспресія пов'язана з посиленням імунної відповіді та вторинним пошкодженням нейронів у моделях стресу й нейротравми [151].

Ген *IL-6* кодує інтерлейкін-6 – плейотропний прозапальний цитокін, що відіграє ключову роль у взаємодії імунної, ендокринної та нервової систем. У мозку *IL-6* синтезується мікроглією, астроцитами та нейронами у відповідь на стресові стимули та активує JAK/STAT-сигналінг. Хронічне підвищення експресії *IL-6* асоціюється з нейрозапаленням, порушенням нейропластичності та порушенням регуляції ГГН осі, що розглядається як один з молекулярних механізмів формування ПТСР [152].

NUR77 (*NR4A1*) кодує орфановий ядерний рецептор, експресія якого швидко індукується нейрональною активністю, глюкокортикоїдами та запальними сигналами. *NR4A1* функціонує як транскрипційний регулятор генів, залучених до клітинної адаптації, апоптозу та метаболічної відповіді. У мозку

цей фактор бере участь у регуляції синаптичної пластичності, контролі нейрозапалення та формуванні поведінкових реакцій на стрес [153].

CYP1A1 кодує фермент системи цитохрому Р450, що каталізує окислювальний метаболізм ксенобіотиків та окремих ендогенних сполук. У нервовій тканині *CYP1A1* експресується в ендотеліальних клітинах та нейронах і бере участь у регуляції локального редокс-гомеостазу. Активація *CYP1A1* пов'язана з AhR-опосередкованими сигнальними шляхами та може модулювати оксидативний стрес і запальні процеси в ЦНС [154].

Вплив травматичних факторів призвів до післястресових змін рівнів іРНК генів *CCL2* та *CYP1A1* у стані рівноваги (Рис. 3.4.А, Б). Відносні рівні іРНК *CCL2* та *CYP1A1* були значно нижчими (на 82-97%) у мишей з груп знерухомлення, впливу звуку хижака та соціальної ізоляції порівняно з контрольною групою (Рис. 3.4.А-Б). Також було виявлено, що рівень іНК *IL-6* був на 77% нижчим у тварин з груп соціальної ізоляції та впливу звуку хижака порівняно з контрольною групою (Рис. 3.4.В). Крім того, рівні іРНК *CXCL1* були на 81% вищими в мишей з групи соціальної ізоляції, ніж у контролі (Рис. 3.4.Е). Не було виявлено значних відмінностей у рівнях іРНК між контрольною групою та стресованими мишами для генів *CXCL2* та *NUR77* (Рис. 3.4.Г, Д).

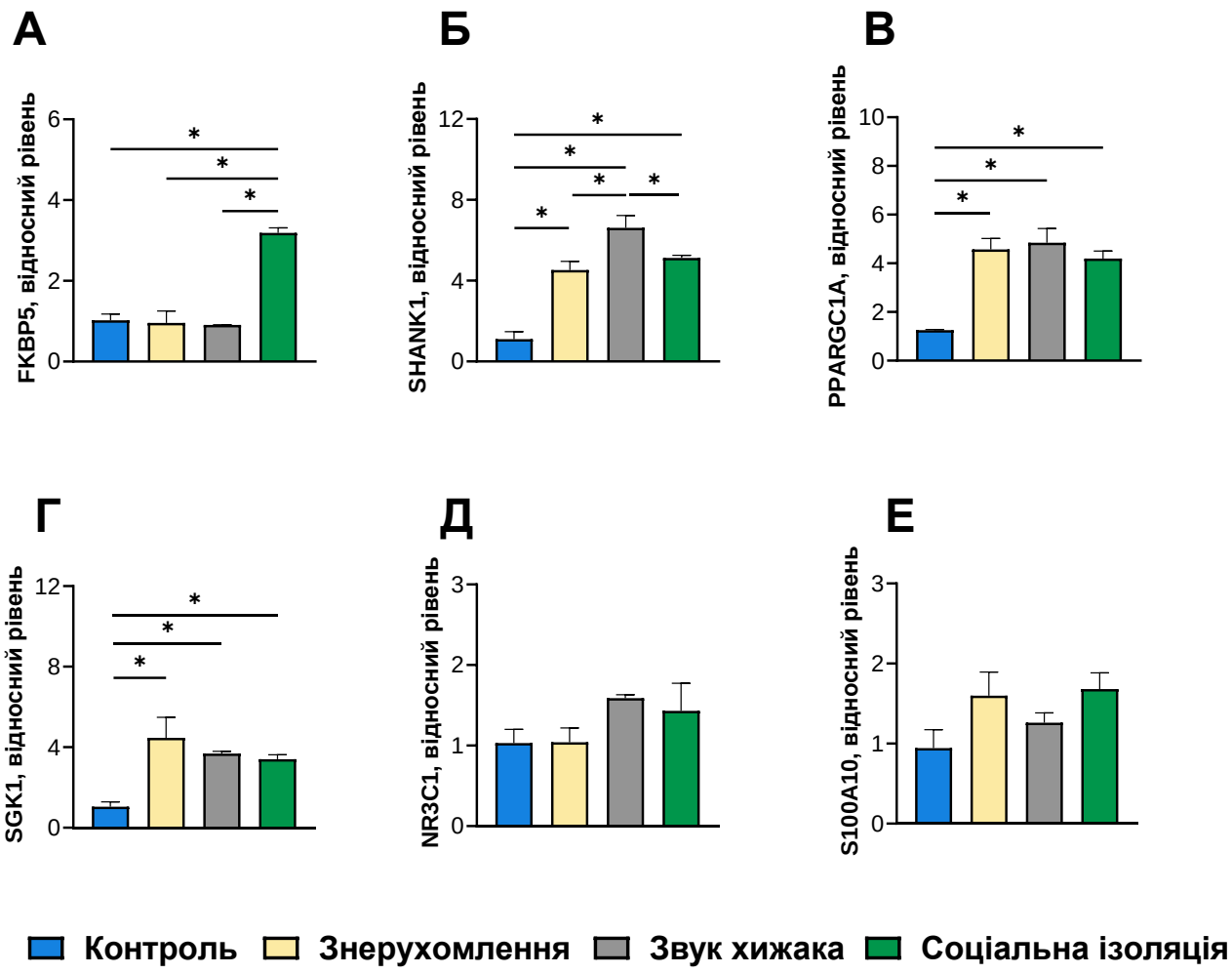

Рис. 3.5. Рівні іРНК-транскриптів (А) *FKBP5*, (Б) *SHANK1*, (В) *PPARGC1A*, (Г) *SGK1*, (Д) *NR3C1*, (Е) *S100A10* у корі головного мозку мишей, підданих різним стресам. Дані представлені як середнє ± SEM від 3 до 6 мишей у кожній групі.

Ген *S100A10* кодує кальцій-незалежний білок родини S100, який утворює функціональний комплекс з анексином А2 та бере участь у регуляції плазміноген-плазмінової системи. У мозку *S100A10* експресується переважно в астроцитах і задіяний у нейропластичності, ремоделюванні позаклітинного матриксу та регуляції серотонінергічної передачі сигналів. Порушення експресії *S100A10* асоціюється з депресивними й тривожними фенотипами, що робить його релевантним для досліджень ПТСР [155].

Ген *NR3C1* (GR) кодує глюкокортикоїдний рецептор – ліганд-залежний транскрипційний фактор, який після зв'язування кортизолу транслокується в ядро та регулює експресію широкого спектру генів, пов'язаних зі стресовою відповіддю, метаболізмом і запаленням. Зміни рівня експресії та епігенетичного статусу *NR3C1* безпосередньо впливають на чутливість ГГН осі та формування довготривалих нейробіологічних наслідків хронічного стресу [156].

Ген *PPARGC1A* кодує коактиватор транскрипції PGC-1α, який координує біогенез мітохондрій, окисне фосфорилювання та енергетичний метаболізм. У нейронах *PGC-1α* забезпечує підтримку енергетичного балансу та захист від оксидативного ушкодження. Зниження активності *PPARGC1A* пов'язують з порушенням нейрональної резистентності до стресу та нейродегенеративними процесами [157].

Ген *SGK1* кодує серин/треонін-кіназу, експресія якої індукується глюкокортикоїдами та іншими стрес-асоційованими сигналами. У нейронах *SGK1* регулює активність йонних каналів, сигнальні каскади синаптичної передачі та механізми нейропластичності. Порушення регуляції *SGK1* асоціюється з підвищеною вразливістю до хронічного стресу та функціональними порушеннями префронтальної кори у моделях ПТСР [158].

Ген *SHANK1* кодує постсинаптичний скелетний білок, що є структурним компонентом збуджувальних синапсів і забезпечує організацію рецепторних комплексів та сигнальних молекул. *SHANK1* відіграє ключову роль у формуванні синаптичної стабільності та пластичності. Порушення його експресії пов'язане зі змінами когнітивних функцій, емоційної регуляції та стрес-індукованої поведінки [159].

Ген *FKBP5* кодує імунофілін FKBP51 – ко-шаперон комплексу Hsp90, який модулює чутливість глюкокортикоїдного рецептору до ліганду. *FKBP5* є критичним регулятором негативного зворотного зв'язку ГГН осі. Генетичні та епігенетичні зміни *FKBP5* асоціюються з індивідуальною схильністю до розвитку ПТСР та порушенням адаптації до хронічного стресу [160].

Ми також визначили рівні транскрипції деяких генів, що кодують маркери стресу, включаючи *S100A10, NR3C1, PPARGC1A, SGK1, SHANK1* та *FKBP5*. Їхні продукти беруть участь у функціонуванні збуджувальних синапсів (зокрема *SHANK1*), а також у транспортуванні та локалізації йонних каналів і рецепторів нейротрансміторів (*S100A10*) і, таким чином, відіграють роль у регуляції настрою [161]. У соціально ізольованих мишей рівень іРНК гену *FKBP5* був у 3,1 рази вищим, ніж у контрольної групи (Рис. 3.5А). Рівень іРНК генів *PPARGC1A, SHANK1* та *SGK1* був значно вищим у тварин з груп знерухомлення, впливу звуку хижака та соціальної ізоляції порівняно з контрольною групою (Рис. 3.5.Б-Д). У мишей, підданих стресовим факторам, не було виявлено змін рівнів іРНК генів *S100A10* та *NR3C1* (Рис. 3.5.Д, Е).

3.1.4. Аналіз головних компонентів

Аналіз головних компонентів (АГК) (Рис. 3.6.) було застосовано для інтегральної оцінки взаємозв'язків між поведінковими, імунологічними, серологічними та біохімічними показниками, а також для виявлення ключових параметрів, що формують відмінності між експериментальними групами. АГК (англ. PCA) дозволив зменшити багатовимірність отриманих даних та візуалізувати загальні закономірності змін, індукованих різними типами стресу.

Перша головна компонента (PC1) відображає напрямок максимальної варіації даних, тобто поєднання показників, що найбільше пояснює загальні відмінності між групами. Друга компонента (PC2) є ортогональною до PC1 і пояснює наступну за величиною частку варіації, відображаючи незалежний внесок інших параметрів у формування кластеризації.

Результати аналізу показали, що значна частина загальної варіації пояснюється імунологічними показниками, зокрема активністю мієлопероксидази, кількістю лейкоцитів та рівнями експресії мРНК прозапальних цитокінів IL-6 і хемокіну CCL2. Вагомий внесок у формування головних компонент також мають серологічні параметри (гематокрит) і

поведінкові характеристики, зокрема кількість дефекацій, загальна пройдена відстань та швидкість руху в тесті відкритого поля. Це свідчить про тісну взаємодію між поведінковими реакціями на стрес, системним запаленням і змінами гематологічного статусу.

На основі сукупності всіх виміряних параметрів стресовані тварини формують три окремі кластери, які чітко відмежовуються від кластера контрольних мишей. При цьому характер кластеризації залежить від типу застосованого стресора. Зокрема, миші, піддані соціальній ізоляції та впливу звуку хижака, демонструють виражене просторове відокремлення від контрольної групи, що вказує на суттєві системні зміни на поведінковому, імунному та метаболічному рівнях.

Натомість стрес, індукований обмеженням рухової активності, зумовлює менш виражені зміни: відповідний кластер частково перекривається з кластером контрольних тварин. Це свідчить про відносно помірний вплив даного стресора на інтегральний фізіологічний стан організму порівняно з соціальною ізоляцією та звуком хижака.

Найбільш віддалене положення у просторі головних компонент займає група тварин, експонованих до звуку хижака. Така локалізація кластера відображає комплексні зміни практично за всіма дослідженими параметрами, що вказує на потужний стресогенний ефект цього чинника та його здатність індукувати глибокі порушення поведінкових реакцій, запальних процесів та антиоксидантного балансу.

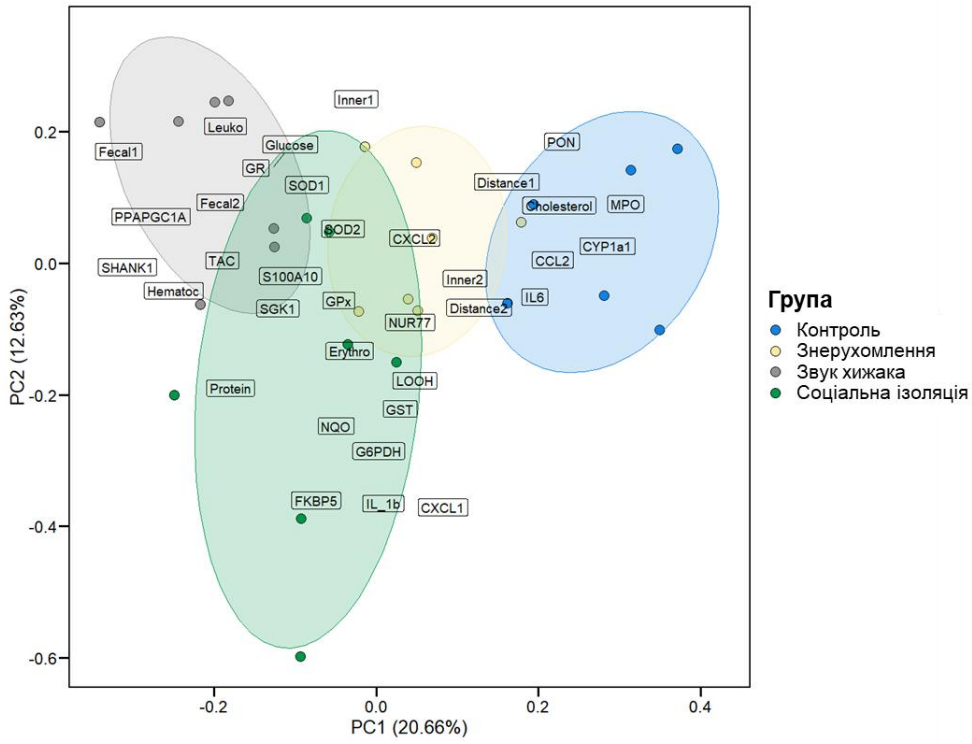

Рис. 3.6. Аналіз головних компонентів. Скорочення мають таке значення: OFT1 (тест відкритого поля 1); Distance 1 – загальна пройдена відстань, OFT1; Inner 1 – час, проведений у внутрішній зоні, OFT1; Fecal 1 – кількість дефекацій, OFT1; Distance 2 – загальна пройдена відстань, OFT2; Inner 2 – час, проведений у внутрішній зоні, OFT2; Fecal 2 – кількість дефекацій, OFT2; PON – активність параоксонази; MPO – активність мієлопероксидази; IL-1b – відносний рівень IL-1β; рівні мРНК: *CCL2*, *CXCL1*, *CXCL2*, *IL-6*, *NUR77*, *CYP1a1*, *S100A10*, *GR*, *PPAPGC1A*, *SGK1*, *SHANK1* та *FKBP5*; Glucose, Protein, Cholesterol – відповідно рівень глюкози, білка та холестерину у плазмі крові; Hematoc – гематокрит; Erythro – еритроцити; Leuko – лейкоцити; LOOH – рівень пероксидів ліпідів; SOD1 – активність супероксиддисмутази 1; SOD2 – активність супероксиддисмутази 2; GPx – активність глютатіонпероксидази; GST – активність глютатіон-S-трансферази; NQO – активність НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1; G6PDH – активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази.

Загалом, результати PCA підтверджують, що різні типи стресу викликають специфічні, але взаємопов’язані зміни на рівні поведінки, імунної відповіді та

метаболічних процесів, а також підкреслюють провідну роль прозапальних і поведінкових показників у формуванні фенотипу стресової відповіді.

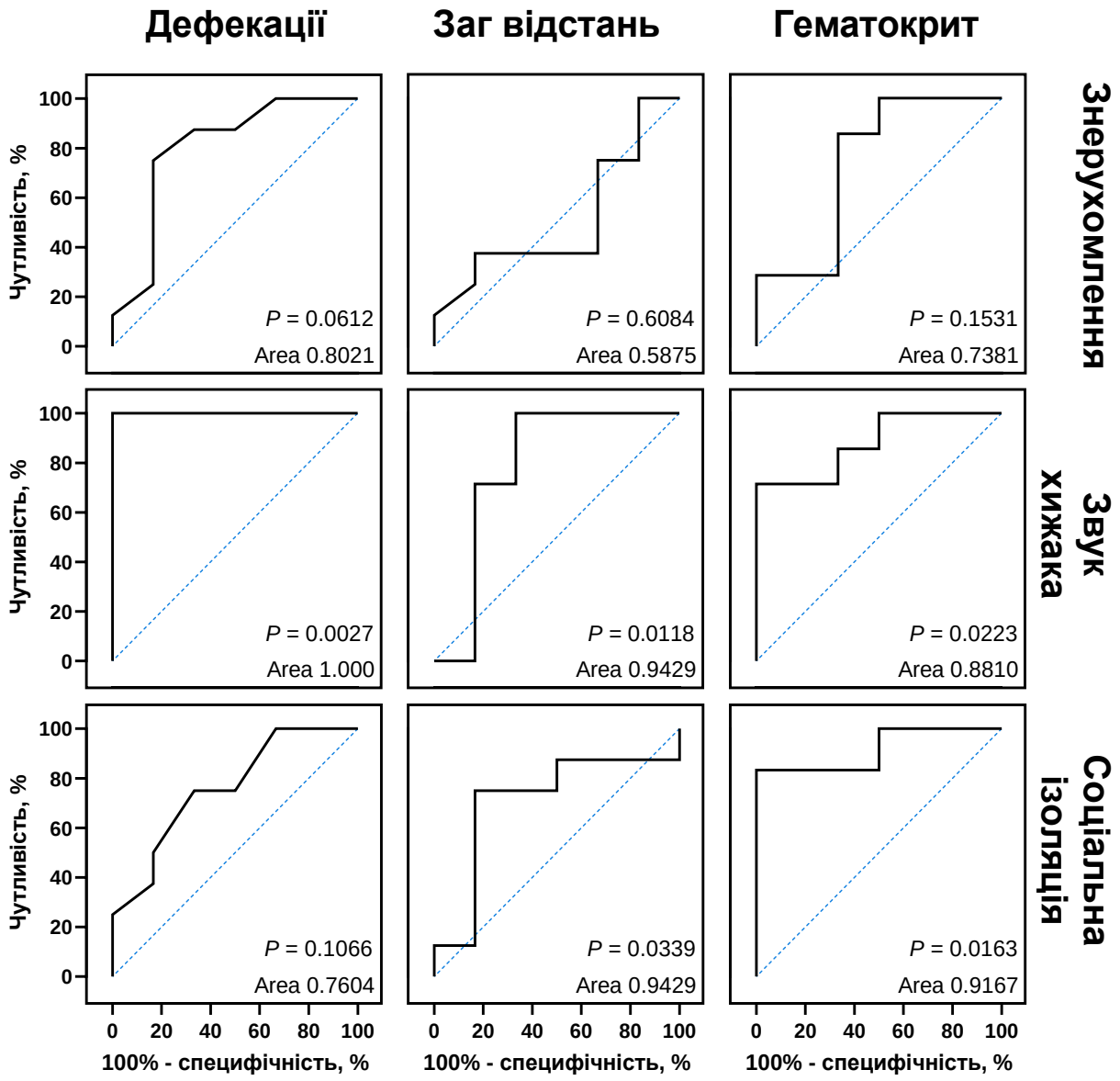

Рис. 3.7. Криві робочої характеристики приймача для поведінкових тестів.

Криві робочої характеристики приймача (РХП) (Рис. 3.7.-3.9.) показують, що рівні іРНК *CCL2*, *SHANK1* та *PPARGC1A* можуть бути універсальними предикторами пережитого стресу. Кількість дефекацій та активність ПОН1 є добрими предикторами впливу звуку хижака (ймовірно, найсильнішого з

досліджених стресорів). Активність МПО, загальна відстань, пройдена у відкритому полі, гематокрит і рівні транскрипту *CYP1A1* є предикторами впливу звуку хижака та соціальної ізоляції.

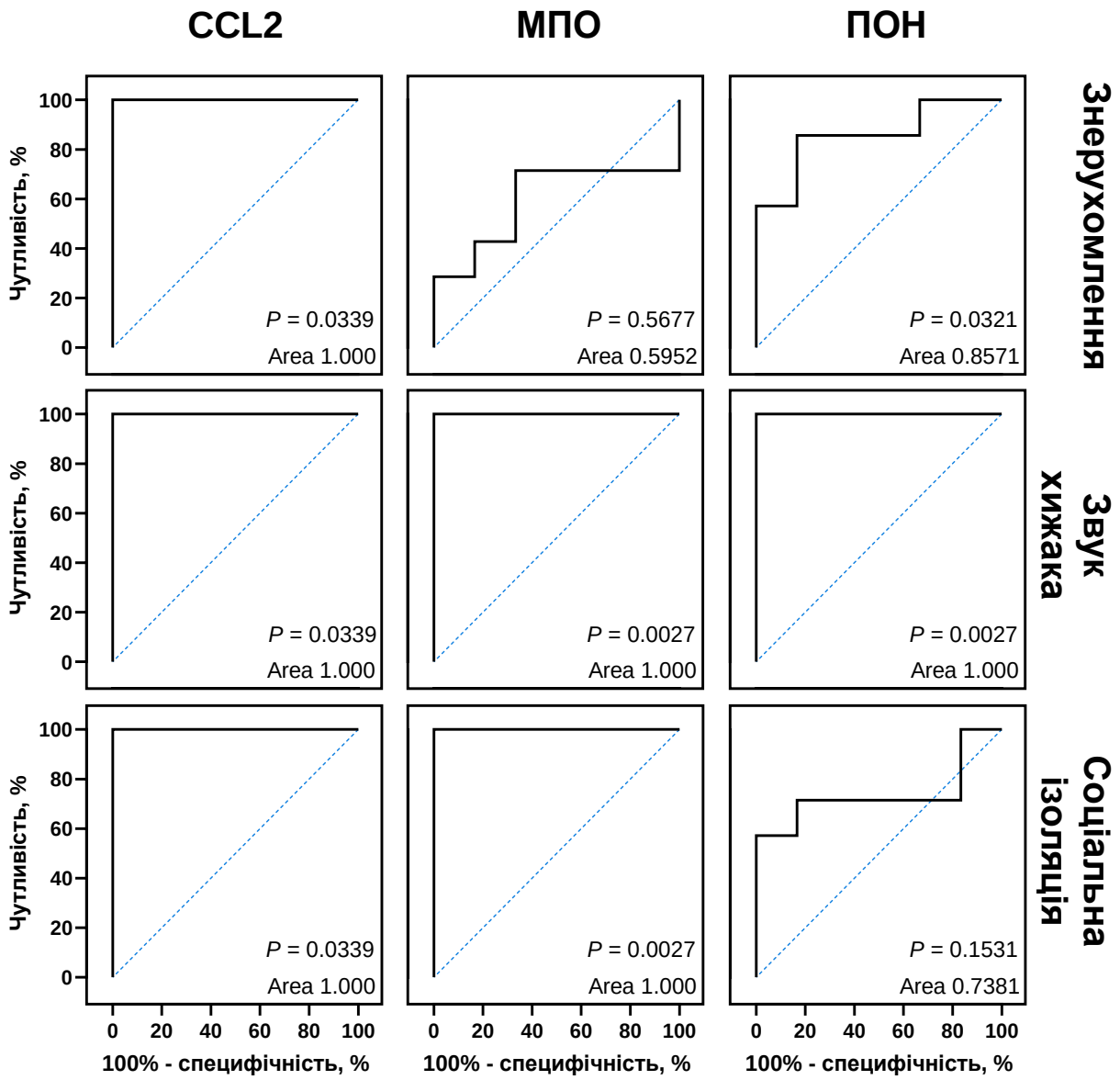

Рис. 3.8. Криві робочої характеристики приймача для маркерів запалення.

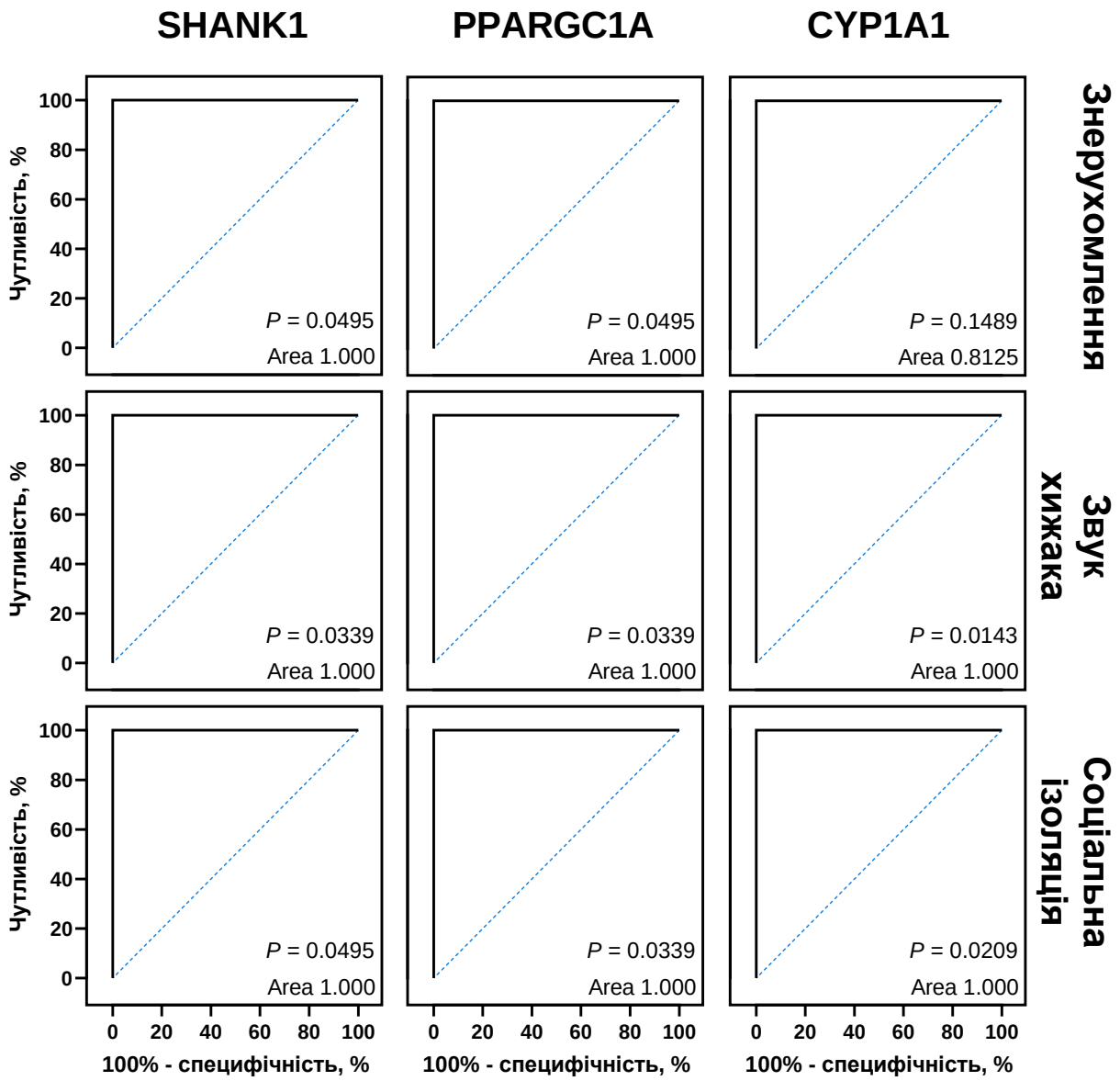

Рис. 3.9. Криві робочої характеристики приймача для пов’язаних зі стресом показників.

3.2. Обговорення та узагальнення отриманих результатів

Стійкість симптомів ПТСР у мишей залежить від типу фактору стресу, інтенсивності та тривалості стресу, а також методів оцінки симптомів (поведінкові тести або біомаркери) [60,162]. Зазвичай симптоми ПТСР зникають у мишей протягом 1-3 місяців після індукції стресу. У цьому дослідженні ми

виявили, що різні стресори викликають дещо різні ПТСР-подібні поведінкові реакції через 2-4 тижні після впливу, але деякі фізіологічні та молекулярні ознаки все ще присутні у стресованих мишей через 5 місяців після індукції стресу.

3.2.1. Аналіз поведінкових реакцій у тесті відкритого поля мишей, які піддавались впливу різних видів стресу

Застосовані в цьому дослідженні стресові процедури часто використовуються для моделювання ПТСР у гризунів. Попередні експерименти показали, що ефекти стресу від обмеження руху залежать від тривалості цієї процедури, і 2-годинне обмеження (як у нашому випадку) не завжди викликає у тварин поведінку, схожу на тривогу [163]. З літературних даних відомо що стійкість певних ліній мишей до акустичних подразників, зокрема до звуку хижака [164], тоді як інші показують, що спричинений хижаком стрес (звук, запах, без фізичного контакту) викликає у мишей поведінку, подібну на депресію [165,166]. Тривожна поведінка раніше описувалася у молодих самців мишей, які зазнали соціальної ізоляції [167].

Уповільнення рухів, скорочення часу перебування у внутрішніх квадратах, зниження дослідницької активності та підвищена частота дефекації є показниками тривоги у гризунів у тесті відкритого поля [168]. Наше дослідження підтвердило попередні висновки, що гострий стрес від обмеження руху, одноразова загроза з боку хижака та соціальна ізоляція викликають анксіогенні реакції у цьому тесті [163–165,167,169]. Однак кожен з використаних методів викликання стресу давав специфічну картину поведінкових результатів, перевірених у тесті відкритого поля (Рис. 3.1). Враховуючи, що час, проведений у центральній зоні відкритого поля, зазвичай вважається основним симптомом тривоги, можна припустити більш тривожну поведінку у мишей, які зазнали стресу знерухомлення та соціальної ізоляції (Рис. 3.1). Водночас ми також спостерігали тенденцію до зменшення загальної відстані, пройденої мишами, та підвищення частоти дефекації у гризунів, які піддавалися впливу нявкання кота

(Рис. 3.1). Було виявлено, що вплив звуку хижака призводив до певної фізіологічної реакції на стрес (підвищення частоти дефекації) та зменшення дослідницької активності без вираження ознак тривожної поведінки (відвідування центральних квадратів ТВП). Раніше повідомлялось, що такі звуки викликають реакцію страху, опосередковану мигдалеподібним тілом і гіпоталамусом [170]. Крім того, зменшення рухливості мінімізує виявлення потенційними хижаками, імітуючи поведінку «завмирання», що спостерігається у відповідь на гострі загрози [171]. Індукована стресом активація парасимпатичної нервової системи може призвести до підвищення моторики шлунково-кишкового тракту, що призводить до збільшення частоти дефекації [172]. Таким чином, можна припустити, що короткочасний одноразовий вплив звуку хижака викликав тривалий страх у самців мишей. Однак соціальна ізоляція зменшила дослідницьку активність і викликала посилення тривожності або уникнення, що свідчить про більш глибокі зміни емоційного стані гризунів. Раніше було показано, що тривожна поведінка молодих самців мишей, які зазнали соціальної ізоляції, проявляється у підвищеній руховій активності та скороченні часу, проведеного в центрі відкритого поля, порівняно з тваринами, що утримуються в групових клітках [167]. Ми спостерігали нижчу дослідницьку активність у соціально ізольованих самців середнього віку, що свідчить про те, що вік є фактором, який може впливати на ризик розвитку ПТСР. Поєднання зниження часу перебування у внутрішній зоні та зменшення загальної пройденої відстані, зазвичай, вказує на низький рівень дослідницької активності. Загалом результати вказують, що вплив стресу знерухомлення, звуку хижака та соціальної ізоляції на самців середнього віку зумовив різні патерни поведінки, схожої на ПТСР, причому звук хижака був найсильнішим фактором, що викликав зумовлену страхом поведінку (Рис. 3.1.). Цікаво, що в усіх експериментальних підходах у тесті відкритого поля, проведених через вісім тижнів після впливу стресу, не було виявлено поведінкових наслідків індукції ПТСР. Зниження вираженості симптомів після повторного проведення тесту може бути пов’язане зі звиканням до установки [173]. Однак ми не можемо

виключити ослаблення поведінкових симптомів ПТСР у мишей з часом, оскільки це доволі тривалий відрізок життя миші.

3.2.2. Звук хижака впливає на гематологічні та біохімічні показники крові мишей більше, ніж інші стресові фактори

Незважаючи на відсутність поведінкових відмінностей між контрольною і експериментальними групами, самці що піддавались впливу звуку хижака через п’ять місяців після стресування, мали значно вищий гематокрит, підвищену загальну кількість лейкоцитів і рівень незрілих нейтрофілів порівняно з контрольними мишами (таблиці 3.1 і 3.2). Існує припущення, що порушення регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової (ГГН) системи може призвести до запалення в мозку [174], що в подальшому може посилити системне запалення [103]. Тому вважається, що підвищення кількості лейкоцитів, еритроцитів і гематокрит пов’язані з запаленням і тяжкістю ПТСР [175]. З іншого боку, стрес призводить до активації глюкокортикоїдної сигналізації. Глюкокортикоїди (ГК) відомі тим, що регулюють імунну відповідь, включаючи дозрівання мієлоїдних клітин й еритроцитів [176,177]. Довгострокові ефекти стресу, які часто асоціюються з вивільненням ГК, можуть пояснити підвищену кількість незрілих нейтрофілів і гематокриту. Останній залежить від кількості та об’єму еритроцитів. Незрілі еритроцити мають дещо більший об’єм, ніж зрілі клітини, тому пригнічення дозрівання еритроцитів глюкокортикоїдами може призвести до підвищення гематокриту [178]. Слід зазначити, що підвищений гематокрит був виявлений у ветеранів, які брали участь у бойових діях і страждають на ПТСР, і був пов’язаний з гіперкоагуляцією [179]. Ми також спостерігали вищий гематокрит та рівень прозапального цитокіну ІЛ-1β у групі соціальної ізоляції, що може бути більш серйозним несприятливим прогностичним показником для здоров’я в цій групі.

Кортикостерон, основний глюкокортикоїд у гризунів, служить ключовим маркером активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркovозалозної осі [180] Усі три

парадигми стресу в нашому дослідженні призвели до стійкого підвищення рівня кортикостерону в плазмі, що відповідає хронічному системному стресу. Ці результати узгоджуються з попередніми висновками, що як гострі, так і хронічні стресові фактори, включаючи фізичне обмеження та психологічні загрози, викликають швидке і тривале підвищення рівня кортикостерону в крові мишей [181,182].

Як маркер запалення, ми також визначали активність мієлопероксидази (МПО) і спостерігали зниження її активності в мишей, які піддавалися впливу звуку хижака і соціальної ізоляції. МПО – захисний фермент нейтрофілів, який виробляє сильні окислювачі, такі як гіпохлорит-аніон, для знищення бактерій та інших патогенів [183]. Водночас аномально активна МПО сприяє розвитку симптомів хронічних запальних патологій, включаючи атеросклероз, та деякі нейродегенеративні захворювання [184]. Дослідження Watling та колег [185] продемонструвало, що активність МПО негативно корелювала з тривалістю ПТСР у пацієнтів. Таким чином, зниження активності МПО у мишей у групах впливу звуку хижака та соціальної ізоляції може відображати тривалий перебіг ПТСР-подібного стану у гризунів. Активність МПО контролюється транскрипційними факторами, які також регулюють дозрівання гранулоцитів (такими як Runx1, C/EBPα та транскрипційні фактори родини GATA). Таким чином, виявлене збільшення кількості незрілих нейтрофілів також може бути пов’язане з низькою активністю МПО [145]. Можливо, миші можуть знижувати активність МПО, щоб врівноважити надмірне запалення, спричинене ІЛ-1β та іншими цитокінами, або тривала активація нейтрофілів може призвести до їх виснаження, зменшуючи кількість МПО в периферійній крові.

Порушення утворення та сигналювання ГК і катехоламінів може призвести до порушення енергетичного обміну, що спричиняє негативні зміни в ліпідному профілі крові. Зокрема, деякі дослідження виявили вищі рівні загального холестерину та нижчі рівні холестерину ліпопротеїдів високої щільності (ХС-ЛПВЩ) у людей з клінічно підтвердженим ПТСР [186,187]. Але інші дослідження показали, що пацієнти з ПТСР мали нижчі або нормальні рівні

загального холестерину [188]. Ми виявили нижчий рівень загального холестерину в плазмі крові мишей у групі впливу звуку хижака, тоді як в інших стресованих групах цей показник не змінився. Холестерин є попередником кортикостерону та багатьох інших сполук, тому це зниження може відображати підвищене використання холестерину для біосинтезу кортикостерону. Адренокортикотропний гормон гіпофізу функціонує для збільшення рецепторів ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ) та підвищення активності холестеринової десмолази, яка перетворює холестерин на прегненолон і є етапом, що лімітує швидкість синтезу кортикостерону. Останній стимулює ліполіз у жировій тканині, забезпечуючи попередники для синтезу холестерину в печінці [189]. Якщо спочатку ПТСР характеризується підвищенням рівня кортизолу (кортикостерону в мишей), то потім утворення цього гормону знижується через негативний зворотний зв'язок з ГГН віссю [190]. Таким чином, підвищене вироблення кортикостерону у мишей, що перебувають у стані хронічного стресу, може виснажувати запаси холестеролу в плазмі.

Параоксонази – це родина трьох незалежних ферментів (ПОН1, ПОН2 і ПОН3), причому ПОН1 в основному секретується печінкою в плазму як компонент ХС-ЛПВЩ [144]. Ми виявили значне зниження активності ПОН у всіх стресованих мишей. Раніше низька активність ПОН спостерігалася у пацієнтів, які страждали на ПТСР, тяжкий тривожний розлад і депресію [191,192]. Низька активність ПОН1 також була виявлена у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу [193]. Таким чином, низька активність ПОН у нашому дослідженні може бути пов'язана з нижчим рівнем ХС-ЛПВЩ і розглядатися як несприятлива прогностична ознака для здоров'я. Більше того, ПОН1 є мішенню арилгідрокарбонового рецептору (AhR) [194]. Також було показано, що глюкокортикоїди та їхній рецептор здатні пригнічувати експресію мішеней AhR [195,196]. Це може пояснити нижчу активність ПОН у стресованих мишей. Ми припускаємо, що активність ПОН у плазмі крові може слугувати маркером як специфічних метаболічних порушень, так і ПТСР. Крім того ПТСР може спричиняти схильність пацієнтів до розвитку цих розладів [104]. Дійсно, раніше

було показано, що спричинений соціальною ізоляцією хронічний стрес сприяє розвитку гіперглікемії та порушенню метаболізму глюкози в мишей [197]. Однак попередні дослідження показали, що концентрація глюкози у гризунів, підданих стрес-факторам обмеження, знижувалася, хоча через деякий час поверталася до нормального рівня [198]. Рівень глюкози в крові в нашому експерименті не залежав від впливу травматичних факторів (Рис. 3.2А). Можна припустити, що вплив стресу на концентрацію глюкози в крові мишей може зникнути через п’ять місяців після його перенесення.

3.2.3. Вплив різних видів стресу на імунну відповідь, стресові реакції і метаболічні показники у корі головного мозку мишей

Ми не спостерігали змін у про-/антиоксидантному статусі, але виявили зниження рівня транскрипції генів, які пов’язані з запаленням і регуляцією імунної відповіді у стресованих мишей. Наші результати також демонструють довгострокову дисрегуляцію глюкокортикоїдного сигналювання в корі головного мозку мишей. Відомо, що стресова подія призводить до вивільнення глюкокортикоїдів, які взаємодіють з глюкокортикоїдними рецепторами (ГКР) в клітинах мозку. Активація ГКР змінює транскрипцію генів-мішеней [199]. Однак на даний час мало відомо про залежний від часу вплив експресії ГКР на перебіг гострого та хронічного стресу [199]. Водночас встановлено, що активність ГКР регулюється індукованою глюкокортикоїдами кіназою 1 (*SGK1*), яка підтримує активність ГКР та її локалізацію в ядрі [158], і пригнічується геном FK506-зв’язуючого білка 51 (*FKBP5*), який зменшує чутливість ГКР і транслокацію комплексу ГКР-глюкокортикоїд до ядра [200]. Зниження фосфорилювання та ядерної локалізації ГКР призводить до зменшення експресії протизапальних генів-мішеней, а потім до розвитку нейрозапалення [174]. Як *SGK1*, так і *FKBP5* є мішенями ГКР [158]. Ми не виявили змін у транскрипції ГКР (ген NR3C1), але виявили збільшення рівня експресії транскрипту *SGK1* у корі мишей, які були піддані впливу всіх стресогенних факторів (Рис. 3.4.Г). Інші автори

продемонстрували збільшення рівнів іРНК *SGK1* у різних ділянках мозку (мозолистого тіла) гризунів у відповідь на гострий стрес [201] та хронічний стрес [158]. Ми також спостерігали вищі рівні мРНК *FKBP5* (Рис. 3.5.А) у мишей з групи соціальної ізоляції. *FKBP5* є мішенню сигналювання ГКР, а також частиною короткого негативного зворотного зв'язку з глюкокортикоїдним рецептором, в якому активація ГКР призводить до збільшення транскрипції *FKBP5* й одночасного інгибування активності рецептору [199]. Підвищений рівень транскрипції *SGK1* та *FKBP5* свідчить про активацію ГКР-сигналювання в корі головного мозку стресованих мишей. З іншого боку, ГК, як відомо, інгибують експресію генів, які регулюються NF-κB [202]. Крім того, глюкокортикоїдний рецептор може безпосередньо взаємодіяти з NF-κB. Ці події можуть бути відповідальними за протизапальні ефекти ГКР [199]. У всіх групах стресованих мишей були нижчі рівні іРНК *CCL2*, а в групах впливу звуку хижака та соціальної ізоляції були нижчі рівні мРНК ІЛ-6 у корі головного мозку. Прозапальні цитокіни *CCL2* та *IL-6* є добре відомими мішенями транскрипційного фактору NF-κB. Таким чином, можна припустити пригнічення сигналізації NF-κB у корі головного мозку стресованих мишей. Дослідження Zhang et al. [203] виявило, що підвищений рівень *CCL2* в крові може бути пов'язаний з розвитком ПТСР, тоді як Pan і колеги [204] продемонстрували нижчий рівень експресії *CCL2* у пацієнтів з ПТСР. Це свідчить про те, що нижчий рівень прозапального хемокіну *CCL2* може бути маркером довгострокових молекулярних наслідків дії ПТСР.

Соціально ізольовані миші мали вищий рівень мРНК *CXCL1*, який також є мішенню фактору NF-κB. Однак експресія цього хемокіну може бути активована стресом і глюкокортикоїдами через шлях Hippo, опосередкований *FKBP5*, мішенню ГКР [205]. Знижений відносний рівень іРНК гену *CYP1A1* у корі головного мозку стресованих мишей, порівняно з контрольною групою (Рис. 3.4.Б), також може бути пов'язаний зі змінами імунного статусу. Фермент цитохром Р450 1А1 (CYP1A1), як член родини ферментів CYP, бере участь у розщепленні стероїдів у мозку [206]. Ген *CYP1A1* регулюється

транскрипційними, посттранскрипційними й епігенетичними механізмами, насамперед через шлях арилгідрокарбонового рецептору (AhR), який, як зазначено вище, може інгибуватися сигналами ГКР [195,207]. Прозапальні цитокіни (ФНП-α, ІЛ-1β, ІЛ-6) можуть пригнічувати опосередковану AhR індукцію *CYP1A1* через NF-κB [208].

Механізми регуляції експресії генів, що належать до родини SHANK, ще недостатньо вивчені, проте дослідження вказують на участь циклічного АМФ та сигнального шляху протеїнкінази А [209]. Значно підвищений рівень транскриптів *SHANK1* у стресованих мишей (Рис. 3.5.Б) також може свідчити про посилення глюкокортикоїдної сигналювання. Підвищення експресії *SHANK1*, білку, що фіксує метаботропний глютаматний рецептор 5 (мГлуР5) до поверхні клітини, раніше було виявлено в посмертних зразках пацієнтів з ПТСР [210]. Було показано, що рівні іРНК *SHANK1* підвищуються під впливом кортизолу у тварин [211].

Ген *PPARGC1A*, що кодує ключовий регулятор енергетичного обміну PGC-1α (коактиватор 1α рецептору, активованого проліфератором пероксисом), є одним з генів-мішеней сигналювання у глюкокортикоїдних рецепторів [212,213]. Він також є добре відомою мішенню білку, що зв'язує чутливий до цАМФ елемент (англ. CREB – cAMP response element-binding protein), який функкціонує як ефектор у сигнальному шляху, який активовується через адренергічну стимуляцію [214]. У нашому дослідженні було виявлено значне підвищення рівнів іРНК *PPARGC1A* у мишей, підданих травматичним стресовим факторам, порівняно зі здоровими контрольними тваринами (Рис. 3.5.В). Це може підтверджувати активацію глюкокортикоїдного й адренергічного сигналювання. Оскільки PGC-1α є важливим регулятором мітохондріального біогенезу та клітинної відповіді на мітохондріальний оксидативний стрес [215], можна припустити, що активація синтезу PGC-1α може сприяти підтримці редокс-гомеостазу в мозку стресованих мишей. Крім того, PGC-1α бере участь у регуляції шляху NF-κB [215]. Ці факти підтверджують пригнічення імунної відповіді в мозку мишей після тривалого впливу стресу.

Аналіз головних компонентів (АГК) вказує на чітку диференціацію контрольних тварин від мишей, що зазнали впливу стресогенних факторів (Рис. 3.6.). Як АГК, так і РХП-криві вказують на імунні маркери, такі як рівні іРНК *CCL2*, *IL-6*, активність МПО, ПОН і кількість лейкоцитів як ефективні маркери стресового розладу. Ці маркери змінюються разом з параметрами тесту відкритого поля, такими як частота дефекації та пройдена відстань, і можуть свідчити про залишкові ознаки перенесеного стресу. Наші результати також вказують на те, що поодинокі гострі травматичні стресові фактори (обмеження руху, звук хижака) викликають довгострокові метаболічні та молекулярні зміни, які не зникають після усунення дії стресового фактору. Ці зміни співмірні з тими, які викликані іншими довгостроковими стресовими факторами, такими як соціальна ізоляція. Це вказує на те, що зміни викликаються на різних рівнях експресії генів і для забезпечення довгострокового ефекту можуть бути задіяні епігенетичні механізми.

3.2.4. Узагальнення результатів отриманих з експерименту

Можливі молекулярні механізми ефектів, що виникають за різних стресових умов (Рис. 3.10.). Вплив стресу може сприяти утворенню та вивільненню глюкокортикоїдів, які, своєю чергою, відомі своєю імуносупресивною дією. Імуносупресія може опосередковуватися інгибуванням NF-κB глюкокортикоїдами. Арилгідрокарбоновий рецептор (AhR) також може пригнічуватися глюкокортикоїдами, наприклад, через конкуренцію між AhR і глюкокортикоїдним рецептором. Інгібування AhR може пояснити зниження рівнів мРНК *CYP1A1* та активності параоксонази, відомих мішеней AhR, у всіх групах стресованих мишей. Пригнічення NF-κB може опосередковано призвести до неповного дозрівання попередників мієлоїдних клітин й еритроцитів, що призводить до їх накопичення у крові, що було підтверджено в нашому дослідженні. Експресія мієлопероксидази (МПО) також залежить від регуляторів транскрипції, що керують дозріванням нейтрофілів. Отже, їх пригнічення може

пояснити зниження активності МПО. Сироваткова глюкокортикоїд-активована кіназа 1 (*SGK1*) та *FKBP5* є прямими мішенями ГКР. У свою чергу, *FKBP5* може активувати експресію хемокіну *CXCL1* через шлях Hippo [205]. Відомо, що SGK1 (серин/треонінова кіназа) регулює вивільнення АТФ з клітин, що далі може запускати активацію запального цитокіну ІЛ-1β. Також було показано, що ГКР може взаємодіяти з білком, що зв'язує чутливий до цАМФ елемент (англ. CREB), мішенню якого є PGC1α.

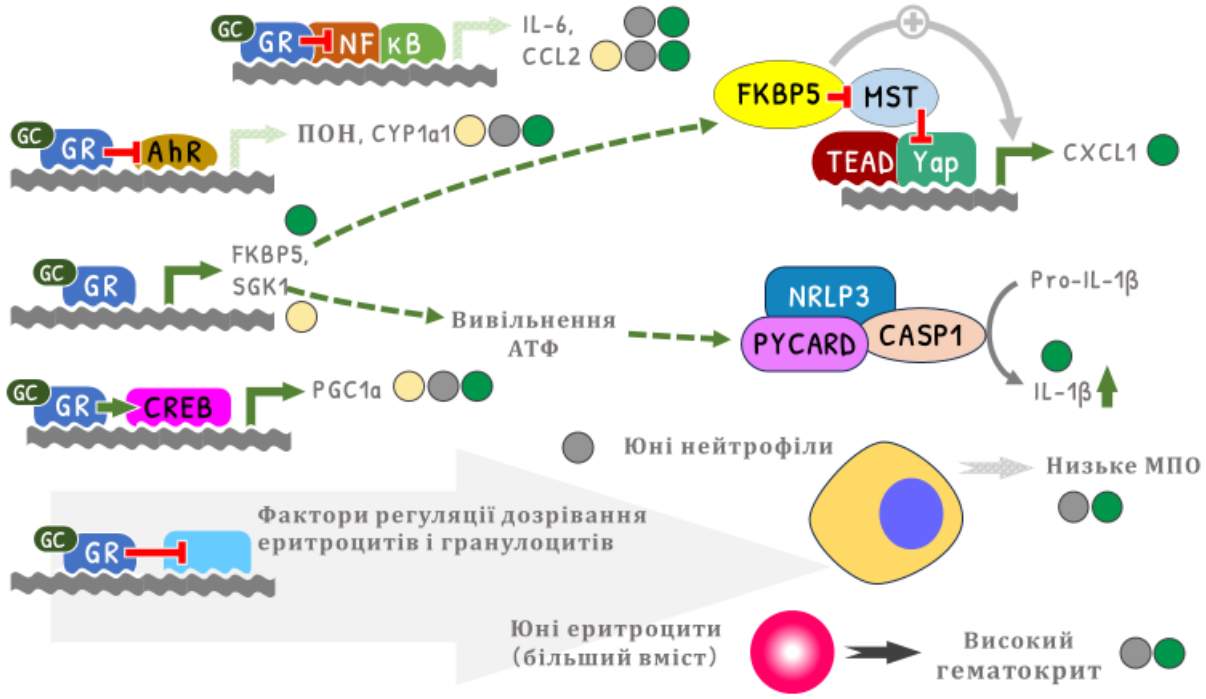

Рис. 3.10. Узагальнююча схема.

3.3. Підсумок

На цьому етапі дослідження ми зафіксували нетривалі поведінкові, та довгострокові метаболічні та молекулярні зміни в мишей, підданих гострим (обмеження руху, звук хижака) та хронічним стресовим факторам (соціальна ізоляція), які часто використовуються для індукції ПТСР у моделях гризунів.

Відмінності в параметрах крові та рівнях транскрипції генів, залучених до стресових та імунних реакцій у мишей, були виявлені через п’ять місяців після впливу стресу, тоді як повторний тест відкритого поля на 56-й день не показав змін. Стрес знерухомлення викликав тривожну поведінку, що спостерігалася у вигляді зменшення часу, проведеного в внутрішніх квадратах відкритого поля. Крім того, спостерігалися довгострокові метаболічні ефекти, зокрема зниження активності ПОН у крові та зміни експресії генів, які пов’язані з імунною та стресовою реакцією. Соціальна ізоляція та вплив звуку хижака викликали ознаки тривоги. Спільним для всіх стресогенних факторів була відсутність впливу на антиоксидантний захист кори головного мозку, але спостерігалося зниження експресії генів, що беруть участь в імунній реакції (*CCL2*) та деградації стероїдів (*CYP1A1*). Натомість маркери стресової реакції та регулятори метаболізму, пов’язані з глюкокортикоїдними та цАМФ сигнальними шляхами, такі як *PPARGC1A, SHANK1* та *SGK1*, були підвищені в корі головного мозку стресованих мишей. Специфічні відмінності були пов’язані з типом стресогенного фактору: звук хижака чітко збільшував загальну кількість лейкоцитів, тоді як соціальна ізоляція значно підвищувала експресію *FKBP5* в корі мишей і рівень ІЛ-1β в плазмі крові навіть після тривалого проміжку часу після викликання стресу. Загалом, наші результати свідчать, що як гострі, так і хронічні травматичні подразники викликають довгострокові зміни в імунній і стресовій реакціях у самців мишей. Зміни, спричинені стресом внаслідок активації глюкокортикоїдних рецепторів, можуть бути стійкими і, таким чином, змінювати майбутні стресові реакції через епігенетичні механізми. Біохімічні та молекулярні зміни, ймовірно, пов’язані зі змінами в поведінці та можуть вважатися перспективними для діагностики ПТСР на тваринних моделях.

РОЗДІЛ 4. ВІКОВІ ТА СТАТЕВІ ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ОДНОРАЗОВОГО ТРИВАЛОГО СТРЕСУ НА ПОВЕДІНКОВІ, ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ У МИШЕЙ *C57BL/6J*

На першому етапі дослідження було проаналізовано вплив різних типів моделювання ПТСР на поведінкові та фізіологічні показники у мишей, застосовуючи як моделі гострого стресу (знерухомлення, вплив звуку хижака), так і хронічного (соціальна ізоляція). Це дозволило нам оцінити специфічні ефекти кожного із стресорів окремо, виявити їх потенційну валідність.

Однак у реальних умовах живі організми можуть зазнавати кількох видів стресу у сукупності. Часто стресові фактори діють одночасно або послідовно, утворюючи складні комбінації, що можуть спричиняти більш виражені або якісно інші фізіологічні й поведінкові ефекти. Крім того, чутливість до стресу може змінюватися залежно від віку та статі, що є важливими змінними при моделюванні психоемоційних розладів. Саме тому наступним логічним кроком нашого дослідження стало моделювання комбінованого стресового впливу.

Отже, на наступному етапі дослідження було вирішено використати модифіковану модель одноразового тривалого стресу (ОТС), яка є однією з добре відомих моделей посттравматичного стресового розладу (ПТСР) у тварин. До класичного протоколу ми додали компонент звуку хижака, який, як показали результати попереднього експерименту, викликає стресову відповідь. Також на цьому етапі було використано мишей обох статей, а також різного віку (молоді і старі) для оцінки потенційної вікової та статевої варіабельності. Така модифікація дозволила нам дослідити, чи підсилюється стресова реакція за умов комбінованої дії кількох інтенсивних стресорів, та чи змінюється якість цієї відповіді порівняно з кожним фактором окремо.

Таким чином, другий етап дослідження був спрямований на перевірку гіпотези про синергічний ефект комбінованого стресу, а також на розширення розуміння того, як вік і стать можуть впливати на стресову відповідь.

4.1. Вплив одноразового тривалого стресу на поведінкові реакції та пам’ять у мишей різного віку та статі

Для оцінки симптомів, схожих на ПТСР, у нашому дослідженні ми використовували два тести: тест відкритого поля (ТВП) та тест піднесеного плюс лабіринту (ТППЛ). Відкрите поле – це широко застосовуваний поведінковий тест, який оцінює дослідницьку поведінку та рівень тривожності у гризунів [30]. Цей тест особливо корисний для виявлення змін у руховій активності, ризикованої поведінці та емоційної реактивності, спричинених стресом. Тварини з підвищеною тривожністю, як правило, уникають центральної зони відкритого поля, віддаючи перевагу периферії, тоді як зменшення загальної рухливості може свідчити про зміни рівня активності, спричинені стресом [216].

У тесті відкритого поля молоді самці, які були піддані процедурі одноразового тривалого стресу (ОТС), пробігли на 29 % меншу відстань, провели на 58 % менше часу в центральній зоні та демонстрували в 7,4 рази більше випадків завмирання порівняно з контрольною групою (Рис. 4.1. А-В). Скорочення відстані, пройденої молодими мишами, що зазнали впливу ОТС, свідчить про погіршення дослідницької поведінки. Менший час перебування у внутрішній зоні з більшою кількістю випадків завмирання порівняно з контрольною групою може вказувати на страх і підвищену тривожність. У сукупності ці три фактори вказують на розвиток стресу в молодих самців.

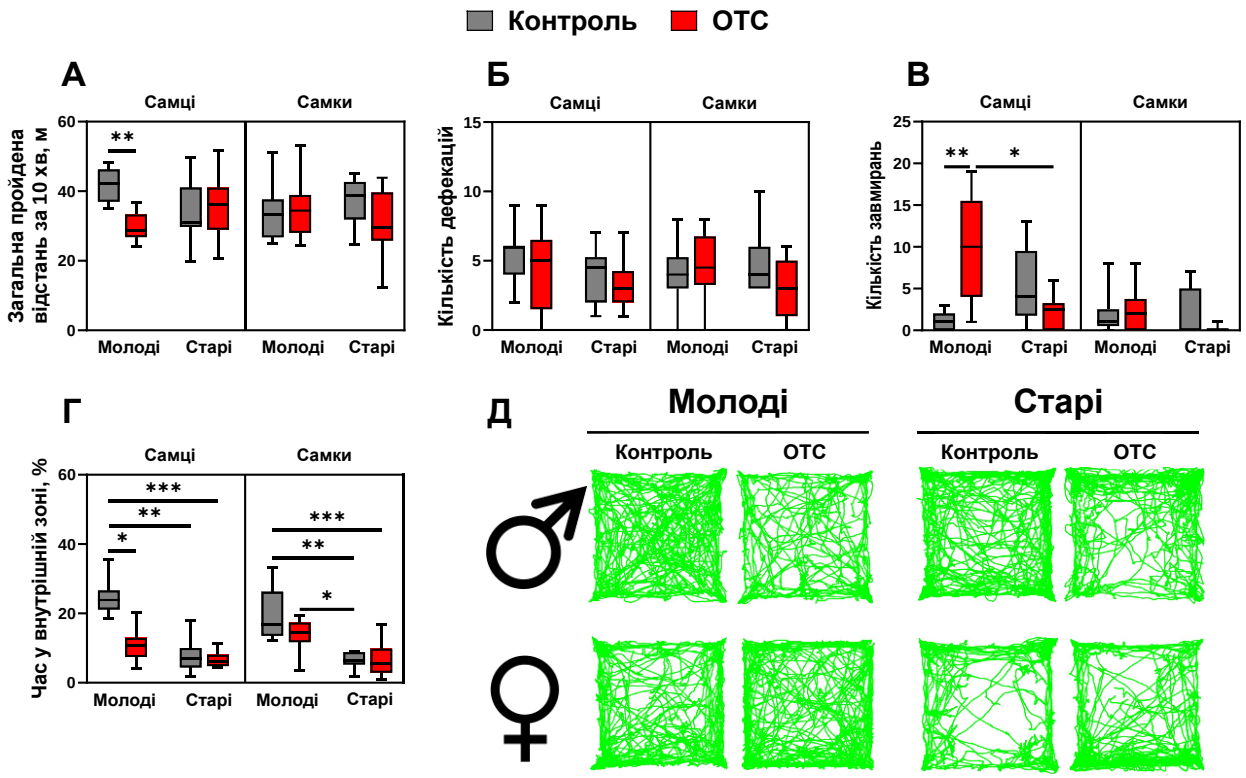

Рис. 4.1. Тест відкритого поля проведений на молодих і старих самцях та самках мишей, підданих процедурі ОТС. (А) середня швидкість, (Б) кількість дефекацій, (В) кількість випадків завмирань під час тесту, (Г) час, проведений у внутрішніх квадратах, і (Д) траєкторії руху мишей. Зірочки (*$p < 0{,}05$, **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}005$) показують значущі відмінності між значеннями двох груп (контроль та дослід, або за віком). Порівняння проводилось за допомогою тесту Крускала-Уолліса з подальшим тестом множинних порівнянь.

Молоді самки також демонстрували подібні тенденції щодо відвідування центральної зони відкритого поля, хоча істотної різниці виявлено не було. Кількість завмирань і пройдена відстань у молодих самок не відрізнялися між групами, що може свідчити про меншу чутливість цих показників у них. ОТС не вплинув на поведінку старих самців і самок у тесті відкритого поля. Це може свідчити про вікові відмінності в поведінкових реакціях на стрес [217]. Слід зазначити, що ми спостерігали вікові відмінності в поведінці контрольних мишей. Старі самці контрольної групи показали тенденцію до зменшення

пройденої відстані та збільшення кількості завмирань порівняно з молодими, але істотної різниці виявлено не було (Рис. 4.1. А, В). Старі самці та самки контрольних груп проводили на 69% та 68% менше часу в центральній зоні, відповідно, порівняно з молодими мишами контрольної групи (Рис. 4.1Г). Погіршення рухової активності з віком у гризунів було показано в інших дослідженнях і вважається нормальним віковим процесом [218]. Скорочення часу перебування у внутрішній зоні відкритого поля порівняно з молодими мишами може свідчити про зниження дослідницької поведінки у старих тварин. Старіння супроводжується змінами в системах нейротрансмітерів (наприклад, дофаміну та серотоніну), які регулюють рухові та пов’язані з тривогою поведінкові реакції [219–221]. Вища чутливість до стресу або порушення механізмів згасання страху у старих самців можуть сприяти більш вираженій реакції завмирання [218].

У тесті піднесеного плюс лабіринту миші відвідували відкриті та закриті рукави з приблизно однаковою частотою і витрачали однаковий час на вхід, незалежно від впливу ОТС, віку чи статі (Рис. 4.2. А-В). Відсутність значних відмінностей у тесті піднесеного плюс лабіринту свідчить про те, що процедура ОТС не викликала вимірюваної тривожної поведінки в мишей. Тести відкритого поля та піднесеного плюс лабіринту вимірюють різні аспекти тривожної поведінки. ТВП оцінює загальну дослідницьку поведінку, рухову активність та уникнення відкритого, незахищеного простору, тоді як ТППЛ є більш вузькоспеціалізованим тестом, завдяки якому можна визначити тривожну поведінку завдяки жаги до двох природніх характеристик мишей, жага до дослідження нових просторів, та відразою до відкритих добре освітлених місць на підвищенні. ТППЛ надає можливість чітко вибирати між відкритими та закритими рукавами, що може дозволити мишам проявляти компенсаторну поведінку.

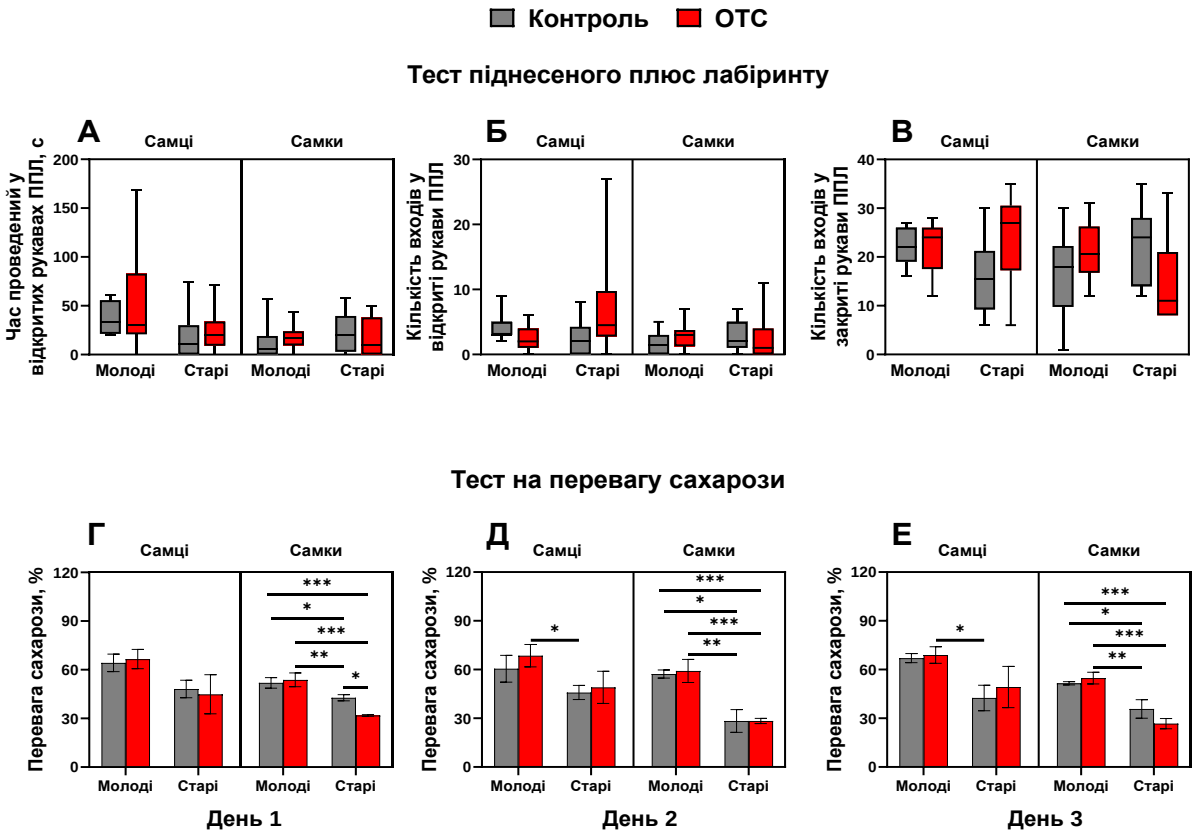

Рис. 4.2. Результати поведінкових тестів піднесеного плюс лабіринту та переваги сахарози, молодих і старих самців та самок мишей, підданих процедурі ОТС. (А-В) Тест «піднятий плюс лабіринт»: (А) час, проведений у відкритих рукавах, (Б) кількість входів у відкриті рукави, (В) кількість входів у закриті рукави. (Г-Е) Тест на перевагу сахарози: (Г) перший день, (Д) другий день, (Е) третій день. Споживання води та сахарози мишами в кожній клітці (3–4 миші на клітку) вимірювали, усереднювали для кожної клітки та розраховували для кожної миші на день. Дані тесту на перевагу сахарози представлені у вигляді середнього значення ± SEM (n = 8-12 мишей). Зірочки (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005) позначають статистично значущі відмінності між групами, визначені за допомогою двофакторного ANOVA з подальшим некоригованим тестом Фішера.

Далі ми провели тест на перевагу сахарози для оцінки ангедонії, яка є основним симптомом депресивної поведінки у гризунів. Ангедонія визначається

як знижена здатність відчувати задоволення, що часто вимірюється за допомогою зниження переваги розчину сахарози над водою [42,222,223]. У старих самок після ОТС на 1-й день спостерігалося зниження споживання сахарози на 25% порівняно з контрольною групою (Рис. 4.2Г). Однак цей ефект не спостерігався на 2-й і 3-й дні, тому цієї зміни недостатньо, щоб зробити висновок про розвиток ангедонії у старих самок мишей. ОТС не викликав ангедонічну поведінку в тесті на перевагу сахарози у всіх досліджених групах, але старі миші мали тенденцію вибирати розчин сахарози і воду рідше, ніж молодші гризуни (Рис. 4.2. Г-Е). Відсутність ангедонії в тесті свідчить про те, що процедура ОТС не викликала депресивної поведінки в досліджуваних тварин. Це важливе розрізнення, оскільки воно вказує на те, що стресові зміни поведінки, виявлені в тесті відкритого поля, не супроводжуються порушеннями в обробці винагород або в поведінці, спрямованій на отримання задоволення. Ця дисоціація між тривожною та депресивною поведінкою підкреслює специфічність процедури ОТС у впливі на певні сфери поведінки.

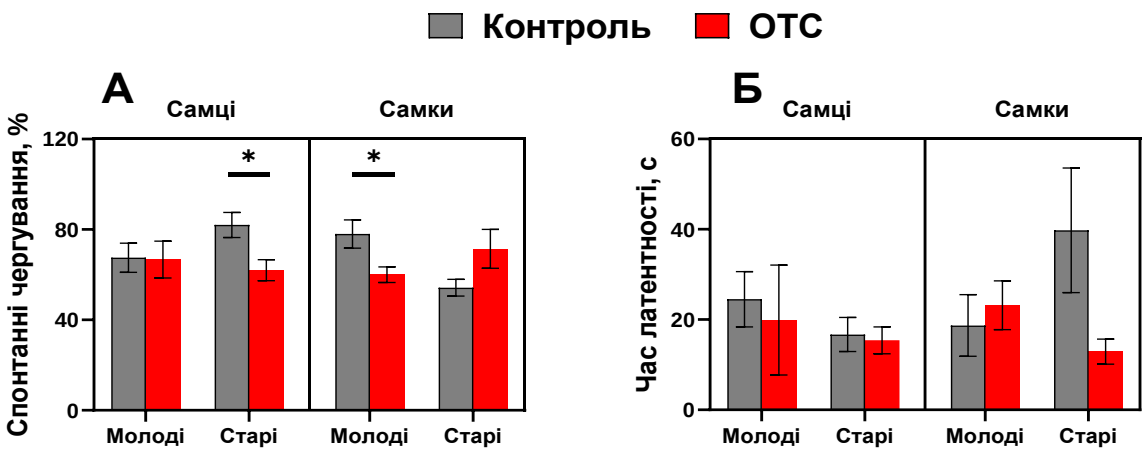

Рис. 4.3. Просторова робоча пам’ять молодих і старих самців та самок мишей, підданих процедурі ОТС. в Тесті спонтанних чергувань у Т подібному лабіринті. (А) Відсоток альтернативного вибору рукава протягом 5 спроб і (Б) час до виходу з точки старту. Зірочки (*$p < 0,05$) показують значущі відмінності між значеннями двох груп порівняння за допомогою тесту Крускала-Уолліса з подальшим тестом множинних порівнянь Данна.

Розвиток ПТСР часто асоціюється з когнітивними дисфункціями, включаючи порушення пам’яті [224,225]. Ми використовували спонтанні зміни в Т-лабіринті для оцінки просторової пам’яті мишей. Зазвичай гризуни схильні вибирати інший рукав після відвідування попереднього. Коли миші вибирають той самий рукав знову, це може вказувати на певні порушення навчання та пам’яті. ОТС не вплинув істотно на правильність вибору сторони та час затримки в Т-лабіринті (Рис. 4.3.А, Б). Старші самки на 30 % частіше робили помилки у виборі сторони порівняно з молодшими самками (Рис. 4.3.А). Ці результати свідчать про те, що ОТС не впливає на запам’ятовування, хоча старі самки характеризуються порушеннями пам’яті порівняно з молодими.

Наші результати також вказують на високу внутрішньогрупову мінливість розвитку симптомів ПТСР, що може відображати наявність у когорті як вразливих, так і стійких до впливу ОТС особин, що є типовим для гризунів [128]. Крім того, старі миші розвивають стійкість до поведінкових змін, спричинених ОТС.

4.2. Залежність впливу ОТС на гематологічні показники мишей від статі та віку

Дослідження показали, що стрес може спричиняти зміни гематологічних показників, зокрема перерозподіл імунних клітин, а також підвищувати ризик серцево-судинних захворювань і діабету [226–228].

У нашому експерименті рівні гемоглобіну, гематокриту та кількості еритроцитів не змінювалися під впливом ОТС у самців обох вікових груп (Рис. 4.4.А-В). У молодих самок, які піддавалися впливу ОТС, рівні гемоглобіну та гематокриту дещо підвищилися (Рис. 4.4.А, Б). У старих самок ОТС призвів до зниження рівня гемоглобіну на 27 %, але не вплинув на загальну кількість еритроцитів порівняно з контрольною групою (Рис. 4.4.В). З літературних даних відомо що аналогічні результати були отримані в щурів, які зазнали гострого стресу від обмеження рухів, а саме: молоді щури демонстрували вищий рівень

гемоглобіну, а старі тварини – нижчий рівень гемоглобіну після впливу стресу [227]. Щодо лейкоцитів, зміни були більш вираженими. У молодих самців, підданих ОТС, загальна кількість лейкоцитів була на 26% вищою, ніж у контролі (Рис. 4.4.Г). Натомість кількість лейкоцитів у старих самців і самок була на 33% і 40% нижчою, ніж у відповідних контрольних групах. Крім того, загальна кількість лейкоцитів у старих самок була на 46% вищою, ніж у молодих (Рис. 4.4.Г).

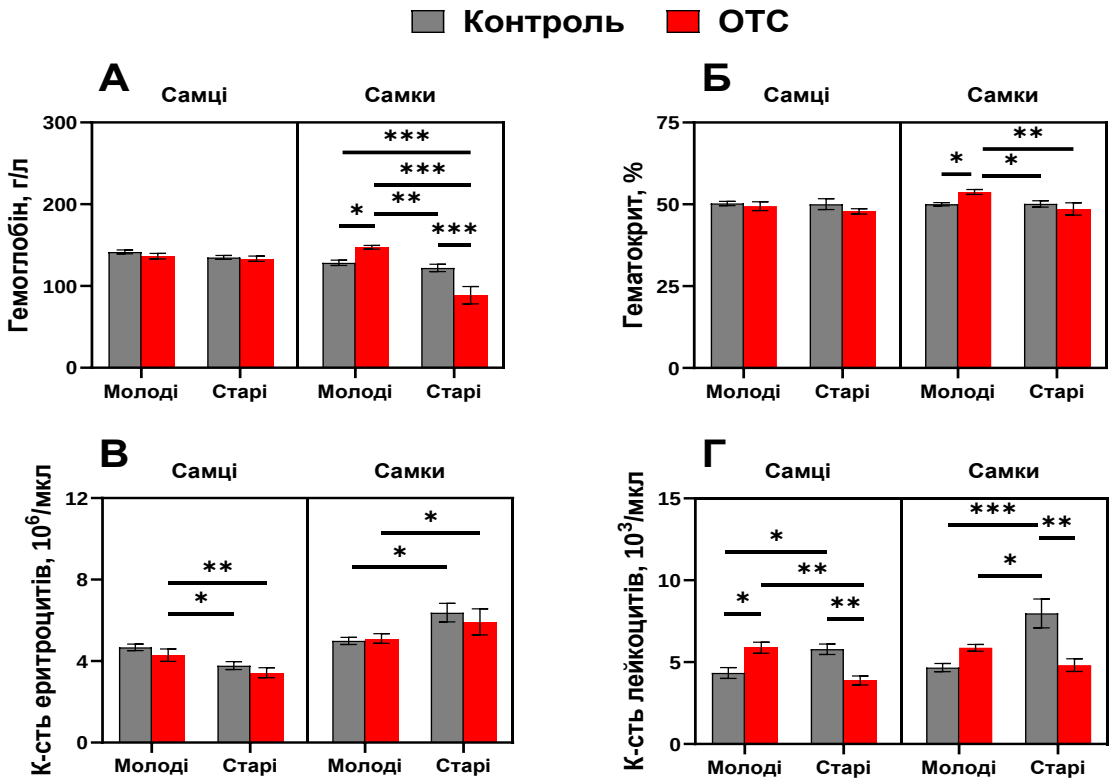

Рис. 4.4. Гематологічні параметри у молодих і старих самців та самок мишей, підданих процедурі ОТС. (А) загальна кількість гемоглобіну, (Б) гематокрит, (В) кількість еритроцитів і (Г) кількість лейкоцитів. Дані представлені у вигляді середнього значення ± SEM. Зірочки (*$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,005$) показують значущі відмінності між значеннями двох груп порівняння за допомогою двофакторного ANOVA з подальшим тестом множинних порівнянь Тюкі.

Не було виявлено помітних змін у лейкоцитарній формулі між контрольною групою та молодими самцями, що піддавалися впливу ОТС (табл. 4.1). У молодих самок після впливу ОТС було виявлено 2,1-кратне збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів (табл. 4.1). Також було зафіксовано зниження рівня лімфоцитів на 6%. Аналогічні та більш виражені ефекти спостерігалися у старих самок. Рівень паличкоядерних нейтрофілів у старих самок, що піддавалися впливу ОТС, був у 8,8 рази вищим, ніж у самок контрольної групи. Водночас спостерігалася тенденція до підвищення рівня сегментованих нейтрофілів. Рівень лімфоцитів у старих самок, що піддавалися впливу ОТС, був на 14% нижчим.

Таблиця 4.1.

Лейкоцитарна формула периферійної крові мишей

Тип клітин, %	**Самці**		**Самки**			
	Молоді		**Молоді**		**Старі**	
	Контроль	ОТС	Контроль	ОТС	Контроль	ОТС
Юні форми	1,6±0,2	1,9± 0,3	0,5±0,2	0,8± 0,4	1,3±0,3#	3,2±0,7
Паличкоядерні нейтрофіли	1,6±0,2	1,6± 0,2	0,9±0,3	1,9± 0,2*	0,9±0,4	8,0±1,2*
Сегментоядерні нейтрофіли	21,3±2,4	21,± 1,7	15,6±1,0	15,8± 0,7	17,1±2,0	23,8±4,0
Базофіли	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ
Еозинофіли	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ
Лімфоцити	75,1±2,7	75,± 1,7	84,9±1,4	79,7± 1,0*	80,1±2,6	68,8±2,4*
Моноцити	0,4±0,2	0,6± 0,2	0,1±0,1	0,6± 0,2	0,3±0,2	0,2±0,2

Дані представлені як середні значення ± SEM, n = 5-12. *Істотно відрізняється від відповідної контрольної групи ($p < 0,05$), #від молодих самок ($p < 0,05$). НВ – не виявлено.

Значних змін у концентрації прозапального цитокіну ІЛ-1β у самців і самок, що піддавалися впливу ОТС, виявлено не було (Рис. 4.5.А). Рівень білків плазми крові був на 15% нижчим у молодих самців і на 19% вищим у старих самців, що піддавалися впливу ОТС, порівняно з контролем (Рис. 4.5.Б). Рівень білків плазми крові в молодих самців контрольної групи був на 22% вищим, ніж у старих самців тієї ж групи (Рис. 4.5.Б). ОТС не мав значного впливу на рівень білків у плазмі крові у самок, але ми спостерігали на 41% вищий рівень білків у старих самок контрольної групи порівняно з молодими. Рівень глюкози в плазмі крові не змінювався під впливом ОТС у молодих самців і самок. Водночас цей показник був на 29% нижчим у старих самців ОТС і на 40% вищим у старих самок ОТС порівняно з відповідними контрольними групами (Рис. 4.5.В). Рівень глюкози в плазмі крові не відрізнявся між віковими групами самців і самок мишей (Рис. 4.5.В).

У молодих і старих самців ОТС не спричиняв змін активності параоксонази (ПОН) і мієлопероксидази (МПО) (Рис. 4.5.Г, Д). Активність параоксонази була на 21% нижчою у молодих самок ОТС (Рис. 4.5.Г), а активність мієлопероксидази була в 2,3 рази вищою у старих самок ОТС порівняно з контролем (Рис. 4.5.Д). У старих самок контрольної групи активність ПОН і МПО була нижчою на 53% і 59%, відповідно, порівняно з молодими самками контрольної групи (Рис. 4.5.Г, Д).

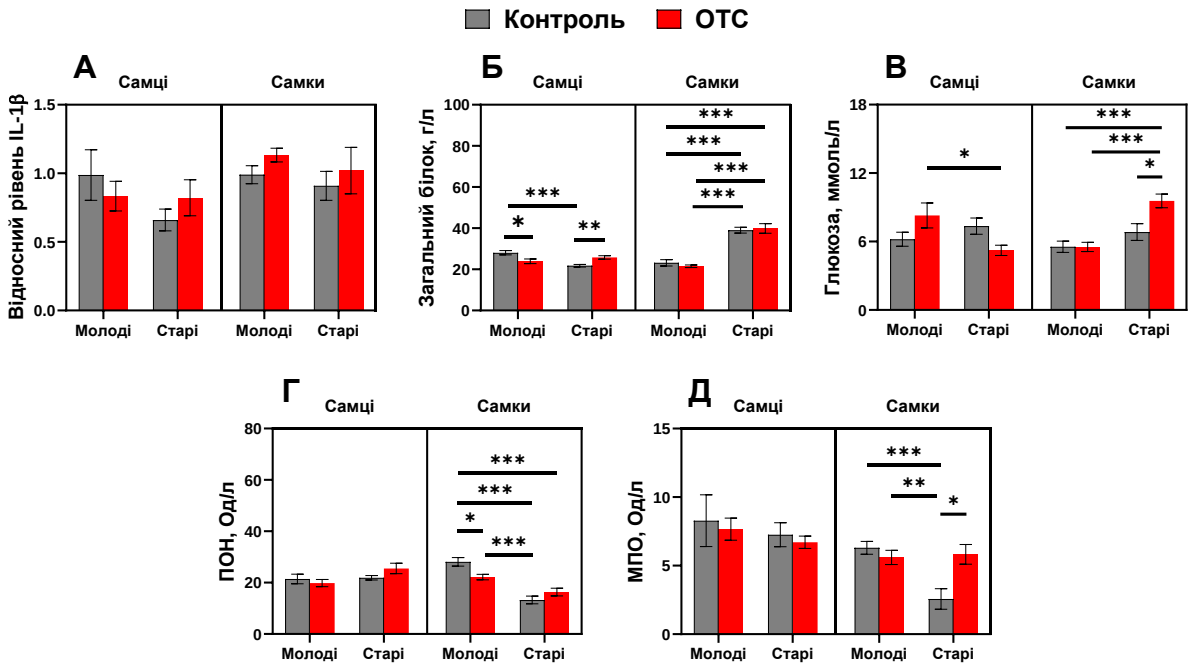

Рис. 4.5. Біохімічні параметри крові у молодих і старих самців та самок мишей, підданих процедурі ОТС. (А) Загальний білок, (Б) глюкоза, (В) відносні рівні ІЛ-1β, активність (Г) параоксонази (ПОН) та (Д) мієлопероксидази (МПО) у плазмі крові молодих та старих самців мишей, підданих процедурі ОТС. Дані представлені у вигляді середнього значення ± SEM. Зірочки (*$p < 0{,}05$, **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}005$) показують значущі відмінності між значеннями двох груп порівняння за допомогою двофакторного ANOVA з подальшим тестом множинних порівнянь Тюкі.

Гемоглобін і гематокрит є важливими показниками оксигенації тканин, що відображають кількість еритроцитів і їх здатність переносити кисень. Вищий рівень гемоглобіну, виявлений у молодих самок, що піддавалися дії ОТС, може бути результатом фізіологічної реакції на стрес, що супроводжується мобілізацією еритроцитів і підвищеним виробленням під впливом стресогенних факторів. Незначне підвищення рівня гемоглобіну також було повідомлено раніше [227,229,230]. Навпаки, стрес, ймовірно, погіршує анемію або здатність до перенесення кисню у старших самок, можливо, через спричинене стресом

запалення або порушення метаболізму заліза. Подальші дослідження могли б краще вивчити механізми цього явища. Крім того, дослідження показали, що гризуни в молодому віці більш вразливі до підвищення рівня гемоглобіну, ніж старі тварини [227]. Однак є дослідження, які спростовують терапевтичну цінність рівня гемоглобіну при психічних захворюваннях [231].

Рівень загального білка в плазмі крові відображає баланс між синтезом і розпадом білкових молекул, а також стан білкового обміну в організмі. У літніх чоловіків стрес спричиняв підвищення рівня білка в плазмі, що може свідчити про реакцію організму на стрес через посилення запалення та активацію імунної системи. Це узгоджується з дослідженнями, які показують, що концентрація білка в плазмі зростає з віком [232]. Навпаки, у молодих чоловіків рівень білків у плазмі крові знижувався після стресу, що може бути наслідком підвищеної потреби в білках для відновлення пошкоджених тканин або катаболічного ефекту гормонів стресу, які стимулюють розпад білків у м’язах та інших тканинах. Подібні результати зниження рівня сироваткового альбуміну під час стресу були отримані раніше [233], що означає наявність певної кореляції між рівнем білків і стресом. Ці зміни вказують на вікові відмінності в метаболічній реакції на стрес.

Було показано, що ОТС викликає у мишей симптоми, схожі на посттравматичний стресовий розлад (ПТСР), включаючи порушення функції систем гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі (ГГН) [128,234,235]. Модель ОТС у щурів показала значні зміни рівнів глютаміну та холіну в префронтальній корі головного мозку протягом 7 днів після стресу, що вказує на зміну збудливого тонусу та мембранного обміну [236]. Крім того, пренатальний вплив синтетичних глюкокортикоїдів у людей призводив до посилення стресових реакцій кортизолу, які зберігалися від дитинства до підліткового віку, що свідчить про довгострокове програмування реактивності ГГН осі [237]. Підвищений рівень глюкокортикоїдів у людини, як було показано, пригнічує секрецію еритропоетину (ЕРО), який є критично важливим для синтезу гемоглобіну та дозрівання еритроцитів [238]. Крім того, дослідження показали,

що запальні цитокіни, зокрема ІЛ-6, рівень яких підвищується в періоди стресу, можуть сприяти секвестрації заліза та пригнічувати синтез гемоглобіну як у людей, так і в експериментальних тварин [234,238]. Результати досліджень на щурах свідчать, що стрес негативно впливає на рівень гематокриту, що можна пояснити його впливом на гормональні та імунні механізми [234]. З огляду на наведені приклади, ми висунули гіпотезу, що ОТС в умовах нашого експерименту також може впливати на показники крові в мишей. Однак, відповідно до експериментальних умов, не було виявлено значних змін у рівні гемоглобіну, гематокриту або еритроцитів у мишей обох статей, які піддавалися ОТС (Рис. 4.4.А-В). Цілком ймовірно, що цьому є кілька причин. По-перше, організм має міцні компенсаторні механізми, здатні підтримувати гематологічний гомеостаз. Навіть за умов ОТС ці механізми можуть слугувати буфером проти змін показників крові. По-друге, можливо, що гематологічні зміни вимагають більш тривалого або повторного впливу стресу, ніж той, що передбачений протоколом ОТС. У деяких дослідженнях гострі стресові фактори не спричиняли значних змін показників крові, на відміну від хронічного або повторного стресу [235].

Варто зазначити, що імунна відповідь мишей, підданих ОТС, варіювала залежно від статі та віку (Рис. 4.4Г, Рис. 4.5. і табл. 4.1). Зокрема, спостережене незначне підвищення загальної кількості лейкоцитів у молодих самців після ОТС за відсутності змін у лейкоцитарній формулі можна трактувати як ранню фазу імунної активації без зміщення клітинного складу. Після ОТС миші можуть демонструвати тимчасове збільшення лейкоцитів як частину своєї негайної фізіологічної реакції на стрес. Під час періодів стресу вивільняються прозапальні цитокіни, які можуть стимулювати вироблення та вивільнення лейкоцитів з кісткового мозку. Проте, якщо стрес не є достатньо сильним або тривалим, щоб спричинити істотне пошкодження тканин або стійке запалення, диференціальний підрахунок конкретних типів лейкоцитів може залишатися незмінним [239].

Хоча в молодих самців може спостерігатися збільшення прозапальних цитокінів, що сприяють рекрутуванню лейкоцитів, у старших самців може бути інший баланс цитокінових реакцій, який не сприяє збільшенню кількості лейкоцитів [240]. Це може бути одним із багатьох пояснень протилежних ефектів реакції молодих і старих самців мишей на стрес (Рис. 4.4.В). Водночас рівні прозапального цитокіну ІЛ-1β, які ми виміряли в ході дослідження, не були показовими, оскільки його профіль не змінювався за всіх експериментальних умов (Рис. 4.5.).

Спостереження, що рівень лейкоцитів у самок істотно не змінюється після впливу ОТС, тоді як кількість нейтрофілів збільшується, а лімфоцитів зменшуються (Рис. 4.4Г і табл. 4.1), можна пояснити кількома фізіологічними та гормональними факторами, які відрізняються у самців і самок мишей [240,241]. Доведено, що естроген має імуномодулюючу дію, яка може сприяти підтримці стабільного рівня лейкоцитів у молодих самок під час стресу. У молодих самців стрес зазвичай призводить до підвищення рівня кортикостерону, що може сприяти лейкоцитозу (збільшенню загальної кількості лейкоцитів) [241]. На відміну від самців, самки можуть мати іншу гормональну реакцію на стрес, що призводить до менш виражених змін у загальній кількості лейкоцитів, але водночас й до змін у конкретних типах клітин (тобто до збільшення нейтрофілів і зменшення лімфоцитів). Така динаміка свідчить про активацію вродженої імунної відповіді, яка часто є більш вираженою під час гострого стресу [242]. NLR (співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів) часто використовується як маркер системного запалення та стресової реакції. Збільшення кількості нейтрофілів у поєднанні зі зменшенням кількості лімфоцитів призводить до підвищення NLR, що вказує на зміну в бік запального стану [242]. Цю закономірність можна розглядати як частину адаптивної реакції організму на стресові фактори, навіть якщо загальна кількість лейкоцитів не змінюється істотно.

Примітно, що вплив на NLR був більш вираженим у старих самок мишей, ніж у молодих (табл. 4.1.). Ймовірно, слід звернути увагу на термін «запальне

старіння», який часто зустрічається в літньому віці, в тому числі в жінок. Цей термін описує хронічне, слабке запалення, яке часто супроводжує старіння [243]. Цей стан характеризується підвищеним рівнем прозапальних цитокінів та збільшенням кількості нейтрофілів у рамках вродженої імунної відповіді. У літніх жінок цей хронічний запальний стан може призвести до підвищення базового рівня нейтрофілів, який зростає ще більше під час стресу або хвороби. Це призводить до значно вищого значення NLR порівняно з молодшими жінками [243]. Ми очікуємо, що подібні ефекти будуть спостерігатися в інших ссавців, включаючи самок мишей.

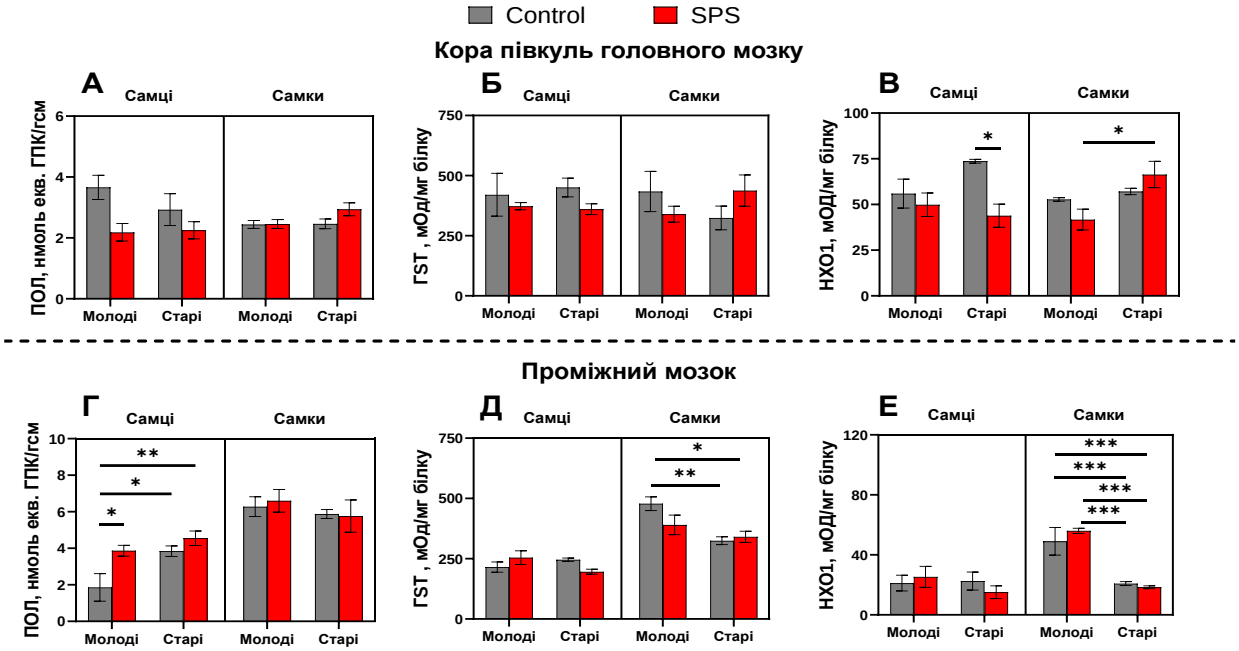

Рис. 4.6. Параметри антиоксидантного статусу мозку у молодих і старих самців та самок мишей, підданих процедурі ОТС. (А, Г) Рівні пероксидів ліпідів, (Б, Д) активність ГST та (В, Е) НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1 в корі головного мозку (А-В) та проміжному мозку (Г-Е) молодих та старих самців мишей, підданих процедурі ОТС. Дані представлені у вигляді середнього значення ± SEM. Зірочки показують значущі відмінності між значеннями двох груп порівняння за допомогою двофакторного ANOVA з подальшим тестом множинних порівнянь Тюкі (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,005).

Таким чином, різні ефекти ОТС на кількість лейкоцитів у молодих і старих самців та самок можуть бути обумовлені взаємодією між стресовою імуномодуляцією, віковими змінами імунної функції та статевими гормональними відмінностями.

Наші попередні припущення щодо активації імунної системи у відповідь на ОТС підтвердились лише частково, оскільки основні маркери запалення, ІЛ-1β, не показали жодних видимих змін хоча ми очікували що його рівень зросте (Рис. 4.5.). Проте ми виявили зміни в активності ферментів-маркерів плазми крові, таких як мієлопероксидаза та параоксоназа (Рис. 4.6.В, Г). Мієлопероксидаза є важливим ферментом, який відіграє ключову роль у функції нейтрофілів та імунній відповіді. Підвищення активності МПО після ОТС може свідчити про активацію запальної реакції [244]. У нашому випадку прозапальний ефект, проявом якого було збільшення кількості нейтрофілів, був найбільш вираженим у старих самок мишей (табл. 4.1.). Активність МПО також була значно вищою у старих гризунів порівняно з контрольною групою (Рис. 4.6.Г). Дослідження показують, що рівні МПО можуть варіюватися залежно від статі та віку тварин. Наприклад, старі самки мишей можуть мати більш виражену реакцію МПО на стрес через зміни рівня гормонів і загальний стан імунної системи [245].

Зміни активності МПО також можуть використовуватися як маркер оксидативного стресу, який часто асоціюється із запаленням. Параоксоназа – фермент, який відіграє важливу роль в антиоксидантному захисті організму. Зміни рівня ПОН можуть свідчити про активність оксидативного стресу. Зниження рівня параоксонази після процедури ОТС може вказувати на підвищення оксидативного стресу, оскільки за таких умов організм втрачає здатність ефективно нейтралізувати вільні радикали та інші окислювальні агенти [246]. У нашому дослідженні нижча активність цього ферменту у старих самок мишей додатково підтверджує припущення про наявність хронічного запального стану. Старіння пов’язане з підвищенням базового рівня оксидативного стресу та запалення. Це призводить до природного зниження активності ПОН, оскільки антиоксидантні системи стають менш ефективними в нейтралізації активних

форм кисню (АФК). Стрес, спричинений ОТС, ймовірно, посилює цю існуючу вразливість, ще більше знижуючи рівень ПОН. Однак зміни активності ПОН після процедури ОТС не були вираженими. Зниження активності цього ферменту спостерігалося лише в молодих самок мишей в результаті тривалого одноразового стресу. Молоді самки можуть виявляти підвищену чутливість до стресу через більш виражені коливання ГГН осі та пов'язані з цим гормональні каскади. Така чутливість може проявлятися у вигляді більш динамічних змін маркерів оксидативного стресу, включаючи ПОН.

Цікаво, що активність мієлопероксидази в крові підвищувалася у старих самок, що свідчить про розвиток гострого оксидативного стресу і добре корелює з підвищеним рівнем глюкози. Оскільки гліколіз посилюється гіперактивацією глюкокортикоїдної сигналізації осі ГГН, організм потребує більше глюкози для задоволення енергетичних потреб.

4.3. ОТС викликає незначні зміни в параметрах оксидативного стресу в корі головного мозку та проміжному мозку мишей

Оксидативний стрес є важливим компонентом патофізіологічних змін при ПТСР [125]. Оксидативний стрес виникає в клітинах, коли швидкість утворення активних форм кисню (АФК) перевищує здатність антиоксидантних систем нейтралізувати ці молекули. Підвищений рівень АФК може спричиняти ушкодження клітин шляхом окислення ДНК, білків і ліпідів [247,248]. Підвищена інтенсивність оксидативного стресу, зокрема внаслідок дисфункції мітохондрій, є особливо небезпечною для нервової тканини [103].

Ми виміряли рівні пероксидів ліпідів ПЛ, маркера оксидативного пошкодження ліпідів, та активність двох антиоксидантних ферментів, зокрема GST і HXO1, у корі та проміжному мозку мишей. У корі головного мозку рівень ПЛ не змінився після ОТС незалежно від віку чи статі тварин (Рис. 4.6.А). Однак у молодих самців після ОТС рівень пероксидів ліпідів був у 2 рази вищим у проміжному мозку (Рис. 4.6.Г). Також у самців старшої вікової групи рівень ПЛ

у проміжному мозку був у 2 рази вищим порівняно з контрольною групою молодих самців (Рис. 4.6.Г). Незначні зміни були виявлені також в активності антиоксидантних ферментів. Процедура ОТС не вплинула істотно на активність GST ні в корі головного мозку, ні в проміжному мозку в жодній з дослідних груп (Рис. 4.6.Б, Д). Однак активність GST була на 32% нижчою в проміжному мозку старих самок порівняно з молодими (Рис. 4.6.Д). Активність HXO1 була значно нижчою лише в корі головного мозку старих самців після впливу ОТС, на 67% порівняно з контрольною групою мишей (Рис. 4.6.В). Подібно до активності GST, активність HXO1 була на 57% нижчою в проміжному мозку старих самок порівняно з молодими самками (Рис. 4.6.Е).

Одним з основних шляхів утворення АФК під впливом стресових факторів є гіперактивація ГГН осі та підвищене вивільнення глюкокортикоїдів, зокрема кортизолу та норадреналіну. Під впливом глюкокортикоїдної сигналізації мітохондрії починають виробляти більше АФК внаслідок активації гліколізу та, відповідно, підвищеного споживання кисню мітохондріями [125]. У молодих мишей, де активність ГГН осі вища, цей процес може бути більш вираженим, що пояснює збільшення пероксидів ліпідів у проміжному мозку, оскільки вони легко окислюються вільними радикалами. Тому очікується збільшення оксидативного пошкодження.

Деякі дослідження повідомляють про кореляцію між низьким рівнем GST і психічними захворюваннями, причому подібні результати отримані в пацієнтів зі шизофренією та великим депресивним розладом [249], а також вказується на можливий зв’язок між GST і ПТСР [102,250]. У нашому дослідженні ми не спостерігали значних змін активності GST у корі або проміжному мозку після ОТС. Вплив ОТС також спричинив зниження активності HXO1 у корі головного мозку старих самців і тенденцію до зниження активності цього ферменту в молодих самок. Таким чином, вплив ОТС дещо послаблює антиоксидантний захист у старих самців і молодих самок. Ці зміни можуть бути пов’язані зі змінами просторової пам’яті, а не з розвитком симптомів тривоги після впливу

ОТС. Також не можна виключити, що використаний протокол стресу не спричинив значних довгострокових порушень окисно-відновного балансу мозку.

З’ясувавши ці відмінності, наші результати можуть поглибити розуміння механізмів розвитку ПТСР та стати основою для майбутніх стратегій лікування стресових розладів.

4.4. Підсумок

У цьому розділі дослідження продемонстровано наслідки моделювання посттравматичного стресового розладу за допомогою протоколу одноразового тривалого стресу (ОТС) у мишей, висвітлюючи фундаментальний статевий диморфізм у патофізіологічних відповідях. Початковий етап реакції на стресор є універсальним для обох статей і полягає в активації гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі. Стрес-індукована стимуляція ЦНС призводить до вивільнення адренокортикотропного гормону (АКТГ), який, своєю чергою, стимулює кору надниркових залоз до синтезу та секреції кортикостерону. Саме кортикостерон виступає центральним медіатором подальших метаболічних, імунних та поведінкових змін, однак напрямок цих змін виявляється кардинально протилежним у самців та самок.

На біохімічному рівні спостерігається ефект у старих самців і молодих самок, що полягає у пригніченні ключових ферментів другої фази детоксикації, які водночас є важливими компонентами антиоксидантної системи. Кортикостерон, діючи через свої внутрішньоклітинні рецептори, ймовірно, репресує Nrf2-залежний сигнальний шлях, що призводить до зниження транскрипційної активності генів, які кодують глютатіон-S-трансферазу (GST) та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктазу 1 (НХО1). Таке пригнічення ендогенного антиоксидантного захисту створює умови для розвитку системного оксидативного стресу.

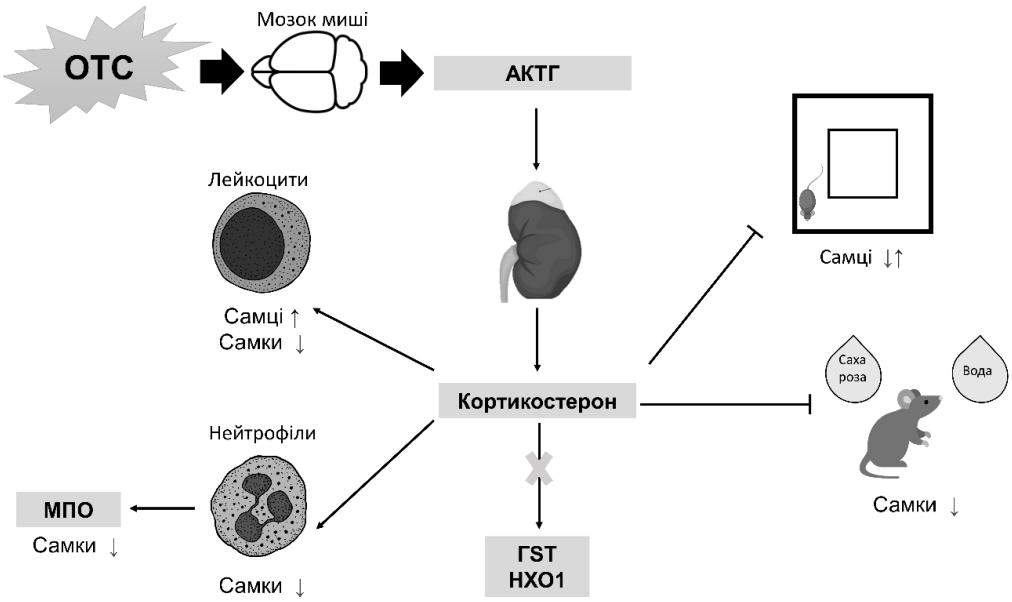

Рис. 4.7. Узагальнююча схема з експерименту в якому використовувався одноразовий тривалий стрес.

У імунній та поведінковій сферах також виявляється глибокий статевий та віковий диморфізм. У молодих самців стрес індукує про-запальний фенотип, що характеризується розвитком лейкоцитозу. Цей ефект може бути пов'язаний з модулюючим впливом андрогенів на чутливість імунних клітин до стресових гормонів. Поведінково цей мобілізаційний стан корелює з підвищенням рівня тривожності або рухової активності в тесті «відкритого поля», що може відображати гіперактивацію центрів страху, зокрема мигдалеподібного тіла.

Натомість у старих самок розвивається діаметрально протилежна реакція. На імунному рівні спостерігається імуносупресія, що проявляється у вигляді лейкопенії та нейтропенії, наслідком якої є зниження активності мієлопероксидази (МПО) – ключового ферменту нейтрофілів. Така підвищена чутливість до імуносупресивної дії глюкокортикоїдів у самок може бути опосередкована естрогенами. На поведінковому рівні у самок розвивається депресивно-подібний стан, маркером якого є порушення просторової пам’яті у

Т-лабіринті та ангедонія, що проявляється у зниженні споживання розчину сахарози.

Ці результати підкреслюють важливість статевих та вікових факторів у реакції на стрес, оскільки молоді самці більш схильні до поведінкових змін, а старі самки виявляють більш виражені запальні й окислювальні порушення. Отримані дані демонструють необхідність індивідуального підходу до діагностики ПТСР з урахуванням вікових і гендерних відмінностей.

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СТРЕСУ СТИМУЛЯЦІЄЮ ЕЛЕКТРИЧНИМ СТРУМОМ, ЯКОГО МОЖНА УНИКНУТИ, НА ПОВЕДІНКОВІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ПОКАЗНИКИ МИШЕЙ

Попередні етапи дослідження дозволили нам дослідити ефекти окремих стресорів (гострих і хронічних), а також їх комбінації в рамках моделі одноразового тривалого стресу. Однак усі ці моделі передбачали неконтрольовану дію стресового чинника, коли тварина не має можливості вплинути на ситуацію чи уникнути загрози. У природних умовах, здатність організму контролювати стресор (тобто уникати за певних дій) часто визначає тяжкість і характер стресової реакції.

У цьому контексті наступним логічним кроком стало моделювання ситуації, в якій тварина має можливість умовного уникнення стресу. Такий підхід дозволяє дослідити, чи наявність виходу зі стресової ситуації пом’якшує наслідки для організму навіть при наявності самого стресору. Для цього на третьому етапі дослідження ми застосували модель стимуляції струмом, яка є технічно зручною для створення умов часткового контролю. У клітку було додано дві ізоляційні планки, що слугували безпечними зонами. Це дозволило змоделювати умовне «бомбосховище», яке тварина могла використати для уникнення подразнення.

Важливо зазначити, що створення подібних умов уникнення є технічно складним у попередніх моделях (таких як стримування або ОТС), де тварина фізично позбавлена можливості діяти. Саме тому модель зі стимуляцією струмом була обрана як інструмент для дослідження впливу суб’єктивного відчуття контролю над стресом на вираженість його наслідків. Це відкриває нову перспективу вивчення не лише сили стресової реакції, але й її психологічного модулювання.

5.1. Результати дослідження

5.1.1. Тести поведінки

У тесті аверсивного контексту мишей поміщали в клітку, де вони раніше зазнавали електричної стимуляції, і фіксували кількість завмирань. Тест проводили на 2-й і 7-й дні після електричних стимулів. На 2-й день миші, які раніше були піддані процедурі індукції стресу, продемонстрували значно більшу кількість завмирань порівняно з контролем, що в 25 разів перевищувало показник контрольної групи ($p=0,0001$) (Рис. 5.1.А). Однак на 7-й день ця різниця між контрольною та експериментальною групами тварин вже не була значущою, спостерігалася лише тенденція ($p=0,06$) (Рис. 5.1.Б). У тесті піднятого плюс лабіринту миші, які зазнали ударів електричного струму, проводили на 88% менше часу у відкритих рукавах лабіринту порівняно з контрольною групою ($p=0,0004$) (Рис. 5.1.В). У тесті відкритого поля ми оцінювали середню швидкість руху, проведений у центральній зоні час та кількість дефекацій. Самці мишей, які зазнали ударів електричним струмом, не показали значних відмінностей у швидкості руху, проведеному в центральній зоні часі, або кількості дефекацій (Рис. 5.1.Г-Е). Однак у стресованій групі спостерігалася тенденція до збільшення проведеного у внутрішніх квадрантах відкритого поля часу (Рис. 5.1.Д).

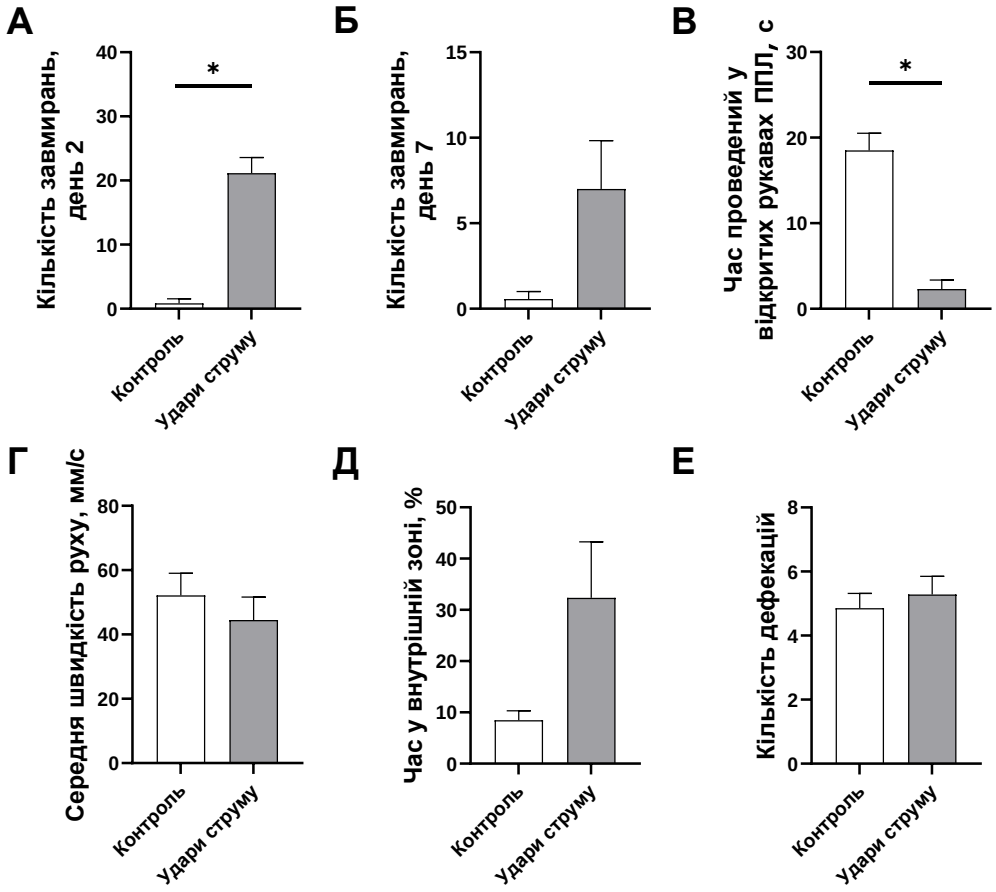

Рис. 5.1. Поведінкові характеристики мишей які піддавались впливу, якого можна уникнути. (А) Кількість завмирань в аверсивному контексті на 2-й день після впливу стресу, (Б) кількість завмирань в аверсивному контексті на 1-й день після впливу стресу, (В) час, який проведений у відкритих рукавах піднятого лабіринту, (Г) середня швидкість мишей у відкритому полі, (Д) час, який проведений у центральних квадратах відкритого поля, та (Е) кількість дефекацій у відкритому полі. Дані представлені як середнє ± SEM, n = 6-7. Істотні відмінності (*$p < 0,05$) між контрольною та експериментальною групами були визначені за допомогою непарного t-критерію Стьюдента.

5.1.2. Маса органів

Ми виявили більшу масу гіпоталамуса, в середньому на 29%, у мишей, які піддавалися електричним стимулам (*$p=0,019$*), але загальна маса мозку не

змінилась після впливу стресу впливу стресу (табл. 1). Не було статистично значущої різниці в масі печінки та селезінки між контрольною та експериментальною групами тварин, проте спостерігалась незначна тенденція до зменшення їх маси: печінка (*p=0,08*) та селезінка (*p=0,09*). Не було різниці в масі серця, кори головного мозку, проміжного мозку та нюхових цибулин (табл. 5.1.).

Таблиця 5.1.

Маса органів контрольних мишей та тих, які піддавались стимуляції електричним струмом

Орган	*Контроль*	*Удари струму*
Серце, мг	109±6	108±5
Печінка, мг	852±42	761±20,5
Селезінка, мг	88,2±5,3	76,4±3,6
Цілий мозок, мг	293±10	293±12
Кора півкуль головного мозку, мг	177±12	182±12
Проміжний мозок, мг	90,1±8,9	80,3±5,2
Гіпоталамус, мг	15,6±1,4	20,1±0,7*
Нюхові цибулини, мг	10,7±2,4	10,6±1,5

Дані представлені у вигляді середнього значення ± SEM, n = 6-7. Істотні відмінності (*$p < 0,05$) між контрольною та експериментальною групами були визначені за допомогою непарного t-критерію Стьюдента.

5.1.3. Гематологічні показники

Електричні стимули не вплинули на гематокрит і рівень гемоглобіну (Рис. 5.2.А, Б). Однак у мишей, які зазнали стимуляції електричним струмом, кількість еритроцитів збільшилася на 37 % (*p=0,01*) (Рис. 5.2.В). Загальна кількість лейкоцитів у контрольної та експериментальної груп не відрізнялася (Рис. 5.2.Г).

5.1.4. Біохімічні параметри плазми крові

Не було виявлено відмінностей у вмісті глюкози, загального білку, загального холестерину та ІЛ-1β між експериментальною та контрольною групами (Рис. 5.2.Д-Є, И). Активність мієлопероксидази та параоксонази також залишалась без змін під впливом стресу (Рис. 5.2.Ж, З).

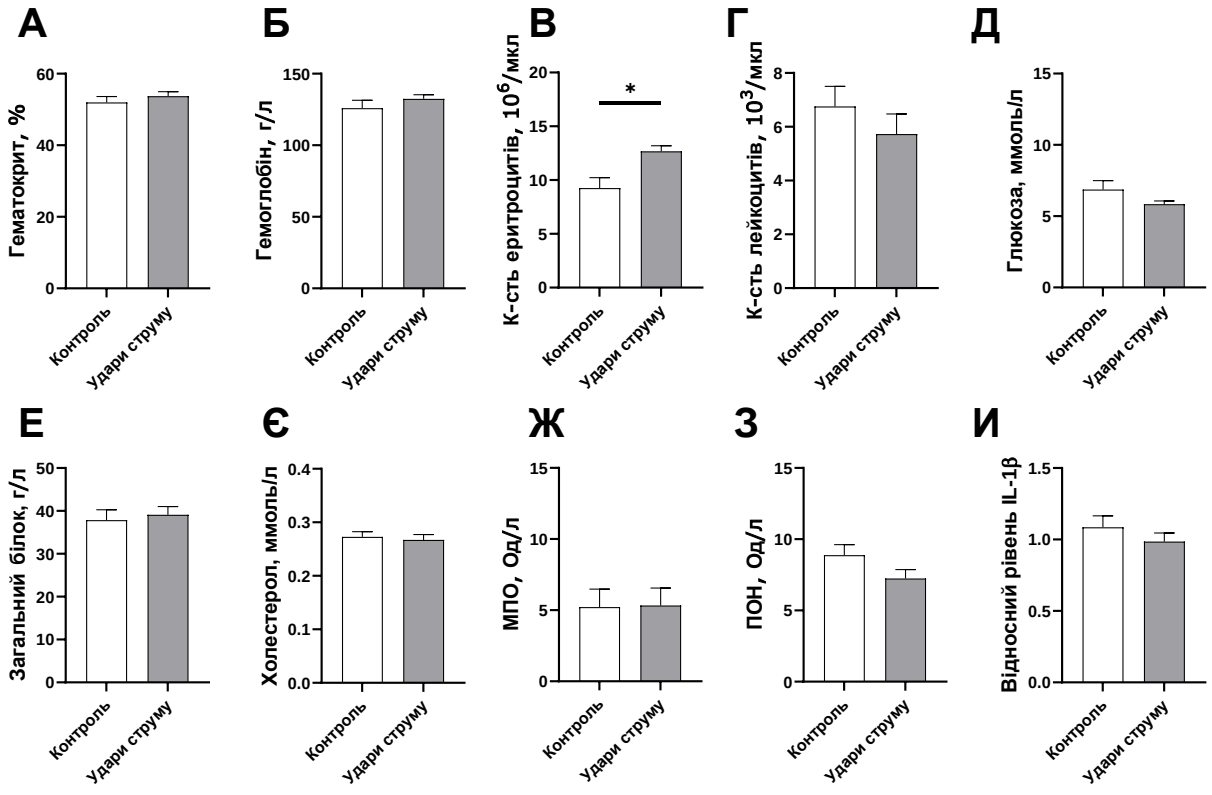

Рис. 5.2. Параметри плазми крові у мишей, які піддавались впливу стресу, що можна уникнути. (А) Гематокрит, (Б) гемоглобін, (В) кількість еритроцитів, (Г) кількість лейкоцитів, (Д) глюкоза, (Е) загальний білок, (Є) загальний холестерин, (Ж) активність мієлопероксидази (МПО), (З) активність параоксонази (ПОН) та (И) рівень ІЛ-1β. Дані представлені як середнє ± SEM, n = 6-7. Істотні відмінності (*$p < 0,05$) між контрольною та експериментальною групами були визначені за допомогою непарного t-критерію Стьюдента.

5.1.5. Біохімічні параметри органів

Рівень глікогену в корі головного мозку та печінці мишей, які зазнали електричних стимулів, не відрізнявся від контрольної групи (Рис. 5.3.А, Б). Рівень ТАГ в печінці не змінився під впливом стресу (Рис. 5.3.В). Після стресового впливу не спостерігалося змін у рівні карбонільних груп білків (Рис. 5.3.Г). Вміст пероксидів ліпідів у корі головного мозку та проміжному мозку експериментальних мишей не відрізнявся від контрольних значень (Рис. 5.3.Д, Е). Однак ми спостерігали на 46 % вищий рівень пероксидів ліпідів у печінці стресованих мишей порівняно з контрольною групою ($p=0,0195$) (Рис. 5.3.Є).

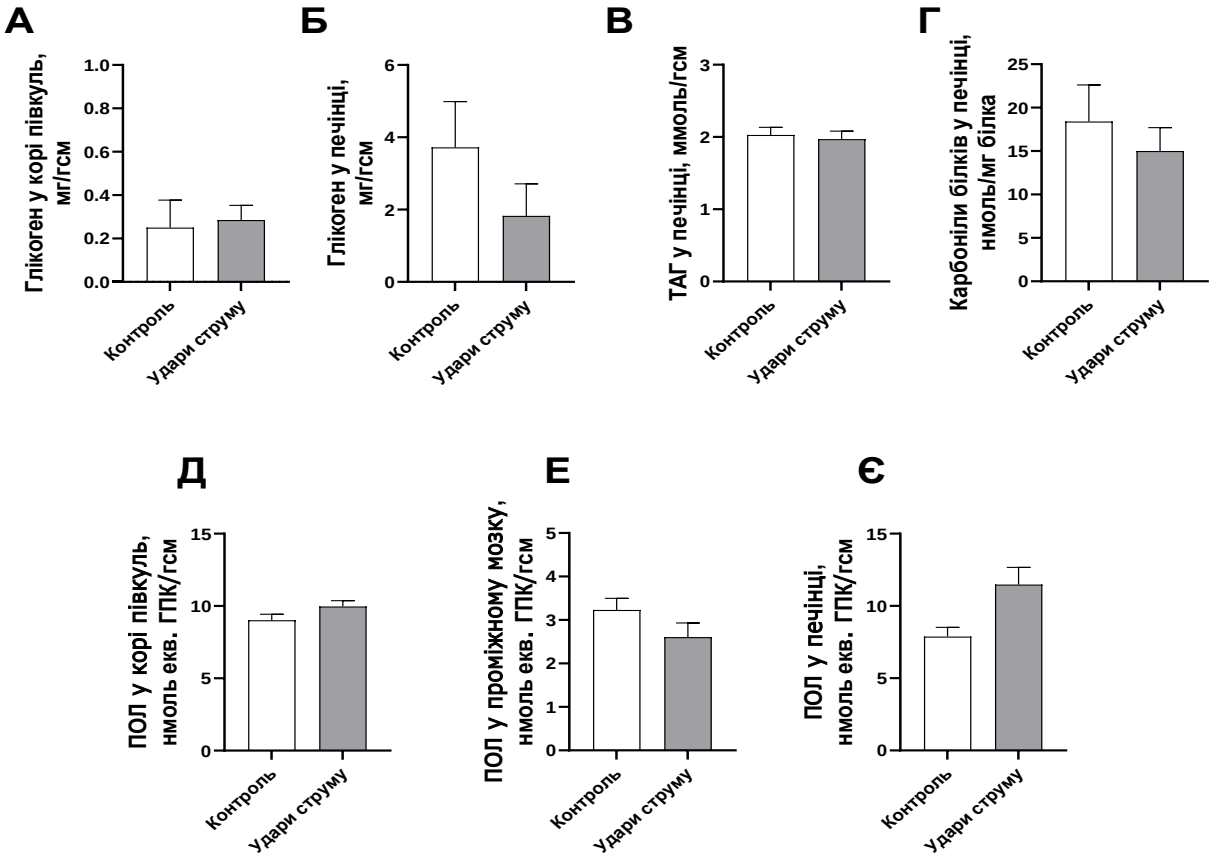

Рис. 5.3. Біохімічні параметри в органах у мишей, які піддавались впливу стресу, що можна уникнути. Рівень глікогену в корі головного мозку (А) та печінці (Б), рівень триацилгліцеролів у печінці (В), рівень карбонільних груп білків у печінці (Г), пероксиди ліпідів у корі головного мозку (Д), проміжному мозку (Е) та печінці (Є). Дані представлені як середнє ± SEM, n = 6-7. Істотні відмінності (*$p < 0,05$) між контрольною та експериментальною групами були визначені за допомогою непарного t-критерію Стьюдента.

5.2. Аналіз та обговорення отриманих результатів

У даному дослідженні вивчалися поведінкові, фізіологічні, гематологічні та біохімічні ефекти стресу, який викликали електричними стимулами з можливістю уникнення, у самців мишей. Отримані результати показують, що такий стрес спричиняє симптоми тривоги, але викликає незначні метаболічні зміни. Ми також спостерігали збереження пам’яті про страх на другий день після стресу, викликаного електричними стимулами, яких можна уникнути, що підтверджується збільшенням кількості завмирань мишей у клітці в якій вони отримували стрес (аверсивний контекст). Посилення кількості завмирань у стресованій групі свідчить про те, що миші сформували сильну асоціацію страху з контекстом. Це можна порівняти з нав’язливими спогадами про травму, які спостерігаються у пацієнтів з ПТСР [251]. Однак відсутність значних відмінностей на 7-й день вказує на потенційне зменшення реакції страху або адаптацію з часом. Ця закономірність узгоджується з попередніми дослідженнями, що показують ослаблення страхових спогадів з часом або звикання тварин до експериментального контексту [252]. Внутрішньогрупові відмінності в кількості випадків завмирань відображають складність механізму збереження пам’яті про страх та її вплив на поведінку, підкреслюючи індивідуальні відмінності в реакції на стресор. Індивідуальна мінливість реакцій на стрес може бути спричинена складною взаємодією генетичних, екологічних і нейробіологічних факторів. Раніше показано, що в когорті мишей можуть існувати як адаптивні, так і неадаптивні фенотипи тривожної поведінки [253]. Отже, індивідуальні відмінності можуть пояснювати різноманітність у проявах спогадів про страх та тривожної поведінки, яку ми спостерігали в нашому дослідженні. Тенденція до збільшення часу перебування у внутрішніх квадратах відкритого поля та зменшення часу перебування у відкритих рукавах тесту піднесеного плюс лабіринту вказує на слабку дослідницьку активність та посилення тривожної поведінки. Як і очікувалось, наші дані підтверджують, що вплив травматичних стресогенних факторів призводить до тривоги та зниження

дослідницької поведінки [254]. Відомо, що гострий стрес активує гіпоталамо-гіпофізарно-надниркововозалозну вісь, що призводить до спрямованої на уникнення ризику поведінки [255]. Збільшення маси гіпоталамусу у стресованих мишей може відображати нейропластичні зміни або посилення активності в цій ділянці мозку. Крім того, ріст гіпоталамусу може свідчити про адаптивні реакції на стрес, можливо, які пов’язані з посиленням синаптичних зв’язків або гіпертрофією клітин [256]. Перевага внутрішньої зони у стресованих мишей в тесті відкритого поля може бути зумовлена асоціативним навчанням, тобто можливо миші асоціювали білі стінки зі стимуляціями струмом, оскільки інші візуальні стимули були відсутні. Візуальний сигнал міг сформувати у мишей перевагу до певних зон, що ілюструє роль контексту в пам’яті про страх [257]. Однак відсутність значних змін у руховій активності або кількості дефекацій в тесті відкритого поля свідчить про те, що стрес від стимуляцій електричним струмом не вплинув на загальну рухову активність і не викликав генералізованого страху в цих умовах. Це спостереження узгоджується з попередніми дослідженнями, які показали, що поведінкові та фізіологічні зміни викликані стресом не пов’язані з порушенням рухової активності [77,258].

Збільшення кількості еритроцитів (на 15-й день експерименту) у стресованих мишей може відображати фізіологічну реакцію на підвищені метаболічні потреби або стресовий еритропоез [238]. Компенсаторна реакція на стрес, ймовірно, зумовлена підвищеною активністю еритропоетину або підвищеною потребою в кисні [259]. Дійсно, стрес часто призводить до активації симпатичної нервової системи та вивільнення катехоламінів (наприклад, адреналіну), які можуть стимулювати еритропоез через еритропоетиновий шлях [230]. Однак відсутність змін гематокриту, гемоглобіну та кількості лейкоцитів свідчить про те, що ці зміни були специфічними для утворення еритроцитів, а не загального складу клітин крові. Крім того, незмінні гематокрит та рівень гемоглобіну разом із вищим рівнем еритроцитів можуть бути пов’язані з варіаціями розміру еритроцитів [137].

Вважається, що будь-який стрес збільшує утворення активних форм кисню, що супроводжується підвищенням інтенсивності оксидативного стресу в мозку, який може ще більше порушити ліпідний обмін [260,261]. Активні форми кисню можуть пошкоджувати ліпіди, білки та ДНК всередині клітини [262]. Раніше було виявлено, що удари електричним струмом викликають розвиток оксидативного стресу в мозку модельних гризунів залежно від інтенсивності та тривалості стресу [263,264]. Ми не спостерігали змін рівня пероксидів ліпідів, що є проміжними продуктами пероксидного окислення ліпідів, у різних частинах мозку мишей, які піддавалися електричним стимулам з можливістю уникнення. Це може бути пов'язано саме з тим, що тварини могли уникнути ударів електричного струму , вибираючи ізольовані стрижні, і тому не були пошкоджені стресогенним фактором, а натомість розвинули адаптивну резистентність. Відсутність значних змін гематологічних показників і прозапальних маркерів крові, зокрема МПО та ІЛ-1β, також може свідчити про стійкість до стресу в мишей, які зазнали впливу електричних стимулів. Водночас підвищений рівень пероксидів ліпідів у печінці свідчить про посилення оксидативного стресу в цьому органі, що може бути наслідком прямого впливу електричних стимулів. Це може також відображати спричинене стресом порушення функції мітохондрій. Пошкодження мітохондрій призводить до збільшення кількості пероксидів ліпідів як побічного продукту порушення окисного фосфорилювання [265].

У більшості експериментальних досліджень зазвичай використовувалася модель стресу, якого неможливо уникнути [266–268]. Однак декілька досліджень були спрямовані на вивчення впливу передбачуваного стресу для навчання можливості уникнення [269–271]. Наприклад, щурам, які піддавалися ударам електричного струму, які можна було припинити поворотом колеса (тобто у камері для тестування знаходилось колесо при повороті якого стимуляція струмом припинялась), а також проводили стимуляції яких можна було уникнути перейшовши у іншу частину камери для тестування [269]. Миші, піддані неконтрольованим стресовим факторам (наприклад, неминучим

електричним стимулам), демонстрували більший фізіологічний і психологічний дистрес, ніж гризуни, піддані контрольованим стресовим факторам [270,271]. Це свідчить про те, що сприйняття можливості контролювати стимули (уникати їх за певних умов) відіграє значну роль у сприйнятті стресу та його впливі на загальний стан здоров'я. Контрольований компонент стресу в парадигмі включає оперативне зумовлення для навчання реакції втечі [270]. Дійсно, під впливом стресу в наших умовах миші демонстрували високий рівень поведінки втечі від подразника. Серотонінергічна (5-НТ-ергічна) система бере участь у регуляції настрою та тривожності [272]. Неконтрольований стрес спричиняє більш виражену активацію 5-НТ-нейронів, ніж контрольований стрес [269]. Префронтальна кора головного мозку відіграє важливу роль у визначенні поведінкових наслідків контрольованого стресу [269].

5.3. Обмеження результатів досліджень

Хоча на цьому етапі дослідження ми отримали цінну інформацію про біохімічні та фізіологічні ефекти стресу, слід зазначити кілька обмежень. Ми створили узагальнену схему, яка демонструє потенційний зв'язок між спостережуваними ефектами біохімічних параметрів (позначених червоним шрифтом) та поведінковими проявами (Рис. 5.4.). Пропонована підсумкова діаграма включає етапи, які не були встановлені нашими даними й потребують подальшої перевірки за допомогою додаткових експериментів (позначені чорним шрифтом). Ми спостерігали збільшення маси гіпоталамусу у стресованих мишей, однак не проводили гістологічних або молекулярних аналізів для підтвердження структурних і клітинних змін. Майбутні дослідження з використанням гістологічних методів, таких як імуногістохімія нейрональних маркерів, а також молекулярна оцінка факторів, пов'язаних з нейропластичністю (наприклад, BDNF, синаптичні білки), дадуть більш глибоке розуміння індукованої стресом нейропластичності.

Стресове збільшення кількості еритроцитів варто підтвердити за допомогою проточної цитометрії, яка забезпечить більш детальний аналіз популяцій клітин крові. Визначення рівня еритропоетину допоможе визначити, чи є спостережувані гематологічні зміни наслідком посиленого еритропоезу, чи зміни обороту еритроцитів.

Незважаючи на ці обмеження, наші результати сприяють кращому розумінню стресових фізіологічних і біохімічних адаптацій до стресу та висвітлюють важливі напрямки для майбутніх досліджень.

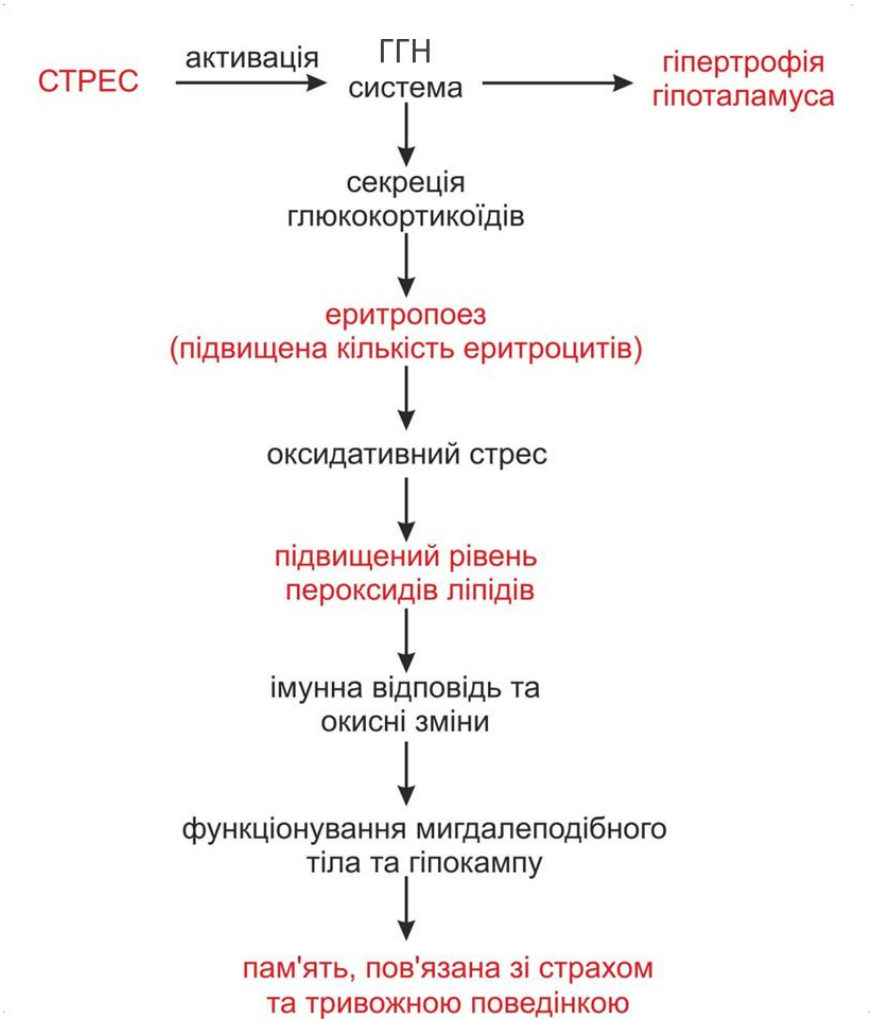

Рис. 5.4. Обмеження дослідження. На рисунку червоним кольором позначено елементи, які були досліджені у нашій роботі, а чорним кольором обмеження, які ще потребують підтвердження.

5.4. Підсумок

Це дослідження показує, що стимуляція електричним струмом викликає у самців мишей значні тривожні та пов’язані зі страхом поведінкові реакції, а також деякі метаболічні зміни. Зокрема, після впливу стресу спостерігалося збільшення маси гіпоталамусу, рівня пероксидів ліпідів у печінці та кількості еритроцитів у крові. Ці зміни можуть корелювати з зафіксованими в нашому дослідженні поведінковими проявами такими як посилена тривожність і підвищена збудливість у тесті піднесеного плюс лабіринту (Рис. 4).

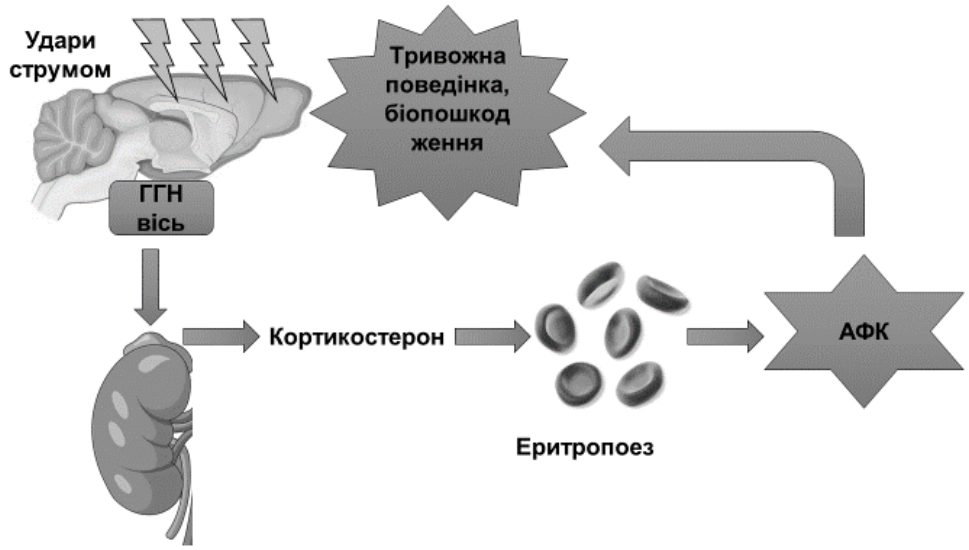

Рис. 5.5. Узагальнена схема залежних від віку та статі механізмів відповіді на одноразовий тривалий стрес у мишей

Збільшення маси гіпоталамусу може свідчити про пов’язану з регуляцією стресу нейропластичністю. Збільшення рівня пероксидів ліпідів у печінці може свідчити про розвиток оксидативного стресу. Специфічне збільшення кількості еритроцитів може бути результатом змін у кровотворенні, хоча загальні гематологічні показники залишаються незмінними. Попередні дані свідчать, що зміни в здатності крові переносити кисень можуть впливати на когнітивні функції й емоційну регуляцію [273]. Загалом, коли миші піддаються

електричним стимулам і мають можливість уникнути їх при повторному впливі, вони, очевидно, користуються цією нагодою. Це дозволяє їм уникнути серйозних метаболічних і запальних змін в організмі. Таким чином, наші експериментальні результати показують, що навіть коли миші здатні уникнути повторного травматичного стресу, вони розвивають страх перед самим стресом і симптоми тривоги. Очевидно, що сприйняття контролю, активація ГГН осі та метаболічні зміни в різних органах відіграють ключову роль у формуванні ефектів стресу, які можна подолати. Таким чином, мишача модель зі здатністю уникнути удару електричним струмом може бути використана для глибшого вивчення патофізіології страху перед травматичними або життєво небезпечними ризиками.

РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У проведених експериментах було застосовано низку моделей, що відтворюють основні патофізіологічні механізми посттравматичного стресового розладу (ПТСР): соціальну ізоляцію, знерухомлення, вплив звуку хижака, одноразовий тривалий стрес (ОТС) та стрес, спричинений стимуляцією електричним струмом, якого можна уникнути. Зазначені моделі охоплюють широкий спектр стресогенних чинників - від хронічних соціальних до гострих фізичних і психологічних, що дало змогу комплексно проаналізувати як спільні, так і специфічні реакції організму на травматичний вплив, а також статеві та вікові залежності цих реакцій.

Серед досліджених моделей ПТСР було виявлено як спільні закономірності, так і відмінності у поведінкових реакціях та біохімічних змінах у крові та корі головного мозку мишей.

Для всіх експериментальних груп оцінювали поведінку мишей у тесті відкритого поля. У самців, які зазнали знерухомлення, соціальної ізоляції або одноразового тривалого стресу, спостерігалося суттєве зменшення проведеного у центральній зоні арени часу, при незмінній загальній пройденій дистанції. Такий тип поведінки свідчить про підвищення тривожності без виражених порушень моторної активності.

У тварин, які зазнавали електричних ударів струмом у лапки (англ. footshock), показники у тесті відкритого поля істотно не відрізнялися від контролю, однак у піднесеному хрестоподібному лабіринті спостерігалося зменшення часу перебування у відкритих рукавах, що також свідчить про формування тривожної поведінки, оскільки миші хоч і бояться відкритих добре освітлених місць, проте мають від природи розвинуту дослідницьку поведінку. Отже, можна припустити, що всі досліджені моделі, за винятком впливу звуку хижака, викликали розвиток тривожних проявів у самців мишей, хоча ступінь вираженості відрізнявся залежно від типу стресора.

Таблиця 6.1.

Узагальнення змін показників у різних моделей викликання ПТСР

Модель ПТСР	Показник	Зміни	Інтерпретація
Знерухомлення	Тест Відкрите поле	Зменшення часу в центральній зоні	Тривожна поведінка
	Активність ПОН	Зменшення активності в плазмі крові	порушення антиоксидантного та детоксикаційного потенціалу організму
Звук хижака	Активність МПО	Зменшення активності в плазмі крові	Репресування імунної відповіді
	Активність ПОН	Зменшення активності в плазмі крові	порушення антиоксидантного та детоксикаційного потенціалу організму
Соціальна ізоляція	Тест Відкрите поле	Зменшення часу в центральній зоні	Тривожна поведінка
	Інтерлейкін 1β	Збільшення в плазмі крові	Запальні процеси
	Активність МПО	Зменшення активності в плазмі крові	Репресування імунної відповіді
	Активність ПОН	Зменшення активності в плазмі крові	порушення антиоксидантного та детоксикаційного потенціалу організму
Одноразовий тривалий стрес	Тест Відкрите поле	Зменшення часу в центральній зоні	Тривожна поведінка
	Рівень пероксидів ліпідів	Збільшення в проміжному мозку	Розвиток оксидативного стресу
Футшок	Тест піднятого плюс лабіринту	Зменшення кількості переходів у відкритий рукав	Тривожна поведінка

Рівень прозапального цитокіну ІЛ-1β був достовірно вищим у мишей, які перебували в умовах соціальної ізоляції, тоді як у решти груп його концентрація

суттєво не відрізнялася від контролю. Відомо, що розвиток ПТСР у людини супроводжується активацією запальних процесів, тому отримані результати свідчать, що гострі стресори (такі як знерухомлення чи короткочасний фізичний вплив) викликають менш виражену імунну відповідь порівняно з тривалим соціальним стресом.

У мишей, які зазнавали впливу звуку хижака або соціальної ізоляції, виявлено зниження активності мієлопероксидази, ферменту, що каталізує реакції знешкодження мікроорганізмів нейтрофілами та моноцитами. Поєднання підвищеного рівня ІЛ-1β зі зниженням активності мієлопероксидази може свідчити про пригнічення вродженого імунітету та компенсаторну активацію адаптивних імунних механізмів.

Крім того, у тварин, які піддавалися знерухомленню, дії звуку хижака чи соціальній ізоляції, спостерігалося зменшення активності параоксонази - важливого ферменту антиоксидантного захисту, що вказує на зниження загального редокс-потенціалу організму.

Аналіз рівнів пероксидів ліпідів у корі головного мозку мишей не виявив достовірних змін у жодній з моделей ПТСР, що свідчить про відсутність вираженого оксидативного пошкодження мембран у цій ділянці. Натомість у проміжному мозку тварин після одноразового тривалого стресу зафіксовано підвищений вміст продуктів пероксидації ліпідів, що може бути наслідком гострої активації асоційованих зі стресом структур (гіпоталамусу та прилеглих ядер).

У жодній з експериментальних моделей не виявлено достовірних змін активності основних антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД), каталази, глютатіон-S-трансферази та НАД(Ф)Н-хіноноксидоредуктази 1. Це свідчить про те, що за умов помірного або короткочасного стресу компенсаторні антиоксидантні системи мозку залишаються функціонально стабільними, тоді як основні зміни спостерігаються на системному (гуморальному) рівні.

Отримані результати засвідчують, що всі досліджувані моделі ПТСР спричиняють зміни поведінки, ознаки тривожності та порушення

гомеостатичних механізмів. Водночас тривалі соціальні стресори (зокрема соціальна ізоляція) викликають більш глибокі та стійкі імунно-запальні зміни, тоді як гострі фізичні впливи (знерухомлення, стимуляція електричним струмом) супроводжуються помірними короткочасними реакціями. Зниження активності параоксонази та мієлопероксидази у поєднанні з підвищенням ІЛ-1β свідчить про зрушення в напрямку про-запального та оксидативного дисбалансу, що може бути ключовою ланкою патогенезу ПТСР.

Таким чином, результати комплексно підтверджують, що соціальні та емоційні стресори чинять більш глибокий системний вплив, ніж фізичні, а хронічність впливу є визначальним чинником у розвитку поведінкових та біохімічних проявів, характерних для посттравматичного стресового розладу.

ВИСНОВКИ

Проведена комплексна перевірка експериментальних моделей ПТСР у мишей, що дозволило детально описати динаміку поведінкових, молекулярно-генетичних, метаболічних та імунологічних змін. Наслідки травматичного стресу мають системний характер і зберігаються на молекулярному рівні навіть після нівелювання видимих поведінкових симптомів.

1. Встановлено явище часової невідповідності між різними проявами стресу: тривожна поведінка у дорослих самців зникає протягом двох місяців, тоді як метаболічні зрушення у великих півкулях та крові тривають понад п'ять місяців. Виявлено, що природа стресору визначає шлях формування патології: звук хижака ініціює переважно лейкоцитарну реакцію, тоді як соціальна ізоляція активує прозапальну вісь через підвищення рівня цитокіну ІЛ-1β та посилення експресії гена-регулятора *FKBP5*.

2. Доведено, що розвиток симптомів ПТСР після одноразового тривалого стресу (ОТС) суттєво залежить від демографічного профілю: молоді особини схильні до тривожності, тоді як старі тварини обох статей демонструють когнітивні дефіцити (порушення пам'яті). Найбільш вразливою групою виявилися старі самки, у яких розвивається виражене системне запалення, пригнічення антиоксидантного захисту та імунна дисфункція, що вимагає специфічних підходів до діагностики.

3. Показано, що індивідуальна вразливість до стресу в моделі контрольованого електричного шоку тісно пов'язана з морфологічними та гематологічними змінами. Зокрема, виявлено пряму кореляцію між поведінковими показниками та масою гіпоталамусу, активністю мієлопероксидази та інтенсивністю еритропоезу. Це підтверджує ключову роль нейропластичності гіпоталамо-гіпофізарної системи у регуляції довготривалої відповіді на страх.

4. Ідентифікована роль глюкокортикоїдних та цАМФ-залежних сигнальних шляхів у підтримці посттравматичного стану. Через п'ять місяців після стресу спостерігається стійка надекспресія генів-регуляторів метаболізму та

синаптичної пластичності (*PPARGC1A, SGK1, SHANK1*). Це свідчить про глибоку перебудову енергетичного обміну та архітектури нейронних зв'язків у великих півкулях головного мозку.

5. Запропоновано використовувати рівень активності параоксонази в сироватці крові як додатковий діагностичний біомаркер ПТСР, оскільки її зниження є стабільним наслідком різних типів травми. Також задокументовано стійке пригнічення експресії генів, які відповідальні за деградацію стероїдних гормонів та імунний контроль, що вказує на хронічну дисфункцію ендокринної та захисної систем організму.

6. З’ясовано, що антиоксидантний захист головного мозку виявляє значну резистентність до травматичного стресу, тоді як периферійні тканини (зокрема печінка) значно чутливіші. Це обґрунтовує необхідність одночасного дослідження як центральних, так і системних біомаркерів для повної оцінки соматичного статусу при ПТСР.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

[1] G. Pinna, Biomarkers and treatments for mood disorders encompassing the neurosteroid and endocannabinoid systems, J Neuroendocrinology 35 (2023) e13226. https://doi.org/10.1111/jne.13226.

[2] L.J. Zass, S.A. Hart, S. Seedat, S.M.J. Hemmings, S. Malan-Müller, Neuroinflammatory genes associated with post-traumatic stress disorder: implications for comorbidity, Psychiatric Genetics 27 (2017) 1–16. https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000143.

[3] Z. Ben-Zion, N. Korem, N.B. Fine, S. Katz, M. Siddhanta, M.C. Funaro, O. Duek, T.R. Spiller, S.K. Danböck, I. Levy, I. Harpaz-Rotem, Structural Neuroimaging of Hippocampus and Amygdala Subregions in Posttraumatic Stress Disorder: A Scoping Review, Biological Psychiatry Global Open Science 4 (2024) 120–134. https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2023.07.001.

[4] M.S. Lapshin, M.V. Kondashevskaya, V.V. Epishev, N.A. Patochkina, Pathogenesis of Post-Traumatic Stress Disorder and Therapeutic Targets, Neurosci Behav Physi 53 (2023) 1072–1083. https://doi.org/10.1007/s11055-023-01501-w.

[5] L.L. Davis, M.B. Hamner, Post-traumatic stress disorder: the role of the amygdala and potential therapeutic interventions – a review, Front. Psychiatry 15 (2024) 1356563. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2024.1356563.

[6] G. Traina, J.A. Tuszynski, The Neurotransmission Basis of Post-Traumatic Stress Disorders by the Fear Conditioning Paradigm, IJMS 24 (2023) 16327. https://doi.org/10.3390/ijms242216327.

[7] R. Yehuda, J. LeDoux, Response Variation following Trauma: A Translational Neuroscience Approach to Understanding PTSD, Neuron 56 (2007) 19–32. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.006.

[8] R.K. Pitman, A.M. Rasmusson, K.C. Koenen, L.M. Shin, S.P. Orr, M.W. Gilbertson, M.R. Milad, I. Liberzon, Biological studies of post-traumatic stress disorder, Nat Rev Neurosci 13 (2012) 769–787. https://doi.org/10.1038/nrn3339.

[9] American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, American Psychiatric Association, 2013. https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.

[10] R.E. KENDELL, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd ed., revised (DSM-III-R), AJP 145 (1988) 1301–1302. https://doi.org/10.1176/ajp.145.10.1301.

[11] S.B. Guze, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. (DSM-IV), AJP 152 (1995) 1228–1228. https://doi.org/10.1176/ajp.152.8.1228.

[12] M.J. Friedman, Finalizing PTSD in DSM-5: Getting Here From There and Where to Go Next, JOURNAL OF TRAUMATIC STRESS 26 (2013) 548–556. https://doi.org/10.1002/jts.21840.

[13] H. Cohen, M.A. Matar, Z. Joseph, Animal models of post-traumatic stress disorder, Curr Protoc Neurosci Chapter 9 (2013) Unit 9.45. https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0945s64.

[14] P.R. Zoladz, D.M. Diamond, Current status on behavioral and biological markers of PTSD: a search for clarity in a conflicting literature, Neurosci Biobehav Rev 37 (2013) 860–895. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.03.024.

[15] R. Yehuda, S.M. Antelman, Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder, Biological Psychiatry 33 (1993) 479–486. https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90001-t.

[16] E.J. Nestler, S.E. Hyman, Animal models of neuropsychiatric disorders, Nat Neurosci 13 (2010) 1161–1169. https://doi.org/10.1038/nn.2647.

[17] J. LeDoux, Rethinking the Emotional Brain, Neuron 73 (2012) 653–676. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.004.

[18] S.A. Golden, H.E. Covington, O. Berton, S.J. Russo, A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice, Nat Protoc 6 (2011) 1183–1191. https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361.

[19] R. Adamec, D. Head, J. Blundell, P. Burton, O. Berton, Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: Sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience,

Physiology & Behavior 88 (2006) 12–29. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.005.

[20] F. Hollis, M. Kabbaj, Social defeat as an animal model for depression, ILAR J 55 (2014) 221–232. https://doi.org/10.1093/ilar/ilu002.

[21] R. Yehuda, C.W. Hoge, A.C. McFarlane, E. Vermetten, R.A. Lanius, C.M. Nievergelt, S.E. Hobfoll, K.C. Koenen, T.C. Neylan, S.E. Hyman, Post-traumatic stress disorder, Nat Rev Dis Primers 1 (2015) 15057. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.57.

[22] L.K. Fonken, M.G. Frank, A.D. Gaudet, H.M. D'Angelo, R.A. Daut, E.C. Hampson, M.T. Ayala, L.R. Watkins, S.F. Maier, Neuroinflammatory priming to stress is differentially regulated in male and female rats, Brain Behav Immun 70 (2018) 257–267. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.005.

[23] K.R. Mifsud, J.M.H.M. Reul, Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus, Proc Natl Acad Sci U S A 113 (2016) 11336–11341. https://doi.org/10.1073/pnas.1605246113.

[24] A.E. Hoban, R.M. Stilling, G. M Moloney, R.D. Moloney, F. Shanahan, T.G. Dinan, J.F. Cryan, G. Clarke, Microbial regulation of microRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex, Microbiome 5 (2017) 102. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0321-3.

[25] V.A. Balatskyi, T.R. Dmytriv, A. Divnych, V.I. Lushchak, Kefir enhances stress resilience and mitigates PTSD-related behavioral and hematological changes in mice, Front. Physiol. 16 (2025) 1682807. https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1682807.

[26] A.M. Stewart, A.V. Kalueff, Developing better and more valid animal models of brain disorders, Behav Brain Res 276 (2015) 28–31. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.12.024.

[27] A.J. Koh, Integrated Behavioral and Physiological Assessment of Anxiety-Like Behavior in Rodent Models, NHSJS (2025). https://nhsjs.com/2025/integrated-behavioral-and-physiological-assessment-of-anxiety-like-behavior-in-rodent-models/ (accessed December 22, 2025).

[28] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, Journal of Neuroscience Methods 14 (1985) 149–167. https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7.

[29] A.A. Walf, C.A. Frye, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, Nat Protoc 2 (2007) 322–328. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44.

[30] M.L. Seibenhener, M.C. Wooten, Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice, JoVE (2015) 52434. https://doi.org/10.3791/52434.

[31] D. Gromer, D.P. Kiser, P. Pauli, Thigmotaxis in a virtual human open field test, Sci Rep 11 (2021). https://doi.org/10.1038/s41598-021-85678-5.

[32] M. Bourin, M. Hascoët, The mouse light/dark box test, European Journal of Pharmacology 463 (2003) 55–65. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3.

[33] N. Kulesskaya, V. Voikar, Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light–dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure, Physiology & Behavior 133 (2014) 30–38. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.006.

[34] M. Takita, T. Taniguchi, J. Zhu, I. Muramatsu, Chronic Treatment with Prazosin Causes a Subtype-specific Increase in the α1-Adrenoceptor Density of the Stressed Rat Cerebral Cortex, Journal of Pharmacy and Pharmacology 49 (1997) 802–805. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06116.x.

[35] Q. Cai, B. Wang, M. Patel, S.M. Yang, B.H. Hu, RNAlater facilitates microdissection of sensory cell-enriched samples from the mouse cochlea for transcriptional analyses, Journal of Neuroscience Methods 219 (2013) 240–251. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.08.010.

[36] J. Goodman, C.K. McIntyre, Impaired Spatial Memory and Enhanced Habit Memory in a Rat Model of Post-traumatic Stress Disorder, Front. Pharmacol. 8 (2017). https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00663.

[37] M.Z. Othman, Z. Hassan, A.T. Che Has, Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory, Exp. Anim. 71 (2022) 264–280. https://doi.org/10.1538/expanim.21-0120.

[38] B. Echefu, M. Becker, D. Stein, A. Ornoy, Methods for Assessing Neurodevelopmental Disorders in Mice: A Critical Review of Behavioral Tests and Methodological Considerations Searching to Improve Reliability, NeuroSci 6 (2025) 27. https://doi.org/10.3390/neurosci6020027.

[39] K.S.V. Angu Bala Ganesh, A short review on behavioural assessment methods in rodents, Bioinformation 19 (2023) 866–870. https://doi.org/10.6026/97320630019866.

[40] C. Vinnakota, A. Schroeder, X. Du, K. Ikeda, S. Ide, M. Mishina, M. Hudson, N.C. Jones, S. Sundram, R.A. Hill, Understanding the role of the NMDA receptor subunit, GluN2D, in mediating NMDA receptor antagonist-induced behavioral disruptions in male and female mice, J of Neuroscience Research 102 (2024). https://doi.org/10.1002/jnr.25257.

[41] P. Willner, A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, R. Muscat, Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant, Psychopharmacology 93 (1987). https://doi.org/10.1007/bf00187257.

[42] M.-Y. Liu, C.-Y. Yin, L.-J. Zhu, X.-H. Zhu, C. Xu, C.-X. Luo, H. Chen, D.-Y. Zhu, Q.-G. Zhou, Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice, Nat Protoc 13 (2018) 1686–1698. https://doi.org/10.1038/s41596-018-0011-z.

[43] J.J. Buccafusco, ed., Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, 2nd ed., CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2009. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5228/ (accessed October 16, 2025).

[44] P. Curzon, N.R. Rustay, K.E. Browman, Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents, in: J.J. Buccafusco (Ed.), Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, 2nd ed., CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2009. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/ (accessed July 7, 2025).

[45] S. Maren, A. Holmes, Stress and Fear Extinction, Neuropsychopharmacol 41 (2016) 58–79. https://doi.org/10.1038/npp.2015.180.

[46] J.W. Rudy, N.C. Huff, P. Matus-Amat, Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model, Neurosci Biobehav Rev 28 (2004) 675–685. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.004.

[47] M.R. Milad, G.J. Quirk, Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress, Annu Rev Psychol 63 (2012) 129–151. https://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131631.

[48] A.E. Hoban, R.M. Stilling, G. Moloney, F. Shanahan, T.G. Dinan, G. Clarke, J.F. Cryan, The microbiome regulates amygdala-dependent fear recall, Mol Psychiatry 23 (2018) 1134–1144. https://doi.org/10.1038/mp.2017.100.

[49] A. Burokas, S. Arboleya, R.D. Moloney, V.L. Peterson, K. Murphy, G. Clarke, C. Stanton, T.G. Dinan, J.F. Cryan, Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice, Biol Psychiatry 82 (2017) 472–487. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.12.031.

[50] G.H. Gameiro, P.H. Gameiro, A. Da Silva Andrade, L.F. Pereira, M.T. Arthuri, F.K. Marcondes, M.C.F. De Arruda Veiga, Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress, Physiology & Behavior 87 (2006) 643–649. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.12.007.

[51] R. Mitra, S. Jadhav, B.S. McEwen, A. Vyas, S. Chattarji, Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (2005) 9371–9376. https://doi.org/10.1073/pnas.0504011102.

[52] R. Andero, S.P. Brothers, T. Jovanovic, Y.T. Chen, H. Salah-Uddin, M. Cameron, T.D. Bannister, L. Almli, J.S. Stevens, B. Bradley, E.B. Binder, C. Wahlestedt, K.J. Ressler, Amygdala-Dependent Fear Is Regulated by Oprl1 in Mice and Humans with PTSD, Sci. Transl. Med. 5 (2013). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005656.

[53] M.F. Herselman, L. Lin, S. Luo, A. Yamanaka, X.-F. Zhou, L. Bobrovskaya, Sex-Dependent Effects of Chronic Restraint Stress on Mood-Related Behaviours and Neurochemistry in Mice, IJMS 24 (2023) 10353. https://doi.org/10.3390/ijms241210353.

[54] F.A. Olave, F.I. Aguayo, L. Román-Albasini, W.A. Corrales, J.P. Silva, P.I. González, S. Lagos, M.A. García, M. Alarcón-Mardones, P.S. Rojas, X. Xu, J.A. Cidlowski, E. Aliaga, J. Fiedler, Chronic restraint stress produces sex-specific behavioral and molecular outcomes in the dorsal and ventral rat hippocampus, Neurobiology of Stress 17 (2022) 100440. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100440.

[55] S. Fuentes, J. Carrasco, A. Hatto, J. Navarro, A. Armario, M. Monsonet, J. Ortiz, R. Nadal, Sex-dependent impact of early-life stress and adult immobilization in the attribution of incentive salience in rats, PLoS ONE 13 (2018) e0190044. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190044.

[56] A. Armario, A. Vallès, S. Dal-Zotto, C. Márquez, X. Belda, A Single Exposure to Severe Stressors Causes Long-term Desensitisation of the Physiological Response to the Homotypic Stressor, Stress 7 (2004) 157–172. https://doi.org/10.1080/10253890400010721.

[57] A.M. Munhoz, E. Montag, E.G. Arruda, C. Aldrighi, R. Gemperli, J.M. Aldrighi, M.C. Ferreira, Critical Analysis of Reduction Mammaplasty Techniques in Combination with Conservative Breast Surgery for Early Breast Cancer Treatment, Plastic and Reconstructive Surgery 117 (2006) 1091–1103. https://doi.org/10.1097/01.prs.0000202121.84583.0d.

[58] M.A. Calcia, D.R. Bonsall, P.S. Bloomfield, S. Selvaraj, T. Barichello, O.D. Howes, Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness, Psychopharmacology 233 (2016) 1637–1650. https://doi.org/10.1007/s00213-016-4218-9.

[59] C. Nasca, D. Zelli, B. Bigio, S. Piccinin, S. Scaccianoce, R. Nisticò, B.S. McEwen, Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in

hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112 (2015) 14960–14965. https://doi.org/10.1073/pnas.1516016112.

[60] A. Verbitsky, D. Dopfel, N. Zhang, Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment, Transl Psychiatry 10 (2020) 132. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0806-x.

[61] R.E. Adamec, T. Shallow, Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat, Physiology & Behavior 54 (1993) 101–109. https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90050-p.

[62] V.P. Bakshi, K.M. Alsene, P.H. Roseboom, E.E. Connors, Enduring sensorimotor gating abnormalities following predator exposure or corticotropin-releasing factor in rats: A model for PTSD-like information-processing deficits?, Neuropharmacology 62 (2012) 737–748. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.040.

[63] H. Cohen, J. Zohar, M. Matar, The relevance of differential response to trauma in an animal model of posttraumatic stress disorder, Biological Psychiatry 53 (2003) 463–473. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01909-1.

[64] R. Mitra, R. Adamec, R. Sapolsky, Resilience against predator stress and dendritic morphology of amygdala neurons, Behavioural Brain Research 205 (2009) 535–543. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.08.014.

[65] P.R. Zoladz, C.D. Conrad, M. Fleshner, D.M. Diamond, Acute episodes of predator exposure in conjunction with chronic social instability as an animal model of post-traumatic stress disorder, Stress 11 (2008) 259–281. https://doi.org/10.1080/10253890701768613.

[66] P.R. Zoladz, M. Fleshner, D.M. Diamond, Psychosocial animal model of PTSD produces a long-lasting traumatic memory, an increase in general anxiety and PTSD-like glucocorticoid abnormalities, Psychoneuroendocrinology 37 (2012) 1531–1545. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.02.007.

[67] P.R. Zoladz, C.R. Park, M. Fleshner, D.M. Diamond, Psychosocial predator-based animal model of PTSD produces physiological and behavioral sequelae

and a traumatic memory four months following stress onset, Physiology & Behavior 147 (2015) 183–192. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.032.

[68] T.D. Geracioti, D.G. Baker, N.N. Ekhator, S.A. West, K.K. Hill, A.B. Bruce, D. Schmidt, B. Rounds-Kugler, R. Yehuda, P.E. Keck, J.W. Kasckow, CSF Norepinephrine Concentrations in Posttraumatic Stress Disorder, AJP 158 (2001) 1227–1230. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.8.1227.

[69] P.R. Zoladz, P.A. D'Alessio, S.L. Seeley, C.D. Kasler, C.S. Goodman, K.E. Mucher, A.S. Allison, I.F. Smith, J.L. Dodson, T.S. Stoops, B.R. Rorabaugh, A predator-based psychosocial stress animal model of PTSD in females: Influence of estrous phase and ovarian hormones, Hormones and Behavior 115 (2019) 104564. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.104564.

[70] C.A. Itoga, E.A. Roltsch Hellard, A.M. Whitaker, Y.-L. Lu, A.L. Schreiber, B.B. Baynes, B.A. Baiamonte, H.N. Richardson, N.W. Gilpin, Traumatic Stress Promotes Hyperalgesia via Corticotropin-Releasing Factor-1 Receptor (CRFR1) Signaling in Central Amygdala, Neuropsychopharmacol 41 (2016) 2463–2472. https://doi.org/10.1038/npp.2016.44.

[71] H. Cohen, J. Zohar, Y. Gidron, M.A. Matar, D. Belkind, U. Loewenthal, N. Kozlovsky, Z. Kaplan, Blunted HPA Axis Response to Stress Influences Susceptibility to Posttraumatic Stress Response in Rats, Biological Psychiatry 59 (2006) 1208–1218. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.12.003.

[72] Z. Liang, J. King, N. Zhang, Neuroplasticity to a single-episode traumatic stress revealed by resting-state fMRI in awake rats, NeuroImage 103 (2014) 485–491. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.08.050.

[73] A. Mazor, M.A. Matar, Z. Kaplan, N. Kozlovsky, J. Zohar, H. Cohen, Gender-related qualitative differences in baseline and post-stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behaviour patterns, The World Journal of Biological Psychiatry 10 (2009) 856–869. https://doi.org/10.1080/15622970701561383.

[74] J. Zohar, H. Yahalom, N. Kozlovsky, S. Cwikel-Hamzany, M.A. Matar, Z. Kaplan, R. Yehuda, H. Cohen, High dose hydrocortisone immediately after trauma

may alter the trajectory of PTSD: Interplay between clinical and animal studies, European Neuropsychopharmacology 21 (2011) 796–809. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.06.001.

[75] M. Aliczki, J. Haller, Electric Shock as Model of Post-traumatic Stress Disorder in Rodents, in: Comprehensive Guide to Post-Traumatic Stress Disorder, Springer, Cham, 2015: pp. 1–16. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08613-2_132-1.

[76] V. Rau, J.P. DeCola, M.S. Fanselow, Stress-induced enhancement of fear learning: An animal model of posttraumatic stress disorder, Neuroscience & Biobehavioral Reviews 29 (2005) 1207–1223. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.010.

[77] R.S. Pynoos, R.F. Ritzmann, A.M. Steinberg, A. Goenjian, I. Prisecaru, A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders, Biological Psychiatry 39 (1996) 129–134. https://doi.org/10.1016/0006-3223(95)00088-7.

[78] H. Nedelescu, C.M. Kelso, G. Lázaro-Muñoz, M. Purpura, C.K. Cain, J.E. Ledoux, C. Aoki, Endogenous GluR1-containing AMPA receptors translocate to asymmetric synapses in the lateral amygdala during the early phase of fear memory formation: An electron microscopic immunocytochemical study, J of Comparative Neurology 518 (2010) 4723–4739. https://doi.org/10.1002/cne.22472.

[79] G.W. Hubert, C. Li, D.G. Rainnie, E.C. Muly, Effects of stress on AMPA receptor distribution and function in the basolateral amygdala, Brain Struct Funct 219 (2014) 1169–1179. https://doi.org/10.1007/s00429-013-0557-z.

[80] B. Shultz, A. Farkash, B. Collins, N. Mohammadmirzaei, D. Knox, Fear learning-induced changes in AMPAR and NMDAR expression in the fear circuit, Learn. Mem. 29 (2022) 83–92. https://doi.org/10.1101/lm.053525.121.

[81] M. Zhao, W. Wang, Z. Jiang, Z. Zhu, D. Liu, F. Pan, Long-Term Effect of Post-traumatic Stress in Adolescence on Dendrite Development and H3K9me2/BDNF Expression in Male Rat Hippocampus and Prefrontal Cortex, Front Cell Dev Biol 8 (2020) 682. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00682.

[82] S.A. Maddox, G.E. Schafe, K.J. Ressler, Exploring epigenetic regulation of fear memory and biomarkers associated with post-traumatic stress disorder, Front Psychiatry 4 (2013) 62. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2013.00062.

[83] A.S. Zannas, T. Wiechmann, N.C. Gassen, E.B. Binder, Gene–Stress–Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications, Neuropsychopharmacol 41 (2016) 261–274. https://doi.org/10.1038/npp.2015.235.

[84] A.K. Rajbhandari, S.T. Gonzalez, M.S. Fanselow, Stress-Enhanced Fear Learning, a Robust Rodent Model of Post-Traumatic Stress Disorder, J Vis Exp (2018) 58306. https://doi.org/10.3791/58306.

[85] B.H. Harvey, C. Naciti, L. Brand, D.J. Stein, Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical 5HT1A/2A receptor changes evoked by a time-dependent sensitisation (TDS) stress model in rats, Brain Research 983 (2003) 97–107. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03033-6.

[86] I. Liberzon, M. Krstov, E.A. Young, Stress-restress: Effects on ACTH and fast feedback, Psychoneuroendocrinology 22 (1997) 443–453. https://doi.org/10.1016/s0306-4530(97)00044-9.

[87] S. Zheng, F. Han, Y. Shi, L. Wen, D. Han, Single-Prolonged-Stress-Induced Changes in Autophagy-Related Proteins Beclin-1, LC3, and p62 in the Medial Prefrontal Cortex of Rats with Post-traumatic Stress Disorder, J Mol Neurosci 62 (2017) 43–54. https://doi.org/10.1007/s12031-017-0909-x.

[88] D. Knox, S.A. George, C.J. Fitzpatrick, C.A. Rabinak, S. Maren, I. Liberzon, Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats, Learn. Mem. 19 (2012) 43–49. https://doi.org/10.1101/lm.024356.111.

[89] A. Imanaka, S. Morinobu, S. Toki, S. Yamawaki, Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors, Behavioural Brain Research 173 (2006) 129–137. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.012.

[90] S.M. Keller, W.B. Schreiber, J.M. Staib, D. Knox, Sex differences in the single prolonged stress model, Behavioural Brain Research 286 (2015) 29–32. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.034.

[91] T.M. Zer-Aviv, I. Akirav, Sex differences in hippocampal response to endocannabinoids after exposure to severe stress: Endocannabinoids, Stress, and Sex Differences, Hippocampus 26 (2016) 947–957. https://doi.org/10.1002/hipo.22577.

[92] T.M. Gruene, K. Flick, A. Stefano, S.D. Shea, R.M. Shansky, Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats, eLife 4 (2015). https://doi.org/10.7554/elife.11352.

[93] A.E. Pooley, R.C. Benjamin, S. Sreedhar, A.L. Eagle, A.J. Robison, M.S. Mazei-Robison, S.M. Breedlove, C.L. Jordan, Sex differences in the traumatic stress response: the role of adult gonadal hormones, Biol Sex Differ 9 (2018). https://doi.org/10.1186/s13293-018-0192-8.

[94] V. Michopoulos, A. Powers, C.F. Gillespie, K.J. Ressler, T. Jovanovic, Inflammation in Fear- and Anxiety-Based Disorders: PTSD, GAD, and Beyond, Neuropsychopharmacol 42 (2017) 254–270. https://doi.org/10.1038/npp.2016.146.

[95] Z. Wang, B. Caughron, M.R.I. Young, Posttraumatic Stress Disorder: An Immunological Disorder?, Front. Psychiatry 8 (2017). https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00222.

[96] J.M. Gill, L. Saligan, S. Woods, G. Page, PTSD is Associated With an Excess of Inflammatory Immune Activities, Perspectives in Psychiatric Care 45 (2009) 262–277. https://doi.org/10.1111/j.1744-6163.2009.00229.x.

[97] I.C. Passos, M.P. Vasconcelos-Moreno, L.G. Costa, M. Kunz, E. Brietzke, J. Quevedo, G. Salum, P.V. Magalhães, F. Kapczinski, M. Kauer-Sant'Anna, Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression, The Lancet Psychiatry 2 (2015) 1002–1012. https://doi.org/10.1016/s2215-0366(15)00309-0.

[98] J. Deslauriers, S.B. Powell, V.B. Risbrough, Immune signaling mechanisms of PTSD risk and symptom development: insights from animal models, Current Opinion in Behavioral Sciences 14 (2017) 123–132. https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.01.005.

[99] A.H. Miller, C.L. Raison, The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target, Nat Rev Immunol 16 (2016) 22–34. https://doi.org/10.1038/nri.2015.5.

[100] D.G. Baker, C.M. Nievergelt, D.T. O'Connor, Biomarkers of PTSD: Neuropeptides and immune signaling, Neuropharmacology 62 (2012) 663–673. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.02.027.

[101] M.W. Miller, N. Sadeh, Traumatic stress, oxidative stress and post-traumatic stress disorder: neurodegeneration and the accelerated-aging hypothesis, Mol Psychiatry 19 (2014) 1156–1162. https://doi.org/10.1038/mp.2014.111.

[102] M.W. Miller, A.P. Lin, E.J. Wolf, D.R. Miller, Oxidative Stress, Inflammation, and Neuroprogression in Chronic PTSD, Harv Rev Psychiatry 26 (2018) 57–69. https://doi.org/10.1097/HRP.0000000000000167.

[103] T.R. Dmytriv, S.A. Tsiumpala, H.M. Semchyshyn, K.B. Storey, V.I. Lushchak, Mitochondrial dysfunction as a possible trigger of neuroinflammation at post-traumatic stress disorder (PTSD), Front. Physiol. 14 (2023) 1222826. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1222826.

[104] O. Lushchak, M. Orru, O. Strilbytska, V. Berezovskyi, A. Cherkas, K.B. Storey, M. Bayliak, Metabolic and immune dysfunctions in post-traumatic stress disorder: what can we learn from animal models?, EXCLI J 22 (2023) 928–945. https://doi.org/10.17179/excli2023-6391.

[105] R. Petrovic, L. Puskas, G. Jevtic Dozudic, T. Stojkovic, M. Velimirovic, T. Nikolic, M. Zivkovic, D.J. Djorovic, M. Nenadovic, N. Petronijevic, NADPH oxidase and redox status in amygdala, hippocampus and cortex of male Wistar rats in an animal model of post-traumatic stress disorder, Stress 21 (2018) 494–502. https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1474874.

[106] C.B. Wilson, L.D. McLaughlin, A. Nair, P.J. Ebenezer, R. Dange, J. Francis, Inflammation and Oxidative Stress Are Elevated in the Brain, Blood, and Adrenal Glands during the Progression of Post-Traumatic Stress Disorder in a Predator Exposure Animal Model, PLoS ONE 8 (2013) e76146. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076146.

[107] H. Li, A.M. Tofigh, A. Amirfakhraei, X. Chen, M. Tajik, D. Xu, S. Motevalli, Modulation of astrocyte activity and improvement of oxidative stress through blockage of NO/NMDAR pathway improve posttraumatic stress disorder (PTSD)-like behavior induced by social isolation stress, Brain and Behavior 12 (2022) e2620. https://doi.org/10.1002/brb3.2620.

[108] E. Karanikas, D.I. Vlasidou, Psychologically traumatic stress inducing redox – inflammation interplay; which comes first?, Pharmacology Biochemistry and Behavior 209 (2021) 173254. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173254.

[109] S. Sandouka, T. Shekh-Ahmad, Induction of the Nrf2 Pathway by Sulforaphane Is Neuroprotective in a Rat Temporal Lobe Epilepsy Model, Antioxidants 10 (2021) 1702. https://doi.org/10.3390/antiox10111702.

[110] H.J. Merchant, C. Forteath, J.R. Gallagher, A.T. Dinkova-Kostova, M.L.J. Ashford, R.J. McCrimmon, A.D. McNeilly, Activation of the Nrf2 Pathway by Sulforaphane Improves Hypoglycaemia-Induced Cognitive Impairment in a Rodent Model of Type 1 Diabetes, Antioxidants 14 (2025) 308. https://doi.org/10.3390/antiox14030308.

[111] C. Zhou, F. Xue, S. Xue, H. Sang, L. Liu, Y. Wang, M. Cai, Z.-J. Zhang, Q. Tan, H. Wang, Z. Peng, Electroacupuncture Pretreatment Ameliorates PTSD-Like Behaviors in Rats by Enhancing Hippocampal Neurogenesis via the Keap1/Nrf2 Antioxidant Signaling Pathway, Front. Cell. Neurosci. 13 (2019). https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00275.

[112] L.E. Neilson, J.F. Quinn, N.E. Gray, Peripheral Blood NRF2 Expression as a Biomarker in Human Health and Disease, Antioxidants (Basel) 10 (2020) 28. https://doi.org/10.3390/antiox10010028.

[113] J. Zhang, W. Pan, Y. Zhang, M. Tan, Y. Yin, Y. Li, L. Zhang, L. Han, J. Bai, T. Jiang, H. Li, Comprehensive overview of Nrf2-related epigenetic regulations involved in ischemia-reperfusion injury, Theranostics 12 (2022) 6626–6645. https://doi.org/10.7150/thno.77243.

[114] F. Sivandzade, S. Prasad, A. Bhalerao, L. Cucullo, NRF2 and NF-κB interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms

and possible therapeutic approaches, Redox Biology 21 (2019) 101059. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.11.017.

[115] A.I. Rojo, M.R.D. Sagarra, A. Cuadrado, GSK-3β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress, Journal of Neurochemistry 105 (2008) 192–202. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05124.x.

[116] R. Bhandari, J. Kaur, S. Kaur, A. Kuhad, The Nrf2 pathway in psychiatric disorders: pathophysiological role and potential targeting, Expert Opinion on Therapeutic Targets 25 (2021) 115–139. https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1887141.

[117] V. Michopoulos, A. Vester, G. Neigh, Posttraumatic Stress Disorder: A Metabolic Disorder in Disguise?, Exp Neurol 284 (2016) 220–229. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.038.

[118] O.M. Farr, D.M. Sloan, T.M. Keane, C.S. Mantzoros, Stress- and PTSD-associated obesity and metabolic dysfunction: A growing problem requiring further research and novel treatments, Metabolism 63 (2014) 1463–1468. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.009.

[119] S. Ogawa, H. Hori, M. Niwa, M. Itoh, M. Lin, F. Yoshida, K. Ino, H. Kawanishi, M. Narita, W. Nakano, R. Imai, M. Matsui, T. Kamo, H. Kunugi, K. Hattori, Y. Kim, Serum lipid and plasma fatty acid profiles in PTSD patients and healthy individuals: Associations with symptoms, cognitive function, and inflammatory markers, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 138 (2025) 111298. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2025.111298.

[120] R. von Känel, S. Begré, C.C. Abbas, H. Saner, M.-L. Gander, J.-P. Schmid, Inflammatory biomarkers in patients with posttraumatic stress disorder caused by myocardial infarction and the role of depressive symptoms, Neuroimmunomodulation 17 (2010) 39–46. https://doi.org/10.1159/000243084.

[121] K. Bromis, M. Calem, A.A.T.S. Reinders, S.C.R. Williams, M.J. Kempton, Meta-Analysis of 89 Structural MRI Studies in Posttraumatic Stress

Disorder and Comparison With Major Depressive Disorder, Am J Psychiatry 175 (2018) 989–998. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.17111199.

[122] F. Ferreri, L.K. Lapp, C.-S. Peretti, Current research on cognitive aspects of anxiety disorders, Curr Opin Psychiatry 24 (2011) 49–54. https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32833f5585.

[123] J. Sareen, Posttraumatic Stress Disorder in Adults: Impact, Comorbidity, Risk Factors, and Treatment, Can J Psychiatry 59 (2014) 460–467. https://doi.org/10.1177/070674371405900902.

[124] G.-L. McLelland, V. Soubannier, C.X. Chen, H.M. McBride, E.A. Fon, Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control, EMBO J (2014) n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/embj.201385902.

[125] H. Kmita, G. Pinna, V.I. Lushchak, Potential oxidative stress related targets of mitochondria-focused therapy of PTSD, Front. Physiol. 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1266575.

[126] G. Vasam, R. Nadeau, V.J.J. Cadete, M. Lavallée-Adam, K.J. Menzies, Y. Burelle, Proteomics characterization of mitochondrial-derived vesicles under oxidative stress, The FASEB Journal 35 (2021) e21278. https://doi.org/10.1096/fj.202002151R.

[127] J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, The Journal of Physiology 552 (2003) 335–344. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478.

[128] M.J. Lisieski, A.L. Eagle, A.C. Conti, I. Liberzon, S.A. Perrine, Single-Prolonged Stress: A Review of Two Decades of Progress in a Rodent Model of Post-traumatic Stress Disorder, Front. Psychiatry 9 (2018) 196. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00196.

[129] M.M. Bayliak, M.V. Vatashchuk, D.V. Gospodaryov, V.V. Hurza, O.I. Demianchuk, M.V. Ivanochko, N.I. Burdyliuk, K.B. Storey, O. Lushchak, V.I. Lushchak, High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects, Biochimica

et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1866 (2022) 130226. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130226.

[130] A. Rodriguez, H. Zhang, J. Klaminder, T. Brodin, P.L. Andersson, M. Andersson, ToxTrac : A fast and robust software for tracking organisms, Methods Ecol Evol 9 (2018) 460–464. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12874.

[131] R. d'Isa, G. Comi, L. Leocani, Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze, Sci Rep 11 (2021) 21177. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00402-7.

[132] A.B. Wulff, P. Cooper, E. Kodjo, E. Abel, S.M. Thompson, How Sucrose Preference Is Gained and Lost: An In-Depth Analysis of Drinking Behavior during the Sucrose Preference Test in Mice, eNeuro 10 (2023) ENEURO.0195-23.2023. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0195-23.2023.

[133] L.M. Fomby, T.M. Wheat, D.E. Hatter, R.L. Tuttle, C.A. Black, Use of CO2/O2 anesthesia in the collection of samples for serum corticosterone analysis from Fischer 344 rats, Contemp Top Lab Anim Sci 43 (2004) 8–12.

[134] N. Chung, K. Lim, Influence of high fat and different types of carbohydrate diet on energy metabolism in growing mice, JENB 23 (2019) 1–12. https://doi.org/10.20463/jenb.2019.0017.

[135] O.M. Sorochynska, M.M. Bayliak, D.V. Gospodaryov, Y.V. Vasylyk, O.V. Kuzniak, T.M. Pankiv, O. Garaschuk, K.B. Storey, V.I. Lushchak, Every-Other-Day Feeding Decreases Glycolytic and Mitochondrial Energy-Producing Potentials in the Brain and Liver of Young Mice, Front. Physiol. 10 (2019). https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01432.

[136] B. Houwen, Blood film preparation and staining procedures, Clinics in Laboratory Medicine 22 (2002) 1–14. https://doi.org/10.1016/S0272-2712(03)00064-7.

[137] K.E. O'Connell, A.M. Mikkola, A.M. Stepanek, A. Vernet, C.D. Hall, C.C. Sun, E. Yildirim, J.F. Staropoli, J.T. Lee, D.E. Brown, Practical murine

hematopathology: a comparative review and implications for research, Comp Med 65 (2015) 96–113.

[138] B.J. Davis, DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS, Ann N Y Acad Sci 121 (1964) 404–427. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x.

[139] C. Beauchamp, I. Fridovich, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, Analytical Biochemistry 44 (1971) 276–287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8.

[140] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, Nat Methods 9 (2012) 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089.

[141] O. Demianchuk, M. Vatashchuk, D. Gospodaryov, V. Hurza, M. Ivanochko, V. Derkachov, V. Berezovskyi, O. Lushchak, K.B. Storey, M. Bayliak, V.I. Lushchak, High-fat high-fructose diet and alpha-ketoglutarate affect mouse behavior that is accompanied by changes in oxidative stress response and energy metabolism in the cerebral cortex, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1868 (2024) 130521. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130521.

[142] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry 72 (1976) 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[143] O.V. Lushchak, O.I. Kubrak, M.Z. Nykorak, K.B. Storey, V.I. Lushchak, The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione, Aquatic Toxicology 87 (2008) 108–114. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.007.

[144] M. Vatashchuk, V. Hurza, M. Bayliak, Adapting of Spectrophotometric Assay of Paraoxonase Activity with 4-Nitrophenylacetate for Murine Plasma and Liver, Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University 9 (2022) 6–14. https://doi.org/10.15330/jpnu.9.4.6-14.

[145] S.A. Rizo-Téllez, M. Sekheri, J.G. Filep, Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy, Antioxidants 11 (2022) 2302. https://doi.org/10.3390/antiox11112302.

[146] D. Aspesi, G. Pinna, Animal models of post-traumatic stress disorder and novel treatment targets, Behavioural Pharmacology 30 (2019) 130–150. https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000467.

[147] M. Zelikowsky, K. Ding, D.J. Anderson, Neuropeptidergic Control of an Internal Brain State Produced by Prolonged Social Isolation Stress, Cold Spring Harb Symp Quant Biol 83 (2018) 97–103. https://doi.org/10.1101/sqb.2018.83.038109.

[148] A. Locci, G. Pinna, Social isolation as a promising animal model of PTSD comorbid suicide: neurosteroids and cannabinoids as possible treatment options, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 92 (2019) 243–259. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.12.014.

[149] Y. Yao, S.E. Tsirka, Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood–brain barrier, Cell. Mol. Life Sci. 71 (2014) 683–697. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1459-1.

[150] R.L. Silva, A.H. Lopes, R.M. Guimarães, T.M. Cunha, CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization, Neurobiology of Disease 105 (2017) 109–116. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.001.

[151] K.V. Sawant, K.M. Sepuru, E. Lowry, B. Penaranda, C.W. Frevert, R.P. Garofalo, K. Rajarathnam, Neutrophil recruitment by chemokines Cxcl1/KC and Cxcl2/MIP2: Role of Cxcr2 activation and glycosaminoglycan interactions, Journal of Leukocyte Biology 109 (2021) 777–791. https://doi.org/10.1002/JLB.3A0820-207R.

[152] R. Dantzer, J.C. O'Connor, G.G. Freund, R.W. Johnson, K.W. Kelley, From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain, Nat Rev Neurosci 9 (2008) 46–56. https://doi.org/10.1038/nrn2297.

[153] M.S. Bridi, T. Abel, The NR4A orphan nuclear receptors mediate transcription-dependent hippocampal synaptic plasticity, Neurobiology of Learning and Memory 105 (2013) 151–158. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.020.

[154] D.W. Nebert, T.P. Dalton, The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis, Nat Rev Cancer 6 (2006) 947–960. https://doi.org/10.1038/nrc2015.

[155] M.X. Chen, Y.-S. Oh, Y. Kim, S100A10 and its binding partners in depression and antidepressant actions, Front. Mol. Neurosci. 15 (2022) 953066. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.953066.

[156] P.O. McGowan, A. Sasaki, A.C. D'Alessio, S. Dymov, B. Labonté, M. Szyf, G. Turecki, M.J. Meaney, Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse, Nat Neurosci 12 (2009) 342–348. https://doi.org/10.1038/nn.2270.

[157] M. Tang, Y. Liu, Z. Hu, H. Luo, S. Zhang, C. Shi, Y. Xu, Study insights in the role of PGC-1α in neurological diseases: mechanisms and therapeutic potential, Front. Aging Neurosci. 16 (2025) 1454735. https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1454735.

[158] C. Anacker, A. Cattaneo, K. Musaelyan, P.A. Zunszain, M. Horowitz, R. Molteni, A. Luoni, F. Calabrese, K. Tansey, M. Gennarelli, S. Thuret, J. Price, R. Uher, M.A. Riva, C.M. Pariante, Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110 (2013) 8708–8713. https://doi.org/10.1073/pnas.1300886110.

[159] P. Monteiro, G. Feng, SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder, Nat Rev Neurosci 18 (2017) 147–157. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183.

[160] E.B. Binder, The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders, Psychoneuroendocrinology 34 (2009) S186–S195. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.021.

[161] L. Iversen, Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology, British J Pharmacology 147 (2006). https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706428.

[162] J. Schöner, A. Heinz, M. Endres, K. Gertz, G. Kronenberg, Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models, J Cellular Molecular Medi 21 (2017) 2248–2256. https://doi.org/10.1111/jcmm.13161.

[163] B. Wang, X. Yang, J. Lu, M. Ntim, M. Xia, S. Kundu, R. Jiang, D. Chen, Y. Wang, J.-Y. Yang, S. Li, Two-hour acute restraint stress facilitates escape behavior and learning outcomes through the activation of the Cdk5/GR P S211 pathway in male mice, Experimental Neurology 354 (2022) 114023. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114023.

[164] C. Chen, Z. Zhong, Z. Xin, S. Zhang, C. Yu, A new stress model by predatory sound produces persistent anxiety-like behaviours in male SD rats but not ICR mice, Applied Animal Behaviour Science 220 (2019) 104843. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104843.

[165] A.C. Campos, F.R. Ferreira, W.A. Da Silva, F.S. Guimarães, Predator threat stress promotes long lasting anxiety-like behaviors and modulates synaptophysin and CB1 receptors expression in brain areas associated with PTSD symptoms, Neuroscience Letters 533 (2013) 34–38. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.11.016.

[166] Y.-P. Wu, H.-Y. Gao, S.-H. Ouyang, H. Kurihara, R.-R. He, Y.-F. Li, Predator stress-induced depression is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis in adult male mice, Neural Regen Res 14 (2019) 298. https://doi.org/10.4103/1673-5374.244792.

[167] A. Ieraci, A. Mallei, M. Popoli, Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice, Neural Plasticity 2016 (2016) 1–13. https://doi.org/10.1155/2016/6212983.

[168] M. Rojas-Carvajal, J.C. Brenes, Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats, Behavioural Processes 176 (2020) 104140. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104140.

[169] B. Xiong, Z. Zhong, C. Chen, H. Huang, J. Lin, Y. Xu, J. Yang, C. Yu, The anxiolytic effect of koumine on a predatory sound stress-induced anxiety model

and its associated molecular mechanisms, Phytomedicine 103 (2022) 154225. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154225.

[170] S.E. Grogans, E. Bliss-Moreau, K.A. Buss, L.A. Clark, A.S. Fox, D. Keltner, A.S. Cowen, J.J. Kim, P.A. Kragel, C. MacLeod, D. Mobbs, K. Naragon-Gainey, M.A. Fullana, A.J. Shackman, The nature and neurobiology of fear and anxiety: State of the science and opportunities for accelerating discovery, Neuroscience & Biobehavioral Reviews 151 (2023) 105237. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105237.

[171] K. Roelofs, M.A. Hagenaars, J. Stins, Facing Freeze: Social Threat Induces Bodily Freeze in Humans, Psychol Sci 21 (2010) 1575–1581. https://doi.org/10.1177/0956797610384746.

[172] K.N. Browning, R.A. Travagli, Central Nervous System Control of Gastrointestinal Motility and Secretion and Modulation of Gastrointestinal Functions, in: R. Terjung (Ed.), Comprehensive Physiology, 1st ed., Wiley, 2014: pp. 1339–1368. https://doi.org/10.1002/cphy.c130055.

[173] W. Chen, Z. Wang, C. Ma, X. Ma, W. Meng, F. Yin, Y. Yang, Tactile cues are important to environmental novelty during repeated open field tests, Behavioural Processes 204 (2023) 104796. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2022.104796.

[174] D.-H. Lee, J.-Y. Lee, D.-Y. Hong, E.-C. Lee, S.-W. Park, M.-R. Lee, J.-S. Oh, Neuroinflammation in Post-Traumatic Stress Disorder, Biomedicines 10 (2022) 953. https://doi.org/10.3390/biomedicines10050953.

[175] D. Lindqvist, S.H. Mellon, F.S. Dhabhar, R. Yehuda, S.M. Grenon, J.D. Flory, L.M. Bierer, D. Abu-Amara, M. Coy, I. Makotkine, V.I. Reus, K. Aschbacher, F.S. Bersani, C.R. Marmar, O.M. Wolkowitz, Increased circulating blood cell counts in combat-related PTSD: Associations with inflammation and PTSD severity, Psychiatry Research 258 (2017) 330–336. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.08.052.

[176] W.C. Liles, D.C. Dale, S.J. Klebanoff, Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils, Blood 86 (1995) 3181–3188.

[177] E. Stellacci, A. Di Noia, A. Di Baldassarre, G. Migliaccio, A. Battistini, A.R. Migliaccio, Interaction between the glucocorticoid and erythropoietin receptors in human erythroid cells, Experimental Hematology 37 (2009) 559–572. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.02.005.

[178] J.D. Bessman, Reticulocytes, in: H.K. Walker, W.D. Hall, J.W. Hurst (Eds.), Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations, 3rd ed., Butterworths, Boston, 1990. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK264/ (accessed June 23, 2025).

[179] A.J.M. Schreijer, P.H. Reitsma, S.C. Cannegieter, High hematocrit as a risk factor for venous thrombosis. Cause or innocent bystander?, Haematologica 95 (2010) 182–184. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.017285.

[180] S.A. Kinlein, D.J. Phillips, C.R. Keller, I.N. Karatsoreos, Role of corticosterone in altered neurobehavioral responses to acute stress in a model of compromised hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, Psychoneuroendocrinology 102 (2019) 248–255. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.12.010.

[181] S.L. Bowers, S.D. Bilbo, F.S. Dhabhar, R.J. Nelson, Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice, Brain, Behavior, and Immunity 22 (2008) 105–113. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.07.012.

[182] A.E. Belo-Silva, N.K. De Gusmão Taveiros Silva, P. Marianno, G. De Araújo Costa, V.P. Da Rovare, A. Bailey, C.D. Munhoz, L.S. Novaes, R. Camarini, Effects of the combination of chronic unpredictable stress and environmental enrichment on anxiety-like behavior assessed using the elevated plus maze in Swiss male mice: Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis-mediated mechanisms, Hormones and Behavior 162 (2024) 105538. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2024.105538.

[183] A.A. Khan, M.A. Alsahli, A.H. Rahmani, Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives, Medical Sciences 6 (2018) 33. https://doi.org/10.3390/medsci6020033.

[184] M.J. Davies, C.L. Hawkins, The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease, Antioxidants & Redox Signaling 32 (2020) 957–981. https://doi.org/10.1089/ars.2020.8030.

[185] S.E. Watling, S.G. Rhind, J. Warsh, D. Green, T. McCluskey, J. Tong, P. Truong, S. Chavez, J.D. Richardson, S.J. Kish, I. Boileau, Exploring brain glutathione and peripheral blood markers in posttraumatic stress disorder: a combined [1H]MRS and peripheral blood study, Front. Psychiatry 14 (2023) 1195012. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1195012.

[186] P.A. Dennis, C.S. Ulmer, P.S. Calhoun, A. Sherwood, L.L. Watkins, M.F. Dennis, J.C. Beckham, Behavioral health mediators of the link between posttraumatic stress disorder and dyslipidemia, Journal of Psychosomatic Research 77 (2014) 45–50. https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2014.05.001.

[187] V. Bharti, A. Bhardwaj, D.A. Elias, A.W.S. Metcalfe, J.S. Kim, A Systematic Review and Meta-Analysis of Lipid Signatures in Post-traumatic Stress Disorder, Front. Psychiatry 13 (2022) 847310. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.847310.

[188] N. Ahmadi, F. Hajsadeghi, H.B. Mirshkarlo, M. Budoff, R. Yehuda, R. Ebrahimi, Post-traumatic Stress Disorder, Coronary Atherosclerosis, and Mortality, The American Journal of Cardiology 108 (2011) 29–33. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.02.340.

[189] L. Thau, J. Gandhi, S. Sharma, Physiology, Cortisol, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2025. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538239/ (accessed June 23, 2025).

[190] S. Schumacher, H. Niemeyer, S. Engel, J.C. Cwik, S. Laufer, H. Klusmann, C. Knaevelsrud, HPA axis regulation in posttraumatic stress disorder: A meta-analysis focusing on potential moderators, Neuroscience & Biobehavioral Reviews 100 (2019) 35–57. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.02.005.

[191] C.C. Bortolasci, H.O. Vargas, A. Souza-Nogueira, D.S. Barbosa, E.G. Moreira, S.O.V. Nunes, M. Berk, S. Dodd, M. Maes, Lowered plasma paraoxonase (PON)1 activity is a trait marker of major depression and PON1 Q192R gene

polymorphism–smoking interactions differentially predict the odds of major depression and bipolar disorder, Journal of Affective Disorders 159 (2014) 23–30. https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.02.018.

[192] A. Atli, M. Bulut, Y. Bez, İ. Kaplan, P.G. Özdemir, C. Uysal, H. Selçuk, A. Sir, Altered lipid peroxidation markers are related to post-traumatic stress disorder (PTSD) and not trauma itself in earthquake survivors, Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 266 (2016) 329–336. https://doi.org/10.1007/s00406-015-0638-5.

[193] B. Mackness, P.N. Durrington, B. Abuashia, A.J. Boulton, M.I. Mackness, Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy, Clin Sci (Lond) 98 (2000) 355–363.

[194] N. Ponce-Ruiz, F.E. Murillo-González, A.E. Rojas-García, M. Mackness, Y.Y. Bernal-Hernández, B.S. Barrón-Vivanco, C.A. González-Arias, I.M. Medina-Díaz, Transcriptional regulation of human Paraoxonase 1 by nuclear receptors, Chemico-Biological Interactions 268 (2017) 77–84. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.005.

[195] L. Stejskalova, A. Rulcova, R. Vrzal, Z. Dvorak, P. Pavek, Dexamethasone accelerates degradation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and suppresses CYP1A1 induction in placental JEG-3 cell line, Toxicology Letters 223 (2013) 183–191. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.09.014.

[196] H.L. Jin, Y. Choi, K.W. Jeong, Crosstalk between Aryl Hydrocarbon Receptor and Glucocorticoid Receptor in Human Retinal Pigment Epithelial Cells, International Journal of Endocrinology 2017 (2017) 1–9. https://doi.org/10.1155/2017/5679517.

[197] M.A. Van Der Kooij, T. Jene, G. Treccani, I. Miederer, A. Hasch, N. Voelxen, S. Walenta, M.B. Müller, Chronic social stress-induced hyperglycemia in mice couples individual stress susceptibility to impaired spatial memory, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115 (2018). https://doi.org/10.1073/pnas.1804412115.

[198] S.-M. Lim, S.-H. Park, N. Sharma, S.-S. Kim, J.-R. Lee, J.-S. Jung, H.-W. Suh, Blood glucose regulation mechanism in depressive disorder animal model

during hyperglycemic states, Brain Research Bulletin 124 (2016) 116–122. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.014.

[199] J.D. Gray, J.F. Kogan, J. Marrocco, B.S. McEwen, Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain, Nat Rev Endocrinol 13 (2017) 661–673. https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97.

[200] D.A. Young, S.S. Inslicht, T.J. Metzler, T.C. Neylan, J.A. Ross, The effects of early trauma and the FKBP5 gene on PTSD and the HPA axis in a clinical sample of Gulf War veterans, Psychiatry Research 270 (2018) 961–966. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.03.037.

[201] L.R. Hinds, L.E. Chun, E.R. Woodruff, J.A. Christensen, M.J. Hartsock, R.L. Spencer, Dynamic glucocorticoid-dependent regulation of Sgk1 expression in oligodendrocytes of adult male rat brain by acute stress and time of day, PLoS ONE 12 (2017) e0175075. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175075.

[202] T.J. De Jesús, J.T. Centore, P. Ramakrishnan, Differential regulation of basal expression of inflammatory genes by NF-κB family subunits, Cell Mol Immunol 16 (2019) 720–723. https://doi.org/10.1038/s41423-019-0242-0.

[203] L. Zhang, X.-Z. Hu, X. Li, Z. Chen, D.M. Benedek, C.S. Fullerton, G. Wynn, Biomarker team, J.A. Naifeh, H. Wu, N. Benfer, T.H.H. Ng, P. Aliaga, H. Dinh, T.-C. Kao, R.J. Ursano, Potential chemokine biomarkers associated with PTSD onset, risk and resilience as well as stress responses in US military service members, Transl Psychiatry 10 (2020) 31. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0693-1.

[204] X. Pan, A.C. Kaminga, S. Wu Wen, A. Liu, Chemokines in post-traumatic stress disorder: A network meta-analysis, Brain, Behavior, and Immunity 92 (2021) 115–126. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.033.

[205] P. Kusumanchi, T. Liang, T. Zhang, R.A. Ross, S. Han, K. Chandler, A. Oshodi, Y. Jiang, A.L. Dent, N.J. Skill, N. Huda, J. Ma, Z. Yang, S. Liangpunsakul, Stress-Responsive Gene FK506-Binding Protein 51 Mediates Alcohol-Induced Liver Injury Through the Hippo Pathway and Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1 Signaling, Hepatology 74 (2021) 1234–1250. https://doi.org/10.1002/hep.31800.

[206] D.M. McMillan, R.F. Tyndale, CYP-mediated drug metabolism in the brain impacts drug response, Pharmacology & Therapeutics 184 (2018) 189–200. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.008.

[207] M. Mescher, T. Haarmann-Stemmann, Modulation of CYP1A1 metabolism: From adverse health effects to chemoprevention and therapeutic options, Pharmacology & Therapeutics 187 (2018) 71–87. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.012.

[208] K.-C. Wu, C.-J. Lin, The regulation of drug-metabolizing enzymes and membrane transporters by inflammation: Evidences in inflammatory diseases and age-related disorders, Journal of Food and Drug Analysis 27 (2019) 48–59. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.11.005.

[209] C. Guo, J. Xu, R. Liu, J.-Z. Wang, X. Wang, P3-208: PKA/CREB/SHANK1 DYSFUNCTION INDUCES COGNITIVE IMPAIRMENT IN SALT TREATED RATS, Alzheimer's & Dementia 15 (2019). https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.3238.

[210] S.E. Holmes, M.J. Girgenti, M.T. Davis, R.H. Pietrzak, N. DellaGioia, N. Nabulsi, D. Matuskey, S. Southwick, R.S. Duman, R.E. Carson, J.H. Krystal, I. Esterlis, the Traumatic Stress Brain Study Group, M. Friedman, N. Kowall, C. Brady, A. McKee, T. Stein, B. Huber, D. Kaloupek, V. Alvarez, D. Benedek, R. Ursano, D. Williamson, D. Cruz, K. Young, R. Duman, J. Krystal, D. Mash, M. Hardegree, G. Serlin, Altered metabotropic glutamate receptor 5 markers in PTSD: In vivo and postmortem evidence, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114 (2017) 8390–8395. https://doi.org/10.1073/pnas.1701749114.

[211] S. Berkel, A. Eltokhi, H. Fröhlich, D. Porras-Gonzalez, R. Rafiullah, R. Sprengel, G.A. Rappold, Sex Hormones Regulate SHANK Expression, Front. Mol. Neurosci. 11 (2018) 337. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00337.

[212] W.G. Jang, E.J. Kim, K.-G. Park, Y.B. Park, H.-S. Choi, H.-J. Kim, Y.D. Kim, K.-S. Kim, K.-U. Lee, I.-K. Lee, Glucocorticoid receptor mediated repression of human insulin gene expression is regulated by PGC-1α, Biochemical and Biophysical

Research Communications 352 (2007) 716–721. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.074.

[213] C. Mahony, C. O'Ryan, A molecular framework for autistic experiences: Mitochondrial allostatic load as a mediator between autism and psychopathology, Front. Psychiatry 13 (2022) 985713. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.985713.

[214] D.C. Souder, E.R. McGregor, J.P. Clark, T.W. Rhoads, T.J. Porter, K.W. Eliceiri, D.L. Moore, L. Puglielli, R.M. Anderson, Neuron-specific isoform of PGC-1α regulates neuronal metabolism and brain aging, Nat Commun 16 (2025) 2053. https://doi.org/10.1038/s41467-025-57363-y.

[215] O. Abu Shelbayeh, T. Arroum, S. Morris, K.B. Busch, PGC-1α Is a Master Regulator of Mitochondrial Lifecycle and ROS Stress Response, Antioxidants 12 (2023) 1075. https://doi.org/10.3390/antiox12051075.

[216] W. Gong, X. Li, Y. Feng, M. Ji, D. Zhang, B. Chen, S. Wang, X. Wu, L. Cui, B. Li, M. Xia, Novel pathogenesis of post-traumatic stress disorder studied in transgenic mice, Journal of Psychiatric Research 161 (2023) 188–198. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.02.042.

[217] A. Lotan, T. Lifschytz, G. Wolf, S. Keller, H. Ben-Ari, P. Tatarsky, N. Pillar, K. Oved, J. Sharabany, T.K. Merzel, T. Matsumoto, Y. Yamawaki, B. Mernick, E. Avidan, S. Yamawaki, A. Weller, N. Shomron, B. Lerer, Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates, Mol Psychiatry 23 (2018) 1432–1445. https://doi.org/10.1038/mp.2017.237.

[218] D.M. Magalhães, M. Mampay, A.M. Sebastião, G.K. Sheridan, C.A. Valente, Age-related impact of social isolation in mice: Young vs middle-aged, Neurochemistry International 174 (2024) 105678. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105678.

[219] D.G. Morgan, P.C. May, C.E. Finch, Dopamine and Serotonin Systems in Human and Rodent Brain: Effects of Age and Neurodegenerative Disease, J American Geriatrics Society 35 (1987) 334–345. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1987.tb04641.x.

[220] V.D. Petkov, V.V. Petkov, S.L. Stancheva, Age-Related Changes in Brain Neurotransmission, Gerontology 34 (1988) 14–21. https://doi.org/10.1159/000212925.

[221] B. Eppinger, D. Hämmerer, S. Li, Neuromodulation of reward-based learning and decision making in human aging, Annals of the New York Academy of Sciences 1235 (2011) 1–17. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06230.x.

[222] S. Scheggi, M.G. De Montis, C. Gambarana, Making Sense of Rodent Models of Anhedonia, International Journal of Neuropsychopharmacology 21 (2018) 1049–1065. https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy083.

[223] M.J. Primo, D. Fonseca-Rodrigues, A. Almeida, P.M. Teixeira, F. Pinto-Ribeiro, Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents, European Neuropsychopharmacology 77 (2023) 80–92. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2023.08.496.

[224] B.-K. Kim, J.-H. Seo, Treadmill exercise alleviates post-traumatic stress disorder-induced impairment of spatial learning memory in rats, J Exerc Rehabil 9 (2013) 413–419. https://doi.org/10.12965/jer.130058.

[225] J. Philbert, C. Belzung, G. Griebel, Long-lasting memory abnormalities following exposure to the mouse defense test battery: An animal model of PTSD, Physiology & Behavior 146 (2015) 67–72. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.039.

[226] T. Jelenik, M. Dille, S. Müller-Lühlhoff, D.G. Kabra, Z. Zhou, C. Binsch, S. Hartwig, S. Lehr, A. Chadt, E.M.J. Peters, J. Kruse, M. Roden, H. Al-Hasani, T.R. Castañeda, FGF21 regulates insulin sensitivity following long-term chronic stress, Molecular Metabolism 16 (2018) 126–138. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.06.012.

[227] Y.-C. Huang, P.-H. Ko, L.-L. Wu, Age-dependent effects of acute stress on the behavior, blood parameters, immunity, and enteric nerves of mice, Behavioural Brain Research 461 (2024) 114848. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2024.114848.

[228] A. Corker, M. Troncoso, M. Learmonth, P. Broughton, S.J. Sidles, R. Kelly, S. Dasgupta, T. Dempster, K. Vu, A. Hazzard, A. Van Laer, R.D. Penrod, J.A. Jones, A.D. Bradshaw, M.R. Zile, A.C. LaRue, K.Y. DeLeon-Pennell, Mouse model

of post-traumatic stress disorder negatively impacts cardiac homeostasis, Journal of Molecular and Cellular Cardiology 201 (2025) 32–43. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2025.01.011.

[229] C. Jern, H. Wadenvik, H. Mark, J. Hallgren, S. Jern, Haematological changes during acute mental stress, Br J Haematol 71 (1989) 153–156. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1989.tb06290.x.

[230] J.A. Munley, L.S. Kelly, A.M. Mohr, Adrenergic Modulation of Erythropoiesis After Trauma, Front. Physiol. 13 (2022) 859103. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.859103.

[231] B.A. Lever-van Milligen, N. Vogelzangs, J.H. Smit, B.W.J.H. Penninx, Hemoglobin levels in persons with depressive and/or anxiety disorders, Journal of Psychosomatic Research 76 (2014) 317–321. https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2014.01.004.

[232] J.D. Rodgers, G.H. Gass, The effect of age on serum proteins in mice, Experimental Gerontology 18 (1983) 39–45. https://doi.org/10.1016/0531-5565(83)90049-9.

[233] F. Van Hunsel, A. Van Gastel, H. Neels, A. Wauters, P. Demedts, K. Bruyland, I. Demeester, S. Scharpé, A. Janca, C. Song, M. Maes, The influence of psychological stress on total serum protein and patterns obtained in serum protein electrophoresis, Psychol. Med. 28 (1998) 301–309. https://doi.org/10.1017/S0033291797006351.

[234] S.A. Perrine, A.L. Eagle, S.A. George, K. Mulo, R.J. Kohler, J. Gerard, A. Harutyunyan, S.M. Hool, L.L. Susick, B.L. Schneider, F. Ghoddoussi, M.P. Galloway, I. Liberzon, A.C. Conti, Severe, multimodal stress exposure induces PTSD-like characteristics in a mouse model of single prolonged stress, Behavioural Brain Research 303 (2016) 228–237. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.056.

[235] K. Tanaka, T. Yagi, T. Nanba, M. Asanuma, Application of Single Prolonged Stress Induces Post-traumatic Stress Disorder-like Characteristics in Mice, (2018). https://doi.org/10.18926/AMO/56245.

[236] S. Lim, K. Song, C. Yoo, D. Woo, B. Choe, SU-F-I-68: Longitudinal Neurochemical Changes On Rat Prefrontal Cortex of Single Prolonged Stress Model by Using Proton Magnetic Resonance Spectroscopy at 9.4T, Medical Physics 43 (2016) 3402–3402. https://doi.org/10.1118/1.4955896.

[237] L. Ilg, C. Kirschbaum, S.-C. Li, F. Rosenlöcher, R. Miller, N. Alexander, Persistent Effects of Antenatal Synthetic Glucocorticoids on Endocrine Stress Reactivity From Childhood to Adolescence, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 104 (2019) 827–834. https://doi.org/10.1210/jc.2018-01566.

[238] B. Ruan, R.F. Paulson, Metabolic regulation of stress erythropoiesis, outstanding questions, and possible paradigms, Front. Physiol. 13 (2023) 1063294. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1063294.

[239] W.-J. You, Y. He, W.-Z. Liu, Y.-G. Zhu, P. Hu, B.-X. Pan, W.-H. Zhang, Exposure to single prolonged stress fails to induce anxiety-like behavior in mice, Stress and Brain 1 (2021) 145–159. https://doi.org/10.26599/SAB.2020.9060001.

[240] R.R. Souza, L.J. Noble, C.K. McIntyre, Using the Single Prolonged Stress Model to Examine the Pathophysiology of PTSD, Front. Pharmacol. 8 (2017) 615. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00615.

[241] S. Gong, Y.-L. Miao, G.-Z. Jiao, M.-J. Sun, H. Li, J. Lin, M.-J. Luo, J.-H. Tan, Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice, PLoS ONE 10 (2015) e0117503. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117503.

[242] A.M. Paul, S.D. Mhatre, E. Cekanaviciute, A.-S. Schreurs, C.G.T. Tahimic, R.K. Globus, S. Anand, B.E. Crucian, S. Bhattacharya, Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio: A Biomarker to Monitor the Immune Status of Astronauts, Front. Immunol. 11 (2020) 564950. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564950.

[243] A. Buonacera, B. Stancanelli, M. Colaci, L. Malatino, Neutrophil to Lymphocyte Ratio: An Emerging Marker of the Relationships between the Immune System and Diseases, IJMS 23 (2022) 3636. https://doi.org/10.3390/ijms23073636.

[244] N. Kothari, R.S. Keshari, J. Bogra, M. Kohli, H. Abbas, A. Malik, M. Dikshit, M.K. Barthwal, Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an

indicator of inflammation and onset of sepsis, Journal of Critical Care 26 (2011) 435.e1-435.e7. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.09.001.

[245] C.J. Barnum, T.W. Pace, F. Hu, G.N. Neigh, M.G. Tansey, Psychological stress in adolescent and adult mice increases neuroinflammation and attenuates the response to LPS challenge, J Neuroinflammation 9 (2012) 9. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-9.

[246] O. Rozenberg, Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice, Free Radical Biology and Medicine 34 (2003) 774–784. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01429-6.

[247] V.I. Lushchak, Classification of oxidative stress based on its intensity, EXCLI J 13 (2014) 922–937.

[248] V.I. Lushchak, K.B. Storey, Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications and regulatory pathways implicated, EXCLI Journal; 21:Doc956; ISSN 1611-2156 (2021). https://doi.org/10.17179/EXCLI2021-3596.

[249] J.W. Gawryluk, J.-F. Wang, A.C. Andreazza, L. Shao, L.N. Yatham, L.T. Young, Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia, Int. J. Neuropsychopharm. 14 (2011) 1069–1074. https://doi.org/10.1017/S1461145711000617.

[250] S.J. Glatt, D.S. Tylee, S.D. Chandler, J. Pazol, C.M. Nievergelt, C.H. Woelk, D.G. Baker, J.B. Lohr, W.S. Kremen, B.T. Litz, M.T. Tsuang, Marine Resiliency Study Investigators, Blood-based gene-expression predictors of PTSD risk and resilience among deployed marines: A pilot study, American J of Med Genetics Pt B 162 (2013) 313–326. https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32167.

[251] L. Iyadurai, R.M. Visser, A. Lau-Zhu, K. Porcheret, A. Horsch, E.A. Holmes, E.L. James, Intrusive memories of trauma: A target for research bridging cognitive science and its clinical application, Clinical Psychology Review 69 (2019) 67–82. https://doi.org/10.1016/j.cpr.2018.08.005.

[252] M. Alemany-González, M.E. Wokke, T. Chiba, T. Narumi, N. Kaneko, H. Yokoyama, K. Watanabe, K. Nakazawa, H. Imamizu, A. Koizumi, Fear in action:

Fear conditioning and alleviation through body movements, iScience 27 (2024) 109099. https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109099.

[253] M.H. Van Der Goot, M. Keijsper, A. Baars, L. Drost, J. Hendriks, S. Kirchhoff, J.G. Lozeman-van T Klooster, H.A. Van Lith, S.S. Arndt, Inter-individual variability in habituation of anxiety-related responses within three mouse inbred strains, Physiology & Behavior 239 (2021) 113503. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113503.

[254] O. Sturman, L. Von Ziegler, M. Privitera, R. Waag, S. Duss, Y. Vermeiren, L. Giovagnoli, P. De Deyn, J. Bohacek, Chronic adolescent stress increases exploratory behavior but does not appear to change the acute stress response in adult male C57BL/6 mice, Neurobiology of Stress 15 (2021) 100388. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100388.

[255] A.E. Belo-Silva, N.K. de G.T. Silva, P. Marianno, G.A. Costa, V.P. da Rovare, A. Bailey, C.D. Munhoz, L.S. Novaes, R. Camarini, Chronic Unpredictable Stress Precipitates Anxiety-Like Behavior in Environmental Enrichment Reared Mice Via a Hypothalamus-Pituitaryadrenal Axis-Mediated Mechanism, (2023). https://doi.org/10.2139/ssrn.4599032.

[256] J. Herman, J. Flak, R. Jankord, Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus, in: Progress in Brain Research, Elsevier, 2008: pp. 353–364. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00429-9.

[257] I. Liberzon, J.L. Abelson, Context Processing and the Neurobiology of Post-Traumatic Stress Disorder, Neuron 92 (2016) 14–30. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.039.

[258] L.-M. Zhang, J.-Z. Yao, Y. Li, K. Li, H.-X. Chen, Y.-Z. Zhang, Y.-F. Li, Anxiolytic Effects of Flavonoids in Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012 (2012) 1–10. https://doi.org/10.1155/2012/623753.

[259] Y. Zhang, L. Wang, S. Dey, M. Alnaeeli, S. Suresh, H. Rogers, R. Teng, C.T. Noguchi, Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and

metabolism, Int J Mol Sci 15 (2014) 10296–10333. https://doi.org/10.3390/ijms150610296.

[260] O. Garaschuk, H.M. Semchyshyn, V.I. Lushchak, Healthy brain aging: Interplay between reactive species, inflammation and energy supply, Ageing Research Reviews 43 (2018) 26–45. https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.02.003.

[261] J. De Munter, D. Pavlov, A. Gorlova, M. Sicker, A. Proshin, A.V. Kalueff, A. Svistunov, D. Kiselev, A. Nedorubov, S. Morozov, A. Umriukhin, K.-P. Lesch, T. Strekalova, C.A. Schroeter, Increased Oxidative Stress in the Prefrontal Cortex as a Shared Feature of Depressive- and PTSD-Like Syndromes: Effects of a Standardized Herbal Antioxidant, Front. Nutr. 8 (2021) 661455. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.661455.

[262] V.I. Lushchak, M. Duszenko, D.V. Gospodaryov, O. Garaschuk, Oxidative Stress and Energy Metabolism in the Brain: Midlife as a Turning Point, Antioxidants 10 (2021) 1715. https://doi.org/10.3390/antiox10111715.

[263] S. Gönenç, O. Açikgöz, B.M. Kayatekin, N. Uysal, M. Akhisaroglu, Effects of footshock stress on superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities and thiobarbituric acid reactive substances levels in the rat prefrontal cortex and striatum, Neuroscience Letters 289 (2000) 107–110. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01272-6.

[264] R. Nisar, Z. Batool, S. Haider, Electric foot-shock induces neurobehavioral aberrations due to imbalance in oxidative status, stress hormone, neurochemical profile, and irregular cortical-beta wave pattern in rats: A validated animal model of anxiety, Life Sciences 323 (2023) 121707. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121707.

[265] P.R. Angelova, N. Esteras, A.Y. Abramov, Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention, Medicinal Research Reviews 41 (2021) 770–784. https://doi.org/10.1002/med.21712.

[266] H.H. Van Dijken, J.A.M. Van Der Heyden, J. Mos, F.J.H. Tilders, Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioural changes in

male rats, Physiology & Behavior 51 (1992) 787–794. https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90117-K.

[267] A.I. Silva, V.A.D. Holanda, J.G. Azevedo Neto, E.D. Silva Junior, V.P. Soares-Rachetti, G. Calo, C. Ruzza, E.C. Gavioli, Blockade of NOP receptor modulates anxiety-related behaviors in mice exposed to inescapable stress, Psychopharmacology 237 (2020) 1633–1642. https://doi.org/10.1007/s00213-020-05487-y.

[268] S.J. Sidles, R.R. Kelly, K.D. Kelly, J.D. Hathaway-Schrader, S.K. Khoo, J.A. Jones, J.J. Cray, A.C. LaRue, Inescapable foot shock induces a PTSD-like phenotype and negatively impacts adult murine bone, Disease Models & Mechanisms 17 (2024) dmm050044. https://doi.org/10.1242/dmm.050044.

[269] J. Amat, M.V. Baratta, E. Paul, S.T. Bland, L.R. Watkins, S.F. Maier, Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus, Nat Neurosci 8 (2005) 365–371. https://doi.org/10.1038/nn1399.

[270] L. Yang, L.L. Wellman, M.A. Ambrozewicz, L.D. Sanford, Effects of Stressor Predictability and Controllability on Sleep, Temperature, and Fear Behavior in Mice, Sleep 34 (2011) 759–771. https://doi.org/10.5665/SLEEP.1044.

[271] M. Machida, L. Yang, L.L. Wellman, L.D. Sanford, Effects of Stressor Predictability on Escape Learning and Sleep in Mice, Sleep 36 (2013) 421–430. https://doi.org/10.5665/sleep.2464.

[272] R. Araki, A. Kita, Y. Ago, T. Yabe, Chronic social defeat stress induces anxiety-like behaviors via downregulation of serotonin transporter in the prefrontal serotonergic system in mice, Neurochemistry International 174 (2024) 105682. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105682.

[273] Q. Zhang, W.D. Haselden, S. Charpak, P.J. Drew, Could respiration-driven blood oxygen changes modulate neural activity?, Pflugers Arch - Eur J Physiol 475 (2023) 37–48. https://doi.org/10.1007/s00424-022-02721-8.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті у наукових журналах, що входять до науково-метричної бази даних Scopus:

1. Balatskyi V., Gospodaryov D., Abrat O., Strilbytska O., Demianchuk O., Tkachyk A., Vasylyshyn O., Lushchak O., Lushchak V.I., Bayliak M. Differential long-term effects of physical, social, and psychological stressors in male mice: down-regulation of inflammatory markers and unresponsiveness of the antioxidant system. Physiology & Behavior. 2025. № 301. 115065. Q2

DOI: https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2025.115065

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105013491606?origin=resultslist

2. Balatskyi V., Strilbytska O., Abrat O., Tkachyk A., Lylyk M., Lushchak V., Bayliak M. Behavioral and metabolic effects of escapable electric foot shock stress in male mice. BMC Research Notes. 2025. № 18(1). 127. Q3

DOI: https://doi.org/10.1186/s13104-025-07189-0

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105001325260?origin=resultslist

3. Balatskyi V.A., Dmytriv T.R., Divnych A., Lushchak V.I. Kefir enhances stress resilience and mitigates PTSD-related behavioral and hematological changes in mice. Frontiers in Physiology. 2025. № 16. 1682807. Q2

DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1682807

URL:https://www.scopus.com/pages/publications/105023698852?origin=resultslist

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

4. Балацький В., Байляк М., Господарьов Д., Лущак В. Довготривалі зміни в організмі мишей після викликання симптомів, схожих до ПТСР // XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 18–20 квітня 2024 р.). – Львів: Сполом, 2024. – С. 314–315.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024-2.pdf

5. Berezovskyi V., Balatskyi V., Demianchuk O. Influence of physical stressors on the levels of lipid peroxides // XX International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of Biology» (Lviv, April 18–20, 2024). – Lviv: Spolom, 2024. – P. 339–340.

URL: https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2024/04/Zbirnyk-Molod-i-postup-biolohii-2024-2.pdf

6. Балацький В.А., Лущак В.І., Байляк М.М., Господарьов Д.В. Довготривалі метаболічні зміни в організмі мишей після впливу різних травматичних стресів // XXII Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 75-річчю з дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава Степановича Федорука (м. Львів, 19–20 вересня 2024 р.). – Львів, 2024. – С. 131.

URL:https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2024/3/AB_2024_26_3_6_CYS.pdf

7. Балацький В.А., Лущак В.І., Байляк М.М. Розробка мишиної моделі для дослідження посттравматичного стресового розладу // XXI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (м. Львів, 2023 р.) // The Animal Biology. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 50.

URL:https://aminbiol.com.ua/images/Journal/2023/2/AB_2023_25_2_8_conference.pdf

8. Ткачик А., Балацький В., Байляк М. Взаємозв'язок між зміною поведінки та антиоксидантним статусом мозку мишей після одноразового тривалого стресу // VII Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (м. Дніпро, 3–4 жовтня 2024 р.) / за заг. ред. Г.О. Ушакової. – Дніпро: Ліра, 2024. – С. 37–39.

URL:https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2024/10/zbirnyk-Dnipro-3_4-Oct-2024.pdf

9. Василишин О., Абрат О., Балацький В., Байляк М. Параметри крові мишей з експериментально викликаними симптомами посттравматичного стресового розладу // VII Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології» (м. Дніпро, 3–4 жовтня 2024 р.) / за заг. ред. Г.О. Ушакової. – Дніпро: Ліра, 2024. – С. 41–43.

URL:https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/uploads/2024/10/zbirnyk-Dnipro-3_4-Oct-2024.pdf

10. Strilbytska O., Balatskyi V., Lushchak V., Gospodaryov D., Abrat O., Tkachyk A., Vasylyshyn O., Bayliak M. Stressor-dependent effects in a mouse model of post-traumatic stress disorder: down-regulation of immune response with minimal impact on the antioxidant system // FEBS Open Bio. – 2025. – Vol. 15, Suppl. 2. – P. 420 (Meeting Abstract P-41-002).

DOI: https://doi.org/10.1002/2211-5463.70071

URL: https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.70071

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на конференціях: XXI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 100-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора Василя Юхимовича Шавкуна (Львів, 2023), XXII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених присвяченої 75-річчю від дня народження доктора ветеринарних наук, професора, члена-кореспондента НААН Ростислава Федорука (Львів, 2024), XX міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2024), VII Міжнародній науковій конференції (Дніпро, 2025), XXI міжнародній

науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2025), щорічних звітних наукових конференціях Карпатського національного університету ім. Василя Стефаника.

Додаток Б

Міністерство освіти і науки України
Карпатський національний університет імені Василя Стефаника

вул. Шевченка, 57, м. Івано-Франківськ, 76018, тел. (0342) 75-23-51, факс (0342) 53-15-74
імейл office@cnu.edu.ua, сайт https://cnu.edu.ua, код ЄДРПОУ 02125266

24.12.2025 № 03.04-29/28 На № _____ від _____

Довідка
про впровадження результатів дисертаційного дослідження
Балацького Віталія Андрійовича на тему:
«Взаємозв'язок між оксидативним стресом і запаленням у мишачій моделі посттравматичного стресового розладу»
представленого на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 Біологія

Матеріали наукового дослідження Балацького Віталія Андрійовича впроваджені та використовуються в освітньому процесі кафедри біохімії та біотехнології факультету природничих наук Карпатського національного університету імені Василя Стефаника. Результати роботи використовуються для підготовки лекцій, лабораторних і практичних занять із загального курсу «Основи психофармакології» (результати досліджень включені в тему «Поведінкові тести на мишах» – 4 год лабораторних); «Молекулярна нейробіологія» (результати досліджень включені в тему «Модельні об'єкти для вивчення нервової системи та поведінки» – 2 год лекційних і 2 год практичних).

З огляду на високий науковий рівень дисертації Балацького В.А. й актуальність наукової проблематики роботи, стверджуємо про доцільність впровадження його результатів у практику закладів вищої освіти України.

Довідку про апробацію та впровадження результатів дослідження Балацького В.А. затверджено на засіданні кафедри біохімії та біотехнології (протокол №8 від 09 грудня 2025 року).

Проректор з науково-педагогічної роботи і міжнародної діяльності Лілія ТУРОВСЬКА

Завідувач кафедри біохімії та біотехнології Марія БАЙЛЯК