

*На правах рукописи*

**ФРЕЙМАН СОФЬЯ ВЛАДИМИРОВНА**

**НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СТРЕСС-РЕАЛИЗУЮЩИХ  
СИСТЕМ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫМ  
ПОВЕДЕНИЕМ: ТРАНСЛЯЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

03.03.01 – Физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2021

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук (ФГБУН ИВНД и НФ РАН) и Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева» Департамента здравоохранения города Москвы (ГБУЗ «НПЦ Психоневрологии им. З.П. Соловьева» ДЗМ).**

**Научный руководитель: Онуфриев Михаил Валериевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН.

**Официальные оппоненты:**

**Воронина Татьяна Александровна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБУН НИИ фармакологии им. В.В. Закусова.

**Рыбникова Елена Александровна**, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией регуляции функций нейронов мозга ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

**Ведущая организация: Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова**, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных.

**Защита состоится 17 февраля 2021 г., в 14.00 на заседании Диссертационного совета Д 002.044.02 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А.**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
д.б.н. Иерусалимский В.Н.



## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы и степень ее разработанности.** Стресс ассоциирован со многими хроническими заболеваниями, например, с аутоиммунными заболеваниями, астмой, диабетом, язвой желудка, атеросклерозом, с психическими заболеваниями. Увеличение риска развития ассоциированных со стрессом заболеваний может происходить в результате хронического стресса, а также вследствие изменения под действием аллостатической нагрузки в раннем онтогенезе систем, напрямую или опосредованно вовлеченных в реализацию стрессорного ответа. Изучение воздействия неонатального стресса на функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), систем нейротрофических факторов и провоспалительных цитокинов во взрослом возрасте особенно актуально для расстройств депрессивного спектра из-за отсутствия точного представления о механизмах развития этой группы заболеваний. Кроме того, актуальность изучения расстройств депрессивного спектра также обусловлена их социальной значимостью ввиду широкой распространенности и раннего возраста начала заболевания. По оценкам ВОЗ показатель DALY (годы жизни, скорректированные по нетрудоспособности) для расстройств депрессивного спектра за последнее десятилетие увеличился с 4,4% (по отчету ВОЗ за 2000 год) до 7,5% (по отчету ВОЗ за 2017 год). В настоящее время теория развития депрессии с наибольшей доказательной базой основана на дисфункции моноаминергических систем, и, соответственно, терапия включает ингибиторы обратного захвата серотонина, норадреналина, ингибиторы моноаминоксидазы. Тем не менее, проводимая терапия у 30% пациентов оказывается не эффективной, а устойчивой ремиссии не удается достичь в более чем 60% случаев (O'Reardon et al. 2000; Oquendo et al. 1999; Smith et al. 2002; Casacalenda et al. 2002; Thase et al. 2001). В связи с этим представляется крайне актуальным выяснение точных механизмов депрессивных нарушений для разработки более эффективных методов лечения и поиска новых фармакологических мишеней лечения.

**Цель исследования.** Целью данной работы является исследование функционального статуса стресс-реализующих систем при тревожном и депрессивно-подобном поведении у экспериментальных животных и пациентов с тревожно-депрессивной симптоматикой.

**Задачи исследования.** Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. сравнить классическую модель индукции депрессивно-подобного поведения – хронический непредсказуемый стресс (ХНС) и модель депрессивно-подобного поведения, вызванного неонатальным провоспалительным стрессом (НПС);
2. исследовать функциональное состояние ГГНС (кортикостерон), систем провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ ) и нейротрофинов (BDNF, NGF) в крови и отделах мозга крыс после НПС;
3. исследовать функциональное состояние ГГНС (кортикостерон), систем провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ ) и нейротрофинов (BDNF, NGF) в крови и отделах мозга крыс с тревожным и депрессивно-подобным поведением после НПС и субхронического стрессорного воздействия;
4. разработать психо-эмоциональный стресс-тест, исследовать функциональное состояние ГГНС (кортизол, АКТГ), систем провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ ) и нейротрофинов (BDNF) у пациентов с тревожно-депрессивной симптоматикой (ТДС) в исходном состоянии и после острого психо-эмоционального стрессорного воздействия.

**Научная новизна.** В настоящей работе мы, во-первых, охарактеризовали модель депрессии на взрослых крысах после НПС, индуцированного инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС) в неонатальном периоде, по уровню биохимических показателей трех стресс-реализующих систем в сыворотке крови и отделах мозга. Впервые показали нарушение функционирования ГГНС и системы нейротрофинов после НПС, что проявилось у этих животных во взрослом возрасте в повышении уровня кортикостерона в коре больших полушарий мозга (коре БП), а также в снижении уровня BDNF в крови и коре БП. Во-вторых, мы впервые выявили ряд изменений, проявляющихся у крыс после НПС в ответ на дополнительный стрессор в виде поведенческих тестов и соответствовавший по длительности субхроническому стрессу. У крыс после НПС на фоне появления тревожного и депрессивно-подобного поведения отсутствовало индуцируемое субхроническим стрессом повышение содержания кортикостерона в сыворотке крови и коре БП, выявляемое в контрольной группе. Кроме того, мы показали, что в результате субхронического стресса у крыс после НПС снижается содержание NGF в гиппокампе. Также были получены данные, указывающие на нарушения в функционировании системы провоспалительных цитокинов в мозге после субхронического стресса на уровне экспрессии мРНК гена ИЛ-6. Кроме того, в рамках данной работы мы экспериментально показали большую чувствительность теста на предпочтение раствора сахарозы по сравнению с тестом *вынужденного* плавания для подтверждения депрессивно-подобного поведения у крыс.

В клинической части работы нашей основной задачей было смоделировать стрессорную реакцию у пациентов с тревожно-депрессивной симптоматикой (ТДС) и исследовать ее по показателям в крови, что впервые было проделано для различных стресс-реализующих систем одновременно. В рамках данной работы мы разработали стрессогенный тест, причем ключевым фактором для подбора задач была максимально слабая психо-эмоциональная нагрузка, при которой индуцируются эффекты стресса. С использованием разработанного нами психо-эмоционального стресс-теста, мы показали, что из трех провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ ) только уровень ИЛ-6 увеличивается после умеренного психо-эмоционального стресса в крови у пациентов с ТДС и у здоровых испытуемых. Мы впервые продемонстрировали большую чувствительность к психо-эмоциональному стрессу людей с ТДС по уровню глюкозы в крови в сравнении со здоровыми испытуемыми.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость экспериментальной части данной работы заключается в расширении современных представлений о влиянии провоспалительной индукции в раннем постнатальном периоде на формирование тревожного и депрессивно-подобного поведения во взрослом возрасте. Показано, что подобные изменения в поведении, вызванные НПС, сопряжены с нарушениями в функционировании ГГНС, систем провоспалительных цитокинов и нейротрофических факторов.

Практическая значимость работы заключается в разработке простого и применимого для пациентов с ТДС стрессорного теста. В настоящее время в клинических условиях чувствительность к стрессогенным воздействиям оценивают по изменению содержания кортизола в крови или слюне. Тем не менее, другим потенциально стресс-чувствительным показателем является содержание глюкозы в крови. Таким образом, мы показали валидность применения простого и доступного маркера чувствительности к стрессорному воздействию у пациентов с ТДС, так как в условиях российских стационаров определение глюкозы в крови значительно более доступно, чем определение кортизола.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Неонатальный провоспалительный стресс вызывает появление тревожного и депрессивно-подобного поведения у взрослых крыс, которое сопровождается дисфункцией ГГНС и системы нейротрофических факторов, а также нарушением физиологической реакции на субхроническое стрессорное воздействие со стороны этих систем;

2. Тревожно-депрессивная симптоматика у людей сопровождается нарушением функционирования ГГНС и системы провоспалительных цитокинов, а также изменением реактивности в ответ на умеренное психо-эмоциональное стрессорное воздействие.
3. Общим для экспериментальной и клинической тревожно-депрессивной симптоматики является исходная дисфункция основной стресс-реализующей системы – ГГНС и, как следствие, нарушение физиологической реакции на стрессор.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов определяется значительным и достаточным для статистического анализа числом наблюдений, использованием в работе современных молекулярно-биохимических методов анализа, применением адекватных методов статистического анализа.

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на расширенном заседании лаборатории функциональной биохимии нервной системы, лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций и лаборатории молекулярной нейробиологии ФГБУН ИВНД и НФ РАН. Материалы диссертации были представлены на: на XIX и XX Школах-конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН, Москва, (27–28.10.2015, 31.10 – 1.11.2016).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации и международных журналах, индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

**Личный вклад автора.** Автор участвовала в разработке дизайна и протоколов исследования, постановке задач и обосновании выводов. Автор принимала участие в проведении поведенческого тестирования, подготовке биологического материала, анализе экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов в структурах мозга крыс, а также в сборе и оформлении клинических данных, проведении психо-эмоционального стресс-теста с испытуемыми клинической части работы. Самостоятельно был проведен биохимический и иммунохимический анализ структур мозга и сыворотки крови крыс. Самостоятельно проведены обработка и статистический анализ полученных данных.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 30 рисунками. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования, обсуждение результатов исследования, заключение и выводы, список сокращений, список литературы. Библиографический указатель содержит 9 отечественных и 293 зарубежных источников литературы.

## 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Моделирование депрессии.** В экспериментальной части нашей работы были использованы 113 крыс линии Wistar: 52 для моделирования депрессии с помощью хронического непредсказуемого стрессорного воздействия (ХНС) и 61 с использованием НПС.

**ХНС** (Рисунок 1). Перед началом эксперимента проводили двухдневный тест вынужденного плавания и тест на потребление раствора сахарозы (1.5%) и для дальнейшей работы отбирали животных со средним уровнем потребления раствора сахарозы. Далее животных делили случайным образом на группу ХНС и контрольную группу. Крыс группы ХНС помещали в индивидуальные полипропиленовые клетки и в течение 8 недель подвергали непредсказуемым стрессорным воздействиям (Stepanichev M., 2016). В конце 1-6 недели всех крыс тестировали на потребление раствора сахарозы. В конце 7-ой недели крыс тестировали на предпочтение раствора сахарозы в течение 1 часа, а в конце 8-ой недели - в течение 48 часов. Затем проводили двухдневный тест «вынужденное плавание» (точка «после ХНС»), после чего крыс выводили из эксперимента.



*Рисунок 1. Схема поведенческих тестов с животными для выявления депрессивно-подобного поведения, индуцированного ХНС.*

**НПС** (Рисунок 2). НПС вызывали двукратной инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС) в дозе 50 мкг/кг на 3 и 5 постнатальные дни. Контрольным животным вводили эквивалентный объем физиологического раствора. Через 30 дней после инъекций (*ювенильный* возраст) 19 животных тестировали на выявления тревожного и депрессивно-подобного поведения, до и после поведенческих тестов забирали кровь из хвостовой вены для биохимических исследований. Через 90 дней (*взрослые* животные) у половины из оставшихся крыс каждой группы тестировали поведение в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «выработка условно-рефлекторного

замирания», «предпочтение раствора сахарозы», «вынужденное плавание». То есть, взрослые животные каждой группы были разделены на 2 подгруппы (Таблица 1).

Таблица 1 - Список групп при моделировании и оценки тревожного и депрессивно-подобного поведения у крыс

Группа	Неонатальный период	Возраст 3 мес.
Контроль	Инъекция NaCl	Без поведения
НПС	Инъекция ЛПС	Без поведения
Контроль+стресс	Инъекция NaCl	Поведенческие тесты
НПС+стресс	Инъекция ЛПС	Поведенческие тесты

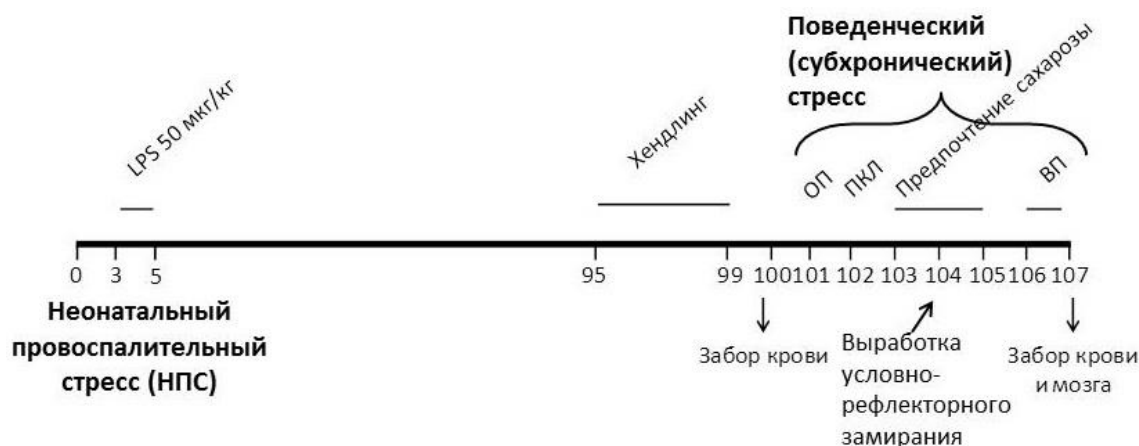


Рисунок 2. Схема манипуляций для формирования и оценки тревожного и депрессивно-подобного поведения у крыс в возрасте 3 месяца.

**Подготовка биоматериала.** После окончания второго этапа теста «вынужденное плавание» крыс декапитировали. Время между окончанием теста и декапитацией составляло 30-40 минут. После декапитации получали сыворотку крови и выделяли структуры мозга (кору больших полушарий (кора БП), фронтальную кору (ФК), гиппокамп) из каждого полушария отдельно. Выделенные структуры мозга гомогенизировали в 20 mM HEPES (pH 7,5), содержащем ингибиторы протеаз (по 10 мг/мл аprotинина, пепстатина А и 1 mM фенилметилсульфонилфторида), затем центрифугировали 30 мин при 13000g при 4°C для получения супернатанта.

**Биохимические и молекулярно-биологические методы исследования.** Содержание кортикостерона определяли в сыворотке крови и структурах мозга крыс с помощью коммерческих наборов для конкурентного иммуноферментного анализа (DRG, Германия). Глюкозу в плазме крови крыс определяли с помощью коммерческого реактива



«Glucose» (BioSystems, Испания). Нейротрофические факторы BDNF и NGF определяли в сыворотке крови (только BDNF) и структурах мозга крыс с помощью наборов для неконкурентного иммуноферментного анализа (Millipore, Германия). Содержание ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  в сыворотке крови и структурах мозга крыс определяли с помощью наборов для мультиплексного иммуноферментного анализа (Bio-Plex Pro Rar Cytokine Th1/Th2 Assay, Bio-Rad, США). Определение уровней экспрессии мРНК ИЛ1 $\beta$ , ИЛ6, ФНО $\alpha$  в структурах мозга крыс проводили с помощью ПЦР-анализа в реальном времени. Для расчетов использовали относительный количественный анализ экспрессии генов (RQ, ген сравнения – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза), праймеры синтезировали в НПО «Синтол» (Москва).

**Работа с людьми: критерии отбора в группы испытуемых.** В клинической части данной работы приняли участие пациенты психоневрологического стационара и здоровые добровольцы (Таблица 2). В группу испытуемых с тревожно-депрессивной симптоматикой (ТДС) вошли пациенты клинического стационара, с диагнозами по МКБ10 в рубриках F32.10, F32.11, F33.10, F33.11, F40.x-F45.x. Все манипуляции, связанные с настоящим исследованием проводили после получения информированного согласия от испытуемых.

Таблица 2 - Характеристики выборки клинической части работы

<b>Группа</b>	<b>Пол, количество м/ж</b>	<b>Средний возраст (СИ)</b>	<b>Средний балл по Шкале Гамильтона (95% СИ)</b>	<b>Средний балл по шкале Спилбергера- сумма субшкал (95%СИ)</b>
<b>Контроль</b>	<b>19/25</b>	<b>30 (28.9-32.3)</b>	<b>1.0 (0.6-1.5)</b>	<b>72.3 (67.7-76.9)</b>
<b>ТДС</b>	<b>30/44</b>	<b>31 (29.4-32.9)</b>	<b>17.4 (16.1-18.6)</b>	<b>106.9 (102.2-111.5)</b>

**Психо-эмоциональный стресс-тест.** Испытуемые проходили стресс-тест, дающий психо-эмоциональную нагрузку с умеренным стрессорным эффектом. В процедуре тестирования использовали черно-белые таблицы Шульте в условиях ограниченного времени и постоянной смены стимульного материала. Каждого испытуемого тестировали отдельно. Процедура стресс-теста занимала примерно 5 минут. Перед началом, а также через час после окончания стресс-теста у испытуемых забирали кровь из вены для клинического, биохимического и иммунохимических анализов (Рисунок 3).

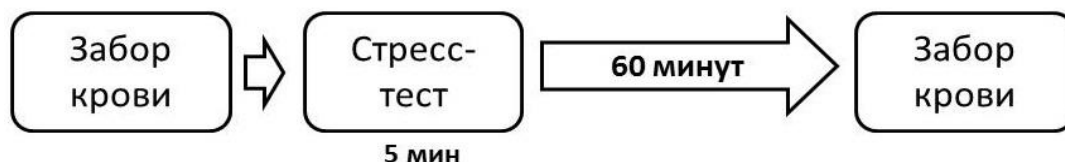


Рисунок 3. Схема забора крови у пациентов до и после стресс-теста.

**Биохимические методы анализа.** В рамках данной работы мы располагали данными стандартных клинического и биохимического анализов крови. Кроме того определяли содержание кортизола, АКТГ, провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$ , нейротрофина BDNF. Для определения этих показателей использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа содержания кортизола (BeckmanCoulter, США), АКТГ (Biomerica, Германия), BDNF(Millipore, Германия), цитокинов ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ФНО $\alpha$  (Вектор-Бест, Россия).

**Статистическая обработка данных.** Для оценки межгрупповых различий мы использовали тест Стьюдента при оценке показателей с нормально распределенными значениями или U-критерий Манна-Уитни, если данные не соответствовали нормальному распределению (проверку проводили по тесту Колмогорова-Смирнова). В экспериментальной части работы попарное сравнение групп по U-критерию Манна-Уитни проводили после подтверждения наличия различий в выборке с помощью теста Краскела-Уоллиса. В клинической части работы для оценки достоверности стресс-индуцированных изменений применяли t-тест для зависимых переменных. Для оценки динамики поведенческих показателей в эксперименте с ХНС использовали метод ANOVA repeated measures. На графиках в разделе «Результаты и обсуждения» представлены средние значения показателей по группам, в качестве ошибок на гистограммах отображена стандартная ошибка среднего (SEM). В заключение клинической части работы провели оценку каждого из исследованных показателей как потенциального маркера тревожно-депрессивной симптоматики с помощью множественной логистической регрессии.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Сравнение валидности тестов «вынужденное плавание» и «предпочтение раствора сахарозы» на модели депрессии, индуцированной ХНС.

Тест «вынужденное плавание» является одним из самых популярных тестов для выявления депрессивно-подобного поведения у крыс: повышенное время пассивного плавания на второй день трактуется как «поведение отчаяния» (Porsolt et al. 1976). Другой популярный тест для выявления депрессивно-подобного поведения у крыс – тест на предпочтение раствора сахарозы. Отсутствие предпочтения раствора сахарозы обычной

воде трактуется как ангедония (Willner et al. 1987; Papp et al. 1991). Для сравнения этих тестов, формирование депрессивно-подобного поведения проводили с помощью ХНС. Мы не выявили разницу во времени пассивного плавания между контрольными животными и животными после ХНС. Тем не менее, у крыс после ХНС время пассивного плавания было достоверно ниже, чем у тех же животных до ХНС (Рисунок 4А). В конце последней недели ХНС мы провели тест на предпочтение раствора сахарозы с длительной экспозицией раствора: крысы контрольной группы в большей степени предпочитают раствор сахарозы воде, чем животные группы ХНС (Рисунок 4Б).

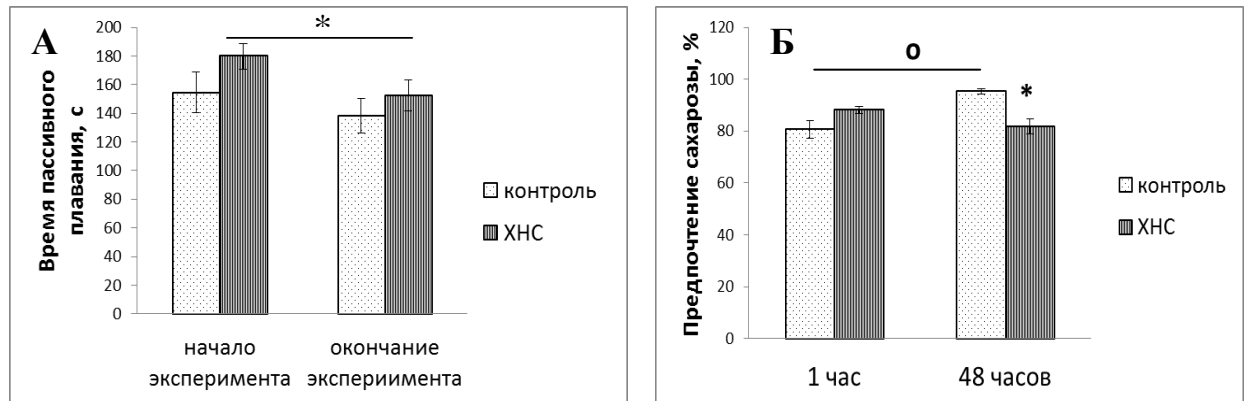


Рисунок 4. А - время пассивного плавания крыс в тесте "вынужденное плавание" до и после хронического непредсказуемого стресса (ХНС); Б - потребление раствора сахарозы в процентах от общего потребления жидкости. \* - различие между тестами для одних и тех же животных,  $p < 0,05$ , тест Вилкоксона для зависимых переменных; о – внутригрупповые различия между разными тестами на предпочтение раствора сахарозы,  $p < 0,05$ , U-тест Манна-Уитни.

Таким образом, сравнив поведенческие тесты «вынужденное плавание» и «предпочтение раствора сахарозы» на модели ХНС у крыс, мы обнаружили, что тест на предпочтение раствора сахарозы является более чувствительным и, возможно, более валидным для подтверждения формирования депрессивно-подобного поведения.

### 3.2. Формирование тревожного и депрессивно-подобного поведения у крыс после НПС

**Оценка тревожного и депрессивно-подобного поведения у крыс после НПС.** У ювенильных (1 мес) крыс после НПС детектировали тревожное поведение в тесте «открытое поле», но не в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», однако в тесте «вынужденное плавание» не выявили признаки депрессивно-подобного поведения. Взрослые (3 мес) крысы после НПС в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» больше времени проводили в закрытых рукавах; в тесте «открытое поле» - меньше времени проводили в центре; снижение предпочтения раствора сахарозы выявили у животных после НПС при тестировании после стрессорного воздействия; в тесте

«вынужденное плавание» взрослые крысы после НПС демонстрировали увеличение времени пассивного плавания. Таким образом, с помощью тестов «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «предпочтение раствора сахарозы» и «вынужденное плавание», мы выявили тревожные и депрессивно-подобные нарушения поведения у взрослых крыс после НПС, т.е. показали, что провоспалительный стресс, индуцированный двукратной внутрибрюшинной инъекцией ЛПС новорожденным крысятам, привел к формированию устойчивого тревожного и депрессивно-подобного поведения у взрослых животных.

**Влияние НПС на функциональное состояние ГГНС, систем провоспалительных цитокинов и нейротрофинов у взрослых крыс.** Функциональное состояние ГГНС, систем нейротрофических факторов и провоспалительных цитокинов, соответствующее исходному состоянию, определяли у групп животных, не проходивших тестирование поведения. Такие же показатели определяли у крыс после поведенческих тестов. Как известно, многие из использованных поведенческих тестов обладают в разной степени выраженным стрессорным эффектом, то есть группы животных, прошедшие эти тесты, суммарно были подвергнуты **субхроническому стрессу**.

У крыс после НПС детектировали повышенное содержание кортикостерона в сыворотке крови по сравнению с группой контроля (Рисунок 6). Повышенный уровень кортикостерона в крови взрослых животных, перенесших НПС, многократно показывали ранее: это связано с гиперфункцией надпочечников, так как у крыс после НПС повышена частота и амплитуда выбросов кортикостерона в кровь (Shanks et al. 2000). В настоящей работе мы впервые показали, что в исходном состоянии содержание кортикостерона у крыс после НПС повышено также в коре БП (Рисунок 6).

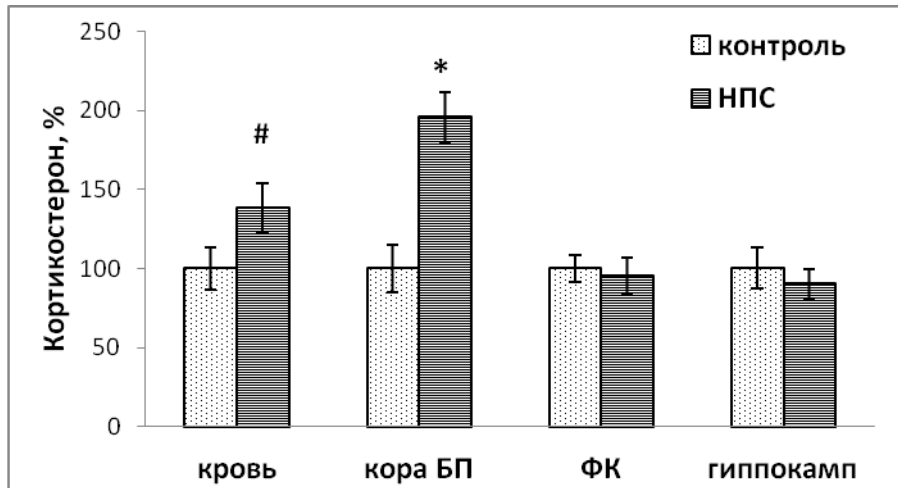


Рисунок 5. Содержание кортикостерона в сыворотке крови и структурах мозга взрослых крыс. \*, # отличие животных с НПС от контрольных, \*  $p=0,001$ , #  $p=0,08$  по U-критерию Манна-Уитни.

Нормальной реакцией на стрессор со стороны ГГНС является повышение уровня кортикостерона в крови. У крыс контрольной группы после субхронического стресса содержание кортикостерона в сыворотке крови повышено по сравнению с подгруппой крыс, у которых не тестировали поведение (Рисунок 7А). У крыс после НПС при изначально более высоком, чем у контрольных животных, уровне кортикостерона в сыворотке крови, отсутствовали различия в значениях этого показателя между подгруппами животных без тестирования и после тестирования поведения. Такой же результат получили при измерении уровня кортикостерона в коре БП у контрольных и экспериментальных животных (Рисунок 7Б).

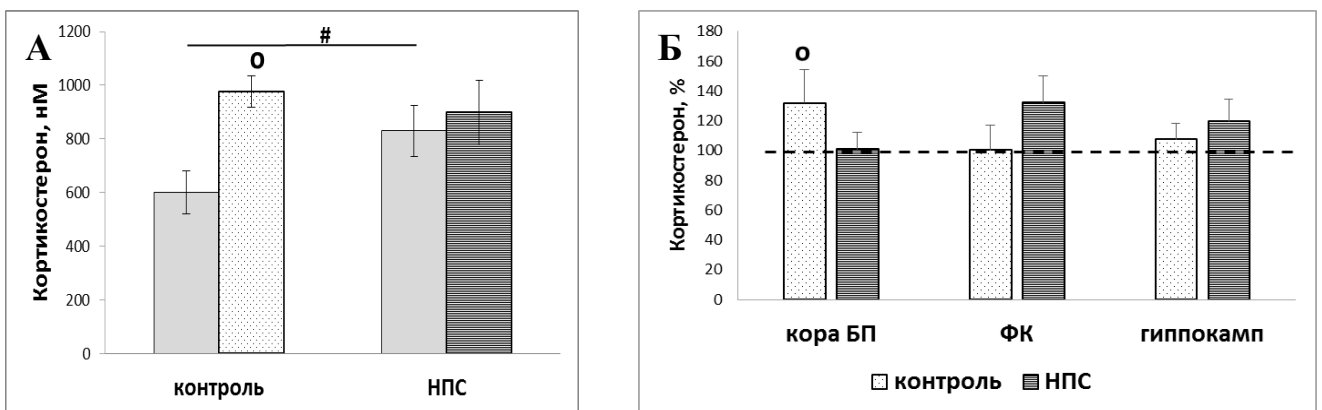


Рисунок 6. Содержание кортикостерона в сыворотке крови (А) и структурах мозга (Б) взрослых крыс, перенесших НПС и субхронический стресс. На рис. А серым цветом в обеих группах обозначены подгруппы животных, не проходивших тестирование поведения. На рис. Б данные представлены в процентном отношении к среднему уровню соответствующих подгрупп без тестирования поведения. <sup>o</sup> - различия между уровнем показателя у группы до и после стрессогенных тестов,  $p<0,005$  по U-критерию Манна-Уитни. # - отличие животных после НПС от контрольных,  $p=0,08$  по U-критерию Манна-Уитни.

Относительно характера нарушений функционирования ГГНС у взрослых крыс после НПС в литературе имеются противоречащие друг другу данные. Во многих работах показана гиперактивация ГГНС в ответ на острое стрессорное воздействие (Hodgson, Knott, and Walker 2001; Shanks et al. 2000; A. K. Walker, Nakamura, and Hodgson 2010). Некоторые авторы выявляют повышенный уровень кортикостерона в крови у крыс после НПС в исходном состоянии и гипоактивацию ГГНС в ответ психо-эмоциональное стрессорное воздействие разной модальности (Nilsson et al. 2002; Adam K. Walker et al. 2011). Мы не исследовали содержание кортикостерона в сыворотке крови в динамике после начала тестирования поведения. Тем не менее, полученный результат позволяет с уверенностью говорить о нарушении функционирования ГГНС как в исходном состоянии, так и в условиях субхронического стресса, причем данные нарушения проявляются на системном уровне и в ЦНС.

У взрослых крыс после НПС детектировали более низкий уровень BDNF в сыворотке крови и коре БП по сравнению с группой контроля (Рисунок 8). Уровень NGF в исследованных регионах мозга крыс после НПС не отличался от уровня этого нейротрофина у крыс контрольной группы. Понижение уровня BDNF хорошо укладывается в современные представления о патогенезе тревожно-депрессивных нарушений. Снижение уровня BDNF в крови выявляли у пациентов с клинической депрессией (Shimizu et al. 2003), а также в многочисленных моделях депрессии, включая материнскую депривацию в неонатальный период (Cirulli et al. 2009).

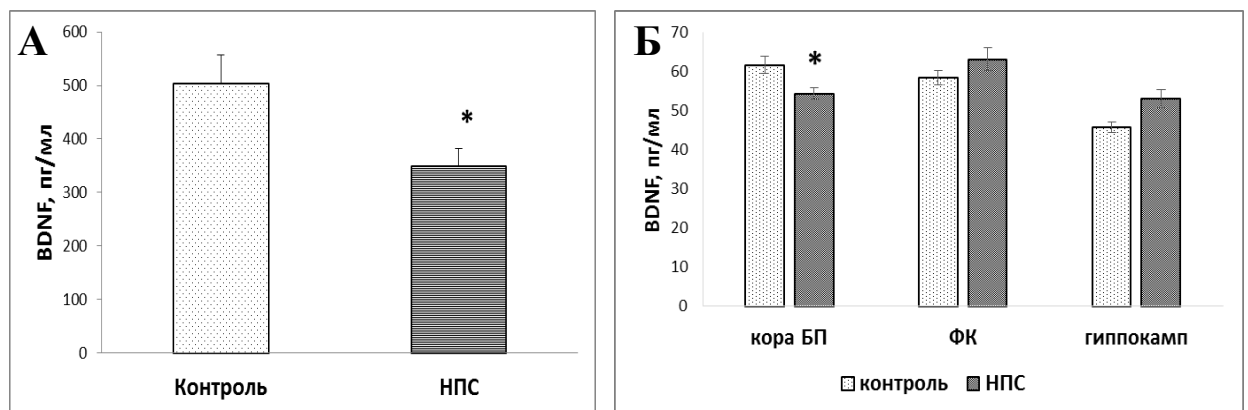


Рисунок 7. Содержание BDNF в сыворотке крови (А) и в структурах мозга (Б) взрослых крыс. \* отличие животных после НПС от контрольных,  $p < 0,01$  по U-критерию Манна-Уитни.

В сыворотке крови взрослых крыс не выявили различий в уровне BDNF между подгруппами без тестирования и после субхронического стресса. В структурах мозга содержание BDNF возросло в подгруппах крыс после тестирования поведения: в

контрольной группе уровень BDNF был выше во всех исследованных структурах мозга (статистически значимые различия в ФК и гиппокампе); в группе НПС уровень BDNF был повышен только в коре БП (Рисунок 9А). Содержания NGF в гиппокампе крыс после НПС было понижено в подгруппе после субхронического стресса (Рисунок 9Б).

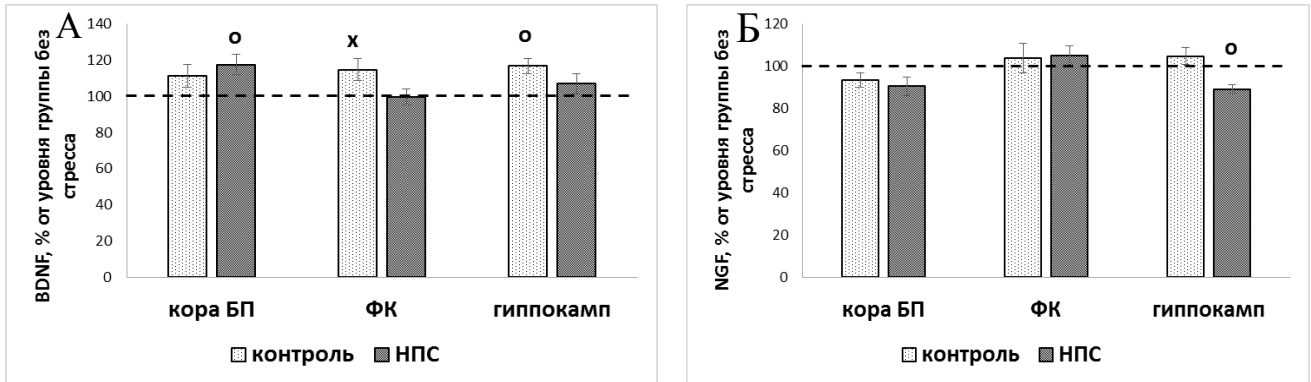


Рисунок 8. Содержание BDNF (А) и NGF (Б) в структурах мозга взрослых крыс после НПС и субхронического стресса. о, х - внутригрупповые различия между уровнем показателя до стрессогенных тестов и после них, о -  $p < 0,05$ , х -  $p < 0,1$  по U-критерию Манна-Уитни.

Показано, что стрессорное воздействие, провоспалительная индукция, повышенное содержание глюкокортикоидов вызывают снижение содержания BDNF и NGF в крови и ЦНС (Kuma et al. 2004; Manni et al. 1998; Murakami et al. 2005; Nowacka et al. 2015; Vaidya, Terwilliger, and Duman 1999). В частности, у крысят материнская депривация в неонатальный период сопровождается снижением содержания BDNF (Kuma et al. 2004; Roceri et al. 2004) и NGF (Manni et al. 1998) в коре БП и гиппокампе. Снижение уровня этих нейротрофинов приводит к апоптотической гибели нейронов и нарушению формирования нейрональных связей (Watanabe, Gould, and McEwen 1992). Если снижение содержания нейротрофических факторов происходит в критический для развития мозга период, оно может вызвать необратимые последствия и в конечном итоге привести к структурно-функциональным нарушениям. В нашем случае мы, по-видимому, имеем дело с последствиями такого воздействия: нервная система крыс после НПС не способна в полном объеме противостоять стрессу, что отражается в недостаточном биосинтезе BDNF структурами мозга.

Исходный уровень ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  в крови и структурах мозга был одинаковым у контрольных группы и группы НПС. После субхронического стресса содержание всех исследованных цитокинов в крови животных обеих групп возросло в равной степени. Тем не менее, у крыс после НПС выявили увеличение экспрессии мРНК ИЛ-6 во фронтальной коре после субхронического стресса. Этот результат указывает на

возможные нарушения в функционировании системы провоспалительных цитокинов в мозге крыс после НПС и субхронического стресса.

### **3.3. Функционально-биохимические нарушения у людей с ТДС в исходном состоянии и после стресса.**

В рамках этого исследования мы располагали данными клинического и биохимического анализов крови пациентов, а также проводили ИФА уровня кортизола, АКТГ, провоспалительных цитокинов и нейротрофина BDNF в крови. Состояние всех этих показателей при клинической депрессии подробно исследовано и опубликовано в многочисленных работах, наши данные полностью согласуются с данными литературы. В рамках нашего трансляционного исследования мы хотели максимально приблизить экспериментальные и клинические условия для сравнения полученных результатов. Очевидно, что воссоздать эффект субхронического стресса, которому подвергались крысы, у пациентов с тревожно-депрессивной симптоматикой не представляется возможным. В то же время наиболее релевантным типом стрессорного воздействия у людей в настоящий момент является психо-эмоциональное стрессорное воздействие. Хотя моделирование психо-эмоционального стрессорного воздействия на грызунах возможно (Гусакова, Городецкая, 2019), оно не достаточно охарактеризовано. Поэтому для клинической части работы мы выбрали умеренное психо-эмоциональное стрессорное воздействие, понимая, что полноценное сравнение реакции на стрессор различной длительности и модальности невозможно. Для всех показателей, которые мы исследовали в сыворотке крови людей в состоянии спокойного бодрствования, мы также анализировали стрессорную реакцию: повторный забор крови для анализа осуществляли через 60 минут после умеренного психо-эмоционального стрессорного воздействия (стресс-теста). Через час после стресс-теста уровень глюкозы был достоверно повышенным в группе пациентов с ТДС, в группе здоровых испытуемых статистически значимых изменений не выявили (Рисунок 10). По-видимому, повышенный уровень глюкозы в сыворотке крови испытуемых с ТДС отражает значительную активацию САС в ответ на психо-эмоциональное стрессорное воздействие. Причем такая же стрессорная нагрузка не вызвала значительного ответа со стороны САС здоровых добровольцев (отсутствие повышения глюкозы). Таким образом, мы показали, что испытуемые с ТДС обладают повышенной чувствительностью к психо-эмоциональному стрессу.



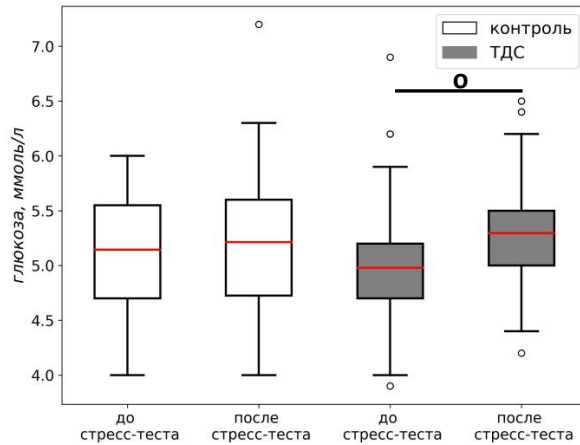


Рисунок 9. Содержание глюкозы в сыворотке крови до и после (через 1 ч) острого психо-эмоционального стрессорного воздействия у здоровых испытуемых и пациентов с ТДС. о – отличие пост-стрессорного уровня показателя от уровня до стресса.  $p=0,0001$  по  $t$ -тесту для зависимых переменных. Поперечной чертой обозначен средний уровень показателя, в качестве ошибок – разброс значений в выборках.

Повышение содержания кортизола (Sachar et al. 1973) и АКТГ (Mortola et al. 1987) в сыворотке крови при депрессии впервые было показано в 70-80-е годы прошлого века. Однако, в настоящее время нет однозначной позиции относительно нарушений стрессорной реакции при тревожно-депрессивных состояниях (Burke et al. 2005; Miller et al. 2005, Takahashi et al. 2005; Young et al. 2000). В нашем исследовании мы показали повышенное содержание кортизола и АКТГ у пациентов с ТДС в состоянии спокойного бодрствования. Оценить индуцируемые стрессом изменения содержания этих показателей в рамках нашего исследования не удалось по техническим причинам. Заборы крови проводили в утренние часы (в 8-9 утра), когда происходит наиболее резкое снижение изменения содержания данных гормонов в сыворотке крови. Соответственно, не было возможности разделить влияние стресса и циркадианные изменения.

Содержание нейротрофического фактора BDNF в сыворотке крови не различалось у пациентов с ТДС и здоровых испытуемых, также не различалась реакция на острый психо-эмоциональный стресс в этих группах по этому показателю (Рисунок 11). Содержание провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$  и ИЛ-6 в сыворотке крови было повышено у пациентов с ТДС, в то же время не выявили повышения содержания ИЛ-1 $\beta$ . Через час после стресс-теста содержание провоспалительного цитокина ИЛ-6 достоверно возросло в сыворотке крови пациентов с ТДС на 7% (Рисунок 11). У здоровых испытуемых содержание ИЛ-6 после стресс-теста также увеличилось (на 10%), тем не менее, больший разброс данных не позволяет подтвердить эти изменения статистически.

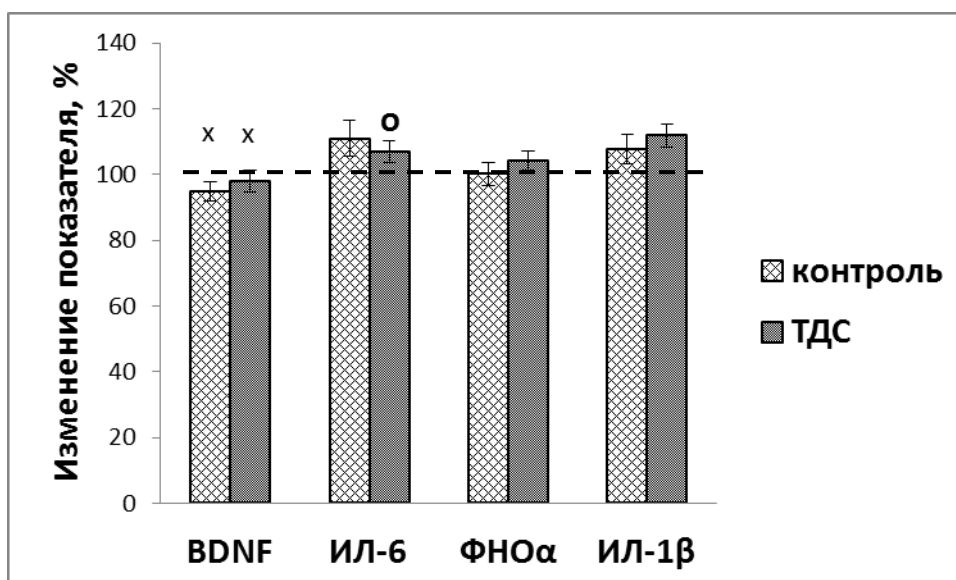


Рисунок 10. Изменение уровня BDNF и провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ФНОα, ИЛ-1β в сыворотке крови в процентах от уровня этих показателей до стресс-теста. Изменение показателя посчитано отдельно для каждого испытуемого, на рисунке представлены средние значения изменений по группам. **o**, **x** - отличие пост-стрессорного уровня показателя от уровня до стресса. **o** -  $p < 0,05$ , **x** -  $p < 0,1$  по t-тесту для зависимых переменных.

Повышение уровня провоспалительных маркеров при расстройствах тревожно-депрессивного спектра было неоднократно показано ранее (Hoge et al. 2009; Miller et al. 2005; O'Brien, Scott, and Dinan 2004). Уровень циркулирующих в крови провоспалительных цитокинов коррелирует с тяжестью и длительностью заболевания (Anisman and Merali 2002). Острое психо-эмоциональное стрессорное воздействие может вызывать увеличение содержания ИЛ-6 в крови у здоровых испытуемых через 75 минут после окончания стрессорной нагрузки (Brydon et al. 2004). Miller et al. (2005) не выявили изменений циркулирующих уровней ИЛ-6 и ФНОα после психо-эмоционального стрессорного воздействия ни у здоровых испытуемых, ни у людей с тревожно-депрессивной симптоматикой. Тем не менее, в этом исследовании продукция провоспалительных цитокинов клетками иммунной системы достоверно возросла после стрессорного воздействия – равнозначно в обеих группах. В исследовании на людях без психических расстройств продемонстрировали увеличение содержания ИЛ-6 в сыворотке крови после психо-эмоционального стрессорного воздействия у испытуемых с трудным детством (Carpenter et al. 2010). То есть, возможно, ключевую роль в нарушении функционирования системы провоспалительных цитокинов играет аллостатическое изменение этой системы в детском возрасте, но не связанное напрямую с тревожно-депрессивным состоянием во взрослом организме.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование функциональных нарушений ГГНС, системы провоспалительных цитокинов и нейротрофических факторов у взрослых крыс, перенесших НПС. Осуществлено трансляционное сопоставление функционального состояния этих систем при тревожно-депрессивных патологиях у людей и на модели депрессии на животных. НПС вызывает функциональные и биохимические нарушения у взрослых животных, что выражается в возникновении тревожного и депрессивно-подобного поведения, нарушением работы ГГНС, систем нейротрофических факторов и провоспалительных цитокинов. Некоторые нарушения в исследованных системах выявляются в исходном состоянии, а другие только при реализации стрессорного ответа. Исходный функциональный статус ГГНС и системы нейротрофинов у крыс после НПС характеризуется повышенным содержанием кортикостерона и пониженным уровнем BDNF в сыворотке крови и коре БП. Использование субхронического стресса позволило выявить наиболее значимое последствие НПС у взрослых крыс - нарушение физиологической реакции на стресс, проявившееся в отсутствии повышения уровня кортикостерона в сыворотке крови и коре БП, а также специфические изменения содержания BDNF и NGF в стресс-чувствительных регионах мозга и нарушение экспрессии мРНК ИЛ-6 в гиппокампе крыс после НПС.

У людей тревожно-депрессивная симптоматика также сопровождается нарушением состояния стресс-реализующих систем как на исходном уровне, так и после стресса. У пациентов с ТДС детектировали исходное нарушение функционирования ГГНС (повышенный уровень кортикостерона и АКТГ), системы провоспалительных цитокинов (повышенный уровень ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ ). Стресс-индуцируемых изменений по уровню ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в крови не наблюдали ни в контрольной группе, ни у пациентов с ТДС, а содержание ИЛ-6 в сыворотке крови увеличилось в обеих группах. Циркадианные изменения уровня кортизола и АКТГ не позволили выявить нарушение стрессорного ответа со стороны ГГНС у пациентов с ТДС. Тем не менее, мы показали высокую репрезентативность для выявления тревожно-депрессивных нарушений по стресс-индуцированному изменению содержания глюкозы в крови.

Таким образом, несмотря на различную этиологию возникновения тревожно-депрессивного состояния у больных и депрессивно-подобного поведения у крыс после НПС, общим нарушением среди исследованных стресс-реализующих систем является дисфункция ГГНС, а специфическим для модели депрессии – изменение функционирования системы нейротрофинов.

## 5. ВЫВОДЫ

- 1) Модели ХНС и НПС сопоставимы по индукции депрессивно-подобного поведения у взрослых крыс.
- 2) У крыс, перенесших НПС, увеличен исходный уровень кортикостерона в крови и коре БП, а также снижен исходный уровень BDNF в крови и коре БП.
- 3) У крыс с тревожным и депрессивно-подобным поведением нарушена физиологическая реакция на субхронический стресс в виде отсутствия увеличения кортикостерона в крови и коре БП, выявленного у крыс контрольной группы.
- 4) У пациентов с тревожно-депрессивной симптоматикой повышена исходная активность ГГНС (по уровню кортизола и АКТГ в крови) и системы провоспалительных цитокинов (по уровню ИЛ-6 и ФНО $\alpha$ ), а также изменена реактивность на острое стрессорное воздействие.

## 6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BDNF – brain derived neurothrophic factor

NGF – nerve growth factor

АКТГ – аденокортикотропный гормон

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ГР – глюкокортикоидные рецепторы

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор

ДМТ – дексаметазоновый тест

ИМАО – ингибиторы моноаминоксидазы

ИЛ - интерлейкин

ИФ $\gamma$  – интерферон гамма

Кора БП – кора больших полушарий

ЛПС – бактериальный липополисахарид

МР – минералокортикоидные рецепторы

НПС – неонатальный провоспалительный стресс

САС – симпато-адреналовая система

СИОС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина

ТДС – тревожно-депрессивная симптоматика

ФК – фронтальная кора головного мозга

ХНС – хронический непредсказуемый стресс

ЦНС – центральная нервная система

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Фрейман С.В., Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю., Моисеева Ю.В., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. Стрессогенные эффекты однократной инъекции физиологического раствора: системные (кровь) и центральные (фронтальная кора, дорсальный и вентральный гиппокамп) // *Нейрохимия*. -2016. - Vol. 33, № 2. -P. 122–127.
2. Tishkina A., Stepanichev M., Kudryashova I., Freiman S., Onufriev M., Lazareva N., Gulyaeva N. Neonatal pro-inflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response // *Behav. Brain Res. Elsevier B.V.* - 2016. - Vol. 304. - P. 1–10.
3. Stepanichev M., Tishkina A., Novikova M., Levshina I., Freiman S., Onufriev M., Levchenko O., Lazareva N., Gulyaeva N. Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. - 2016. - Vol. 76, № 4. - P. 324–333.
4. Onufriev M.V., Freiman S.V., Peregud D.I., Kudryashova I.V., Tishkina A.O., Stepanichev M.Yu., Gulyaeva N.V. Neonatal proinflammatory stress induces accumulation of corticosterone and Interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: potential mechanism of synaptic plasticity impairments // *Biochemistry (Moscow)* – 2017. – Vol. 82 - No. 3. - P. 275-281.
5. Stepanichev M., Manolova A., Peregud D., Onufriev M., Freiman S., Aniol V., Novikova M., Moiseeva Y., Lazareva N., Gulyaeva N. Specific activity features in the forced swim test: brain neurotrophins and development of stress-induced depressive-like behavior in rats // *Neuroscience. IBRO*. - 2018. -Vol. 375. - P. 49–61.