

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

На правах рукописи

Гор

Горлова Анна Вячеславовна

**ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО
СОСТОЯНИЯ КРЫС, ВЫЗВАННОГО ХРОНИЧЕСКИМ
ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА ПЕРЕМЕННЫХ ЧАСТОТ**

Специальность - 03.03.06 – «Нейробиология»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Иноземцев А.Н.

Москва – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Модели депрессивно-подобного состояния на экспериментальных животных	13
1.2. Депрессивно-подобное состояние и окислительный стресс	23
1.3. Роль BDNF в развитии депрессии	26
1.4. Роль ГАМКергической системы в развитии депрессии	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1. Экспериментальные животные.....	30
2.2. Ультразвуковое воздействие.....	31
2.3. Поведенческое тестирование	31
2.4. Диссекция	36
2.5. ПЦР «в реальном времени»	36
2.6. Флуорометрический анализ	39
2.7. Иммуноферментный анализ.....	40
2.8. Статистика	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	41
3.1. Влияние ультразвукового воздействия на потребление крысами сахарозы	41
3.2. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «вынужденного плавания»	43
3.3. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте социального взаимодействия	46
3.4. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «резидент-интродер»	48
3.5. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «открытое поле»	54
3.6. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»	58

3.7. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «темно-светлая камера».....	60
3.8. Влияние ультразвукового воздействия на память крыс в тесте «распознавание объекта»	63
3.9. Влияние ультразвукового воздействия на память крыс при выработке условной реакции пассивного избегания	65
3.10. Влияние ультразвукового воздействия на обучение и память крыс в тесте «водный лабиринт Морриса».....	67
3.11. Оценка уровня кортикостерона в плазме крови крыс	71
3.12. Оценка уровня окислительного стресса в различных структурах мозга	72
3.12.1. Оценка содержания карбонилированных белков	72
3.12.2. Оценка содержания общего глутатиона	73
3.13. Оценка содержания BDNF и экспрессии соответствующего гена в головном мозге крыс.....	75
3.13.1. Оценка экспрессии гена BDNF в головном мозге крыс	75
3.13.2. Оценка содержания BDNF в головном мозге крыс	77
3.14. Оценка экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК _A -рецепторов в головном мозге крыс	79
3.14.1. Оценка экспрессии гена GABRA1, кодирующего субъединицу $\alpha 1$ ГАМК _A -рецепторов, в головном мозге крыс.....	79
3.14.2. Оценка экспрессии гена GABRA2, кодирующего субъединицу $\alpha 2$ ГАМК _A -рецепторов, в головном мозге крыс.....	80
3.14.3. Оценка экспрессии гена GABRA3, кодирующего субъединицу $\alpha 3$ ГАМК _A -рецепторов, в головном мозге крыс.....	82
3.14.4. Оценка экспрессии гена GABRB2, кодирующего субъединицу $\beta 2$ ГАМК _A -рецепторов, в головном мозге крыс.....	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	104
Список литературы	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BDNF – нейротрофический фактор мозга
dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат
DTT – дитиотреитол
GAPDH – глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа
GSH – восстановленная форма глутатиона
GSSG – окисленная форма глутатиона
FSL – линия крыс Flinders Sensitive Line
IL – интерлейкин
MMLV ревертаза – обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей
АФК – активные формы кислорода
ГАМК – гамма-амино-масляная кислота
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
МДА – малоновый диальдегид
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
УЗ – ультразвук
УРПИ – условная реакция пассивного избегания
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы и степень ее разработанности

В настоящее время патогенез депрессивного расстройства, проблемы его диагностирования и поиск адекватного лечения являются важнейшими проблемами клинической психиатрии, поскольку ежегодно фиксируется рост диагностированных случаев данного заболевания на душу населения (Celada et al., 2006; Robinson, 2018). Депрессия значительно ухудшает качество жизни пациентов, приводя к потере трудоспособности, нарушениям памяти и сна. Эта болезнь является также основной причиной суицидов среди населения.

Модели депрессивно-подобного состояния животных (в первую очередь, мышей и крыс) воссоздают данную патологию, что необходимо для выяснения механизмов ее развития, которые в настоящее время точно не установлены, и описания которых существуют в виде многочисленных гипотез. Кроме того, модели депрессивно-подобного состояния широко используются для поиска новых способов терапии заболевания, в том числе тестирования фармакологических агентов и сравнения их эффективности. Существует большое разнообразие подобных моделей, основанных на непосредственном физическом воздействии на животного или на использовании социального стресса грызунов. Однако модели, базирующиеся главным образом не на физическом воздействии на животное, можно считать более приближенными к причинам развития депрессии человека и потому более интересными для дальнейшего изучения и, возможно, более перспективными.

Одной из подобных моделей является модель хронического воздействия ультразвуковых (УЗ) волн, разработанная в ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского». В данной модели грызуны подвергаются действию переменных ультразвуковых частот диапазоном от 20 до 45 кГц (Морозова и др., 2012). Выбор данных частот обусловлен их эмоциональной разнонаправленностью, поскольку более низкие частоты (20-25 кГц) являются так называемыми

эмоционально негативными сигналами, поскольку издаются грызунами в ситуациях опасности и поражении в схватке, в то время как более высокие частоты (около 45 кГц) являются, наоборот, эмоционально положительными, поскольку издаются, например, при копуляции и потреблении пищи после депривации (Brudzynski, 2013; Seffer et al., 2014). Непредсказуемое чередование данных частот приводит к появлению конфликтной ситуации «информационной неопределенности», то есть переизбытка несвязной информации, к поступлению которой невозможно приспособиться, что рассматривается создателями модели как аналог состояния человека в современном обществе.

Поскольку модель хронического ультразвукового воздействия является сравнительно новой и не всесторонне изученной, актуальность работы заключается в углубленном изучении поведенческих параметров крыс и ряда важных молекулярных маркеров, ранее не изучавшихся или недостаточно исследованных в рамках данной новой модели депрессивно-подобного состояния грызунов. Кроме того, впервые была предпринята попытка изучить динамику развития депрессивно-подобного состояния крыс, для чего было использовано несколько опытных групп животных, подвергавшихся ультразвуковому воздействию различной продолжительности. Наконец, важно отметить, что в исследовании было задействовано несколько контрольных групп с одиночным содержанием в течение разных временных интервалов в соответствии с изучаемой продолжительностью ультразвукового воздействия для исследования вклада социальной изоляции, присутствующей в данной модели.

В связи с актуальностью проблемы роста заболеваемости депрессивными расстройствами и необходимостью изучения патогенеза данного состояния на экспериментальных животных, **целью** работы стало исследование динамики развития депрессивно-подобного состояния крыс, вызываемого хроническим воздействием ультразвука переменных частот.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценка влияния ультразвукового воздействия различной продолжительности на развитие депрессивно-подобного состояния крыс;
2. Оценка влияния ультразвукового воздействия различной продолжительности на социальную активность крыс;
3. Оценка влияния ультразвукового воздействия различной продолжительности на уровень тревожности, горизонтальной и исследовательской активности крыс;
4. Оценка влияния ультразвукового воздействия различной продолжительности на обучение и память крыс;
5. Изучение содержания кортикостерона в плазме крови крыс под воздействием ультразвукового воздействия различной продолжительности;
6. Изучение содержания маркеров окислительного стресса в мозге крыс под воздействием ультразвукового воздействия различной продолжительности;
7. Изучение содержания белка BDNF и экспрессии гена *BDNF* в мозге крыс под воздействием ультразвукового воздействия различной продолжительности;
8. Изучение экспрессии генов, кодирующих ряд субъединиц ГАМК_A-рецепторов в мозге крыс под воздействием ультразвукового воздействия различной продолжительности.

Научная новизна работы. Поскольку модель хронического ультразвукового воздействия является новой, актуальность работы заключается в получении данных о поведенческих параметрах крыс и ряда важных молекулярных маркеров в рамках валидации данной модели депрессивно-подобного состояния грызунов. Кроме того, впервые была установлена динамика развития депрессивно-подобного состояния крыс. Впервые было показано, что изменения в социальной активности крыс проявляются раньше, чем изменения поведения в классических тестах на

определение депрессивно-подобного состояния грызунов, а нарушения памяти, наоборот, выявляются позднее. Также впервые были выявлены молекулярные маркеры окислительного стресса, содержание кортикостерона, содержание BDNF и экспрессия генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецепторов, в различных структурах головного мозга крыс, подвергавшихся хроническому ультразвуковому воздействию различной продолжительности. Наконец, важно отметить, что в исследовании впервые было показано, что социальная изоляция крыс продолжительностью до 3 недель не приводит к развитию поведенческих и молекулярных изменений.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные открывают новые перспективы в изучении взаимосвязи между продолжительностью стрессового воздействия и комплексом развивающихся поведенческих и молекулярных нарушений. Изучение ряда молекулярных коррелятов депрессивно-подобного состояния крыс развивает представления о механизмах его возникновения, развития и усугубления. Так, было показано, что обнаруженные изменения развиваются не одновременно, а последовательно, указывая на возможность выделения этапов развития депрессивно-подобного состояния животного по мере его усугубления, что в дальнейшем может найти применение в клинических исследованиях, в частности, в поиске возможных новых мишеней для терапии. Также важно отметить, что очевидными плюсами используемой модели является простота ее использования и низкие финансовые затраты.

Методология и методы исследования. В представленной работе применялись нейрофизиологические и биохимические методы исследования. Для проведения поведенческого анализа использовалось 10 стандартных нейрофизиологических тестов. Тесты предпочтения сахарозы и «вынужденного плавания» применялись для оценки депрессивно-подобного состояния животных, тест «резидент-интродер» и тест социального взаимодействия - для оценки социальной активности крыс, тесты «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «темно-светлая камера» -

для оценки тревожности, горизонтальной и исследовательской активности крыс, а тест «распознавания объектов», условная реакция пассивного избегания и «водный лабиринт Морриса» – для изучения возможных нарушений обучения и памяти крыс. Анализ экспрессии генов *BDNF*, *GABRA1*, *GABRA2*, *GABRA3* и *GABRB2* проводился методом полимеразной цепной реакции «в реальном времени» в гиппокампе, префронтальной коре, среднем мозге и миндалине крыс. Для изучения содержания в гиппокампе и префронтальной коре двух маркеров окислительного стресса – карбонилированных (окисленных) белков и общего глутатиона – были проведены соответствующие флуорометрические анализы. Было проведено два иммуоферментных анализа: анализ содержания BDNF в гиппокампе и префронтальной коре и анализ содержания кортикостерона в плазме крови животных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменения поведения, характеризующие развитие депрессивно-подобного состояния крыс как результата хронического ультразвукового воздействия переменных частот, находятся в зависимости от продолжительности стресса.

2. Хроническое ультразвуковое воздействие увеличивает содержание кортикостерона в плазме крови крыс и маркеров окислительного стресса в головном мозге крыс.

3. Хроническое ультразвуковое воздействие снижает относительную экспрессию гена и содержание BDNF, а также относительную экспрессию генов *GABRA1*, *GABRA2* и *GABRA3*, кодирующих субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ ГАМК_A-рецепторов, в головном мозге крыс.

Степень достоверности данных. Достоверность полученных данных подтверждается использованием общепринятых экспериментальных методик, актуальных методов статистического анализа и достаточным для обработки объемом выборки.

Публикации. По результатам работы опубликовано 12 печатных работ, из них 7 статей в журналах, индексируемых в Scopus и WoS в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности нейробиология 03.03.06, и 5 тезисов докладов международных научных конференций и конгрессов.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», IX Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 2016; XII Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии», 2016, Судак; 30th European College of Neuropsychopharmacology Congress, Париж, 2017.

Личный вклад автора. Автором проведен анализ литературных данных, выполнены все этапы экспериментального исследования, проведена статистическая обработка данных, подготовлены указанные в списке публикации.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 125 страницах и содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 186 источников, из них 21 отечественный и 165 зарубежных. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 16 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Депрессия – это расстройство, характеризующееся ангедонией, двигательной заторможенностью и различными соматическими симптомами (Goodwin, 2006; Treadway, Zald, 2010, Сукиасян и др., 2007). Депрессивное расстройство может быть коморбидным заболеванием при диабетической энцефалопатии (Castillo-Gomez et al., 2015), эпилепсии (Kanner, 2003), синдроме хронической усталости (Murrough et al., 2010), шизофрении (Fatemi et al., 2010). Также при депрессии часто наблюдаются когнитивные нарушения (Lam et al., 2014) и расстройства сна (Nutt, 2008). В связи с распространением депрессии и ее огромной негативной ролью в жизни современного человека, изучение патогенеза этого заболевания является крайне актуальным вопросом современности (Jacob et al., 2012).

В настоящее время существуют различные теории патогенеза депрессивного расстройства:

- 1) Дисбаланс моноаминергических систем мозга: серотонинергической, дофаминергической, норадренергической (Mansari et al., 2010), а также ГАМКергической системы (Grønli et al., 2007; Sanacora, Saricicek, 2007);
- 2) Нарушения функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (Hendrickx et al., 2005; Varghese, Brown, 2001);
- 3) Дефицит нейротрофических факторов (Sen et al., 2008);
- 4) Деградация глии (Rial et al., 2015; Rajkowska, Miguel-Hidalgo, 2010);
- 5) Наличие генетической предрасположенности к развитию данного заболевания (Lohoff, 2010; Wurtman, 2005).

Таким образом, патогенез клинической депрессии до сих пор не является однозначно решенным вопросом, при этом отмечается широкое распространение этого расстройства по всему миру. Так, в настоящее время более чем у 350 миллионов человек диагностировано депрессивное расстройство (Kessler et al., 2015). Считается, что в ближайшем будущем это заболевание может стать главной причиной нетрудоспособности, обогнав

сердечно-сосудистые заболевания (Ferrari et al., 2013), что диктует необходимость исследований, направленных на изучение механизмов возникновения и развития депрессии.

Однако поскольку пациентов с диагностированной клинической депрессией можно подвергать только неинвазивным методам исследования, изучение механизмов данного расстройства зачастую представляется затруднительным. В ряде случаев проводится постмортальный молекулярный анализ образцов ткани мозга самоубийц с целью поиска генетических маркеров предрасположенности к развитию депрессии (Wysowski et al., 2001), однако закономерность подобных исследований зачастую подвергается сомнению (Tochigi et al., 2008). Главным возражением против подобной стратегии является неоднородность выборки, поскольку акт самоубийства не обязательно подразумевает у погибшего наличие клинической депрессии и, с другой стороны, не каждый пациент с диагностированным депрессивным расстройством предпринимает попытку самоубийства. Кроме того, трудной задачей является сохранность тканей мозга самоубийцы в состоянии, пригодном для дальнейшего молекулярного и генетического анализа.

Таким образом, для изучения механизмов возникновения и развития депрессивных расстройств необходимо использование адекватных моделей на экспериментальных животных, а также создание новых моделей, отвечающих критериям валидности и приближенных по своей природе к причинам появления депрессии человека. Использование моделей на животных позволяет не только изучить внутренние патологические процессы в организме, но и оценивать эффективность различных методов терапии, в том числе новых, прежде не использованных в клинической практике. Поиск новых методов лечения клинической депрессии является крайне актуальным, поскольку по различным оценкам более 30% больных в настоящее время являются устойчивыми к лечению существующими антидепрессантами (El-Nage et al., 2013).

1.1. Модели депрессивно-подобного состояния на экспериментальных животных

Обязательным условием использования той или иной модели психопатологического состояния на животных является ее удовлетворение ряду критериев, означающих соответствия проявления патологии у животных и у человека. Так, критерий надежности отражает возможность повторения схожих результатов данной модели в разных условиях, например, в разные года и у разных экспериментаторов (Язуина и др., 2013). Критерий валидности отражает правомочность использования модели для адекватного воспроизведения какой-либо патологии. Существует несколько типов критерия валидности: 1) наличная валидность – это поведенческие и молекулярные характеристики модели, которые должны воспроизводить поведенческие и молекулярные изменения, наблюдаемые при изучаемой патологии; 2) этиологическая валидность – общность этиологии изучаемого состояния у человека и у животных; 3) конструктивная валидность означает, что модель должна воспроизводить известные механизмы патологии; 4) предсказательная валидность означает, что те или иные фармакологические воздействия должны влиять на моделируемую патологию таким же образом, которым они влияют на состояние пациентов в клинике (Григорян, Гуляева, 2015; Willner et al., 2005).

Существующие животные модели депрессивных состояний можно подразделить на следующие основные группы:

1. Модели повреждения:

а) Генетические модели, связанные с нокаутированием отдельных генов у экспериментальных животных. Их использование связано с распространением гипотез, объясняющих склонность к депрессии генетической предрасположенностью (Fava, Kendler, 2000). Так, для моделирования недостаточной функции серотонинергической системы, часто наблюдающейся при клинических проявлениях депрессии, нокаутруется ген *Trph2*, играющий важную роль в синтезе серотонина (Jacobsen et al., 2012).

Также при моделировании депрессивно-подобного состояния распространено нокаутирование гена эндоканнабиноидного рецептора CB1 (Aso et al., 2008). Помимо этого, психические расстройства, в частности, включая депрессию, предположительно связаны с воспалительными реакциями и иммунной системой. В частности, была выявлена связь депрессивных расстройств с провоспалительным цитокином интерлейкин-6 (ИЛ-6). У мышей, нокаутированных по данному гену, наблюдались черты тревожного и депрессивно-подобного поведения, проявляющиеся в развитии ангедонии, увеличении времени иммобильности в тесте «вынужденного плавания» и подвешивания за хвост и снижении времени, проведенного в светлом отсеке в темно-светлой камере (Chourbaji et al., 2015).

Однако в норме депрессивное состояние затрагивает не один функциональный блок нервной системы, а вовлекает большое число генов и вызывает различные биохимические изменения (Valvassori et al., 2013). Поэтому весь комплекс депрессивных изменений невозможно воспроизвести при нокаутировании определенного гена, и, несмотря на свое удобство, эти модели не могут в полной мере затронуть механизмы развития депрессии и депрессивно-подобного состояния.

Наряду с нокаутированием определенных генов, вовлеченных в формирование депрессивных симптомов, в настоящее время широко используются животные модели психопатологических состояний, основанные на выведении специальных линий. Одной из самых ранних линий, демонстрирующих депрессивно-подобное поведение, была линия крыс FSL (Flinders sensitive line). Выводившаяся изначально как линия, устойчивая к действию диизопропилфлуорофосфата, вещества антихолинэстеразного действия, FSL оказалась удобной моделью для воспроизведения депрессивных симптомов, сходных с таковыми у человека (Overstreet, Wegener, 2013). Так, было показано, что животные демонстрируют увеличение длительности стадии парадоксального сна, что сходно с таковым у человека при депрессии, а также снижение двигательной активности и адаптации к стрессовому

воздействию в тесте «вынужденного плавания» и появление ангедонии после воздействия хронического стресса (Willner, 2005). Еще одной линией крыс, часто используемой для исследования депрессии, является линия крыс Вистар-Киото (Wistar-Kyoto). Животные этой линии демонстрируют симптоматику расстройств, сходную с таковой у человека (Bruzon-Cidon et al., 2014). Было показано увеличение стадии быстрого сна у крыс Вистар-Киото, увеличение иммобильности в тесте «вынужденного плавания», снижение социальной активности, проявление ангедонии и нарушения функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (Nam et al., 2014). Кроме того, у крыс Вистар-Киото выявляется устойчивость к лечению антидепрессантами, что может делать их удобным объектом для исследования резистентной депрессии и способов возможного воздействия на неё.

Первой генетической моделью депрессии на мышах стала линия мышей Rouen. Для определения депрессивно-подобного состояния проводили тест «вынужденного плавания» и подвешивания за хвост. По результатам этих тестов отбирали особей с выраженным «поведением беспомощности» и скрещивали между собой, после чего к 12-му поколению почти у 100% особей наблюдалось признаки депрессивно-подобного состояния, в том числе выраженная ангедония (Yacoubi et al., 2013).

Также существует ряд менее известных моделей генетической предрасположенности к депрессии, однако содержание и выведение всех линий отличается достаточно высокой степенью финансовых затрат, что делает затруднительным их использование в масштабных исследованиях. Кроме того, симптомокомплекс депрессивно-подобного состояния часто отягощён дополнительными проявлениями (склонность к эпилептическим припадкам, алыцгеймер-подобное состояние), что затрудняет изучение клинической картины собственно депрессивно-подобного состояния.

б) Фармакологические модели. Известно, что введение ряда лекарственных препаратов зачастую нарушает баланс медиаторных систем

мозга, что у людей часто приводит к развитию депрессивного синдрома в качестве побочного эффекта после их приема. Это наблюдение было взято за основу для создания моделей депрессивно-подобного состояния у экспериментальных животных, вызванного введением больших доз фармакологических агентов.

Одним из примеров экспериментальной фармакологической модели депрессии на животных является депрессивно-подобное состояние, вызванное введением резерпина. Резерпин представляет собой индолный алкалоид, в основном использующийся как антигипертензивное средство для лечения артериальной гипертензии (Minor, Hanff, 2015). В то же время он оказывает угнетающий эффект на центральную нервную систему, что может приводить к появлению депрессии.

Еще одним примером фармакологической модели депрессивного состояния может служить модель нейролептической депрессии. Типичные нейролептики иногда применяют у животных для угнетения их двигательной и исследовательской активности, поскольку одним из побочных эффектов лечения нейролептиками является так называемая нейролептическая депрессия, связанная с длительной блокадой дофаминовых рецепторов. Большие дозы нейролептиков приводят к развитию каталепсии – патологически длительного сохранения заданной непривычной позы, а введение антидепрессивных препаратов уменьшает данные эффекты (Muccignat-Caretta et al., 2004).

Известно, что стрессовое воздействие активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, что приводит к повышению уровня глюкокортикоидных гормонов в плазме крови (Morris et al., 2012). По этой причине предполагается, что введение кортизола и последующая активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси также приводит к развитию депрессивно-подобного состояния. В рамках «кортизоловой» модели депрессии экспериментальные животные, получающие инъекцию кортизола, демонстрируют признаки депрессивно-подобного состояния, в том числе

увеличенное время иммобильности в тестах «вынужденного плавания» и подвешивания за хвост, причем данные эффекты предотвращаются использованием антидепрессантов (Wei et al., 2007).

Еще большую роль при развитии депрессивно-подобного состояния грызунов играет кортикостерон. Было показано, что инъекции кортикостерона крысам также приводили к нарушениям функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и депрессивно-подобному состоянию (Xie et al., 2018), а также снижению веса животных. Более того, эффекты данных инъекций оказались дозозависимыми (Johnson et al., 2006). Инъекции кортикостерона используются исследователями в том числе для тестирования лекарственных препаратов (Neis et al., 2018; Weina et al., 2018). Повышенное содержание кортикостерона наблюдается в различных моделях депрессивно-подобного состояния, часть из которых описана ниже, а именно у крысят при отлучении от матери (Avitsur et al., 2013), а также у мышей в модели социальной изоляции (Möller et al., 2013), у крыс, подвергаемых неизбежным ударам тока (Kubera et al., 2011); у субмиссивных особей крыс в модели социального поражения (Gómez-Lázaro et al., 2011) и у крыс с удаленными обонятельными луковицами (Song, Leonard, 2009). Таким образом, повышение кортикостерона является общим показателем самых разнообразных видов стресса.

К фармакологическим экспериментальным моделям можно отнести модели психопатологических состояний, развивающихся на фоне наркотической или алкогольной зависимости. Грызуны в данных моделях демонстрируют ангедонию и набор поведенческих симптомов, характерных для депрессивно-подобных патологий, причем применение антидепрессантов позволяет обратить эти симптомы. Кроме того, в модели алкогольной депривации грызуны демонстрируют ангедонию и повышенную агрессивность. Данная модель интересна не только с точки зрения изучения самого депрессивно-подобного состояния, но и для исследования непосредственных эффектов отказа от наркотических веществ и алкоголя у

людей, включающих в себя более широкий набор симптомов, а также для изучения механизмов склонности к алкогольной зависимости (Becker, 2000). В целом, фармакологические экспериментальные модели являются важным и полезным инструментом для изучения психопатологических расстройств, развивающихся на фоне применения препаратов, оказывающих выраженный эффект на нервную систему.

в) Одной из широко применяемых инвазивных моделей депрессии является модель удаления обонятельных луковиц (Jarosic et al., 2007). Удаление обонятельных луковиц у грызунов приводит к изменениям в дофамин-, холин-, серотонин- и ГАМКергической системах, сходным с наблюдаемыми у пациентов с депрессивным расстройством (Muccignat-Caretta et al., 2004). Они сопровождаются рядом симптоматических проявлений – наблюдается снижение веса, ангедония, нарушенная социальная активность (Valvassori et al., 2013). В поведенческих тестах у таких животных показано увеличение времени иммобилизации в тесте «вынужденного плавания», снижение потребления сахарозы в тесте на ангедонию, а также снижение горизонтальной активности (Amchova et al., 2014). Данные нарушения могут быть обращены хроническим лечением антидепрессантами, что указывает на предсказательную валидность данной модели.

Однако эта модель имеет целый ряд недостатков. Главное возражение против ее использования заключается в том, что удаление обонятельных луковиц является серьезным хирургическим вмешательством, имеющим множество последствий, среди которых трудно выделить непосредственно депрессивно-подобные черты поведения. Механизм развития депрессивно-подобного состояния в данной модели имеет мало общего с природой клинической депрессии человека (Kelly et al., 1997).

2. Модели стресса

Модели стресса особенно распространены в связи с тем, что стресс является основным этиологическим фактором возникновения депрессии (Duman, 2010). Одной из подобных моделей, основывающихся на стрессовом

воздействии, является модель «выученной беспомощности». Она заключается в повторении болевых или неприятных для животного стимулов (например, ударов тока), от которых невозможно избавиться, в результате чего у животных вырабатывается пассивность, отсутствие каких-либо реакций, направленных на избавление от вредящего стимула. Эти поведенческие проявления схожи с клинической картиной пациентов с диагностированной клинической депрессией, у которых наблюдается снижение двигательной активности, повышенная тревожность и снижение мотивации (Григорян, Гуляева, 2015; Гарибова и др., 2017). Считается, что данная модель приближена к причинам стресса у человека, которые можно охарактеризовать как ситуации, на которые невозможно повлиять: насилие, банкротство и т.п. (Fincham et al., 1989).

Еще одной моделью острого стресса является модель повторяющегося плавательного стресса (Drugan et al., 2013). По своей сути она сходна с «выученной беспомощностью», поскольку депрессивное состояние возникает у животного в результате действия неконтролируемого стрессора – неоднократного помещения в цилиндр с холодной водой. Было показано, что модель приводит к увеличению иммобильности, а также нарушению пространственной памяти у животных (Warner et al., 2013).

К моделям острого стресса относят также тест подвешивания за хвост. В этом тесте главным показателем также является время иммобильности, отражающее так называемое «поведение отчаяния». Однако гораздо чаще этот тест, равно как и тест Порсолта, используется не для индуцирования депрессивно-подобного состояния, а для оценки наличия в рамках других моделей. Часто с использованием данных тестов оценивают эффективность действия антидепрессантов, а также тестируют нокаутных животных и отличие их поведения от животных с функционирующим геном (Cryan, Mombereau, 2004).

Некоторые модели основываются на воздействии не острого, а хронического стресса – это так называемая модель хронического

непредсказуемого стресса. Данная модель является одной из самых распространенных и применяемых моделей депрессивно-подобного состояния на грызунах. В этой модели используется несколько вариантов сменяющих друг друга стрессовых воздействий (смена клетки, колебания температуры, непродолжительные периоды пищевой и питьевой депривации, инверсия светового режима), продолжающиеся в течение 2 и более недель (Willner, 2005). Предполагается, что источники стрессового воздействия в данном случае имеют более естественную природу по сравнению, например, с электрическими ударами. У животных с депрессивно-подобным состоянием, сформированным при помощи воздействия хронического неизбежного стресса, наблюдается снижение потребления сахарозы в тесте на ангедонию, увеличение имобильности в тесте «вынужденного плавания» и снижение активности в тесте «открытое поле» (Sun et al., 2016). Минусом модели является то, что протоколы экспериментальной процедуры могут варьироваться, что зачастую приводит к плохой воспроизводимости результатов (Willner, 2005). Однако данная модель широко используется для изучения молекулярных механизмов развития депрессивно-подобного состояния и роли различных нейромедиаторных систем.

Тем не менее, следует понимать, что в случае развития клинической депрессии стресс часто имеет другую природу, поскольку человек в повседневной жизни в первую очередь сталкивается не с физическим стрессом, а с эмоциональной оценкой событий, вызывающих эмоциональный стресс. Поэтому перечисленные модели не могут в полной мере отражать картину заболевания депрессией у человека, что ставит вопрос о необходимости поиска иных моделей депрессивно-подобного состояния животных.

3. По сравнению с моделями, перечисленными ранее, социальные модели считаются более приближенными к природе клинической депрессии. Одной из социальных моделей депрессивно-подобного состояния является модель социального поражения. В данном случае создаются условия

социальной конфронтации двух самцов грызунов. Так, при помещении двух самцов мышей в одну клетку в большинстве случаев один из них начинает демонстрировать доминантные черты, а второй – субмиссивные, причем при повторных столкновениях их роли не меняются (Коваленко, Кудрявцева, 2010). После повторных ежедневных поражений субмиссивные грызуны проявляют набор поведенческих черт, характерных для депрессивно-подобного состояния: сниженную горизонтальную и вертикальную активность в открытом поле, ухудшение долговременной памяти в парадигме контекстуального страха, снижение социальной активности, увеличение иммобильности в тесте подвешивания за хвост (Iniguez et al., 2016). У грызунов также выявляется ангедония, выражающаяся в снижении потребления сахарозы. Поведенческие изменения сопровождаются изменением уровня серотонина и дофамина в различных структурах мозга (Goto, Toyoda, 2015). Данная модель также считается приближенной к причинам возникновения депрессии человека, поскольку социальный стресс, включающий в себя социальное отчуждение и травлю, играет большую роль в современном обществе. Недостатком данной модели является невозможность воспроизвести ее на самках, поскольку самки в норме не демонстрируют агрессии по отношению к своему полу.

Еще одним примером социальной экспериментальной модели депрессии может служить модель социальной изоляции. Продолжительная социальная изоляция приводит к повышенной тревожности и ангедонии у животных, снижению сексуальной мотивации, увеличению длительности иммобилизации в тесте «вынужденного плавания» (Liu et al., 2016). Зачастую у животных также развивается повышенная агрессивность. Эта модель считается хорошо валидированной и является простой для воспроизведения, однако требует больших временных затрат. Как и модель социального поражения, модель социальной изоляции направлена на создание условий, аналогичных условиям развития депрессивно-подобного расстройства человека.

В целом, большинство моделей стресса основано на использовании разных физических воздействий. Однако рассмотрения физических факторов как стрессоров недостаточно для понимания природы стресса и его моделирования. Даже такой стрессогенный раздражитель, как электрический ток, сам по себе может и не вызвать стресс. Напротив, он может служить сигналом следующего за ним благоприятного для животного события. Показателен в этом отношении опыт в лаборатории И.П. Павлова, в котором ток использовался в качестве условного стимула для выработки пищевого условного рефлекса. В результате ток стал вызывать не отрицательную реакцию, а поведение, характерное для положительного эмоционального состояния животных, и свойственное условному пищевому рефлексу слюноотделение.

Эмоциональный стресс человека, для купирования негативных эффектов которого, в конечном счёте, ищутся лекарственные средства и создаются экспериментальные модели, развивается не столько вследствие физических воздействий как таковых, сколько из-за их сигнального информационного значения, соотнесённого с жизненными потребностями человека. Это с разных точек зрения обосновано многими крупными учёными (Анохин, 1968; Вальдман и др., 1979; Симонов, 1981; Судаков, 1981). Эмоциональный стресс можно расценить как состояние дистресса, вызванное переживанием конфликтных ситуаций (Fontes et al., 2014). Долгое время считалось, что данный вид стресса присущ только человеку, и его невозможно смоделировать у других видов (Chrousos, Gold, 1992). У человека эмоциональный стресс играет большую роль в развитии клинической депрессии и других психоневрологических расстройств (Roy et al., 2014; Kessler et al., 2015), причем известно, что именно продолжительные, неконтролируемые и непредсказуемые стрессовые воздействия наиболее часто приводят к возникновению данных нарушений (de Kloet et al., 2005; McEwen, Stellar, 1993). На основе этих фактов была предложена модель хронического ультразвукового воздействия, в которой главную роль играет не

непосредственное физическое или физиологическое воздействие, такое как депривация воды или пищи, иммобилизация или вынужденное плавание (Morozova et al., 2016). В данной модели грызуны подвергаются продолжительному неизбежному воздействию ультразвуковых частот, входящих в нормальный диапазон их вокализации, но имеющих противоположное сигнальное значение. Так, частоты диапазоном 20-25 кГц являются так называемыми «эмоционально отрицательными», поскольку издаются грызунами при поражении в схватке, болевой стимуляции или отлучении от матери (Constantini, D'Amato, 2006). Частоты диапазоном 40-45 кГц являются так называемыми «эмоционально положительными», поскольку издаются при коитусе или пищевом подкреплении (Brudzynski, Fletcher, 2010). Ультразвуковые частоты указанных диапазонов чередуются случайным образом, что создает конфликтную ситуацию: потребность адаптироваться к среде и невозможность удовлетворения этой потребности. Стоит отметить, что чередование раздражителей, вызывающих противоположные физиологические реакции (возбуждение и торможение), демонстрировалось ранее в опытах И.П. Павлова на собаках и приводило к нарушению высшей нервной деятельности, известному под названием «сшибка».

1.2. Депрессивно-подобное состояние и окислительный стресс

Хорошо известно, что умеренные концентрации активных форм кислорода (АФК) важны для большого количества физиологических функций (Valko et al., 2007). Однако, когда концентрация АФК превышает антиоксидантные возможности организма, клетки животных входят в состояние, называемое окислительным стрессом, в результате которого АФК вызывают окислительное повреждение клеточных компонентов (Aitken, Roman, 2008). В результате окислительный стресс оказывается вовлеченным в широкий спектр заболеваний, включающий нейродегенеративные заболевания. При этом мозг особенно уязвим для окислительного стресса из-за его высокого потребления кислорода и, соответственно, большой

продукции свободных радикалов (Cardozo et al., 1999). В результате, возникший в тканях нервной системы окислительный стресс может нарушить нейротрансмиссию, функцию нейронов и общую активность мозга (Halliwell, 2006). Кроме того, дисбаланс в окислительно-восстановительной системе может приводить к развитию нейровоспаления и нейродегенерации, ведущим к хроническому воспалению (Cline et al., 2015).

Многочисленные недавние исследования также подтвердили наличие взаимосвязи между развитием окислительного стресса в мозге и развитием патологической тревожности и депрессивно-подобных нарушений у экспериментальных животных (Kuloglu et al., 2002). Некоторые исследователи определяют окислительный стресс в тканях мозга как первопричину возникновения тревожного расстройства (Ng et al., 2008) и рассматривают прямую взаимосвязь между уровнем тревожности и степенью выраженности окислительного стресса (Bilici et al., 2001).

Помимо этого, ряд исследований подтверждает, что окислительный стресс в тканях мозга индуцирует развитие депрессивного расстройства человека и депрессивно-подобного состояния у животных (Maes et al., 2011). Более того, в настоящее время считается, что антидепрессанты оказывают терапевтический эффект во многом за счет подавления продукции АФК и усиления антиоксидантной защиты (Lee et al., 2013). Новейшие представления также напрямую связывают уровень окислительного стресса и развитие шизофрении и биполярного расстройства.

Несмотря на убедительные доказательства существования связи между повышением уровня окислительного стресса и развития тревожных и депрессивных расстройств, исследования этой темы единичны и нуждаются в проверке и расширении представлений о влиянии на этот показатель различных видов стресса, особенно стресса, не базирующегося непосредственного на физическом воздействии на экспериментальное животное.

В качестве маркеров окислительного стресса могут быть использованы различные общепринятые показатели, одним из которых являются карбонилированные (окисленные) белки. Наиболее распространенными продуктами окисления белка в биологических образцах являются белковые карбонильные производные пролина, аргинина, лизина и треонина. Эти производные химически стабильны и служат надежными маркерами окислительного стресса (Mohanty et al., 2010). Увеличение содержания карбонилированных белков в тканях наблюдали при различных неврологических заболеваниях, включая энцефаломиелит (Zheng, Bizzozero, 2010) и болезнь Альцгеймера (Dalle-Donne et al., 2003)

Глутатион является основным внутриклеточным низкомолекулярным тиолом, который играет решающую роль в клеточной защите от окислительного стресса в тканях и клетках (Wu et al., 2004). Важным показателем является соотношение восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона. Это соотношение является показателем клеточного здоровья, при этом в нормальных условиях содержание GSH составляет до 98% клеточного глутатиона. Однако соотношение GSH/GSSG снижается при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера (Owen, Butterfield, 2010). Молярное соотношение GSH/GSSG в тканях является надежным маркером наличия окислительного стресса. Однако и содержание общего глутатиона также является удобным маркером, поскольку этот показатель увеличивается при окислительном стрессе (Duffy et al., 2015).

Также была показана высокая корреляция между экспрессией глутатионредуктазы I и проявлением тревожности у мышей линии BALB/c (Novatta et al., 2005). При этом линия CD-1 обладала большей гетерогенностью, несмотря на сохранение той же тенденции (Bouayed et al., 2007). Таким образом, при исследовании данного маркера оксидативного стресса могут наблюдаться межлинейные различия. Была продемонстрирована взаимосвязь между окислительным стрессом в мозге и

стрессом в модели социального поражения (Patki et al., 2013), а также в модели подрезания вибриссов (Talwar et al., 2002).

Еще одним маркером окислительного стресса является содержание малонового диальдегида (МДА), который является широко используемым показателем перекисного окисления липидов (Ayala et al., 2014). Полиненасыщенные липиды подвержены влиянию активных форм кислорода, и в результате их взаимодействия возникает цепная реакция с образованием конечных продуктов, таких как МДА.

Недавнее исследование, посвященное изучению тканей мозга пациентов с диагностированной клинической депрессией, показало, что как содержание общего глутатиона, так и содержание карбонилированных белков были достоверно повышены в группе пациентов по сравнению с группой условно здоровых людей. В этом исследовании также было предложено широко использовать препараты с антиоксидантными свойствами для лечения депрессивных расстройств (Gibson et al., 2012). Нам представляется интересным изучить оба этих показателя у экспериментальных животных в новой модели депрессивно-подобного состояния.

1.4. Роль BDNF в развитии депрессии

Установлено, что с развитием депрессии тесно связан нейротрофический фактор мозга (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF). В частности, многочисленные исследования указывают на то, что динамика содержания BDNF в тканях мозга является важной составляющей как про-депрессантных изменений, так и терапевтического действия антидепрессантных препаратов (Shirayama et al., 2002; Monteggia, 2004). Внутривентрикулярная инъекция BDNF приводит к антидепрессантным изменениям в моделях выученной беспомощности у грызунов (Hoshaw et al., 2005; Shirayama et al., 2002), при этом эффект от единичной инъекции длится в течение 10 последующих дней. Применение препаратов, блокирующих рецептор BDNF – тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор B (TrkB),

препятствует проявлению указанных терапевтических свойств инъекции BDNF, что указывает на важность BDNF–TrkB взаимодействия в развитии депрессивно-подобного состояния (Shirayama et al., 2002). BDNF является белком, широко экспрессируемым в мозге млекопитающих, который участвует в процессах нейропластичности, угнетает клеточный апоптоз, поддерживает выживаемость нейронов (Autry, Monteggia 2012; Kuipers, Bramham, 2006). Участие BDNF в синаптической пластичности также определяет роль данного белка в том числе в механизме действия антидепрессантов (Taliaz et al., 2010). Снижение содержания BDNF было обнаружено в сыворотке крови пациентов с диагностированным депрессивным расстройством, а снижение уровня BDNF в головном мозге и плазме крови было неоднократно обнаружено в образцах, забранных у жертв суицида (Salas-Magaña et al., 2017; Lee et al., 2012). Помимо этого, у пациентов с депрессивным расстройством было показано снижение экспрессии рецептора BDNF-TrkB, что вновь подтверждает связь активности системы BDNF с клинической депрессией (Phillips, 2017). Животные модели депрессивных расстройств также подтверждают клинические данные, поскольку содержание BDNF в тканях префронтальной коры и гиппокампа является одним из критериев развития предрасположенности к формированию депрессивно-подобных расстройств у крыс и мышей (Yang et al., 2015).

Интересно отметить, что применение синтетических агонистов TrkB также приводит к антидепрессантным изменениям – например, ANA-12 (Ren et al., 2013) не только изменяет поведенческие показатели депрессивного расстройства у мышей, инъецированных липополисахаридом (провоспалительный агент, который приводит к формированию депрессивно-подобных и тревожно-подобных расстройств в животных моделях), но и нормализует морфологические изменения гиппокампа (Zhang et al., 2015). Таким образом, сигнальный каскад, запускаемый через взаимодействие BDNF–TrkB, является важным механизмом формирования депрессивно-подобных расстройств.

1.5. Роль ГАМКергической системы в развитии депрессии

В последнее время большое внимание исследователей уделяется роли ГАМКергической системы в патогенезе депрессии. В частности, отмечается важная роль ионотропного ГАМК_A-рецептора, отвечающего за быструю ингибиторную трансмиссию (Olsen, Sieghart, 2009; Gunther et al., 1995). Так, было установлено, что нарушение функционирования ряда субъединиц данного рецептора, в том числе $\alpha 1$ -4, $\beta 1$ -2 и $\gamma 1$ -субъединиц, предположительно ассоциировано с депрессивными нарушениями (Fatemi et al., 2013; Smith, Rudolph, 2012). Однако в целом, роль ГАМКергической системы в патогенезе депрессивного расстройства остается менее изученной по сравнению с системами моноаминовых нейромедиаторов. При этом ряд исследований указывает на ее взаимосвязь с развитием как клинической депрессии человека, так и депрессивно-подобного состояния экспериментальных животных. В частности, имеются подтверждения роли различных субъединиц ГАМК_A-рецепторов в развитии депрессивно-подобного состояния грызунов, однако в основном соответствующие исследования проводились на мышах и крысах, нокаутных по гену, кодирующему какую-либо субъединицу данного рецептора (Earnheart et al., 2007; Maguire, 2014). Таким образом, наблюдается недостаток изучения роли данных субъединиц у животных со стресс-индуцированным депрессивно-подобным состоянием. В связи с этим представляют интерес полученные нами данные с использованием новой модели депрессивно-подобного состояния.

Описанные выше молекулярные и биохимические параметры представляется важным рассмотреть в новой модели депрессивно-подобного состояния — модели хронического ультразвукового воздействия, что необходимо для ее дальнейшей валидации. Кроме того, прежде не рассматривалась зависимость рассмотренных показателей от продолжительности стрессового стимула. На наш взгляд, динамика проявления возможных изменений может внести свой вклад в понимание

механизмов развития депрессии. Таким образом, нами была предпринята попытка описать динамику изменения наиболее важных биохимических и поведенческих показателей депрессивно-подобного состояния животных в новой модели.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

Эксперименты проводились на самцах крыс линии Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) из Центрального питомника лабораторных животных РАН (Андреевки) общим числом 140. В начале эксперимента возраст животных составлял 2,5 месяца. Животных содержали в индивидуальных поликарбонатных клетках размером 38x25x16см при постоянной температуре 23⁰С, контролируемом прямом освещении, режиме 12:12 ч и свободном доступе к воде и пище. Содержание крыс и все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Директива 2010/63 Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г.). Были использованы 3 опытные группы животных, 3 группы контроля и группа интактных животных. Опытные группы подвергали непрерывному круглосуточному воздействию ультразвуковых волн в диапазоне 20-45 кГц в течение 1, 2 или 3 недель. Контрольные группы использовались для изучения вклада индивидуального содержания; входившие в них животные содержались в отдельных клетках в течение 1, 2 либо 3 недель в условиях, идентичных условию содержания опытных групп за исключением ультразвукового воздействия. В группе интактных животных крысы содержались в стандартных условиях по 5 особей в клетках размерами 55x35x20см. Каждая группа состояла из 10 особей. Животных не подвергали никаким иным потенциально стрессовым воздействиям, прежде они не участвовали в других экспериментах. Было задействовано две когорты животных. Первая когорта подвергалась тесту на ангедонию, тесту социального взаимодействия, тестам «открытое поле», «распознавание объекта» и выработке условной реакции пассивного избегания; позднее их биологический материал был использован для проведения ПЦР «в реальном времени» и иммуноферментных анализов для определения содержания BDNF в головном мозге и кортикостерона в плазме крови. Вторая когорта

подвергалась тесту «вынужденного плавания», тестам «резидент-интродер», «темно-светлая камера», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «водный лабиринт Морриса»; их биологический материал был использован для проведения флуорометрического анализа для определения содержания маркеров окислительного стресса в головном мозге.

2.2. Ультразвуковое воздействие

Ультразвуковое воздействие в диапазоне 20-45 кГц проводили с помощью УЗ-генератора (Wietech, Бельгия); уровень звукового давления на используемом в опыте расстоянии до клетки с животным, равном 1.5 м, составляло 50 ± 5 Дб. Соответствующие группы подвергались воздействию ультразвуковых частот в течение 1, 2 либо 3 недель. Диапазон ультразвукового воздействия чередовался между следующими интервалами: короткие частоты (20-25 кГц), средние частоты (25-40 кГц), высокие частоты (40-45 кГц) каждые 10 минут. Суммарная продолжительность действия излучения на коротких и средних частотах составляла 35%, на высоких частотах - 30%. Местоположение клеток менялось каждые три дня.

2.3. Поведенческое тестирование

Через сутки после окончания ультразвуковой экспозиции проводили поведенческое тестирование. В целом, проведенные тесты можно разделить на несколько подгрупп.

А) Тесты на определение депрессивно-подобного состояния:

Тест на предпочтение раствора сахарозы

Данный тест широко используется для определения депрессивно-подобного состояния грызунов. Известно, что наличие ангедонии означает снижение способности получать удовольствие. У грызунов данное состояние выражается в том числе в снижении предпочтения к раствору сахара, поскольку в норме грызуны предпочитают потреблять подслащенный раствор,

в то время как при наличии депрессивно-подобного состояния это предпочтение снижается или отсутствует.

Для приучения животных к подслащенной воде в первые сутки тестирования им предъявляли поилки с раствором сахарозы (2%) на 2 часа в вечернее время (с 19:00). В течение 24 часов крысам одновременно был предоставлен доступ к выбору между двумя идентичными поилками, одна из которых содержала 1%-ый раствор сахарозы, а другая — обычную воду. Расположение поилок менялось через 12 часов, чтобы исключить эффект предпочтения места. Предпочтение раствора сахарозы вычисляли по следующей формуле: $\text{Предпочтение} = (\text{масса раствора сахарозы} / \text{суммарная масса потребленной жидкости}) \times 100\%$. Потребление воды и раствора сахарозы было оценено путем взвешивания поилок до и после окончания эксперимента. Данный тест был также проведен до начала эксперимента при распределении животных по группам.

Тест «вынужденного плавания» по Порсолту

В данном тесте крысу помещали в стеклянный цилиндр высотой 45 см и диаметром 20 см, на 30 см заполненный водой, температура которой составляла 24⁰С. После 2 минут адаптации в течение 6 минут регистрировали суммарную длительность иммобильности (отсутствия направленных движений) и длительность активного плавания, а также число ныряний.

Б) Тесты на социальное взаимодействие:

Тест социального взаимодействия

В домашнюю клетку тестируемого животного на 10 минут помещали ювенильного самца крыс линии Sprague-Dawley (возрастом 4-5 недель). Регистрировали суммарное время социальных (обнюхивание партнера, груминг и следование) контактов между экспериментальными животными, их суммарное число, а также латентный период первой атаки. Помимо этого, регистрировались акты агрессивного поведения (Vishnivetskaya et al., 2007).

Тест «резидент-интродер»

Данный тест предназначен для измерения уровня межсамцовой агрессии (Koolhaas et al., 2013). В домашнюю клетку с тестируемым животным помещали незнакомого ему половозрелого самца беспородных крыс сходного веса и возраста. В течение 10 минут регистрировали число и суммарную длительность агрессивных контактов, инициированных резидентом, а также латентный период первой атаки. В каждой группе также подсчитывался процент животных, демонстрировавших признаки агрессии. Также регистрировали суммарное время и число социальных контактов между животными и латентный период первой атаки.

В) Тесты на определение уровня тревожности:

Тест «открытое поле»

Крысу помещали в камеру из серого пластика размером 45х45х40 см, разделенную на периферические и центральные сектора. В течение 5 минут регистрировали суммарное время нахождения крысы в центральных и периферических секторах при освещенности в 25 люкс. Для грызунов естественна боязнь открытых пространств, и нахождение в центральном отсеке установки может являться показателем сниженного уровня тревожности, и наоборот – постоянное нахождение животного только в периферических отсеках (тигмотаксис) можно расценивать как показатель повышенной тревожности. Также в данном тесте измерялось число совершенных стоек, что является показателем исследовательской активности, и число пересеченных секторов – показатель горизонтальной активности. Наконец, регистрировалось число и суммарная длительность актов замирания, показателя тревожности, и актов груминга, специфической поведенческой реакции грызунов на стресс (Ахмадеев и др., 2015). По окончании теста подсчитывалось число болюсов дефекации, показателя вегетативной реакции на стресс (Демянко и др., 2019).

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Крысу помещали в установку, состоящую из двух закрытых (высота стенок 29 см) и двух открытых (высота бортиков 0.5 см) рукавов размерами 45х14 см с центральной площадкой размером 14х14, размещенной на высоте 100 см от пола. Тестируемое животное помещали в центр установки головой к открытому рукаву и в течение 5 минут регистрировали время нахождения в закрытых и открытых рукавах, число совершенных стоек, выглядываний из закрытых рукавов в открытые рукава лабиринта и свешиваний с открытых рукавов.

Тест «Темно-светлая камера»

Крысу помещали в установку, состоящую из двух отсеков размерами 30х30х32 см. Один отсек был затемнен, второй – ярко освещен. В течение 5 минут регистрировали суммарное время нахождения животного в светлом отсеке, число стоек, совершенных в светлом отсеке, и число выглядываний из темного отсека.

Г) Тесты на обучение и память:

Тест распознавания нового объекта

Данный тест проводили в камере «открытое поле» размером 45х45х40 см. Тест проводили в три этапа, разделенные интервалом в 24 часа. Каждый этап длился 5 минут. В первый день использовали установку без объектов, чтобы обеспечить адаптацию животного. Во второй день в установку помещали два одинаковых цилиндрических объекта и регистрировали время обнюхивания животным каждого из них. В норме оба объекта являются равнозначными для животного, поэтому время их исследования не должно значительно различаться. В третий день один из объектов заменили на новый, другой формы и текстуры. Затем вычисляли индекс распознавания, используя следующую формулу: $(T_n - T_z / T_n + T_z) * 100\%$, где T_n – время исследования «нового» объекта, а T_z – время исследования «знакомомого» объекта во время

третьей сессии. Индекс позволяет оценить степень запоминания животным старого объекта и распознавания нового.

Условная реакция пассивного избегания

Данный тест используется для оценки запоминания грызунами контекста получения болевого стимула. Его выработку проводили в камере размером 40x30x36 см, разделенной на два равных отсека перегородкой с отверстием 8x8 см. Один из отсеков освещался, второй был затемнен. В ходе обучения крыс помещали в светлый отсек и фиксировали время перехода в темный. Как только все четыре лапы животного оказывались в темной половине камеры, ему наносили однократный удар тока через прутья пола (сила тока – 1 мА, длительность удара – 3 с), после чего тест прекращали. Повторные тестирования проводили через 48 часов и 7 дней после обучения, во время которых крысу помещали в светлый отсек и фиксировали время перехода животного в темный отсек. Тестирования заканчивались в момент перехода или через 5 минут.

Водный лабиринт Морриса

Данный тест предназначен для исследования пространственной памяти у животных. Он проводился в бассейне из полипропилена серого цвета со следующими параметрами: диаметр арены – 150 см, высота стенок – 60 см. В бассейне на 2-3 см ниже уровня воды размещалась платформа диаметром 10 см. Крысы запускались в воду в случайном месте, регистрировался латентный период нахождения ими платформы. Давалось 8 попыток, разделенных интервалом в 10 минут. Через 48 часов проводилась контрольная попытка, в которой также регистрировался латентный период нахождения платформы. Через 7 дней после обучения платформа убиралась из установки, и животное помещалось в бассейн на 5 минут, в течение которых регистрировалось время, проводимое животным в секторе, где ранее находилась платформа.

Поведение животных во всех тестах регистрировали с помощью цифровой видеокамеры и анализировали, используя компьютерную программу RealTimer («Открытая наука», Россия).

2.4. Диссекция

Через сутки после окончания тестирования животных глубоко наркотизировали (5% р-р кетамина, 200 мг/кг, внутривенно), затем проводили декапитацию, извлекали головной мозг и на холодной подложке выделяли гиппокамп, префронтальную кору, средний мозг и миндалину. Части структур помещали в раствор RNA later (Qiagen, Германия) и хранили при +4°C до выделения тотальной РНК (не более 10 дней). Оставшиеся ткани немедленно замораживали при температуре -80°C для дальнейшего иммуноферментного или флуориметрического анализа. После декапитации также проводился забор крови в пробирки с добавлением гепарина. Забранную кровь откручивали на центрифуге в течение 15 минут на скорости 1000 оборотов в минуту. Отобранную плазму замораживали при температуре -80°C для последующего иммуноферментного анализа.

2.5. ПЦР «в реальном времени»

Относительную экспрессию всех исследуемых генов измеряли в гиппокампе, префронтальной коре, среднем мозге и миндалине. Гомогенизацию образцов производили при помощи добавления 1 мл TRIzol Reagent, металлического шарика из нержавеющей стали диаметром 7 мм в приборе Tissue Liser LT (QIAGEN, Германия) в течение 3 минут с частотой 50 Гц. Затем выделение тотальной РНК из ткани проводили с помощью TRI REAGENT (MRC, США) по протоколу производителя. Концентрацию тотальной РНК в полученных образцах измеряли с помощью спектрофотометра Nanovue Plus (GE Healthcare, США).

Для проверки наличия РНК искомым образцам в пробе проводили электрофорез. Использовался агарозный гель (Agarose, SIGMA, Китай) с добавлением бромистого этидия, разведенный в трисцетатным буфером (ТАЕ буфер, Евроген, Россия). В гель вносили 10 мкл маркера (ThermoFisher Scientific, США) и образца из расчета 1000-1500 нг на трек, смешанного с 4

мкл красителя (DNA GelLoadingDye (6X), ThermoFisher Scientific, США). Использовали прибор PowerPac (Bio-Rad, США).

Далее проводили ДНКазную обработку: к образцам добавляли ДНКазу с буфером, содержащим $MgCl_2$ (ThermoFisher Scientific, США), после чего инкубировали в течение 30 минут при температуре $37^{\circ}C$. Затем добавляли 1 мкл ЭДТА и инкубировали при температуре $65^{\circ}C$ в течение 10 минут.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Для проведения реакции смесь (4 мкл 5X буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл Random primer, 2 мкл DTT, 2 мкл dNTP, 1 мкл MMLV ревертазы, 1 мкл образца РНК) 1 час инкубировали при температуре $37^{\circ}C$, после чего еще в течение 3 минут смесь инкубировали $70^{\circ}C$ и инкубировали 3 минуты. Полученные образцы кДНК хранились при $-20^{\circ}C$.

ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора StepOnePlus (AppliedBiosystems, ThermoFisher Scientific, США). Для исследования были выбраны гены *BDNF*, *GABRA1*, *GABRA2*, *GABRA3* и *GABRB2*, а в качестве референсного гена – ген *GAPDH*. Референсный ген был выбран на основе предыдущих публикаций, посвященных исследованию генной экспрессии мозга экспериментальных животных, подвергающихся хроническому ультразвуковому воздействию (Morozova et al., 2016; Pavlov et al., 2019), в которых была продемонстрирована высокая стабильность экспрессии данного гена в лимбических структурах мозга. Последовательности праймеров, представленные в таблице 1, были получены с использованием программы BeaconDesigner 7 (Premier Biosoft International, США) и синтезированы в компании "ЕВРОГЕН" (Россия). Перед постановкой ПЦР в реальном времени кДНК разводили в 5 раз до концентрации 200 нг/мкл. Для каждого праймера измерялась эффективность ПЦР, составившая 95-98%. ПЦР в реальном времени проводили с использованием с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, США) при следующих условиях: первичная

денатурации при температуре 95°C в течение 4 минут, денатурация – при температуре 95 °C в течение 20 секунд, отжиг и элонгация – при температуре 62°C в течение 1 минуты 30 секунд. Все реакции повторялись в течение 40 циклов. Реакцию осуществляли в объеме 10 мкл, используя 1 мкл исследуемой кДНК. При каждом исследовании реакцию ставили в трех повторах. Эксперимент проводили в двух повторах. Относительный уровень экспрессии целевых генов рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SEM$ (Livak, Schmittgen, 2001). Значение порогового цикла (Ct) соответствует относительному количеству целевой РНК. Уровень экспрессии генов опытных групп сравнивался с уровнем их экспрессии группы контроля.

Таблица 1. Последовательности праймеров для исследуемых генов

Праймер	Последовательность
<i>BDNF</i>	
-forward	ATGGGTACACGAAGGAAGG
-reverse	CCGAACATACGATTGGGTAGT
<i>GABRA1</i>	
-forward	GACAAGCCCGTGATGAAGAAA
-reverse	TCCTCGTGAAGACAGTGGTG
<i>GABRA2</i>	
-forward	CTGAAGTCTCCACCAACATCTAT
-reverse	AACCGCTCGTCTTTCCATTT
<i>GABRA3</i>	
-forward	TGCCATATTCAATCTTGTCTATT
-reverse	TGCTGCCACTATTATCTACT
<i>GABRB2</i>	
-forward	CCACAATCAATACCCATCTCC
-reverse	GCCATAAAGACAAAGACAAAGC
<i>GAPDH</i>	
-forward	AAACCCATCACCATCTTCCA
-reverse	GTAGACTCCACGACATACTCAG

2.6. Флуорометрический анализ

Определение содержания карбонилированных белков

Содержание окисленных белков измеряли в гиппокампе и префронтальной коре. Данный показатель измерялся с использованием набора для флуорометрического анализа OxiSelect™ Protein Carbonyl Fluorometric Assay kit (CellBiolabs, Inc., США). Ткани были гомогенизированы с использованием гомогенизатора TissueRuptor II (Quiagen, Германия). Гомогенизация проводилась в 1 мл буфера, предоставленного в наборе, после чего раствор был отцентрифугирован на скорости в 10000g в течение 5 минут при 4°C, после чего был отобран супернатант, и тотальная концентрация карбонила белка согласно инструкции производителя с использованием флуоресцентного ридера GloMax Multi Detection System (Promega, Madison, WI, США), оборудованного флуоресцентным модулем 485/540 нм. Каждая проба была поставлена в дубликатах.

Определение содержания общего глутатиона

Содержание общего глутатиона измеряли в гиппокампе и префронтальной коре. Этот маркер окислительного стресса исследовали с использованием набора для флуорометрического анализа BioVision™ Glutathione Fluorometric Assay Kit (BioVision, Inc., США). 10 мг каждого образца было гомогенизировано с использованием гомогенизатора TissueRuptor II (Quiagen, Германия) в 100 мкл ледяного буфера, предоставленного в наборе, и концентрация общего глутатиона была определена согласно инструкции производителя с использованием флуоресцентного ридера GloMax Multi Detection System (Promega, Madison, США), оборудованного флуоресцентным модулем 340/420 нм. Каждая проба была поставлена в дубликатах.

2.7. Иммуноферментный анализ

Анализ содержания BDNF

Данный анализ в гиппокампе и префронтальной коре животных проводили с использованием набора Rat BDNF ELISA kit (RayBiotech, Norcross, США). Каждый образец был гомогенизирован с использованием гомогенизатора TissueRuptor II (Quiagen, Германия) в RIPA-буфере (ThermoFisher Scientific, США) и исследован согласно инструкции производителя с использованием планшетного ридера Anthos Reader 2020. Каждая проба была поставлена в дубликатах.

Анализ содержания кортикостерона

Кортикостерон измеряли в плазме крови животных при помощи набора Corticosterone ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, Вашингтон, США). Каждый образец был гомогенизирован с использованием гомогенизатора TissueRuptor II (Quiagen, Германия) в RIPA-буфере (ThermoFisher Scientific, США) и использованы согласно инструкции производителя с использованием планшетного ридера Anthos Reader 2020. Каждая проба была поставлена в дубликатах.

2.8. Статистика

Данные по измерению показателей поведения выражали как среднее $\pm$ ошибка среднего. Предварительно был проведен тест Колмогорова-Смирнова. В случае, если он не отрицал нормального распределения данных, при статистической обработке использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим post hoc анализом Tukey's test. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$. В случае, если результаты теста Колмогорова-Смирнова отрицали нормальность распределения, использовался Kruskal-Wallis test с последующим множественным сравнением Dunn's test. Для статистического анализа использовалась программа GraphPad Prism версии 6.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние ультразвукового воздействия на потребление крысами сахарозы

Тест на предпочтение сахарозы рядом исследователей считается наиболее точным тестом на определение депрессивно-подобного состояния грызунов. В нашей работе данный тест проводился дважды, первый раз – до начала ультразвукового воздействия, чтобы исключить случайное попадание в одну будущую экспериментальную группу особей с более выраженными депрессивно-подобными чертами. Так, было показано, что до начала эксперимента не наблюдалось статистически значимых различий в предпочтении сахарозы между группами ($F_{6,63}=0.12$, $p=0.96$, one-way ANOVA, рис. 1А), что означает равномерность распределения животных по данному показателю.

По окончании ультразвукового воздействия наблюдалось статистически значимые различия между группами в предпочтении подслащенного раствора ($F_{6,63}=8.08$, $p=0.002$, one-way ANOVA). А именно, снижение предпочтения раствора сахарозы относительно простой воды проявилось через 2 недели стрессового воздействия ($p=0.0313$ vs интактная группа и $p=0.0455$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и сохранилось спустя 3 недели воздействия ($p=0.0046$ vs интактная группа и $p=0.0489$ vs контроль, Tukey's test; рис. 1Б).

Кроме того, не было обнаружено статистически значимой разницы между группами ($F_{6,63}=0.96$, $p=0.191$, one-way ANOVA; рис. 1В) в суммарном объеме потребленной жидкости.

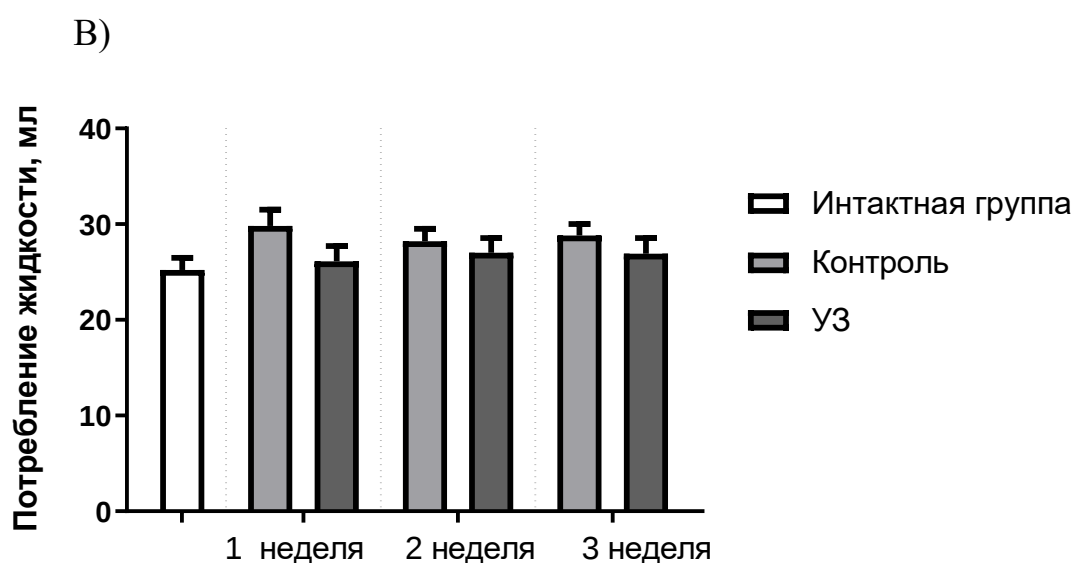
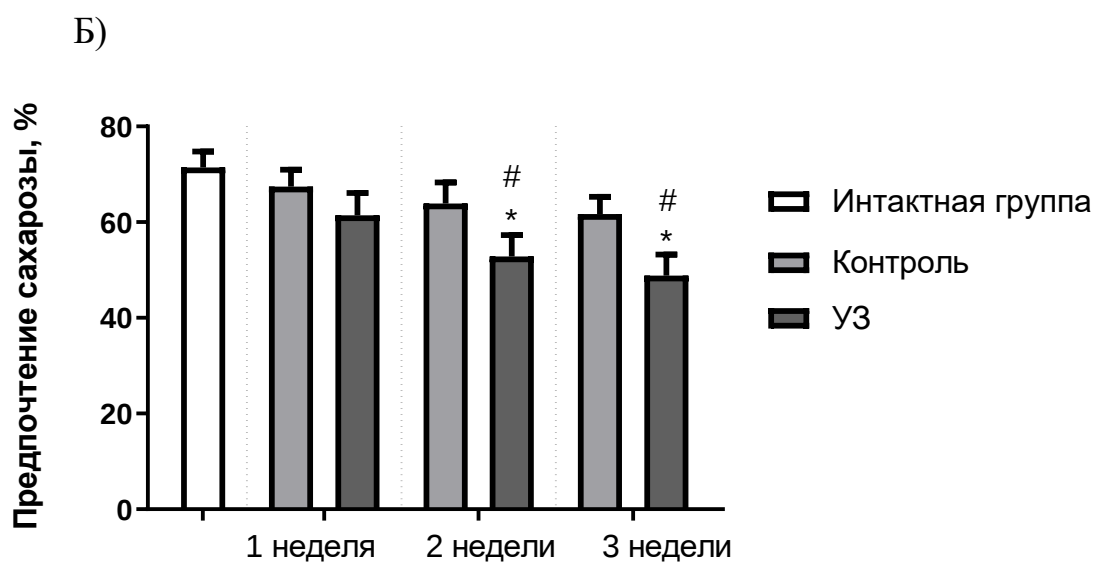
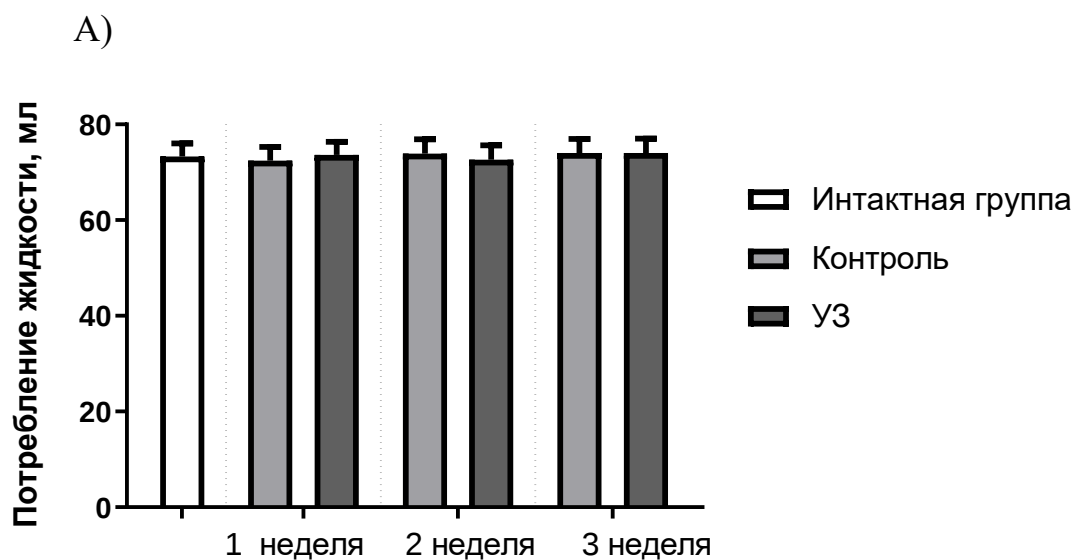


Рисунок 1. Результаты теста на предпочтение сахарозы до и после ультразвукового воздействия. (А) Предпочтение раствора сахарозы до начала эксперимента. (Б) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на предпочтение раствора сахарозы. (В) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на суммарный объем потребленной жидкости. Данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

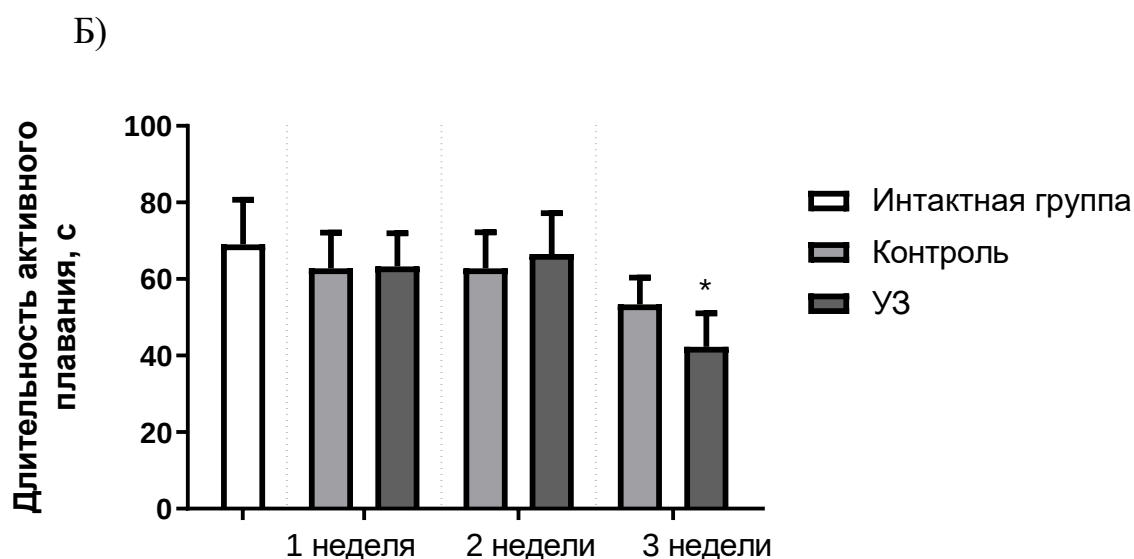
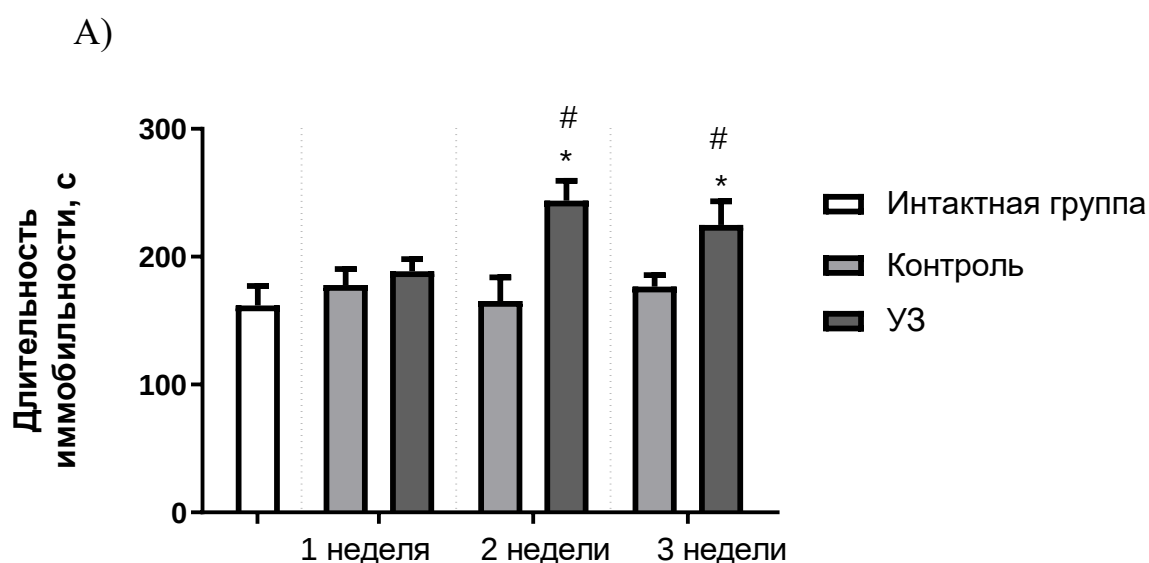
Таким образом, 2 недели УЗ приводят к развитию ангедонии у крыс, что является широко известным и надежным критерием наличия у экспериментальных животных депрессивно-подобного состояния. При этом индивидуальное содержание животных само по себе не внесло вклад в снижение предпочтения сахара. Хроническое ультразвуковое воздействие также не повлияло на средний суточный объем потребляемой жидкости, что означает, что наблюдаемые эффекты были связаны не с колебаниями объема выпитого, а именно со снижением способности получать удовольствие (в данном случае, от подслащенной воды).

3.2. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте вынужденного плавания

Иммобильность крыс в данном тесте может рассматриваться как показатель «поведения отчаяния», то есть отказа от борьбы с обстоятельствами - пассивного поведения, свойственного как животным с депрессивно-подобным состоянием, так и человеку с диагностированной клинической депрессией. В нашей работе также регистрировались длительность активного плавания животных и ныряний.

Нами была зарегистрирована статистически значимая разница между группами в длительности иммобильности ($F_{6,63}=11.04$, $p=0.0044$, one-way ANOVA) и суммарной длительности активного плавания ($F_{6,63}=7.54$, $p=0.017$, one-way ANOVA). Увеличение длительности иммобильности животных было

зарегистрировано через 2 недели ультразвукового воздействия ($p=0.024$ vs интактная группа и $p=0.035$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и через 3 недели УЗ ($p=0.014$ vs интактная группа и $p=0.020$ vs контроль, Tukey's test; рис. 2А), в то время как снижение длительности активного плавания наблюдалось только у группы, подвергавшейся ультразвуковому воздействию в течение 3 недель ($p=0.018$ vs интактная группа, Tukey's test; рис. 2Б). При этом не было зарегистрировано статистически значимых различий между группами в числе ныряний ($F_{6,63}=1.76$, $p=0.065$, one-way ANOVA; рис. 2В).



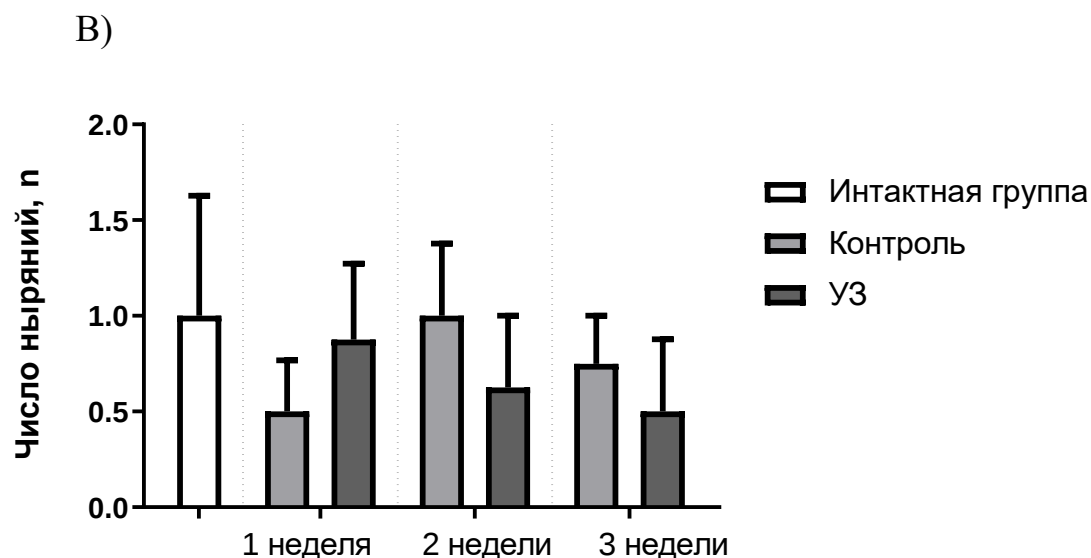


Рисунок 2. Ультразвуковое воздействию приводит к развитию депрессивно-подобного состояния крыс. (А) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на длительность иммобильности. (Б) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на длительность активного плавания крыс. (В) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на число ныряний. Данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Согласно этим результатам, 2 и 3 недели ультразвукового воздействия привели к повышению длительности иммобильности, то есть к развитию депрессивно-подобных черт поведения в тесте «вынужденного плавания»; индивидуальное содержание не внесло вклад в развитие наблюдаемых отклонений поведения. Группа, подвергавшаяся УЗ в течение 3 недель, также демонстрировала снижение длительности активного плавания. Следует отметить, что результаты этого теста соотносятся с результатами другого теста на определение депрессивно-подобного состояния грызунов – теста на ангедонию, что взаимно подкрепляет полученные данные.

3.3. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте социального взаимодействия

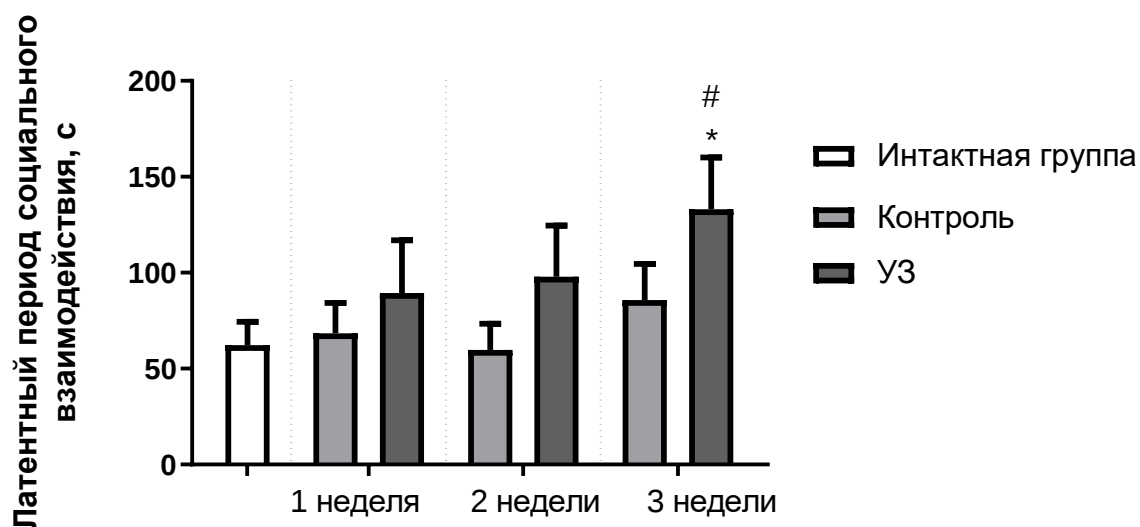
В тесте социального взаимодействия в домашнюю клетку экспериментального животного посещался ювенильный самец крысы той же линии, и регистрировались как социальные, так и агрессивные взаимодействия.

Нами была обнаружена статистически значимая разница между группами в латентном периоде социального взаимодействия ($F_{6,63}=4.92$, $p=0.047$, one-way ANOVA), а также в суммарной длительности социального взаимодействия ($F_{6,63}=7.03$, $p=0.021$, one-way ANOVA) и в числе социальных контактов ($F_{6,63}=6.21$, $p=0.028$, one-way ANOVA).

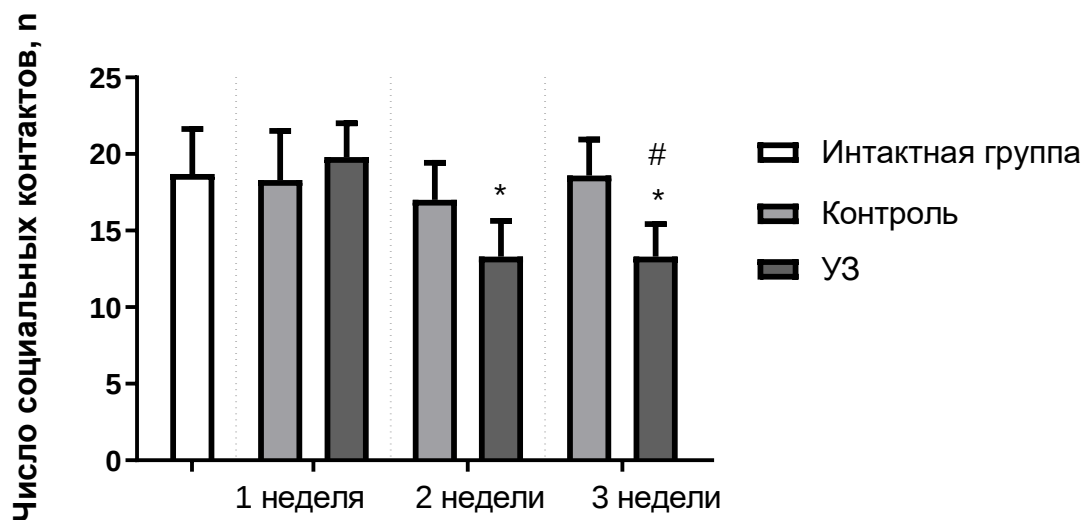
Увеличение латентного периода социального взаимодействия животных было зарегистрировано только через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.0423$ vs интактная группа и $p=0.045$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 3А). При этом снижение длительности социального взаимодействия животных наблюдалось как после 1 недели ультразвукового воздействия ($p=0.0392$ vs интактная группа и $p=0.0466$ vs контроль, post hoc Tukey's test), так и после 2 недель ($p=0.022$ vs интактная группа и $p=0.019$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и 3 недель хронического ультразвукового воздействия ($p=0.003$ vs интактная группа и $p=0.011$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 3Б). Наконец, снижение числа социальных контактов наблюдалось после 2 недель ($p=0.019$ vs интактная группа, post hoc Tukey's test) и после 3 недель ультразвукового воздействия ($p=0.017$ vs интактная группа и $p=0.008$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 3В).

Важно отметить, что ни один из рассматриваемых показателей значимо не изменился под влиянием социальной изоляции длительностью до 3 недель, что указывает на то, что изолированное содержание соответствующей продолжительности само по себе не влияло на нарушение социального поведения экспериментальных животных.

А)



Б)



В)

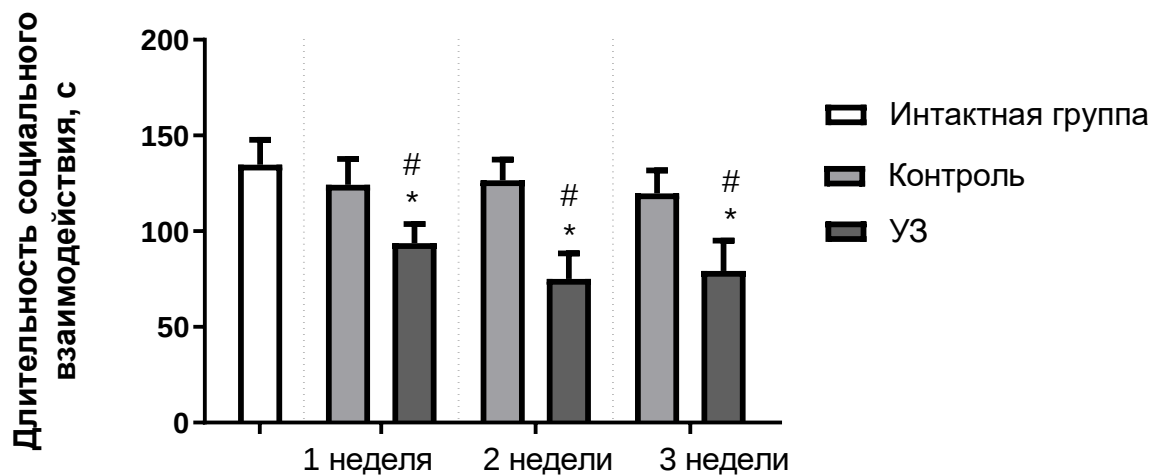


Рисунок 3. Влияние ультразвукового воздействия на социальное поведение крыс. (А) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на латентный период социального взаимодействия. (Б) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на число социальных контактов с ювенильными самцами. (В) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на суммарную длительность социальных контактов крыс с ювенильными самцами. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

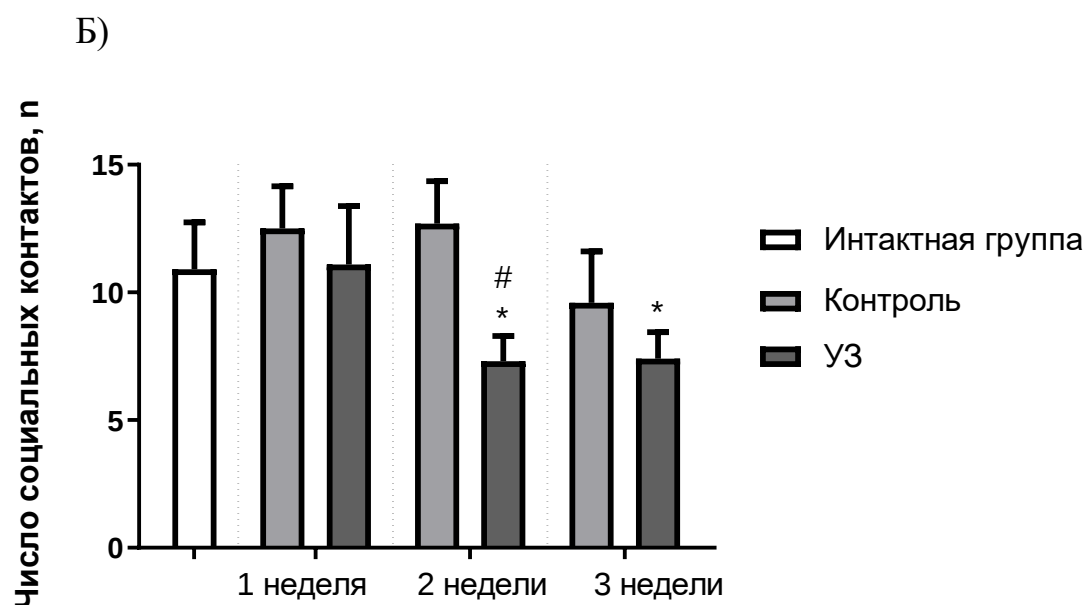
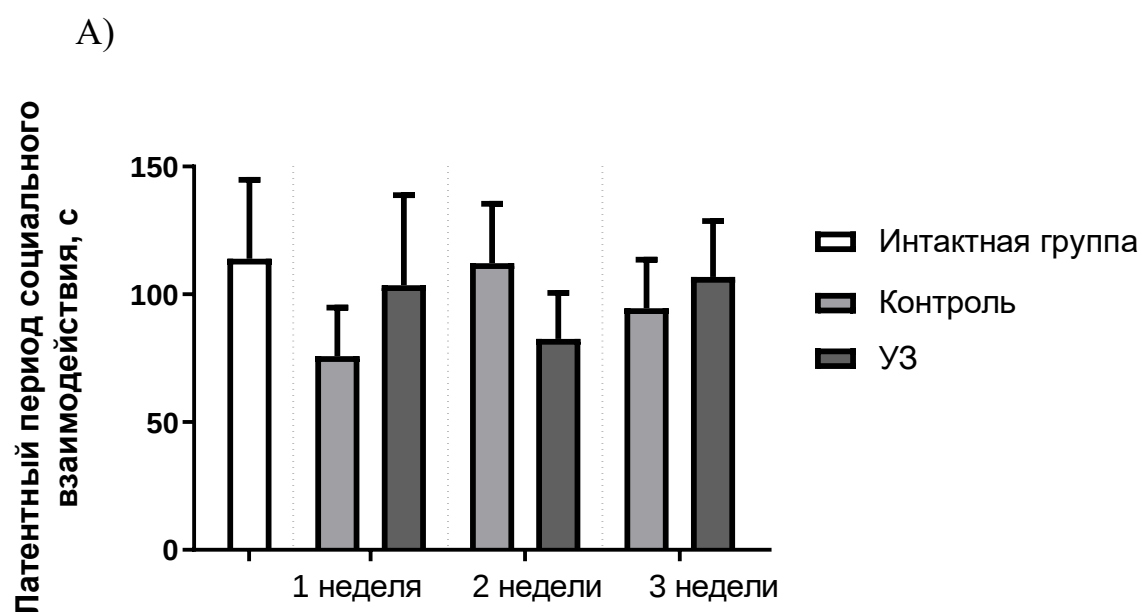
Согласно полученным данным, ультразвуковое воздействие привело к снижению социальной активности экспериментальных животных, при этом снижение длительности социальных взаимодействий было зарегистрировано у группы, подвергавшейся УЗ в течение 1 недели. Следует отметить, что ни в одной из тестируемых групп не было зарегистрировано агрессивных контактов с ювенильным самцом, что говорит об отсутствии патологической агрессии у экспериментальных животных, поскольку в норме половозрелые самцы крыс демонстрируют агрессивное поведение по отношению к другим половозрелым самцам, но не ювенильным особям.

3.4. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «резидент-интродер»

В отличие от теста социального взаимодействия, в тесте «резидент-интродер» в домашнюю клетку экспериментального животного помещались не ювенильные, а половозрелые самцы. Вновь регистрировались как социальные, так и агрессивные контакты.

Не было обнаружено статистически значимой разницы между группами в латентном периоде социального взаимодействия ($F_{6,63}=1.56$, $p=0.35$, one-way ANOVA; рис. 4А). При этом значимая разница между группами была зарегистрирована в длительности социальных контактов ($F_{6,63}=7.03$, $p=0.018$,

one-way ANOVA) и их числе ($F_{6,63}=7.99$ $p=0.013$, one-way ANOVA). А именно, 2 недели ($p=0.004$ vs интактная группа и $p=0.024$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.021$ vs интактная группа, post hoc Tukey's test; рис. 4Б) привели к статистически значимому снижению числу социальных контактов. 2 и 3 недели ультразвукового воздействия также привели к статистически значимому снижению длительности социальных контактов ($p=0.009$ vs интактная группа и $p=0.042$ vs контроль; $p=0.022$ vs интактная группа и $p=0.037$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 4В).



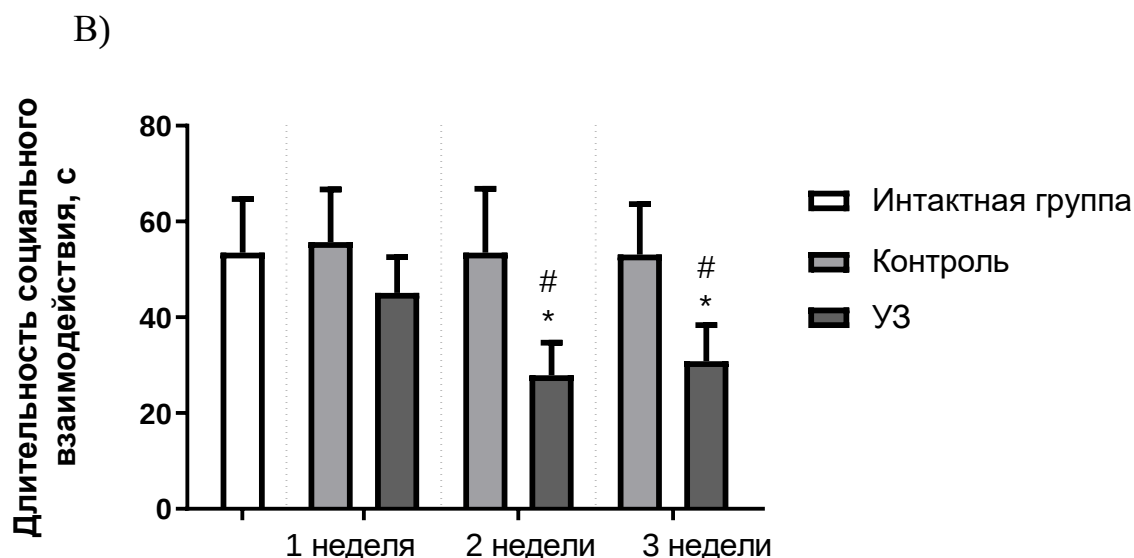


Рисунок 4. Влияние ультразвукового воздействия на социальное поведение крыс в тесте «резидент-интродер». (А) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на латентный период первого социального контакта. (Б) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на число социальных контактов. (В) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на длительность социальных контактов в тесте «резидент-интродер». Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Таким образом, 2 и 3 недели УЗ снизили социальную активность крыс в данном тесте, то есть изменение параметров, характеризующих социальное поведение животных, оказалось равнонаправленным в тестах социального взаимодействия с ювенильным самцом и тесте «резидент-интродер» с половозрелым самцом. Однако главной целью теста «резидент-интродер» была попытка изучить возможное изменение уровня межсамцовой агрессии экспериментальных животных.

Для этого, в первую очередь, был подсчитан процент крыс, демонстрировавших признаки агрессии. Было установлено, что он не

отличался значимо ни в одной из опытных групп относительно группы контроля (Таблица 2).

Таблица 2. Процент крыс, демонстрирующих агрессию в тесте «Резидент-интродер»

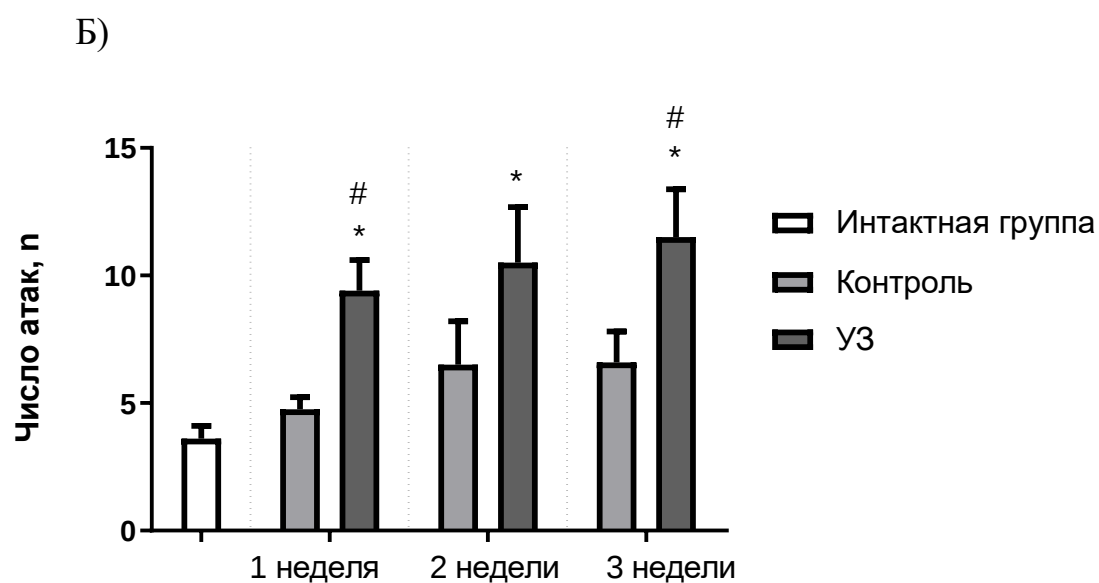
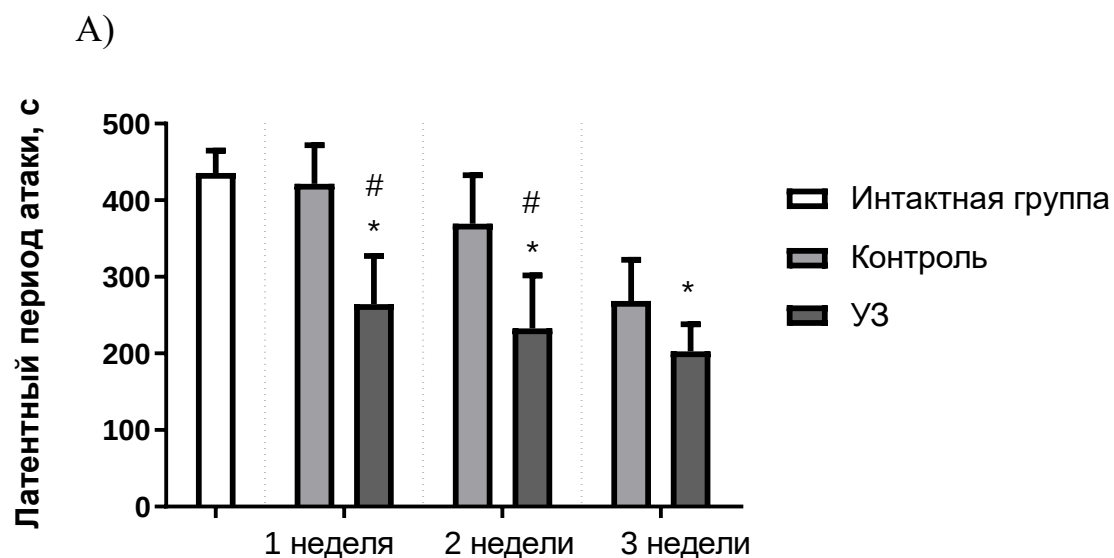
Группа	% агрессивных крыс
Контроль	50
1 неделя изоляции	40
1 неделя УЗ	50
2 недели изоляции	40
2 недели УЗ	40
3 недели изоляции	50
3 недели УЗ	60

Далее нами были рассмотрены показатели агрессивного поведения среди особей, демонстрировавших агрессию в данном тесте: суммарная длительность и суммарное число атак, а также латентный период первой атаки.

Так, была установлена статистически значимая разница между группами в латентном период первой атаки ($F_{6,26}=10.11$, $p=0.011$, one-way ANOVA, в числе атак ($F_{6,26}=12.01$, $p=0.009$, one-way ANOVA) и в длительности атак ($F_{6,26}=13.01$, $p=0.001$, one-way ANOVA).

Снижение латентного периода первой атаки резидента наблюдалось уже после 1 недели ($p=0.017$ vs интактная группа и $p=0.028$ vs контроль, post hoc Tukey's test), а также 2 недель ($p=0.0015$ vs интактная группа и $p=0.007$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и 3 недель ультразвукового воздействия ($p<0.001$ vs интактная группа, post hoc Tukey's test; рис. 5А). Увеличение числа агрессивных контактов также наблюдалось после 1 недели ($p=0.023$ vs

интактная группа и $p=0.021$ vs контроль, post hoc Tukey's test), 2 недели ($p=0.009$ vs интактная группа, post hoc Tukey's test) и 3 недели ультразвукового воздействия ($p<0.001$ vs интактная группа и $p=0.0024$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 5Б). Аналогично, увеличение длительности агрессивных контактов также наблюдалось после 1 недели ($p=0.035$ vs интактная группа и $p=0.038$ vs контроль, post hoc Tukey's test), 2 недели ($p=0.018$ vs интактная группа и $p=0.016$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.0023$ vs интактная группа и $p=0.009$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 5В).



В)

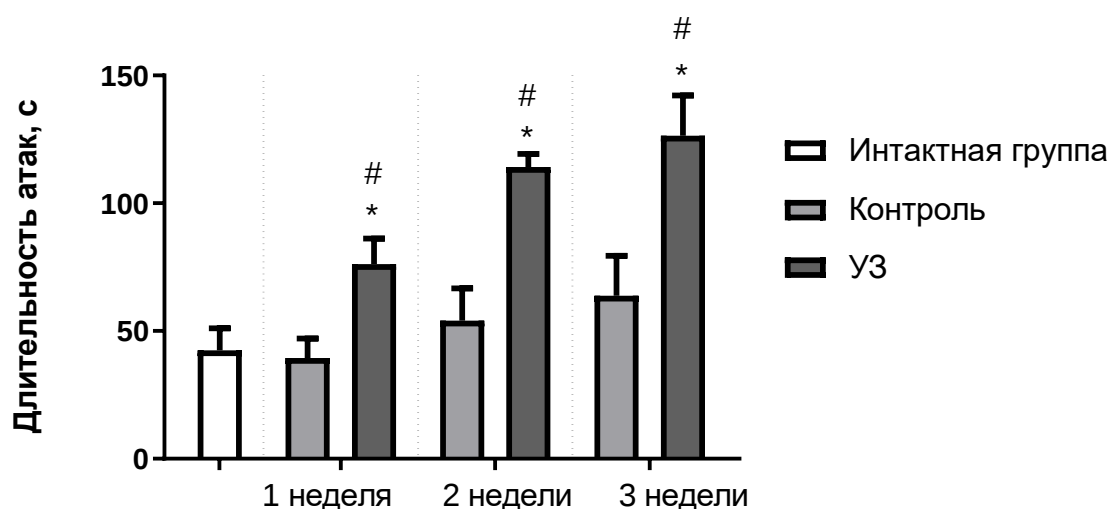


Рисунок 5. Влияние ультразвукового воздействия на агрессивное поведение крыс. (А) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на латентный период первой атаки. (Б) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на число агрессивных контактов. (В) Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на длительность агрессивного взаимодействия. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

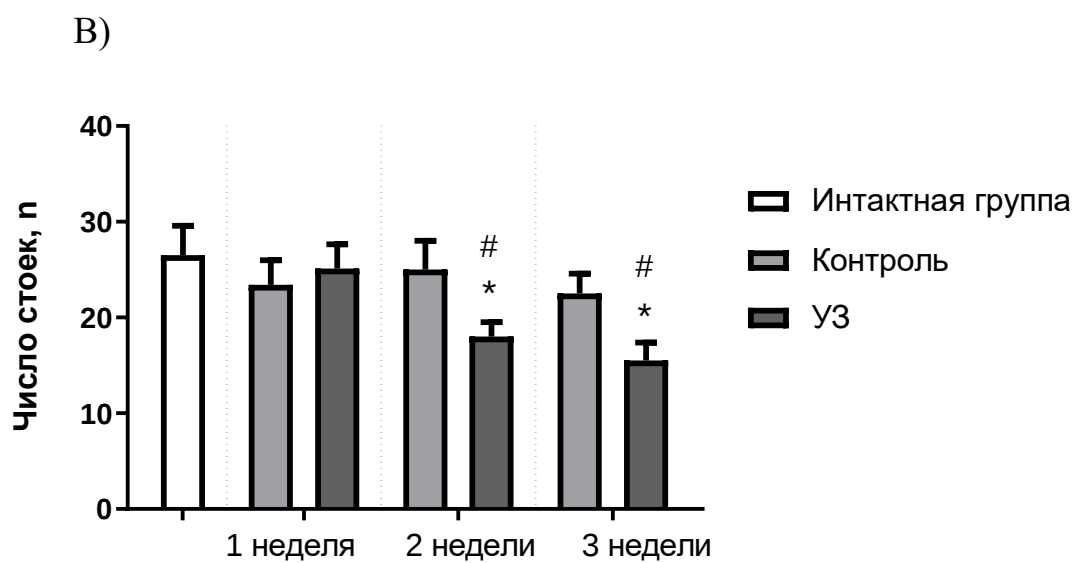
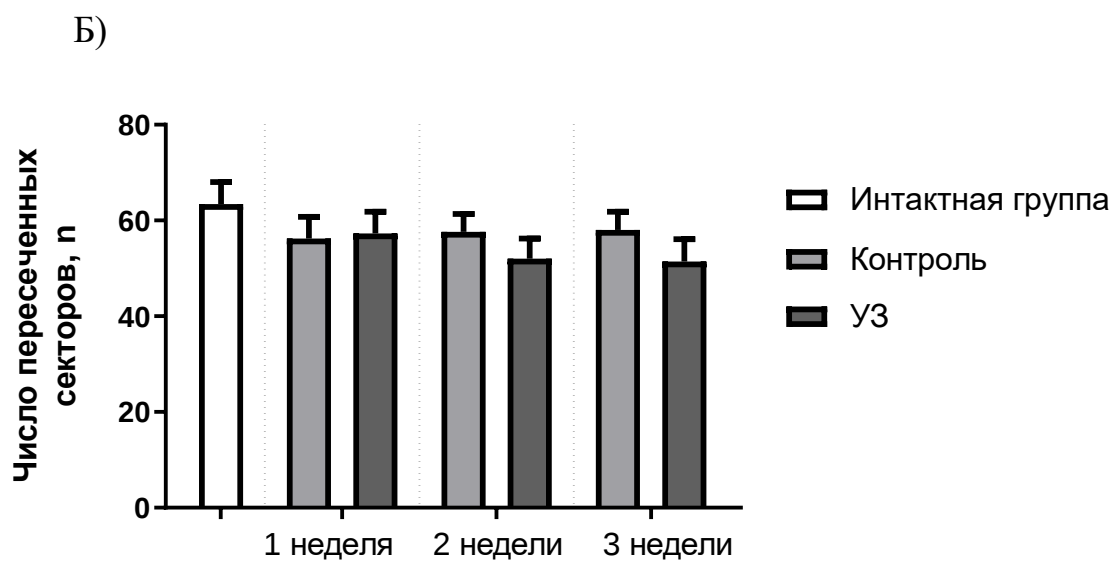
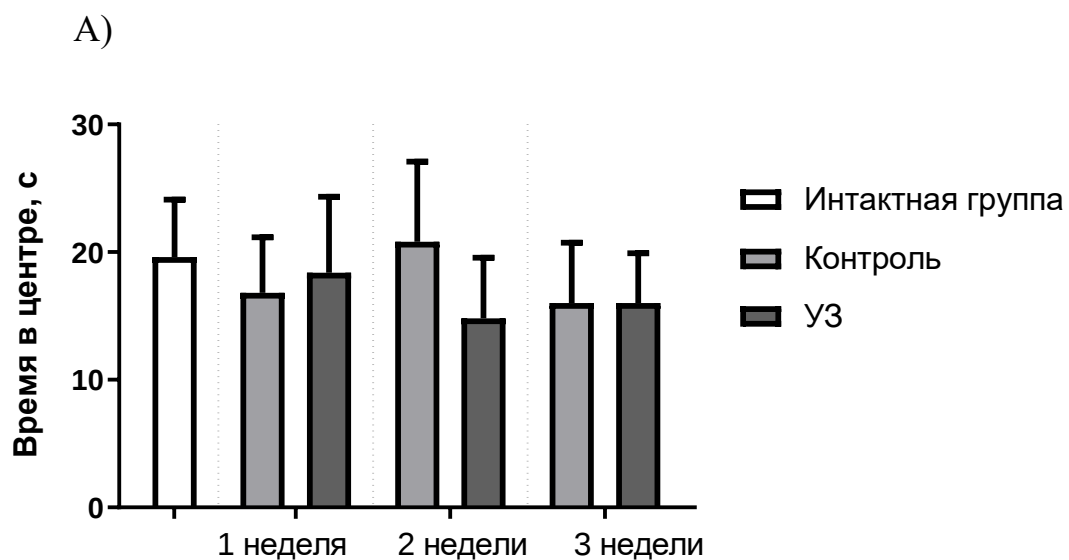
Таким образом, при отдельном рассмотрении параметров агрессивного поведения крыс, было показано, что все рассматриваемые показатели агрессии увеличились под влиянием УЗ длительностью 1 и более недель. Полученные результаты свидетельствует о том, что ультразвуковое воздействие нарушает социальное поведение крыс, одновременно увеличивая уровень их агрессии, однако повышение агрессивности наблюдалось примерно у половины экспериментальных животных.

3.5. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «открытое поле»

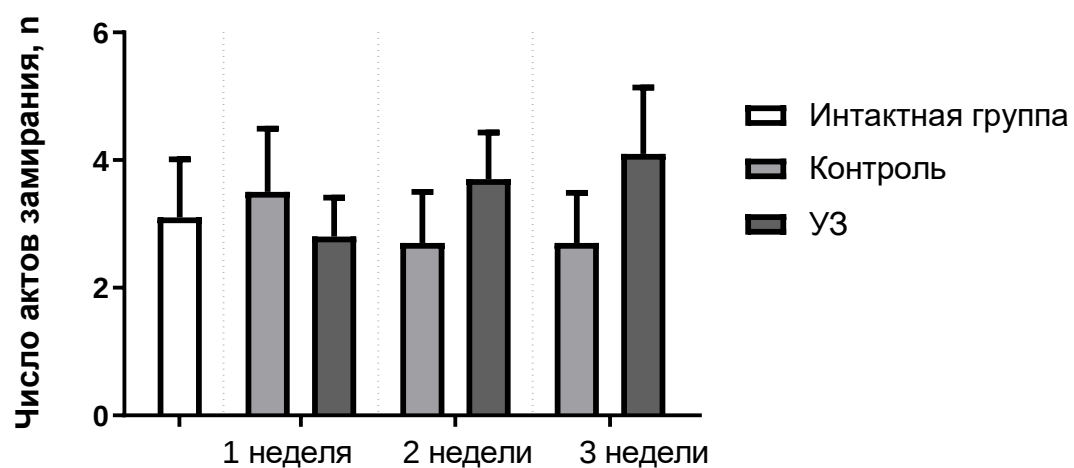
В тесте «открытое поле» не было обнаружено статистически значимой разницы между группами во времени, проведенном животными в центральном секторе ($F_{6,63}=1.11$, $p=0.087$, one-way ANOVA; рис. 6А), а также в числе пересеченных секторов ($F_{6,63}=0.05$, $p=0.866$, one-way ANOVA; рис. 6Б). Таким образом, воздействие ультразвука на уровень тревожности и горизонтальной активности в тесте «открытое поле» оказалось незначимым. При этом было зарегистрировано статистически значимое различие между группами в числе совершенных стоек, показателя исследовательской активности ($F_{6,63}=6.06$, $p=0.007$, one-way ANOVA). Снижение этого параметра наблюдалось у крыс, подвергавшихся воздействию ультразвука в течение 2 недель ($p=0.023$ vs интактная группа и $p=0.027$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и 3 недель ($p=0.017$ vs интактная группа и $p=0.019$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 6В).

Было проанализировано число и суммарная длительность актов замирания и груминга как дополнительных показателей уровня тревожности экспериментальных животных. Статистически значимая разница между группами проявилась только в суммарной длительности замираний ($F_{6,63}=4.98$, $p=0.039$, one-way ANOVA). Увеличение этого параметра проявилось спустя 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.017$ vs интактная группа и $p=0.025$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 6Д).

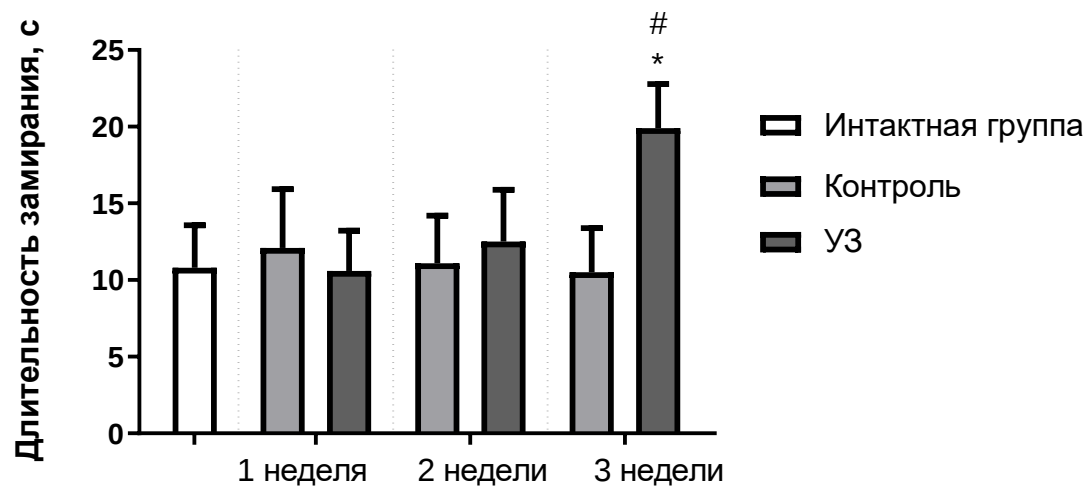
В то же время по результатам исследования не было обнаружено статистически значимой разницы между группами в числе актов замирания ($F_{6,63}=0.92$, $p=0.56$, one-way ANOVA; рис. 6Г), числе актов груминга ($F_{6,63}=1.14$, $p=0.59$, one-way ANOVA; рис. 6Е) и суммарной длительности груминга ($F_{6,63}=0.24$, $p=0.95$, one-way ANOVA; рис. 6Ж). Помимо этого, не было обнаружено статистически значимой разницы между группами в числе болюсов ($F_{6,63}=0.78$, $p=0.14$, one-way ANOVA; рис. 6З).



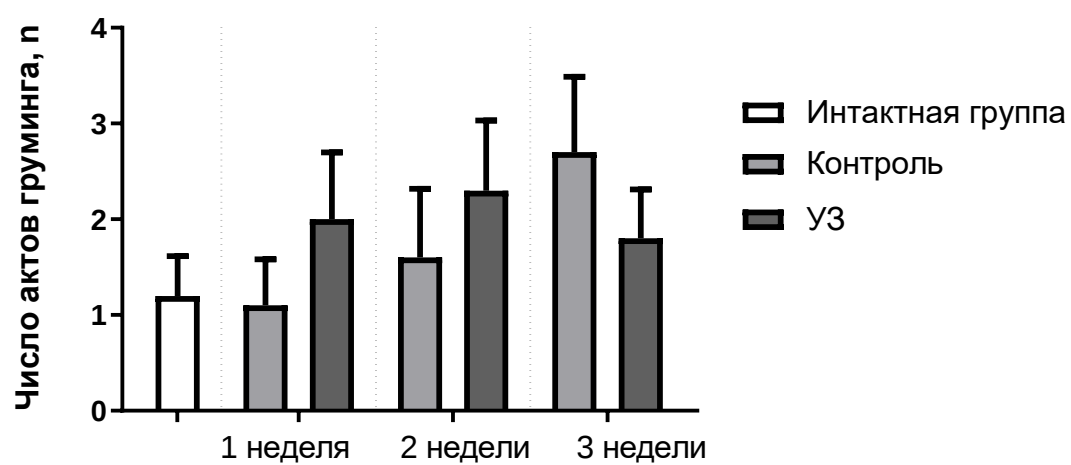
Г)



Д)



Е)



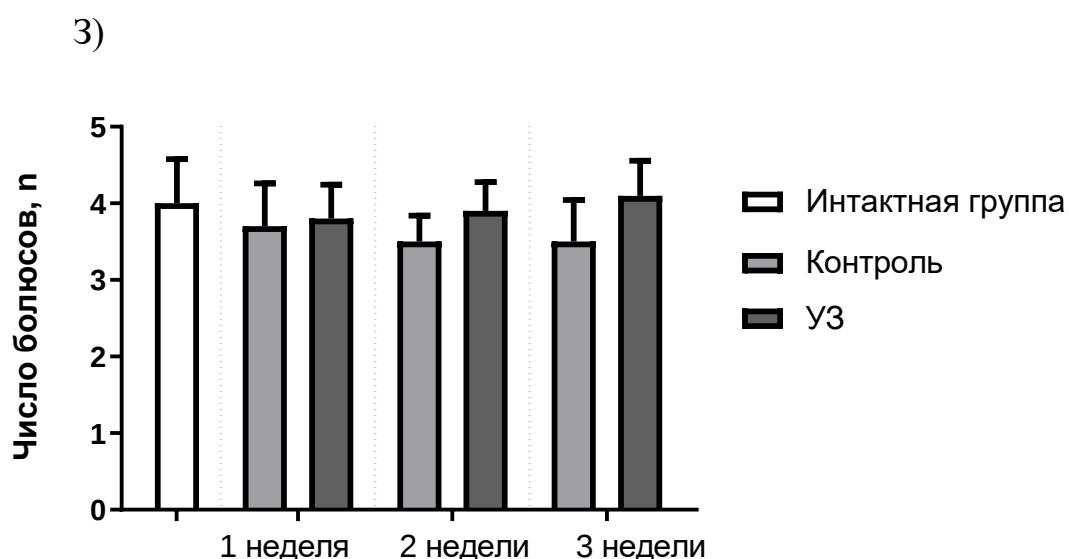
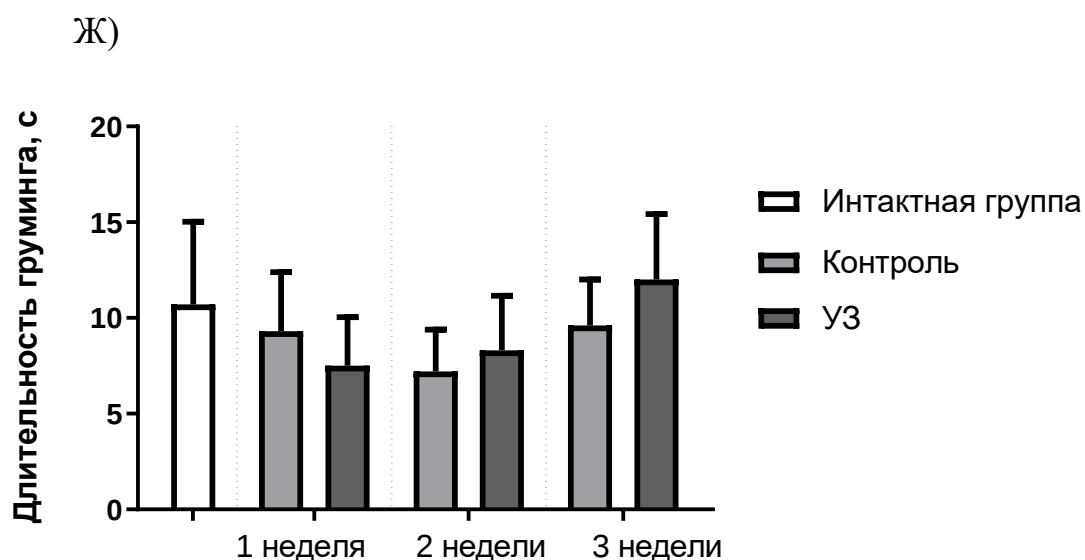


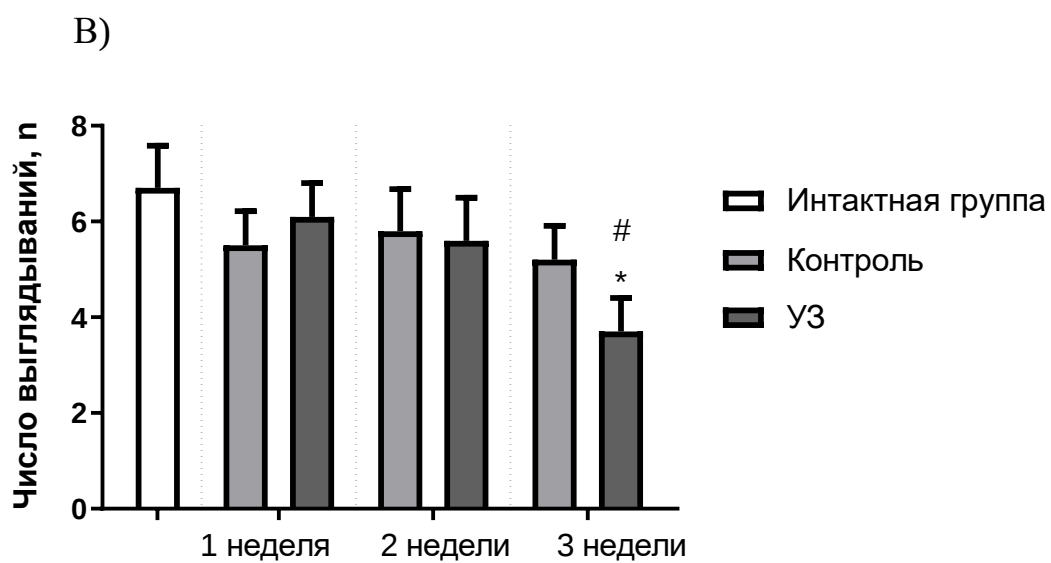
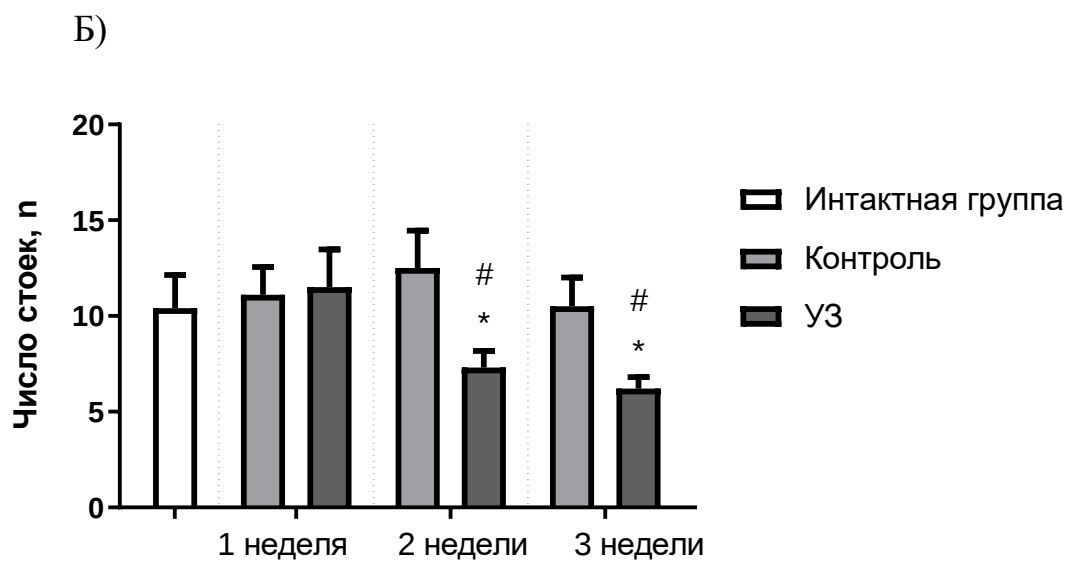
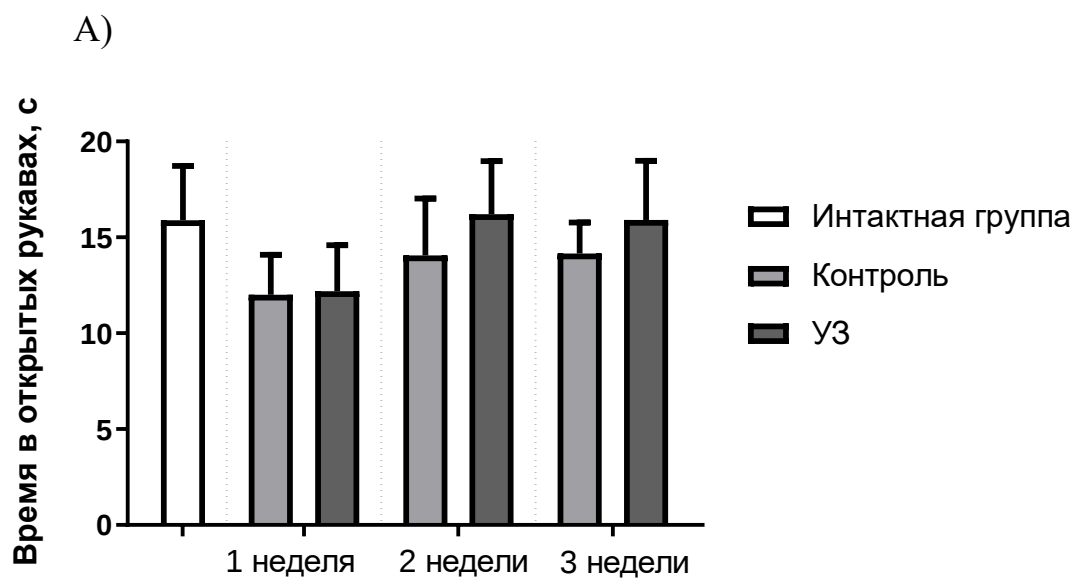
Рисунок 6. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «открытое поле». Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на (А) время, проведенное животными в центральном отсеке, (Б) число пересеченных секторов, (В) число стоек, (Г) число актов замирания, (Д) длительность замирания, (Е) число актов груминга, (Ж) суммарное время актов груминга, (З) число болюсов. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Данные, полученные в «открытом поле», являются несколько противоречивыми, поскольку из них нельзя однозначно заключить, указывают ли они на снижение уровня тревожности. Ряд важных параметров, такие как время, проведенное животными в центре арены, число и длительность актов груминга и число болюсов, не изменились статистически значимо под влиянием УЗ. При этом 2 и 3 недели ультразвукового воздействия привели к снижению числа совершенных стоек, что указывает на снижение исследовательской активности.

3.6. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» не было обнаружено статистически значимой разницы между группами во времени, проведенном крысами в открытом рукаве ($F_{6,63}=0.67$, $p=0.48$, one-way ANOVA; рис. 7А). Однако группы значимо различались в числе совершенных стоек ($F_{6,63}=5.15$, $p=0.032$, one-way ANOVA; рис. 7Б), числе выглядываний из закрытых рукавов ($F_{6,63}=7.2$, $p=0.013$, one-way ANOVA; рис. 7В) и числе свешиваний с открытых рукавов ($H=19.82$, $p=0.003$, Kruskal-Wallis test; рис. 7Г).

Крысы совершали меньше стоек через 2 недели ($p=0.048$ vs интактная группа и $p=0.037$ vs контроль, post hoc Tukey's test), а также через 3 недели воздействия ультразвука ($p=0.037$ vs интактная группа и $p=0.042$ vs контроль, post hoc Tukey's test). Было зарегистрировано меньше выглядываний у группы, подвергавшейся 3 неделям ультразвукового воздействия ($p=0.026$ vs интактная группа и $p=0.033$ vs контроль, post hoc Tukey's test). Кроме того, крысы совершали меньше свешиваний через 2 недели ($p=0.03$ vs интактная группа и $p=0.045$ vs контроль, Dunn's test), а также через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.013$, vs интактная группа и $p=0.021$ vs контроль, Dunn's test).



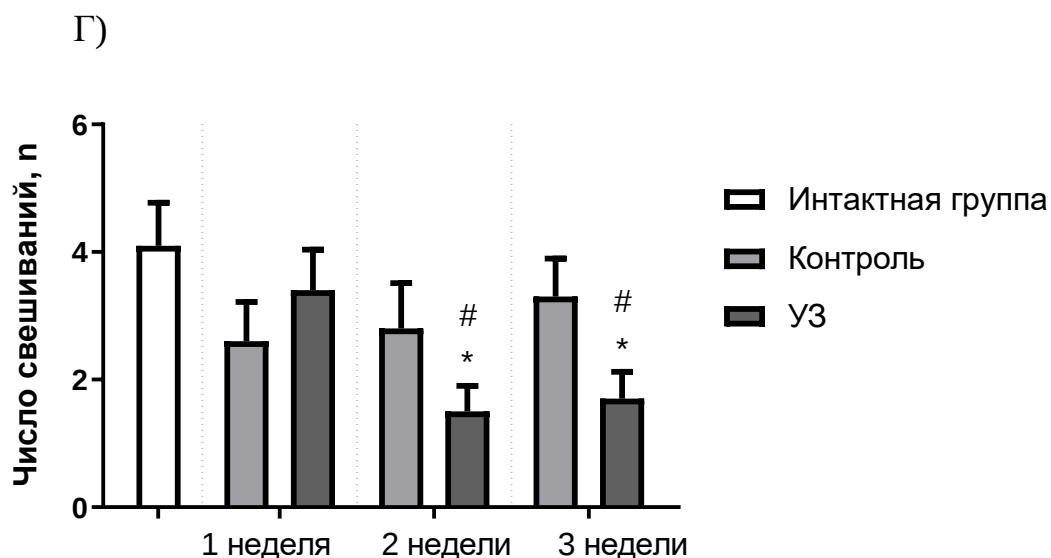


Рисунок 7. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Влияние ультразвукового воздействия и изоляции на (А) время, проведенное животными в открытом рукаве, (Б) число совершенных стоек, (В) число выглядываний, (Г) число свешиваний. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA или Kruskal-Wallis test, post hoc Tukey's test или Dunn's test.

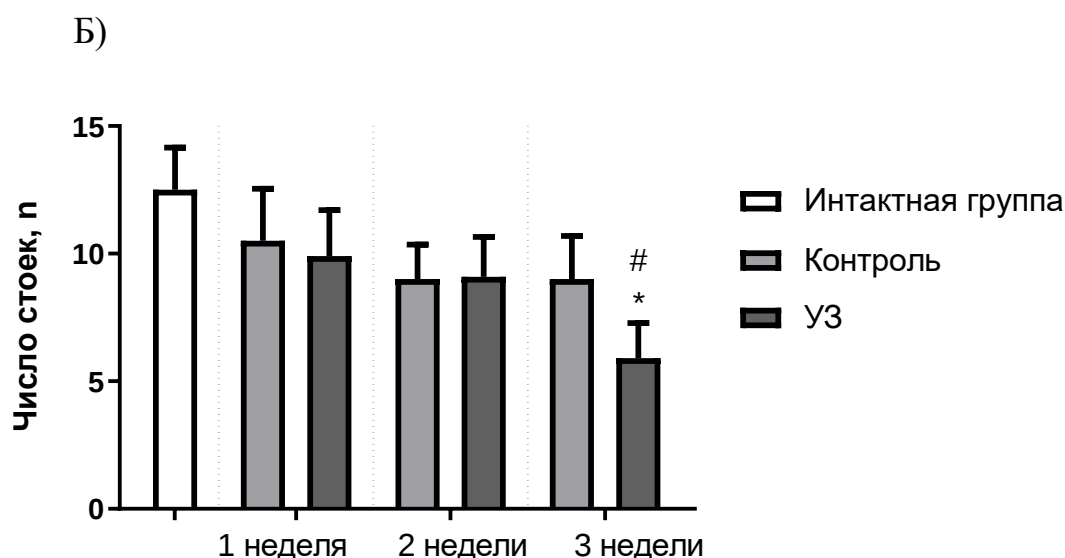
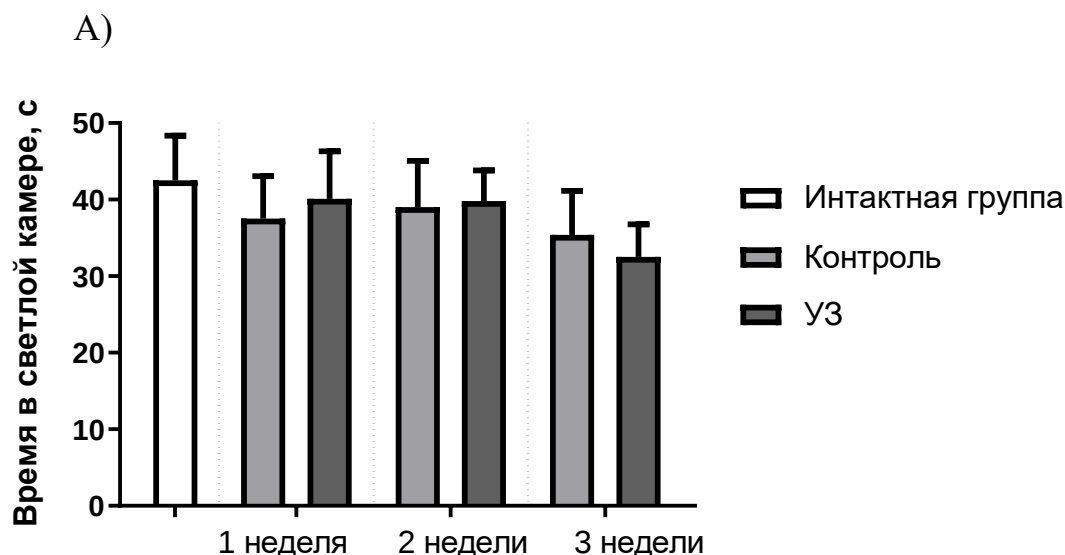
Описанные данные, аналогично данным, полученным в тесте «открытое поле», указывают на выраженное изменение исследовательской активности животных, однако из них нельзя заключить о явном изменении уровня тревожности экспериментальных животных, поскольку воздействие ультразвука не привело к снижению времени, проведенном крысами в открытых рукавах приподнятого лабиринта.

3.7. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «темно-светлая камера»

В тесте «темно-светлая камера» не было обнаружено статистически значимого различия между группами во времени, проведенном крысами в светлом отсеке ($F_{6,63}=1.23$, $p=0.19$, one-way ANOVA; рис. 8А), однако значимое

различие между группами было зарегистрировано в таких показателях как число стоек, совершенных в светлом отсеке ($F_{6,63}=6.12$, $p=0.022$, one-way ANOVA), и число выглядываний из светлого отсека ($F_{6,63}=6.24$, $p=0.019$, one-way ANOVA).

Крысы, подвергавшиеся ультразвуковому воздействию в течение 3 недель, совершали меньше стоек ($p=0.032$ vs интактная группа и $p=0.048$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 8Б). Также крысы демонстрировали меньше выглядываний из закрытого рукава через 2 недели ($p=0.045$ vs интактная группа и $p=0.047$ vs контроль, post hoc Tukey's test) и через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.044$ vs интактная группа и $p=0.036$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 8В).



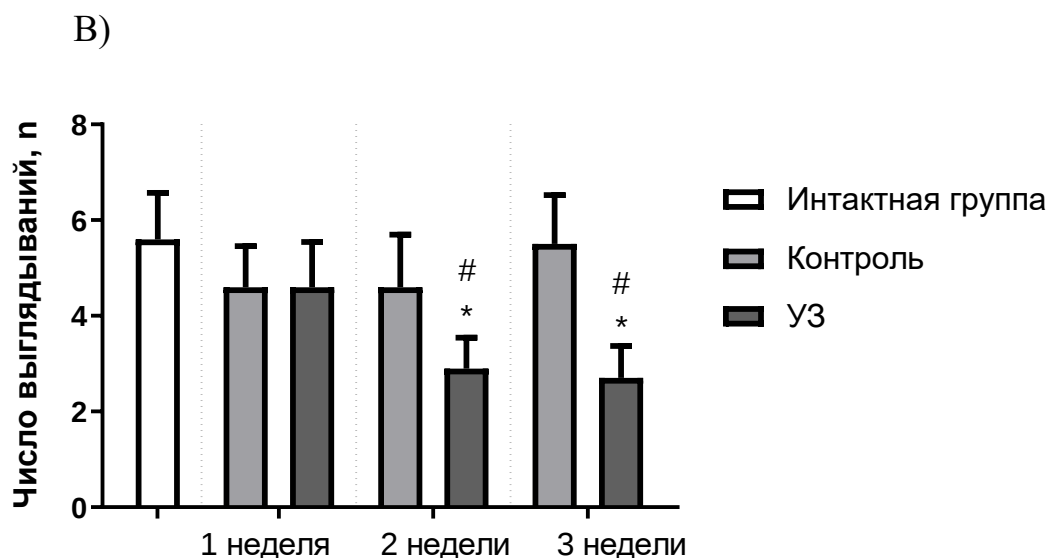


Рисунок 8. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «темно-светлая камера». Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на (А) время, проведенное животными в светлом отсеке камеры, (Б) число совершенных стоек, (В) число выглядываний. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Таким образом, во всех трех тестах на тревожность и исследовательскую активность: «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «темно-светлая камера» были получены схожие результаты, а именно отсутствие снижения времени, проведенного животными в центре арены, открытых рукавах лабиринта или светлом отсеке темно-светлой камере, то есть открытых и освещенных пространствах, являющихся для животного менее комфортными. При этом во всех тестах наблюдалось снижение показателей исследовательской активности. Большинство изменений проявилось через 2 недели хронического ультразвукового воздействия, некоторые параметры изменились статистически значимо только у группы, подвергавшейся 3 неделям УЗ. У групп, подвергавшихся изолированному

содержанию продолжительностью до 3 недель, не было зарегистрировано аналогичных изменений исследовательской активности и других показателей.

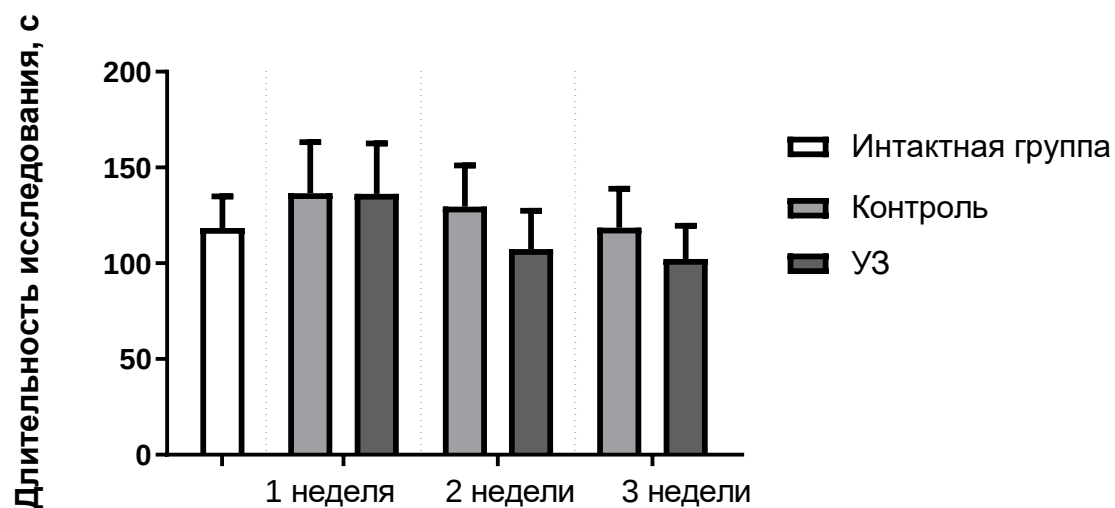
3.8. Влияние ультразвукового воздействия на память крыс в тесте «распознавание объекта»

Поскольку клиническая депрессия человека зачастую сопровождается ухудшениями памяти и когнитивных способностей, в данной работе были проведены тесты на обучение и память крыс. В тесте «распознавание объекта» в день тестирования с двумя идентичными объектами группы не различались статистически значимо в суммарном время исследования обоих объектов ($F_{6,63}=0.21$, $p=0.97$, one-way ANOVA; рис. 9А).

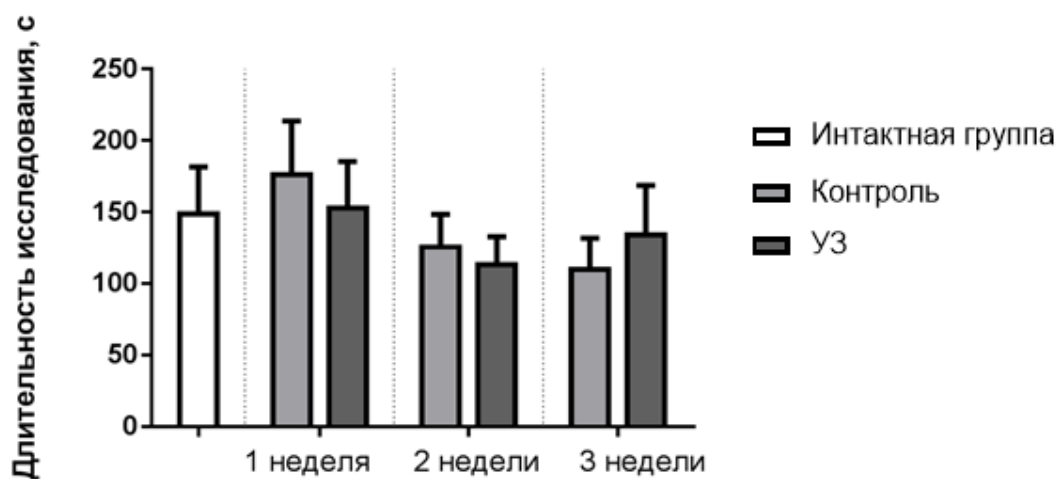
На следующий день один из объектов был заменен новым. В этот день также не было обнаружено статистически значимой разницы между группами в суммарном времени исследования различных между собой объектов ($F_{6,63}=0.74$, $p=0.47$, one-way ANOVA; рис. 9Б). Таким образом, можно заключить, что группы животных не различались между собой по общему уровню активности исследования объектов.

На основании данных, полученных за два дня тестирования, был рассчитан индекс распознавания нового объекта. Было показано, что группы статистически значимо различались между собой по этому параметру ($F_{6,63}=8.12$, $p=0.006$, one-way ANOVA), а именно, индекс распознавания достоверно снизился через 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.007$ vs контроль и $p=0.012$ vs 3 недели изоляции, post hoc Tukey's test; рис. 9В).

А)



Б)



В)

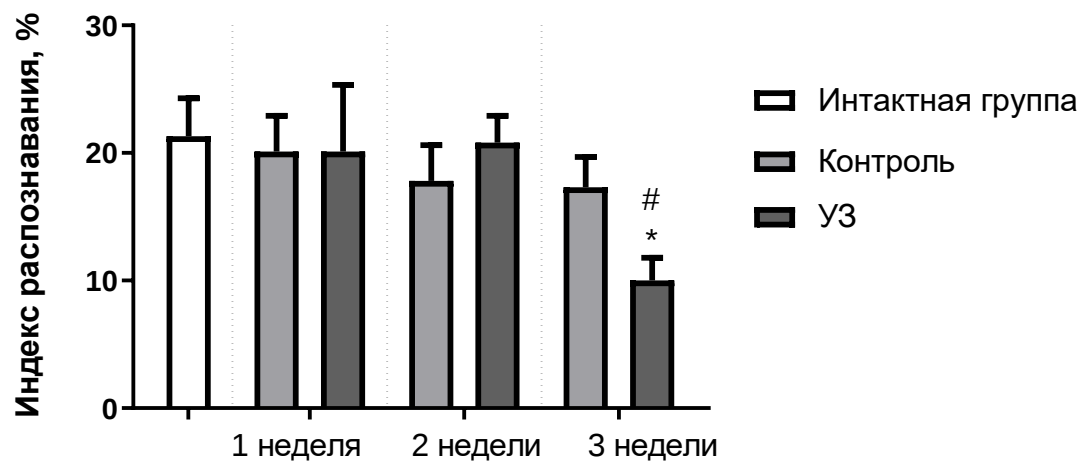


Рисунок 9. Влияние ультразвукового воздействия на поведение крыс в тесте «распознавание объекта». (А) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на суммарное время исследования животными объекта в первый день и (Б) во второй день. (В) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на индекс распознавания объектов. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs контроль, # - $p < 0.05$ vs изолированное содержание, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Полученные в этом тесте данные свидетельствуют об ухудшении памяти животных после 3 недель ультразвукового воздействия, что выразилось в снижении распознавания нового объекта относительно знакомого. При этом не наблюдалось статистически значимых различий в суммарном времени исследования животными обоих объектов, из чего следует, что зарегистрированное снижение индекса распознавания не связано с общим снижением уровня исследовательской активности животных. Изолированное содержание не привело к развитию аналогичных нарушений.

3.9. Влияние ультразвукового воздействия на память крыс в тесте «условный рефлекс пассивного избегания»

При выработке условной реакции пассивного избегания оценивается способность грызунов запоминать факт получения электрического удара в темном отделении камеры. Важно отметить, что темный отсек установки является для животного более комфортным, но память о полученном в нем электрическом ударе может увеличить латентный период захода в него в последующие дни. Животные повторно помещались в камеру через 48 часов и 7 дней после обучения.

Значимое различие между группами в латентном периоде перехода в темный отсек наблюдалось как спустя 48 часов после обучения ($F_{6,63}=7.22$, $p=0.018$, one-way ANOVA), так и через 7 суток после обучения ($F_{6,63}=6.07$,

$p=0.023$, one-way ANOVA). Данный показатель достоверно снизился только через 3 недели ультразвукового воздействия через 48 часов ($p=0.044$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 10А) и через неделю после обучения ($p=0.024$ vs контроль и $p=0.033$ vs 3 недели изоляции, post hoc Tukey's test; рис. 10Б).

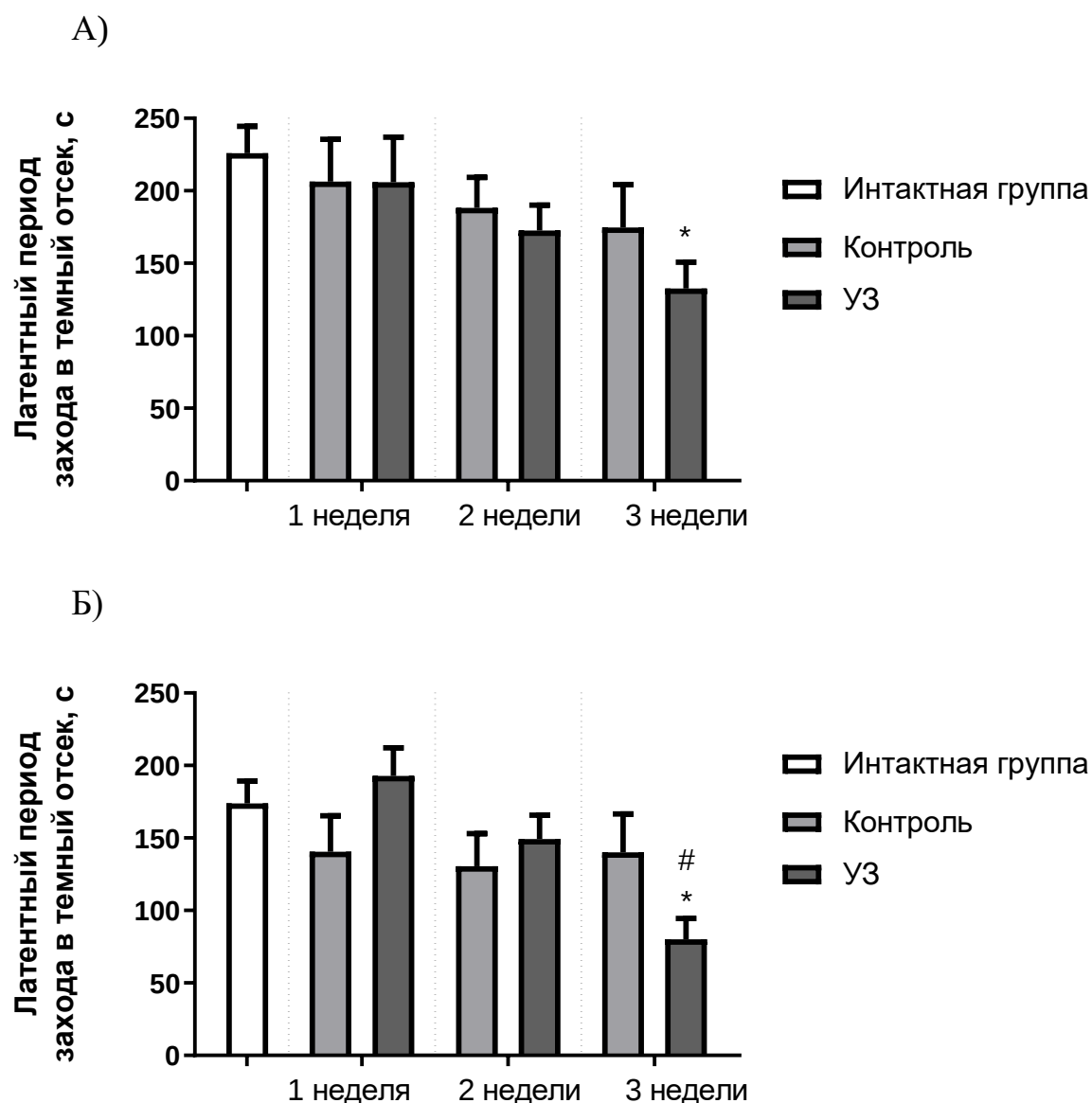


Рисунок 10. Влияние ультразвукового воздействия на выработку крысами условной реакции пассивного избегания. Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на латентный период захода в темный отсек (А) через 48 часов и (Б) 1 неделю после обучения. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p<0.05$ vs

контроль, # - $p < 0.05$ vs изолированное содержание, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Таким образом, в данном тесте крысы демонстрировали ухудшение памяти как после 48 часов, так и спустя неделю после обучения. При этом изолированное содержание продолжительностью до трех недель не привело к ухудшению памяти крыс. Результаты данного теста согласуются с результатами теста «распознавания объектов», поскольку в обоих случаях нарушения памяти крыс были обнаружены после 3 недель ультразвукового воздействия.

3.10. Влияние ультразвукового воздействия на обучение и память крыс в тесте «водный лабиринт Морриса»

В данном тесте животному предоставлялось 8 попыток для поиска скрытой под водой платформы. Попытки осуществлялись с десятиминутным интервалом, после чего через 48 часов проводилась дополнительная тестовая попытка.

Группы значительно различались между собой в латентном периоде поиска платформы в попытке 2 ($F_{6,63}=5.12$, $p=0.012$, one-way ANOVA), попытке 3 ($F_{6,63}=4.56$, $p=0.043$, one-way ANOVA), попытке 4 ($F_{6,63}=5.09$, $p=0.34$, one-way ANOVA), попытке 5 ($F_{6,63}=4.99$, $p=0.03$, one-way ANOVA), попытке 6 ($F_{6,63}=8.14$, $p=0.009$, one-way ANOVA), попытке 7 ($F_{6,63}=7.12$, $p=0.012$, one-way ANOVA) и попытке 8 ($F_{6,63}=7.97$, $p=0.007$, one-way ANOVA), а также тестовой попытке через 48 часов после обучения ($F_{6,63}=5.12$, $p=0.041$, one-way ANOVA). Статистически значимых различий между группами не наблюдалось только в латентном периоде поиска платформы в первой тестовой попытке ($F_{6,63}=1.17$, $p=0.12$, one-way ANOVA, Таблица 3).

У группы, подвергавшейся ультразвуковому воздействию в течение 2 недель, время поиска платформы было увеличено в попытке 2 ($p=0.029$ vs интактная группа, post hoc Tukey's test), попытке 3 ($p=0.014$ vs интактная

группа и $p=0.023$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 4 ($p=0.032$ vs интактная группа и $p=0.038$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 8 ($p=0.041$ vs интактная группа и $p=0.045$ vs контроль, post hoc Tukey's test, Таблица 3), а также в дополнительной тестовой попытке ($p=0.005$ vs интактная группа и $p=0.008$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис.11А).

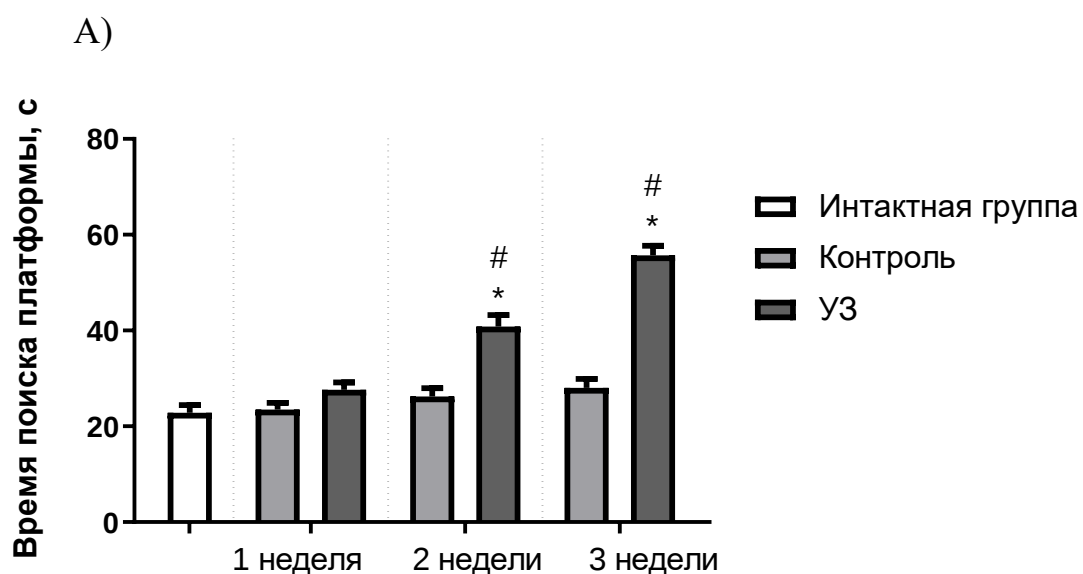
У группы, подвергавшейся ультразвуковому воздействию в течение 3 недель, время поиска платформы было увеличено в попытке 2 ($p=0.001$ vs интактная группа и $p=0.002$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 3 ($p=0.009$ vs интактная группа и $p=0.004$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 4 ($p=0.001$ vs интактная группа и $p=0.001$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 5 ($p=0.003$ vs интактная группа и $p=0.008$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 6 ($p=0.012$ vs интактная группа и $p=0.022$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 7 ($p=0.021$ vs интактная группа и $p=0.025$ vs контроль, post hoc Tukey's test), попытке 8 ($p=0.01$ vs интактная группа и $p=0.008$ vs контроль, post hoc Tukey's test, Таблица 3) и дополнительной тестовой попытке ($p=0.001$ vs интактная группа и $p=0.003$ vs контроль, post hoc Tukey's test, рис. 11А), то есть во всех попытках, кроме попытки 1.

Через неделю после обучения крысы вновь помещались в лабиринт, и фиксировалось время, проводимое животными в том секторе, где ранее находилась платформа. По этому показателю также была зарегистрирована статистически значимая разница между группами ($F_{6,63}=7.44$, $p=0.006$, one-way ANOVA). Время, проведенное в правильном секторе, было достоверно снижено только через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.032$ vs интактная группа и $p=0.039$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 11Б).

Таблица 3. Время поиска платформы в водном лабиринте Морриса.

* - $p < 0,05$ vs интактная группа, # - $p < 0,05$ vs контроль

№ попытки/ группа	Интактная группа	Контроль 1	1 неделя УЗ	Контроль 2	2 недели УЗ	Контроль 3	3 недели УЗ
Попытка 1	60±0	56±2.3	58±1.1	57±0.7	60±0	49±4.5	60±0
Попытка 2	32±6.8	38±6.4	39±4.5	40±5.1	44±7.8 *	38±6	58±0.6 *#
Попытка 3	27±3.4	30±4.5	32±5.2	28±3.1	42±4.8 *#	26±5.9	60±0 *#
Попытка 4	17±2.2	23±2.7	31±3.9	22±3	41±4.6 *#	21±3.4	51±6.7 *#
Попытка 5	22±3.6	26±4.7	26±3.3	25±2.1	26±4.8	17±1.7	42±6.5 *#
Попытка 6	18±2.5	22±1.9	24±3.1	19±1.5	25±3.5	23±3.1	51±6.7 *#
Попытка 7	15±1.2	23±2.4	33±4	21±3.2	24±2.1	17±2.1	39±4.5 *#
Попытка 8	18±1.2	19±1.4	23±1.6	22±2.1	38±1.4 *#	19±1.3	46±4.1 *#



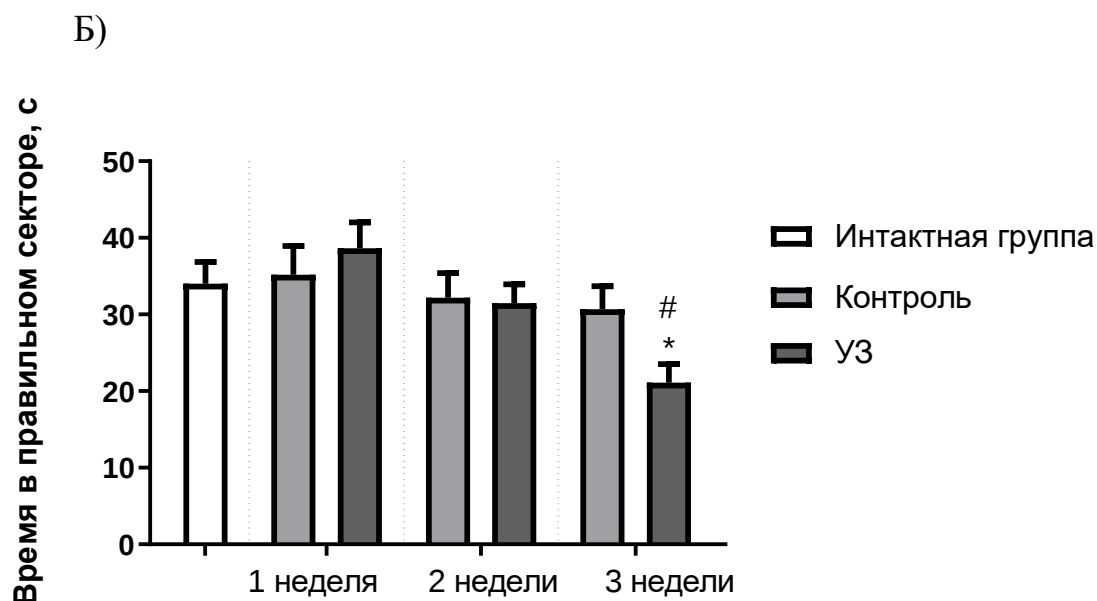


Рисунок 11. Влияние ультразвукового воздействия на обучение в тесте «водный лабиринт Морриса». (А) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на время поиска платформы через 48 часов после обучения и (Б) на время, проведенное в правильном секторе лабиринта через неделю после обучения. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Результаты данного теста также согласуются с результатами других тестов на обучение и память, однако в водном лабиринте Морриса ухудшение обучения, выраженное в увеличении латентного периода поиска платформы, проявилось уже через 2 недели ультразвукового воздействия. При этом время нахождения в правильном секторе через неделю после обучения снизилось только у группы, подвергнутой 3 неделям ультразвукового воздействия.

В целом, три проведенных теста на обучение и память указывают на ухудшение памяти животных под воздействием УЗ, причем эти изменения проявлялись позже большинства прочих поведенческих различий. При этом

социальная изоляция сама по себе не привела к развитию подобных нарушений.

3.11. Оценка уровня кортикостерона в плазме крови крыс

Данные, представленные в этой главе, получены совместно с сотрудниками ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Зубковым Е.А., Зоркиной Я.А. и Чехониным В.П.

Было обнаружено статистически значимое различие между группами в концентрации кортикостерона в плазме крови ($F_{6,63}=7.12$, $p=0.014$, one-way ANOVA). Содержание кортикостерона в плазме крови статистически значимо повысилось после 2 недель УЗ воздействия ($p=0.014$ vs интактная группа и $p=0.02$ vs контроль) и оставалось повышенным после 3 недель данного стрессового воздействия ($p=0.005$ vs интактная группа и $p=0.013$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 12).

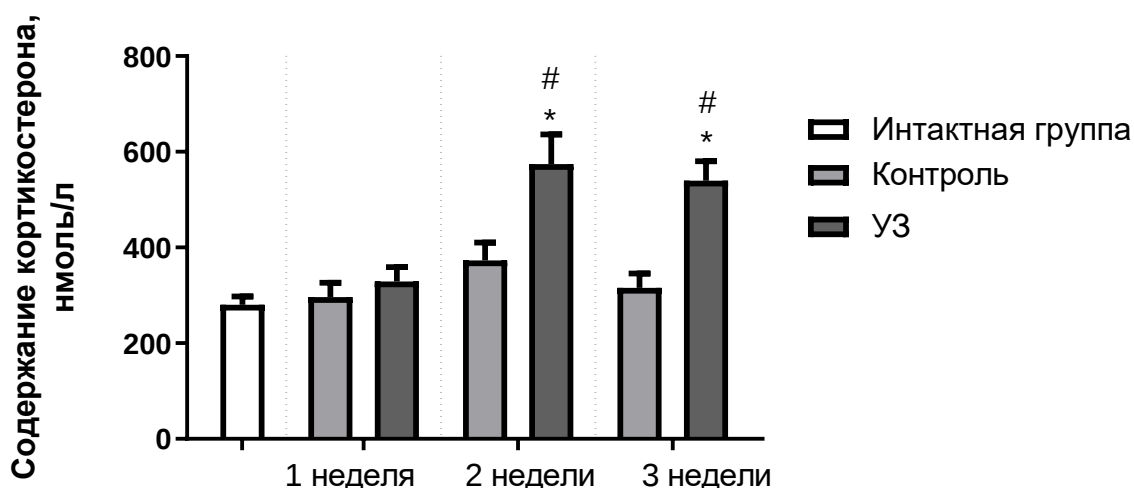


Рисунок 12. Влияние ультразвукового воздействия на содержание кортикостерона. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p<0.05$ vs интактная группа, # - $p<0.05$ vs контроль, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

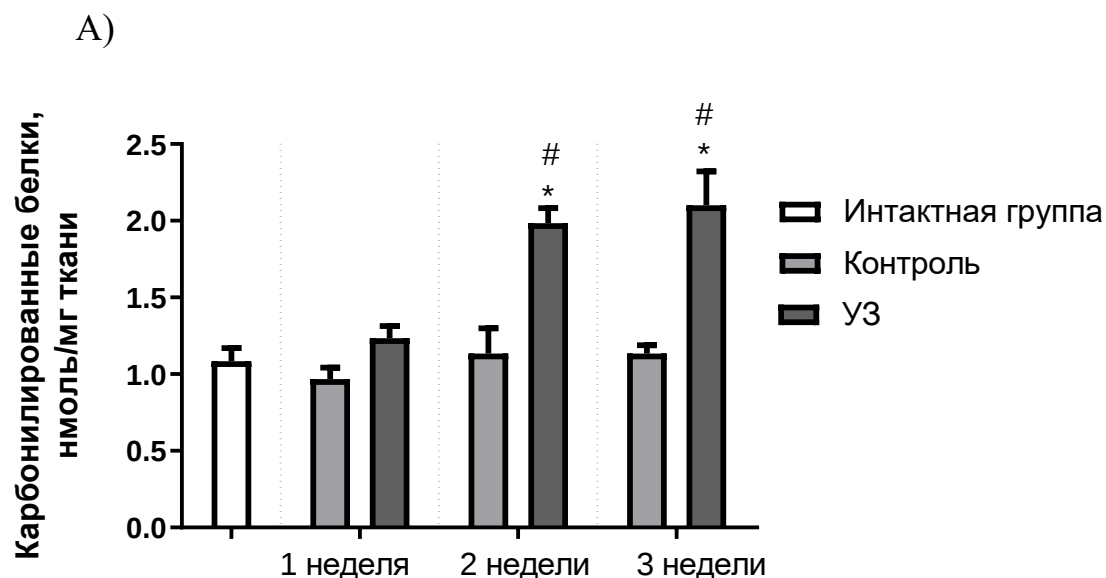
Таким образом, содержание кортикостерона, важного молекулярного маркера стресса грызунов, было повышено под влиянием ультразвукового

воздействия длительностью 2 и 3 недели, но не социальной изоляции соответствующей продолжительности.

3.12. Оценка уровня окислительного стресса в различных структурах мозга

3.12.1. Оценка содержания карбонилированных белков

Нами было обнаружено статистически значимое различие между группами в содержании карбонилированных белков в гиппокампе ($F_{6,63}=8.06$, $p=0.003$, one-way ANOVA) и префронтальной коре ($F_{6,63}=6.89$, $p=0.007$, one-way ANOVA). А именно, содержание карбонилированных белков в гиппокампе было значимо повышено через 2 недели ($p=0.005$ vs интактная группа и $p=0.01$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.023$ vs интактная группа и $p=0.018$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 13А). При этом содержание карбонилированных белков в префронтальной коре было значимо повышено только через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.012$ vs интактная группа и $p=0.016$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 13Б).



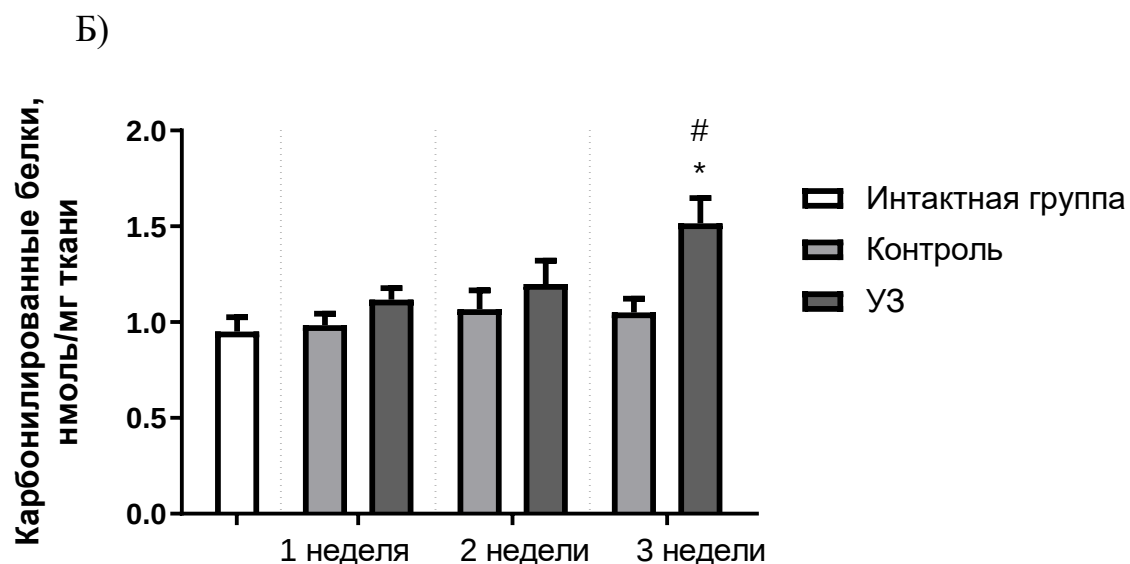


Рисунок 13. Влияние ультразвукового воздействия на содержание карбонилированных белков. (А) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на содержание карбонилированных белков в гиппокампе и (Б) в префронтальной коре. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs контроль, # - $p < 0.05$ vs изолированное содержание, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Из полученных результатов можно заключить о развитии окислительного стресса в тканях мозга крыс, подвергавшихся ультразвуковому воздействию, а именно, проявлении белкового окисления.

3.12.2. Оценка содержания общего глутатиона

В данном анализе было выявлено статистически значимое различие между группами в содержании глутатиона в гиппокампе ($F_{6,63}=7.12$, $p=0.018$, one-way ANOVA) и префронтальной коре ($F_{6,63}=8.98$, $p=0.0006$, one-way ANOVA).

Содержание глутатиона в гиппокампе было статистически значимо повышено через 2 недели ($p=0.038$ vs интактная группа и $p=0.039$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.028$ vs интактная группа и $p=0.017$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 14А). Аналогично, содержание глутатиона

в префронтальной коре было повышено через 2 недели ($p=0.044$ vs интактная группа и $p=0.029$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.022$ vs интактная группа и $p=0.031$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 14Б).

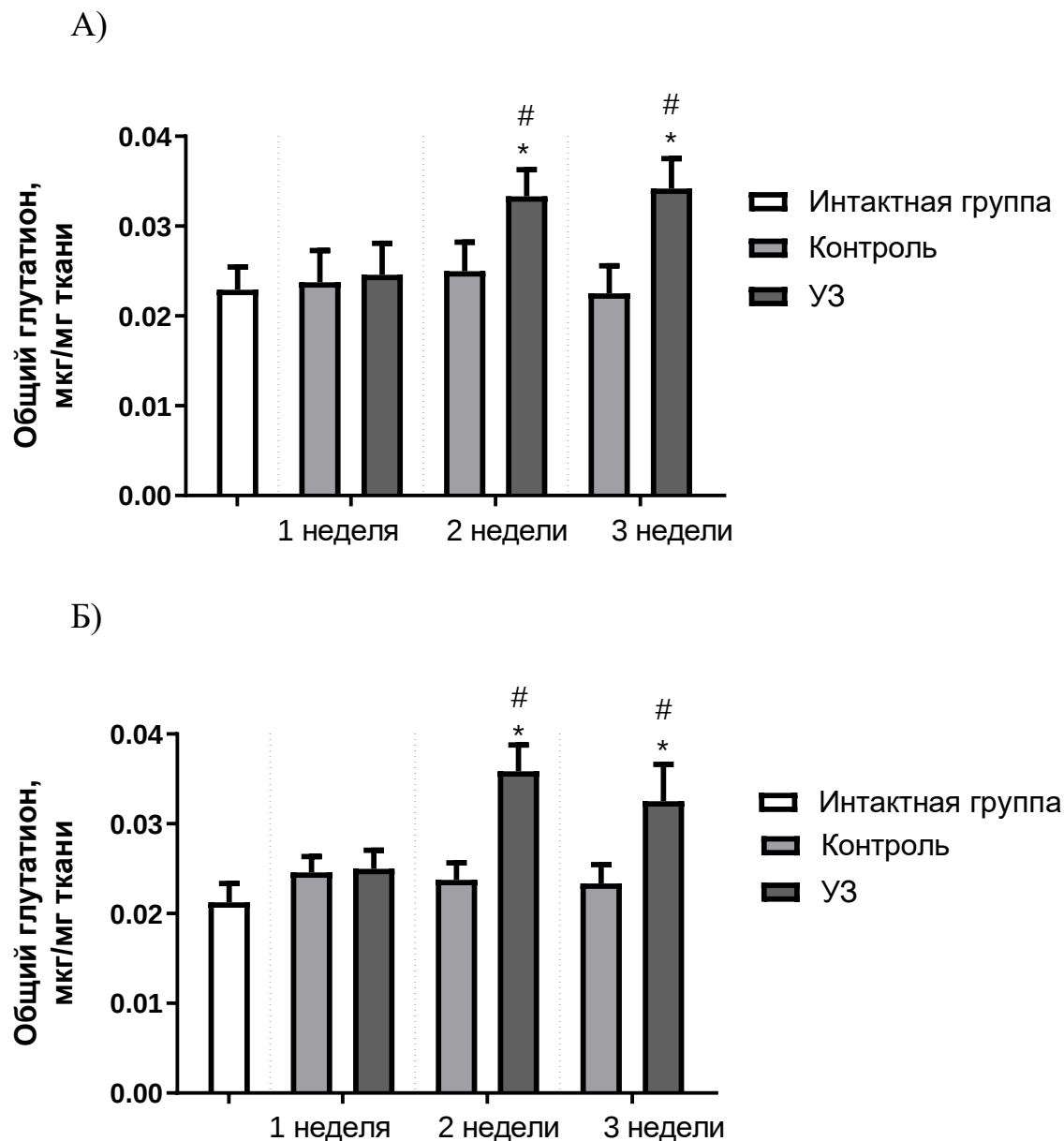


Рисунок 14. Влияние ультразвукового воздействия на содержание общего глутатиона. (А) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на содержание общего глутатиона в гиппокампе и (Б) в префронтальной коре. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p<0.05$ vs контроль, # - $p<0.05$ vs изолированное содержание, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Таким образом, было показано повышение двух широко известных маркеров окислительного стресса тканей, подтверждающих наличие окислительного стресса в мозге крыс, подвергнутых 2 и более неделям хронического ультразвукового воздействия. Социальная изоляция не привела к подобным изменениям.

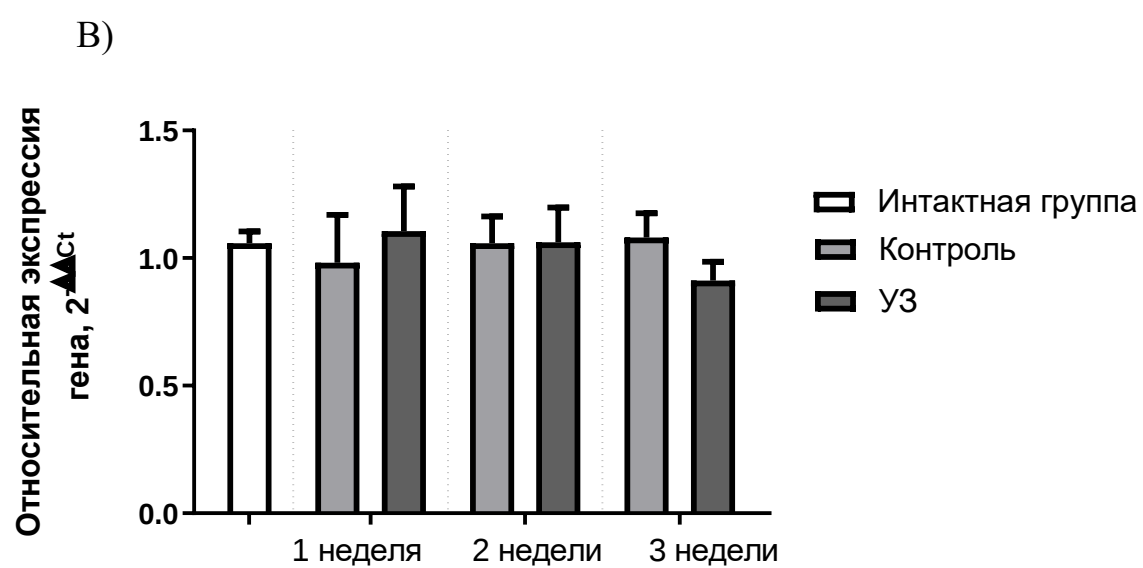
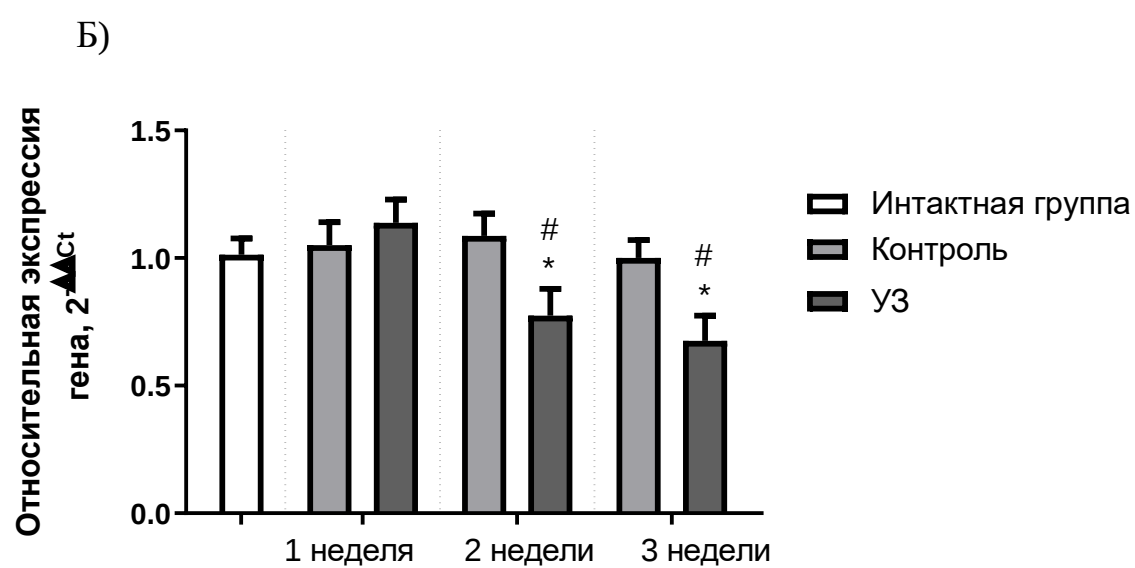
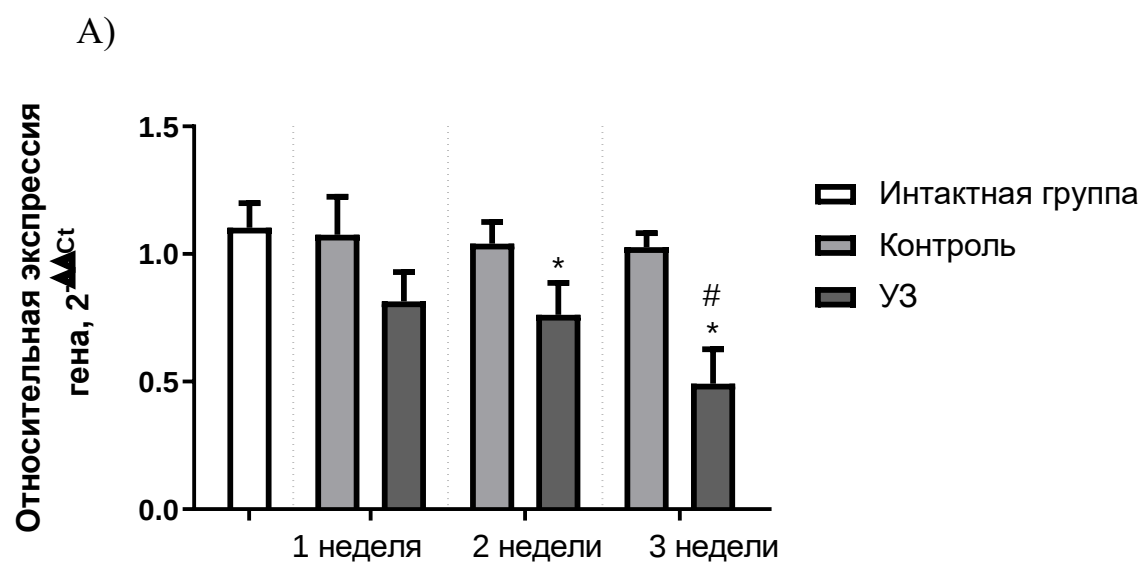
3.13. Оценка содержания BDNF и экспрессии соответствующего гена в головном мозге крыс

Данные, представленные в этой главе, получены совместно с сотрудниками ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Зубковым Е.А., Морозовой А.Ю., Зоркиной Я.А. и Чехониным В.П.

3.13.1. Оценка экспрессии гена BDNF в головном мозге крыс

Для изучения экспрессии данного гена было выбрано 4 структуры головного мозга: гиппокамп, префронтальная кора, средний мозг и миндалина. Статистически значимая разница между группами была обнаружена в экспрессии *BDNF* в гиппокампе ($F_{6,63}=5.98$, $p=0.047$, one-way ANOVA), префронтальной коре ($F_{6,63}=7.45$, $p=0.017$, one-way ANOVA) и миндалине ($F_{6,63}=6.09$, $p=0.033$, one-way ANOVA), но не в среднем мозге ($F_{6,63}=0.12$, $p=0.82$, one-way ANOVA; рис. 15B).

Относительная экспрессия гена *BDNF* в гиппокампе достоверно снизилась через 2 недели ($p=0.004$ vs интактная группа) и 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.028$ vs интактная группа и $p=0.014$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 15A). Относительная экспрессия гена *BDNF* в префронтальной коре также достоверно снизилась через 2 недели ($p=0.038$ vs интактная группа и $p=0.047$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.016$ vs интактная группа и $p=0.009$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 15Б). При этом относительная экспрессия гена *BDNF* в миндалине достоверно снизилась только через 3 недели ($p=0.009$ vs интактная группа и $p=0.018$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 15Г).



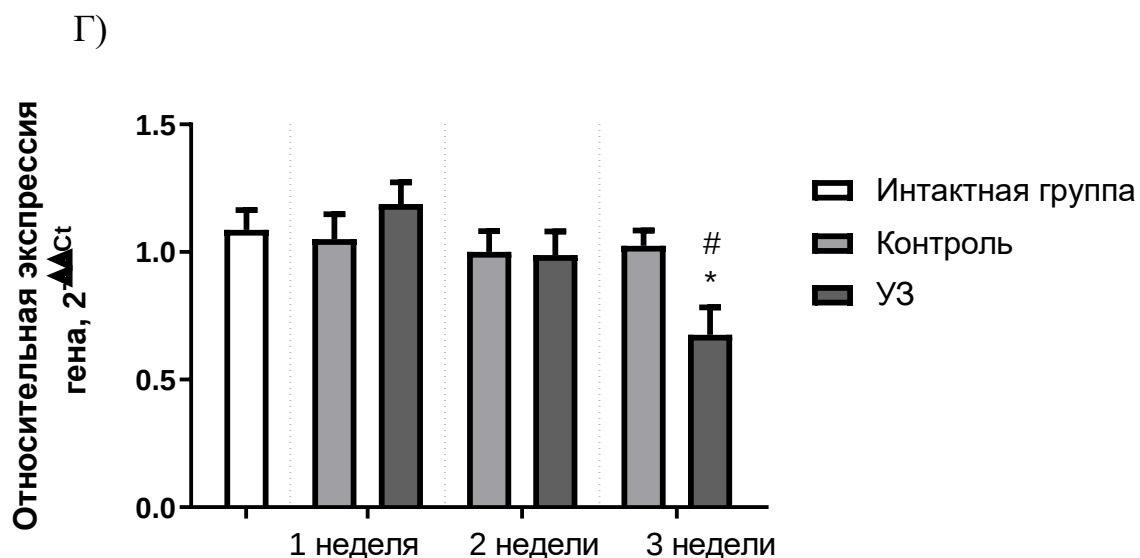


Рисунок 15. Влияние ультразвукового воздействия на экспрессию гена BDNF. (А) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на экспрессию гена BDNF в гиппокампе, (Б) префронтальной коре, (В) среднем мозге и (Г) миндалине. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p < 0.05$ vs контроль, # - $p < 0.05$ vs изолированное содержание, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Таким образом, ультразвуковой стресс привел к снижению экспрессии BDNF во всех исследованных структурах, кроме среднего мозга. Экспрессия данного гена была снижена в гиппокампе и префронтальной коре после 2 и 3 недель УЗ, в то время как его экспрессия в миндалине статистически значимо понизилась только у группы, подвергавшейся ультразвуковому воздействию в течение 3 недель.

3.13.2. Оценка содержания BDNF в головном мозге крыс

Для иммуноферментного анализа содержания BDNF было отобрано 2 структуры, в которых проявились наиболее выраженные изменения экспрессии соответствующего гена, – гиппокамп и префронтальная кора.

Была обнаружена статистически значимая разница между группами в содержании BDNF в гиппокампе крыс ($F_{6,63}=8.22$, $p=0.004$, one-way ANOVA) и в префронтальной коре ($F_{6,63}=6.29$, $p=0.014$, one-way ANOVA).

А именно, концентрация BDNF в гиппокампе достоверно снизилась только через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.007$ vs интактная группа и $p=0.008$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 16А). Аналогичным образом, содержание данного белка в префронтальной коре также снизилось только через 3 недели стрессового воздействия ($p=0.034$ vs интактная группа и $p=0.041$ vs контроль, post hoc Tukey's test; рис. 16Б).

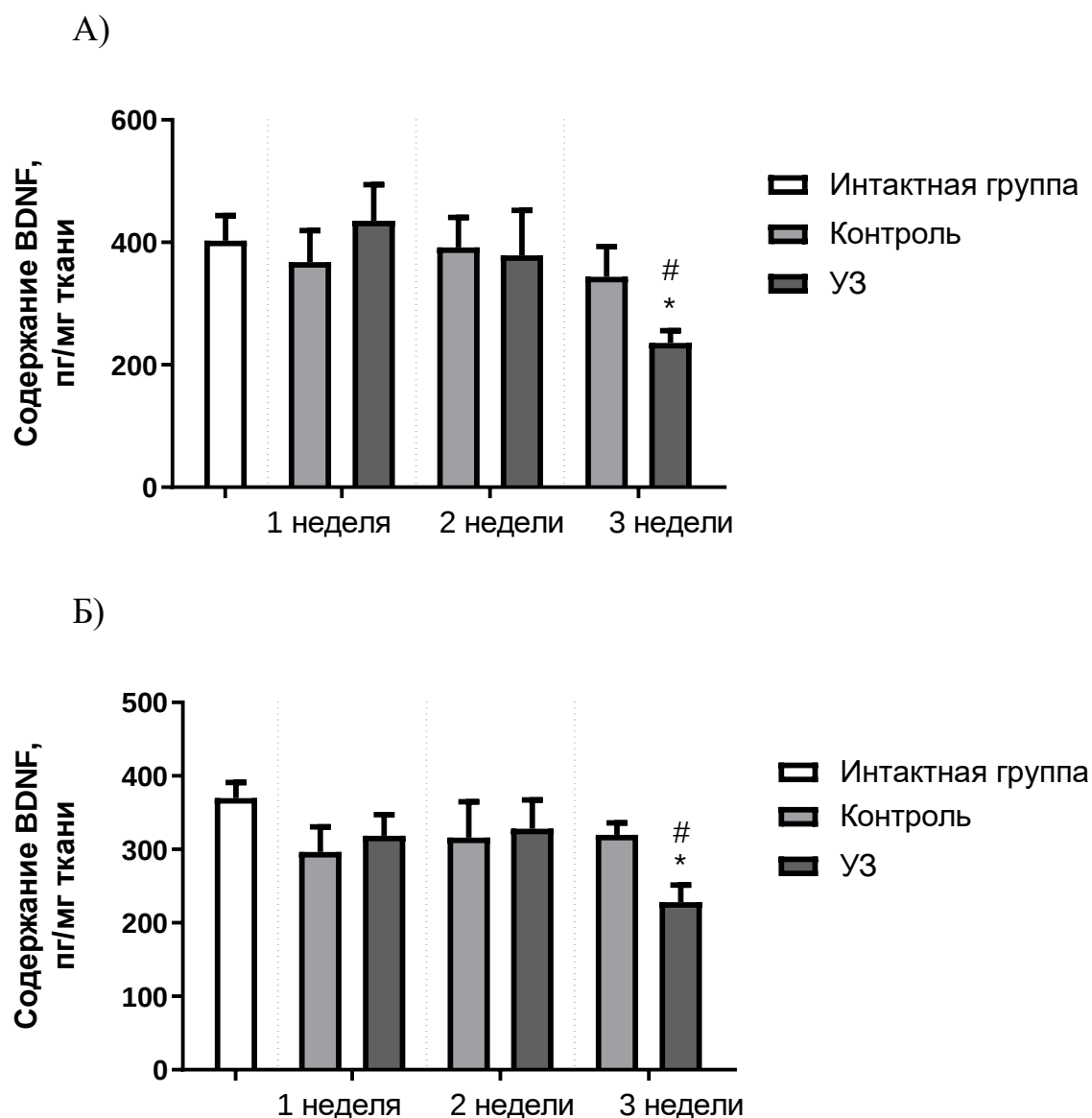


Рисунок 16. Влияние ультразвукового воздействия на содержание BDNF. (А) Влияние хронического ультразвукового воздействия и изоляции на концентрацию BDNF в гиппокампе и (Б) в префронтальной коре. Данные представлены в виде средних значений, ошибок среднего; * - $p<0.05$ vs

контроль, # - $p < 0.05$ vs изолированное содержание, one-way ANOVA, post hoc Tukey's test.

Из полученных данных следует, что снижение содержание BDNF в гиппокампе и префронтальной коре проявилось одновременно только после 3 недель ультразвукового воздействия. Таким образом, снижение этого показателя было зарегистрировано позднее, чем снижение экспрессии соответствующего гена, наблюдаемого уже после 2 недель УЗ.

3.14. Оценка экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецепторов в головном мозге крыс

Данные, представленные в этой главе, получены совместно с сотрудниками ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Зубковым Е.А., Морозовой А.Ю. и Чехониным В.П.

3.14.1. Оценка экспрессии гена GABRA1, кодирующего субъединицу $\alpha 1$ ГАМК_A-рецепторов, в головном мозге крыс

Экспрессия генов выбранных субъединиц была измерена в 4 структурах головного мозга: гиппокампе, префронтальной коре, среднем мозге и миндалине. Было обнаружено статистически значимое различие между группами в относительной экспрессии гена *GABRA1*, кодирующего субъединицу $\alpha 1$ ГАМК_A-рецепторов, в гиппокампе ($F_{6,63}=6.87$, $p=0.022$, one-way ANOVA), префронтальной коре ($F_{6,63}=7.12$, $p=0.003$, one-way ANOVA), среднем мозге ($F_{6,63}=5.07$, $p=0.045$, one-way ANOVA) и миндалине ($F_{6,63}=7.45$, $p=0.009$, one-way ANOVA).

Относительная экспрессия гена *GABRA1* в гиппокампе достоверно снизилась уже через 1 неделю ультразвукового воздействия ($p=0.042$ vs интактная группа и $p=0.041$ vs контроль), также снижение этого параметра было зафиксировано спустя 2 недели ($p=0.016$ vs интактная группа и $p=0.027$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.003$ vs интактная группа и $p=0.013$ vs контроль, post hoc Tukey's test, Таблица 4). В префронтальной

коре относительная экспрессия данного гена также была значимо снижена через 1 неделю ультразвукового воздействия ($p=0.034$ vs интактная группа и $p=0.022$ vs контроль), через 2 недели ($p=0.048$ vs интактная группа и $p=0.033$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.025$ vs интактная группа и $p=0.018$ vs контроль, post hoc Tukey's test, Таблица 4). В то же время в среднем мозге этот показатель был статистически значимо снижен только через 2 недели ($p=0.037$ vs интактная группа и $p=0.043$ vs контроль) и 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.015$ vs интактная группа и $p=0.028$ vs контроль, post hoc Tukey's test; Таблица 4). Также в миндалине относительная экспрессия гена была значимо снижена через 2 недели ($p=0.043$ vs интактная группа и $p=0.045$ vs контроль) и 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.036$ vs интактная группа и $p=0.04$ vs контроль, post hoc Tukey's test; Таблица 4).

Таблица 4. Экспрессия гена *GABRA1* в различных структурах головного мозга. * - $p<0.05$ vs интактная группа, # - $p<0.05$ vs контроль

Структура мозга/группа	Интактная группа	Контроль	1 неделя УЗ	Контроль	2 недели УЗ	Контроль	3 недели УЗ
Гиппокамп	1,06±0,13	1,12±0,11	0,27±0,12 *#	0,98±0,08	0,44±0,15 *#	1,01±0,14	0,55±0,19 *#
Префронтальная кора	1,11±0,29	1,05±0,07	0,39±0,12 *#	0,94±0,08	0,43±0,12 *#	0,97±0,10	0,37±0,12 *#
Средний мозг	1,16±0,22	0,93±0,06	0,78±0,18	1,22±0,14	0,53±0,11 *#	0,91±0,17	0,52±0,16 *#
Миндалина	1,32±0,19	1,20±0,18	1,28±0,27	1,16±0,09	0,58±0,14 *#	1,07±0,14	0,55±0,14 *#

Таким образом, снижение экспрессии гена *GABRA1* наблюдалось во всех рассматриваемых структурах мозга, при этом в гиппокампе и префронтальной коре оно проявилось уже через 1 неделю ультразвукового воздействия. В среднем мозге и миндалине снижение относительной экспрессии рассматриваемого гена проявилось позднее – через 2 недели ультразвукового

воздействия. При этом в группах, содержащихся в изоляции сроком до 3 недель, не наблюдалось подобных изменений.

3.14.2. Оценка экспрессии гена GABRA2, кодирующего субъединицу $\alpha 2$ ГАМК_A-рецепторов, в головном мозге крыс

Нами была обнаружена статистически значимая разница между группами в уровне относительной экспрессии GABRA2 в префронтальной коре ($F_{6,63}=9.85$, $p=0.001$, one-way ANOVA), среднем мозге ($F_{6,63}=5.25$, $p=0.035$, one-way ANOVA) и миндалине ($F_{6,63}=6.36$, $p=0.027$, one-way ANOVA), однако разницы между группами не было зафиксировано в гиппокампе ($F_{6,63}=1.11$, $p=0.36$, one-way ANOVA; Таблица 5).

Относительная экспрессия гена GABRA2 в префронтальной коре была значимо снижена через 1 неделю ультразвукового воздействия ($p=0.025$ vs интактная группа и $p=0.031$ vs контроль), через 2 недели ($p=0.017$ vs интактная группа и $p=0.026$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.002$ vs интактная группа и $p=0.014$ vs контроль, post hoc Tukey's test; Таблица 5).

При этом относительная экспрессия этого гена в среднем мозге была статистически значимо снижена только через 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.039$ vs интактная группа и $p=0.019$ vs контроль, post hoc Tukey's test; Таблица 5); аналогичным образом, экспрессия гена GABRA2 в миндалине также была снижена только у группы, подвергавшейся ультразвуковому воздействию в течение 3 недель ($p=0.025$ vs интактная группа и $p=0.031$ vs контроль, post hoc Tukey's test; Таблица 5).

Таблица 5. Экспрессия гена *GABRA2* в различных структурах головного мозга. * - $p < 0.05$ vs интактная группа, # - $p < 0.05$ vs контроль

Структура мозга/группа	Интактная группа	Контроль	1 неделя УЗ	Контроль	2 недели УЗ	Контроль	3 недели УЗ
Гиппокамп	1,11±0,14	1,23±0,13	1,84±0,52	1,14±0,21	1,53±0,57	1,06±0,09	1,31±0,47
Префронтальная кора	1,33±0,25	1,12±0,08	0,5±0,13 *#	1,01±0,11	0,72±0,23 *#	0,94±0,06	0,66±0,19 *#
Средний мозг	1,08±0,34	1,04±0,13	1,17±0,3	0,96±0,07	0,66±0,13	0,93±0,08	0,12±0,05 *#
Миндалины	1,22±0,22	1,21±0,23	1,28±0,25	1,08±0,06	0,57±0,14	1,03±0,10	0,38±0,07 *#

Из полученных данных следует, что экспрессия гена *GABRA2* в мозге, как и экспрессия гена *GABRA1*, была снижена, однако подобных изменений не наблюдалось в гиппокампе, а в остальных структурах (префронтальной коре, среднем мозге и миндалине) это снижение проявилось позже, чем снижение экспрессии гена *GABRA1*.

3.14.3. Оценка экспрессии гена *GABRA3*, кодирующего субъединицу $\alpha 3$ ГАМК_A-рецепторов, в головном мозге крыс

Статистически значимые различия между группами в относительной экспрессии гена *GABRA3*, были зарегистрированы в гиппокампе ($F_{6,63}=8.12$, $p=0.006$, one-way ANOVA), префронтальной коре ($F_{6,63}=5.99$, $p=0.014$, one-way ANOVA) и среднем мозге ($F_{6,63}=6.12$, $p=0.011$, one-way ANOVA), но не в миндалине ($F_{6,63}=0.23$, $p=0.86$, one-way ANOVA; Таблица 6).

Относительная экспрессия гена *GABRA3* в гиппокампе была статистически значимо снижена через 1 неделю ультразвукового воздействия ($p=0.036$ vs интактная группа), через 2 недели ($p=0.037$ vs интактная группа и $p=0.044$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.008$ vs интактная группа и $p=0.01$ vs контроль, post hoc Tukey's test, Таблица 6). Аналогично, относительная экспрессия гена *GABRA3* в префронтальной коре была снижена через 1 неделю ($p=0.034$ vs интактная группа и $p=0.04$ vs

контроль), 2 недели ($p=0.025$ vs интактная группа и $p=0.031$ vs контроль) и 3 недели стрессового воздействия ($p=0.019$ vs интактная группа и $p=0.17$ vs контроль, post hoc Tukey's test, Таблица 6).

В отличие от экспрессии гена *GABRA3* в двух предыдущих структурах, его экспрессия в среднем мозге была значимо снижена только через 3 недели ультразвукового воздействия ($p=0.042$ vs интактная группа и $p=0.046$ vs контроль, post hoc Tukey's test; Таблица 6).

Таблица 6. Экспрессия гена *GABRA3* в различных структурах головного мозга. * - $p<0.05$ vs интактная группа, # - $p<0.05$ vs контроль

Структура мозга/группа	Интактная группа	Контроль	1 неделя УЗ	Контроль	2 недели УЗ	Контроль	3 недели УЗ
Гиппокамп	1,10±0,13	1,13±0,12	0,38±0,16 *#	1,03±0,09	0,36±0,13 *#	1,01±0,11	0,45±0,25 *#
Префронтальная кора	1,04±0,16	1,05±0,06	0,42±0,17 *#	0,99±0,11	0,45±0,11 *#	0,93±0,05	0,41±0,15 *#
Средний мозг	1,12±0,1	1,29±0,14	1,02±0,35	1,04±0,09	0,98±0,23	1,01±0,06	0,24±0,13 *#
Миндалины	1,14±0,17	1,11±0,16	0,98±0,28	1,00±0,07	1,13±0,25	1,05±0,15	0,93±0,19

Экспрессия гена *GABRA3*, кодирующего субъединицу $\alpha 3$ ГАМК_A-рецепторов, была снижена в головном мозге крыс, подвергавшихся хроническому ультразвуковому воздействию, подобно тому, как наблюдалось стресс-индуцированное снижение экспрессии генов *GABRA1* и *GABRA2*. Единственной исследованной структурой мозга, в которой не наблюдалось снижение экспрессии гена *GABRA3*, оказалась миндалина. Изоляция продолжительностью до 3 недель сама по себе не привела к развитию подобных изменений.

3.14.4. Оценка экспрессии гена *GABRB2*, кодирующего субъединицу $\beta 2$ ГАМК_A-рецепторов, в головном мозге крыс

Не было обнаружено статистически значимых различий между группами в относительной экспрессии гена *GABRB2* в гиппокампе ($F_{6,63}=1.19$, $p=0.67$, one-way ANOVA), префронтальной коре ($F_{6,63}=2.01$, $p=0.059$, one-way ANOVA), среднем мозге ($F_{6,63}=1.2$, $p=0.27$, one-way ANOVA) и миндалине ($F_{6,63}=0.17$, $p=0.93$, one-way ANOVA; Таблица 7).

Таблица 7. Экспрессия гена *GABRB2* в различных структурах головного мозга.

Структура мозга/группа	Интактная группа	Контроль	1 неделя УЗ	Контроль	2 недели УЗ	Контроль	3 недели УЗ
Гиппокамп	1,02±0,16	1,04±0,12	1,1±0,18	1,02±0,05	0,9±0,26	1,05±0,09	0,88±0,33
Префронтальная кора	1,09±0,14	0,94±0,12	0,99±0,27	0,94±0,13	1,02±0,24	0,91±0,08	0,86±0,17
Средний мозг	1,06±0,1	1,06±0,12	0,94±0,23	1,00±0,11	0,85±0,14	1,03±0,12	0,89±0,24
Миндалина	1,17±0,19	0,99±0,12	0,92±0,25	1,12±0,14	1,1±0,11	1,04±0,08	0,98±0,19

Таким образом, ген *GABRB2*, кодирующий субъединицу $\beta 2$ ГАМК_A-рецепторов, стал единственным из изучаемых нами генов, чья экспрессия не изменилась ни в одной из исследованных структур головного мозга крыс, подвергнутых хроническому ультразвуковому воздействию.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В последние десятилетия учащаются случаи диагностирования клинической депрессии; одновременно растет необходимость поиска эффективных методов ее лечения, в том числе медикаментозных (Al-Harbi, 2012). Для решения этих задач используются модели на лабораторных животных. В настоящее время существует большое разнообразие моделей депрессивно-подобного состояния на грызунах различной этиологии, однако большинство из них основывается на физическом воздействии на животное, что не соответствует причинам развития клинической депрессии человека. Таким образом, существует необходимость поиска новых моделей депрессивно-подобного состояния на животных, основной стрессовый фактор которой был бы максимально приближен к причинам возникновения депрессии человека. В качестве подобной модели нами была рассмотрена модель хронического ультразвукового воздействия (Morozova et al., 2016). В отличие от большинства существующих моделей депрессивно-подобного состояния, главенствующую роль в ней играет не непосредственное физическое воздействие на экспериментальное животное, а эмоциональная оценка данного воздействия. В рамках модели хронического ультразвукового воздействия используется непредсказуемое чередование «эмоционально положительных» и «эмоционально отрицательных» стимулов — ультразвуковых волн определенной частоты, вызывающих эмоциональный стресс. Ранее было показано, что воздействие «белого шума» (20Гц-20кГц) и других ультразвуковых частот (16-20 кГц, 60 кГц) не приводило к развитию поведенческих нарушений (Morozova et al., 2016), что доказывало специфичность ультразвуковых частот, вызывающих депрессивно-подобное состояние грызунов. Таким образом, стрессовый фактор данной модели более приближен к факторам, ведущим к нейропсихическим отклонениям человека, одним из которых является психоэмоциональный стресс (Chrousos, Gold, 1992; Simonov, 1997).

Модель ультразвукового воздействия была разработана менее 10 лет назад и, являясь сравнительно новой, нуждается в более детальном изучении. По этой причине в настоящем исследовании впервые было проведено комплексное исследование поведения животных с использованием разнообразных тестов, кроме того, был исследован ряд молекулярных показателей, предположительно ассоциированных с развитием депрессивного расстройства. Отличительной чертой исследования является попытка изучения развития депрессивно-подобного состояния крыс в динамике. Большинство других моделей не предоставляют подобной возможности, в то время как в рамках ультразвуковой модели легко менять длительность стрессового стимула. В нашем исследовании изучалась гипотеза о последовательном, а не одновременном развитии поведенческих и молекулярных изменений у экспериментальных животных по мере увеличения продолжительности стимула. В более ранних исследованиях с использованием данной модели изучался эффект только трех недель непрерывного ультразвукового воздействия, которые, как было показано, гарантированно приводили к развитию депрессивно-подобного состояния у грызунов (Morozova et al., 2016). В связи с этим в настоящей работе изучались также эффекты более коротких сроков действия ультразвука – 1 и 2 недели. Таким образом, в эксперименте было задействовано три группы, подвергающиеся ультразвуковому воздействию разной продолжительности. Данный дизайн эксперимента позволит оценить временной интервал развития различных поведенческих нарушений и соответствие этим изменениям тех или иных молекулярных изменений.

Были проведены классические тесты на определение депрессивно-подобного состояния крыс. Одним из классических признаков клинической депрессии является снижение способности получать удовольствие, отказ от которого является важнейшим симптомом клинической депрессии (Dhar, Barton, 2016). В норме грызуны предпочитают потреблять подслащенный раствор, а при наличии депрессивно-подобного состояния это предпочтение

отсутствует, что расценивается как ангедония (Overstreet, 2012). Тест на развитие ангедонии является наиболее распространенным критерием определения депрессивно-подобного состояния у грызунов (Moreau, 2012). В нашей работе было установлено, что две и более недели ультразвукового воздействия привели к снижению потребления раствора сахарозы, что может быть расценено как состояние ангедонии.

Вторым тестом на определение депрессивно-подобного состояния животных был тест «вынужденного плавания». В данном тесте оценивается поведение животных, помещенных в цилиндр с водой; основным исследуемым показателем в данном тесте является продолжительность иммобильности, то есть отсутствия активных движений, или «поведения отчаяния». Этот показатель может отражать состояние апатии и двигательной заторможенности, также часто сопровождающее клиническую депрессию (Castagné et al., 2011). В настоящем исследовании было показано, что 2 и 3 недели хронического ультразвукового воздействия привели к росту данного показателя, что можно расценивать как признак депрессивно-подобного состояния крыс.

Однако в настоящее время тест вынужденного плавания подвергается критике как тест, определяющий наличие депрессивно-подобного состояния грызунов. Это связано с тем, что иммобильность животных в воде может рассматриваться не как признак поведения отчаяния, а как одна из стратегий поведения, заключающаяся в экономии сил (Molendijk, de Kloet, 2019). Поэтому важно отметить, что в дополнение к тесту вынужденного плавания нами был проведен описанный выше тест на ангедонию, признанный наиболее точным тестом на определение у грызунов депрессивно-подобных черт. В настоящем исследовании изменения поведения экспериментальных животных проявились одновременно как в тесте на ангедонию, так и в тесте вынужденного плавания. Из этого можно заключить, что двух недель хронического ультразвукового воздействия оказалось достаточно для развития поведенческих признаков депрессивно-подобного состояния у

самцов крыс линии Sprague-Dawley, которые могут рассматриваться как удобный объект для моделирования данного состояния в последующих экспериментах.

Развитие клинической депрессии человека часто сопровождают нарушения социального поведения, в том числе избегание социальных контактов (Ratnani et al., 2017; McKenzie et al., 2013). Ввиду этого для изучения социального поведения крыс нами был проведен тест социального взаимодействия, в рамках которого в домашнюю клетку экспериментальных животных помещали ювенильных самцов крыс той же линии. Было установлено, что у крыс, подвергавшихся хроническому ультразвуковому воздействию, снижалась длительность и число социальных контактов, а также увеличивался латентный период первого контакта.

Интересным вопросом при изучении депрессии человека и депрессивно-подобного состояния экспериментальных животных остается их связь с повышенным уровнем агрессии. Некоторые исследователи предполагают, что агрессивность не характерна для депрессивных расстройств, за исключением редких случаев (Смулевич, 1997), в то время как другие исследования утверждают, что повышенный уровень агрессии в большинстве случаев ассоциирован с депрессивным расстройством (Meyrueix et al., 2014; Pikó et al., 2014). В связи с этим, нам представляется важным оценить наличие повышенной агрессивности в структуре депрессивно-подобного состояния, индуцированного хроническим ультразвуковым стрессом у крыс. В работе показано, что в тесте социального взаимодействия не было зарегистрировано случаев агрессивных контактов, что является признаком отсутствия патологической агрессии, поскольку в норме самцы крыс не нападают на ювенильных животных (Vishnivetskaya et al., 2007). Для изучения межсамцовой агрессии нами был также проведен тест «резидент-интродер», отличающийся тем, что в домашнюю клетку экспериментальных животных (резидентов) помещались интродеры - половозрелые самцы сходного пола и возраста. Нами было показано, что процент крыс, демонстрировавших

признаки агрессии, не отличался значимо ни в одной экспериментальной группе относительно группы контроля. Однако были обнаружены различия в показателях крыс, демонстрировавших агрессию в данном тесте. Оказалось, что среди агрессивных животных такие показатели, как суммарное число атак и суммарная продолжительность атак были повышены у крыс, подвергавшихся стрессовому воздействию, а латентный период первой атаки был снижен, причем статистически значимые изменения по сравнению с контрольной группой наблюдались уже после одной недели ультразвукового воздействия. Следовательно, хроническое ультразвуковое воздействие увеличило уровень агрессии у части самцов крыс в тесте «резидент-интродер». Интересно отметить, что наблюдаемые изменения проявились уже через 1 неделю стрессового воздействия, в то время как для увеличения уровня агрессии мышей в данной модели понадобилось 3 недели хронического ультразвукового воздействия (Павлов и др., 2017). Таким образом, крысы оказались более чувствительны к ультразвуковому стрессу. Однако отсутствие увеличения доли животных, демонстрирующих агрессию, указывает на то, что изменение уровня агрессии крыс в рамках данной модели оказалось выборочным. Предположительно, это изменение могло проявляться у животных, изначально склонных к проявлению межсамцовой агрессии. Полученные данные могут быть полезными для изучения механизмов различной чувствительности к стрессу и стресс-индуцированного повышения уровня агрессии. Это может быть актуально в связи с наличием индивидуальных особенностей пациентов с диагностированной клинической депрессией, которые могут быть склонны либо не склонны к проявлению социальной агрессии (Llorca et al., 2016). В целом, полученные нами данные поддерживают точку зрения об отсутствии обязательной взаимосвязи между ростом агрессии и развитием депрессивно-подобного состояния.

Интересно, что нарушения социального поведения крыс в обоих тестах проявились раньше, чем нарушения в тесте Порсолта и тесте на предпочтение раствора сахарозы – классических тестах на определение депрессивно-

подобного состояния у грызунов. Это позволяет заключить, что социальное поведение грызунов очень чувствительно к стрессовому воздействию.

В качестве отличительной черты поведения грызунов с индуцированным депрессивно-подобным состоянием часто рассматривается повышение уровня тревожности (Zhang et al., 2017). Как правило, депрессивно-подобное состояние и тревожные нарушения изучаются экспериментаторами совместно, поскольку повышенная тревожность и депрессивные нарушения могут проявляться одновременно (Estrela et al., 2015). Тем не менее, эти состояния не обязательно связаны друг с другом и обладают различной этиологией (Knyazev et al., 2016). Так, у некоторых пациентов выявляют депрессию, связанную с ангедонией, – неспособностью испытывать удовольствие, – но не связанную с повышенной тревожностью. Это поднимает вопрос о взаимосвязи ангедонии и тревожности у экспериментальных животных в различных моделях депрессивно-подобного состояния.

Из литературных данных известно, что в большинстве теоретических и экспериментальных исследований подчёркивается тесная связь между тревогой и развитием как клинической депрессии человека (Rallis et al., 2014; Fan et al., 2015), так и депрессивно-подобного состояния грызунов (Beerya, Kauferb, 2015; Huang et al., 2017; Neumann et al., 2011; Frazer, Morilak, 2005). При этом увеличение уровня тревожности у грызунов не всегда проявляется совместно с развитием депрессивно-подобных нарушений, аналогично тому, как это наблюдается у пациентов с клинической депрессией (Ju et al., 2018; Knyazev et al., 2016). В связи с этим, для нас представляла интерес оценка возможного изменения уровня тревожности, сопровождающая развитие депрессивно-подобного состояния крыс в новой модели хронического ультразвукового воздействия.

Полученные нами данные о влиянии хронического ультразвукового воздействия на уровень тревожности крыс оказались противоречивыми. С одной стороны, во всех проведенных тестах, направленных на изучение

тревожности, наблюдались схожие результаты. Опытные группы крыс не проводили статистически значимо меньше времени в центральном секторе в тесте «открытое поле», открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» или светлой камере в тесте «темно-светлая камера», что может быть расценено как признак отсутствия повышенной тревожности. С другой, ряд полученных данных подтверждает возможность повышения уровня тревожности под влиянием ультразвука, что выражается в снижении числа выглядываний в открытые рукава лабиринта и свешиваний с открытых рукавов в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», а также снижении числа выглядываний в светлый отсек в тесте «темно-светлая камера».

Известно, что оценка уровня тревожности экспериментального животного является сложной задачей, поскольку в различных экспериментальных моделях одни и те же животные могут демонстрировать различное поведение (Bourin et al., 2007; Ramos, 2008), и потому для определения уровня индивидуальной тревожности или предрасположенности к воздействию эмоционального стресса рекомендуется использовать несколько тестов для одних и тех же животных (Судаков и др., 2013). Схожесть изменений поведения экспериментальных животных, полученных в батарее проведенных тестов, позволяет предположить отсутствие развития явных признаков тревожности, сопряженных с депрессивно-подобным состоянием мышей, индуцированным хроническим ультразвуковым воздействием, однако при этом нельзя полностью исключать влияние данного вида стресса на уровень тревожности экспериментальных животных.

Таким образом, данные, полученные в нашей модели, скорее подтверждают возможность независимого развития депрессивно-подобного состояния от тревоги, уже описывавшуюся в литературе (Overstreet, 2012). Однако наличие данной взаимосвязи, проявляемой на поведенческом уровне, и механизмы, ответственные за наличие или отсутствие повышенной

тревожности как коморбидности депрессивного расстройства, нуждаются в дальнейшем изучении.

Интересным вопросом остается анализ стресс-индуцированного изменения исследовательской активности животных, которая является важным показателем естественного интереса к новизне (Stepanichev et al., 2014). В более ранних исследованиях уже отмечалась ее тесная связь со стресс-индуцированным депрессивно-подобным поведением животных (Mällo et al., 2007), однако в целом эта связь изучалась фрагментарно. В настоящем исследовании исследовательская активность животных с признаками депрессивно-подобного состояния впервые была рассмотрена в целой батарее тестов. Так, оказалось, что у крыс, подвергнутых ультразвуковому воздействию, развивается значительное снижение исследовательской активности во всех использованных тестах. Поэтому, наряду с оценкой прочих параметров депрессивно-подобного состояния, этот показатель также можно считать важным и значимым. Изменение исследовательской активности, наблюдающееся при стрессе у экспериментальных животных, может рассматриваться как воспроизведение симптомов, характеризующих депрессию человека – потерю интереса к новизне и какой-либо деятельности (Гарибова и др., 2017). Ввиду этого снижение показателя активности крыс при хроническом ультразвуковом воздействии еще раз подтверждает валидность модели.

Таким образом, модель ультразвукового стресса приводит к развитию у экспериментальных животных ангедонии и сниженной исследовательской активности. Полученные результаты согласуются с данными об отсутствии явных признаков тревожного поведения у грызунов в данной модели (Морозова и др., 2012). При этом в настоящей работе большинство описанных нарушений в данных тестах было зарегистрировано уже через 2 недели УЗ, то есть одновременно с признаками депрессивно-подобного состояния.

Также было проведено несколько тестов для оценки обучения и памяти экспериментальных животных, поскольку известно, что развитие депрессии

человека часто сопровождается когнитивными нарушениями. В нашем исследовании при выработке УРПИ животные демонстрировали достоверно сниженный латентный период захода в темный отсек, свидетельствующий об ухудшении запоминания удара током в темном отсеке. Это изменение также проявилось только после 3 недель ультразвукового воздействия. Латентный период захода в темный отсек был снижен как через 48 часов после обучения, так и через 1 неделю после обучения, то есть долговременная память экспериментальных животных также была нарушена под воздействием ультразвуковых частот.

Установлено также, что под влиянием УЗ у крыс наблюдалось ухудшение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. Увеличение среднего времени нахождения платформы в большинстве из 8 попыток, проведенных в первый день тестирования, а также в тестовой попытке, проведенной через 48 часов после обучения, было зарегистрировано у крыс, подвергавшихся как 3, так и 2 неделям УЗ, то есть несколько ранее, чем в других проведенных тестах на обучение и память. Предположительно, это может быть связано с дополнительным стрессирующим действием воды. Это косвенно подтверждает тревожное поведение животных, подвергавшихся 2 и 3 неделям УЗ, в воде: хаотичные движения и вокализация. В этом тесте также была проведена дополнительная попытка для оценки отставленных эффектов УЗ на память животных. Было показано, что спустя неделю у крыс было снижено время, проведенное в секторе лабиринта, где ранее находилась платформа, причем этот эффект наблюдался только у группы, подвергавшейся УЗ максимально длительный из рассмотренных сроков – 3 недели.

Наконец, был проведен тест «распознавания объектов», в котором основным рассматриваемым параметром является индекс распознавания нового объекта. Данный индекс был снижен только у экспериментальной группы, подвергавшейся хроническому ультразвуковому воздействию в течение 3 недель, что указывает на ухудшение памяти животных о старом объекте. При этом важно отметить, что рассчитанный индекс не является

отрицательным, что позволяет предположить у животных отсутствие неофобии – боязни нового объекта и его избегания (Ennaceur et al., 2009). Поскольку в настоящем исследовании не было выявлено явных признаков роста уровня тревожности, полученные данные согласуются с известными фактами о том, что неофобия часто сопровождается повышенной тревожностью экспериментального животного (Stryjek et al., 2012).

Полученные результаты о нарушениях памяти экспериментальных животных, вызванных ультразвуковым воздействием, согласуются с данными о том, что пациенты с диагностической клинической депрессией часто жалуются на рассеянность, ухудшение памяти и заторможенность мышления. То, что почти все когнитивные изменения у крыс были обнаружены только спустя 3 недели ультразвукового воздействия, также согласуется с представлениями о когнитивных нарушениях во время депрессии, которые, как правило, сопровождают наиболее затяжные формы расстройства (Antikainen et al., 2001; Butters et al., 2000), в том числе рекуррентные депрессивные расстройства.

Таким образом, в наших опытах выявлена зависимость специфики регистрируемых нарушений от длительности стрессового воздействия. Первые отмеченные нарушения затрагивают сферу коммуникации; затем, по мере усугубления депрессивно-подобного состояния, развивается «поведение отчаяния» и ангедония. В последнюю очередь проявляются когнитивные нарушения. Различный протокол воздействия ультразвука переменных частот позволяет определить у крыс стадии развития депрессивно-подобного состояния, что в дальнейшем может стать основой для новых исследований, посвященных формированию депрессивно-подобных состояний экспериментальных животных и депрессии человека.

Установлено, что с развитием депрессии тесно связан нейротрофический фактор мозга (BDNF). Он угнетает клеточный апоптоз, поддерживая выживаемость нейронов (Autry, Monteggia, 2012; Kuipers, Bramham, 2006), а также способствует росту нейронов и формированию новых

синапсов (Martinowich et al., 2007). Дефицит данного нейротрофического фактора принимается рядом исследователей за одну из основных причин развития депрессии человека (Hashimoto et al., 2014, Molendijk et al., 2011; Вялова, Левчук, 2014) и наблюдался в том числе у грызунов с моделированным депрессивно-подобным состоянием.

При депрессивных расстройствах уменьшается объем некоторых структур мозга, таких как гиппокамп, префронтальная кора, средний мозг и миндалина (Coryell et al., 2005; Hamilton et al., 2008; Sapolsky, 2001). Эти процессы могут изменяться при лечении антидепрессантами, причем часто именно BDNF служит мишенью данного вида пластичности (Lee et al., 2010). Кроме того, префронтальная кора входит в состав системы вознаграждения, чье функционирование нарушается при депрессии (Murray et al., 2011). Нарушения функций гиппокампа связаны с когнитивными расстройствами, часто наблюдающимися при депрессии (Campbell, MacQueen, 2004). По этой причине именно эти структуры были выбраны для дальнейшего молекулярного анализа, в том числе, для исследования экспрессии гена *BDNF*.

В нашей работе было установлено, что 2 недели ультразвукового воздействия вызвали значимое снижение уровня экспрессии гена *BDNF* в гиппокампе. Уровень экспрессии гена *BDNF* в префронтальной коре также достоверно снизился через 2 недели ультразвукового воздействия, а уровень экспрессии гена *BDNF* в миндалине значимо снизился только после 3 недель УЗ. В среднем мозге не было зафиксировано значимого снижения экспрессии гена *BDNF*.

Поскольку измерение относительной экспрессии гена является косвенной оценкой уровня BDNF в мозге, в нашей работе был также проведен иммуноферментный анализ, направленный на непосредственное измерение содержания этого нейротрофического фактора в тканях. Для этой цели были выбраны гиппокамп и префронтальная кора, поскольку в этих структурах наблюдались наиболее значительные изменения экспрессии гена *BDNF*. Согласно результатам данного анализа, концентрация данного белка

достоверно снизилась только через 3 недели УЗ как в гиппокампе, так и в префронтальной коре. Таким образом, снижение содержания белка BDNF проявилось позднее снижения экспрессии соответствующего гена. В данном случае можно предположить, что снижение экспрессии гена под воздействием УЗ и явилось причиной снижения продукции белка, кодируемого этим геном.

Полученные данные соотносятся с результатами тестов на память, нарушения в которых также проявились только у группы, подвергавшейся трем неделям ультразвукового воздействия. Деятельность гиппокампа связана с формированием долговременной памяти (Burgess et al., 2002; Smith, Mizumori, 2006). Эта структура участвует в процессах извлечения памятного следа, а также играет важную роль в пространственной навигации (Duncan, Schlichiting, 2018). Падение уровня BDNF в данной структуре, вероятно, приводит к нарушению ее нормального функционирования, поскольку BDNF участвует в регуляции клеточного апоптоза и синаптогенеза (McAllister et al., 1999; Thoenen, 2000). При этом следует отметить, что обнаруженные поведенческие нарушения в большей степени соотносятся с результатами иммуноферментного анализа, то есть нарушения памяти связаны непосредственно со снижением содержания BDNF. В целом, полученные результаты позволяют предположить связь снижения уровня BDNF с когнитивными нарушениями при депрессивно-подобных состояниях.

Роль ГАМКергической системы в патогенезе депрессивного расстройства остается менее изученной по сравнению с системами моноаминовых нейромедиаторов. Однако ряд исследований указывает на ее взаимосвязь с развитием как клинической депрессии человека, так и депрессивно-подобного состояния экспериментальных животных.

В нашей работе снижение относительной генной экспрессии субъединиц ГАМК_A-рецептора было зарегистрировано уже после 1 недели ультразвукового воздействия. При этом наиболее чувствительной к стрессовому воздействию в данной модели оказалась субъединица $\alpha 1$ ГАМК_A-

рецептора, поскольку снижение относительной экспрессии кодирующего ее гена *GABRA1* наблюдалось во всех изучаемых структурах мозга.

В отличие от гена *GABRA1*, уровень относительной экспрессии генов *GABRA2* и *GABRA3* снижался не во всех исследуемых структурах. Так, снижение экспрессии гена *GABRA2*, кодирующего $\alpha 2$ субъединицу, произошло только в среднем мозге и миндалине, а снижение экспрессии гена *GABRA3*, кодирующего $\alpha 3$ субъединицу, только в среднем мозге и префронтальной коре. При этом экспрессия гена *GABRB2* не изменилась ни в одной структуре. Таким образом, в целом в данной работе наблюдалось стресс-индуцированное снижение ряда количественных компонентов ГАМКергической системы, проявляющееся по-разному в разных структурах мозга.

Кроме того, исследование динамики снижения относительной экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецепторов, в ответ на ультразвуковое воздействие позволило установить различные временные интервалы, в которые происходят эти изменения. Так, снижение экспрессии гена *GABRA1* наблюдалось уже после 1 недели хронического ультразвукового воздействия, в то время как снижение экспрессии гена *GABRA2* развивалось только после 3 недель аналогичного воздействия. Таким образом, продолжительность стрессового воздействия может различным образом влиять на функционирование ГАМКергической системы. Полученные нами данные могут способствовать объяснению некоторых противоречий, полученных ранее другими авторами. Так, в некоторых исследованиях, посвященных влиянию на функционирование ГАМКергической системы крыс различных видов стресса говорилось как о снижении экспрессии генов, кодирующих различные субъединицы ГАМК_A-рецепторов, в том числе субъединицы $\alpha 1$ и $\alpha 2$ (Verkuyl et al., 2004), так и об отсутствии подобных изменений (Rocha et al., 2016). Вероятно, подобные отличия в полученных результатах могут быть связаны со сложной зависимостью развития нарушений функционирования различных компонентов ГАМКергической

системы, для выяснения которой требуется продолжать исследования в этом направлении.

Таким образом, в нашей работе наблюдалась тенденция к стресс-индуцированному снижению экспрессии генов, кодирующих субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ ГАМКергических рецепторов, подобно тому, как это было отмечено в клинических исследованиях (Fatemi et al., 2013). Данный эффект был обнаружен нами во всех выбранных для исследования структурах мозга и проявился одновременно с поведенческими проявлениями депрессивно-подобного состояния. Однако при этом наблюдалась различная вовлеченность структур в реакции на стрессовое воздействие. Полученные данные могут оказаться важными при выборе моделей депрессивно-подобного состояния, различающихся по длительности стрессового воздействия, и для исследования зависимости развивающихся молекулярных изменений от продолжительности стресса.

Среди патофизиологических механизмов стрессового воздействия рассматривают окислительный стресс в ткани головного мозга (Bouyaed et al., 2009), лежащий в основе многих симптомов, связанных со стрессом (Cline et al., 2015). По этой причине в нашей работе также была изучена роль окислительного стресса в структурах лимбической системы головного мозга в формировании депрессивно-подобного состояния. В качестве общепринятых маркеров окислительного стресса нами были выбраны общий глутатион и содержание карбонилированных белков, определяемые флуорометрическим методом. В работе установлено, что как содержание карбонилированных белков, так и содержание общего глутатиона было повышено в префронтальной коре экспериментальных животных после 2 недель ультразвукового воздействия. Аналогично, повышение содержания общего глутатиона в гиппокампе также наблюдалось спустя 2 недели экспериментального воздействия; содержание карбонилированных белков в гиппокампе было повышено спустя 3 недели ультразвукового стресса. Таким образом, большинство изменений наблюдалось уже после 2 недель УЗ, то есть

соотносилось с большинством поведенческих изменений, особенно изменений, отражающих именно депрессивно-подобные черты животных. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что развитие депрессивно-подобного состояния в данной модели тесно связано с окислительным стрессом в головном мозге.

В последнее время установлено, что окислительный стресс возникает также при умеренных функциональных нагрузках, сопровождающих обучение и память животных. Так, было показано развитие окислительного стресса при выработке у крыс условных рефлексов как с отрицательным, так и с положительным подкреплением, который нивелировался эндогенным антиоксидантом карнозином, что сопровождалось ускорением обучения (Стволинский и др., 2014; Бережной и др., 2016). Из этого можно заключить, что снижение окислительного стресса в мозге также благотворно влияет на память и обучения животных.

В настоящем исследовании окислительный стресс, вызванный хроническим воздействием УЗ переменных частот, сопровождался, как было описано выше, ухудшением памяти крыс, что подчеркивает связь окислительного стресса с нарушением когнитивных функций.

Еще одним фактором, отражающим развитие депрессивно-подобного состояния животных, является уровень кортикостерона в плазме крови. Кортикостерон представляет собой глюкокортикоид, синтезируемый корой надпочечников, и рассматривается как основной «гормон стресса» у грызунов. В настоящей работе повышение уровня кортикостерона в плазме крови наблюдалось спустя 2 недели ультразвукового воздействия, что является важным физиологическим показателем, доказывающим наличие стрессового воздействия в данной модели. Результаты измерения этого показателя хорошо согласуются с другими поведенческими и молекулярными данными, полученными при изучении данной модели.

Наконец, при изучении модели ультразвукового воздействия необходимо отделить влияние собственно ультразвука от фактора

индивидуального содержания, в связи с чем в рамках данной работы был изучен вопрос о влиянии кратковременной социальной изоляции на поведение крыс. Задействованные контрольные группы состояли из особей, содержащихся в индивидуальных клетках в течение 1, 2 или 3 недель. Ранее было показано, что при содержании животных в группах признаки депрессивно-подобного поведения под влиянием ультразвукового воздействия развиваются слабее, поэтому во всех последующих экспериментах стрессируемые крысы содержались поодиночке, что усиливало эффект ультразвукового воздействия. Однако при этом важно иметь в виду, что изоляция животных в течение 3 недель сама по себе не вызывала подобных изменений.

В целом, модель социальной изоляции является известной экспериментальной моделью депрессивно-подобного состояния на грызунах (Шабанов и др., 2003). Она хорошо валидирована и приближена к причинам возникновения депрессии у человека по сравнению со многими прочими описанными моделями. Протоколы данной парадигмы могут быть различными: так, например, зачастую используется разновидность этой модели, связанная с ранней социальной изоляцией, в рамках которой детеныши крыс и мышей отлучаются от матери на 20-30 день постнатального развития (Крупина и др., 2002; Fischer et al., 2012). Однако модель социальной изоляции успешно применяется и на половозрелых особях (Lukkes et al., 2009). Общей чертой подобных исследований является продолжительность социальной изоляции, составляющая, как правило, 7-10 недель (Djordjevic et al., 2012; Stepanichev et al., 2014). Таким образом, применение данной модели связано со значительными временными затратами, при этом крайне редко встречается аргументация относительно выбора столь длительного срока изоляции. Нередко перед исследователями встает вопрос, можно ли расценивать кратковременную социальную изоляцию как стрессирующий фактор, способный вызвать выраженные депрессивно-подобные нарушения.

В настоящей работе было показано, что социальная изоляция продолжительностью до 3 недель не привела к развитию статистически значимых отличий практически ни в одном из рассматриваемых параметров. Это может являться важным сведением при проведении экспериментов, подразумевающих необходимость кратковременного изолированного содержания животных и карантина. Необходимо также учитывать, что данный срок социальной изоляции крыс нельзя использовать как модель депрессивно-подобного состояния в связи с отсутствием изменения поведенческого ответа экспериментальных животных в классических тестах на определение депрессивно-подобного состояния. Для развития депрессивно-подобного состояния у половозрелых самцов крыс требуется более длительный период изоляции. Следовательно, полученные в нашей работе свидетельства депрессивно-подобного поведения и сопутствующих ему изменений поведения, такие как повышение агрессии, снижение исследовательской активности и нарушения памяти, вызваны ультразвуковым воздействием, а не изолированным содержанием животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы различные поведенческие и молекулярные изменения под воздействием хронического ультразвукового воздействия продолжительностью в 1, 2 и 3 недели, при этом исследование эффектов УЗ длительностью в 1 и 2 недели было проведено впервые. Нами было показано, что поведенческие изменения развились не одновременно, а последовательно: 1 неделя ультразвукового воздействия привела к нарушению социальной активности крыс, через 2 недели ультразвукового воздействия проявились депрессивно-подобные черты поведения крыс, а также снижение уровня исследовательской активности. Наконец, нарушения памяти экспериментальных животных были зарегистрированы только у группы, подвергавшейся 3 неделям УЗ. В целом, полученные результаты согласуются с некоторыми более ранними данными, полученными при изучении данной модели, что подтверждает ее воспроизводимость.

В работе также было исследовано несколько важных молекулярных параметров, характеризующих данную модель как модель депрессивно-подобного состояния грызунов. Так, было показано увеличение уровня содержания кортикостерона в плазме крови крыс, подвергнутых 2 и 3 неделям ультразвукового воздействия. 2 и более недели УЗ также привели к росту окислительного стресса в головном мозге крыс, что выразилось в увеличении содержания карбонилированных белков и общего глутатиона - двух широко используемых маркеров окислительного стресса. Развитие этих изменений соотносится по времени с возникновением большинства нарушений поведения.

Также была исследована экспрессия гена *BDNF* и проведён иммуноферментный анализ содержания белка в головном мозге крыс. Снижение содержания *BDNF* проявилось после 3 недель УЗ, что соотносится со временем проявления нарушений памяти экспериментальных животных. Таким образом, можно предположить, что снижение *BDNF* при депрессивно-

подобном состоянии связано, в том числе, с ухудшением памяти, поскольку данный белок известен своим участием в процессах синаптогенеза и вовлечением в регуляцию памяти и обучения.

Наконец, была исследована экспрессия некоторых субъединиц ГАМК_A-рецепторов, чья роль в патогенезе депрессивно-подобного состояния остается менее изученной по сравнению с рецепторами, например, моноаминергических систем. Полученные данные оказались однонаправленными, то есть наблюдалось снижение экспрессии субъединиц $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$, однако оно проявлялось по-разному в разных структурах мозга. Экспрессия субъединицы $\beta 2$ не изменилась в данной модели.

Ценность работы также обусловлена впервые проведенным изучением динамики развития депрессивно-подобного состояния. Полученные данные могут быть полезны для дальнейшего исследования этапов развития депрессивного расстройства. Полученные данные могут представлять собой методологическую ценность, поскольку указывают на возможность моделирования разных симптомокомплексов у крыс.

Таким образом, в работе был выявлен ряд изменений, вызываемых ультразвуковым воздействием как на поведенческом, так и на молекулярно-биохимическом уровне, и впервые показана их зависимость от продолжения стрессового воздействия. Одновременно было показано отсутствие аналогичных изменений под воздействием индивидуального содержания сроком до 3 недель. Следовательно, полученные в нашей работе свидетельства депрессивно-подобного поведения и молекулярных изменений вызваны ультразвуковым воздействием, а не изолированным содержанием животных.

ВЫВОДЫ

1. Установлена динамика развития поведенческих изменений под влиянием хронического ультразвукового воздействия: 1 неделя УЗ вызывает нарушение социального поведения крыс, 2 недели УЗ - депрессивно-подобные черты поведения и снижение исследовательской активности, а 3 недели УЗ приводят к нарушениям памяти крыс.

2. Две недели хронического ультразвукового воздействия приводят к увеличению содержания кортикостерона в плазме крови крыс.

3. Две недели хронического ультразвукового воздействия приводят к увеличению содержания маркеров окислительного стресса в головном мозге крыс.

4. Три недели хронического ультразвукового воздействия вызывают снижение содержания BDNF в головном мозге крыс, которому предшествует снижение относительной экспрессии кодирующего гена.

5. Хроническое ультразвуковое воздействие приводит к снижению относительной экспрессии генов *GABRA1*, *GABRA2* и *GABRA3*, кодирующих субъединицы $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$ ГАМК_A-рецепторов, не изменяя экспрессию гена *GABRB2*, кодирующего субъединицу $\beta 2$.

6. Социальная изоляция продолжительностью до 3 недель не вызывает подобных поведенческих и молекулярных изменений.

7. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что развитие депрессивно-подобного состояния, вызванного хроническим ультразвуковым воздействием, происходит поэтапно, что соотносится с динамикой молекулярных изменений.

Список литературы

1. Анохин П. К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса. М.: Медицина, 1968. 547 с.
2. Ахмадеев А.В., Галиева Л.Ф., Леушкина Н.Ф. / Половые различия груминга и уровней тревожности у предпочитающих алкоголь крыс. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – Т.5.
3. Бережной Д.С., Фёдорова Т.Н., Стволинский С.Л., Иноземцев А.Н. / Карнозин модулирует окислительный гомеостаз мозга и уровень нейромедиаторов в условиях обучения с положительным и отрицательным подкреплением // Нейрохимия. – 2016. – Т.33, № 4. – С. 293–300.
4. Вальдман А.В., Козловская М.М., Медведев О.С. Фармакологическая регуляция эмоционального стресса. М.: Медицина, 1979. 359 с.
5. Вялова Н., Левчук Л. / Роль BDNF в формировании депрессивных расстройств. // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т.10. – С. 771-775.
6. Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. / Поведенческие экспериментальные модели депрессии. // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2017. – Т.3. – С. 14-19.
7. Григорьян Г.А., Гуляева Н.В. / Моделирование депрессии на животных: поведение как основа методологии, критериев оценки и классификации. // Журн. высш. нерв. деят. – 2015. – Т.65. – С. 1-18.
8. Демянко И.В., Филатова Е.В., Веракса А.Е., Егоров А.Ю. / Экспериментальное моделирование обсессивно-компульсивного расстройства. // Психическое здоровье. – 2019. – Т.10. – С.21-26.
9. Коваленко И., Кудрявцева Н. / Развитие симптомов аутистического спектра под влиянием хронического социального стресса у тревожных самцов мышей: влияние диазепама // Психофармакология и биологическая наркология. – 2010. – Т. 10. – С. 2624-2635.

- 10.Крупина Н.А., Хоничева Н.М., Гарбач Р.Р. / Поведенческие последствия изоляции в раннем онтогенезе у крыс: селективность тревожных состояний. // Журн. высш. нерв. деят. – 2002. – Т. 6. – С. 743-749.
- 11.Морозова, А.Ю., Зубков Е.А., Сторожева З.И., Кекелидзе З.И., Чехонин В.П. / Влияние излучения ультразвукового диапазона на формирование симптомов депрессии и тревожности у крыс. // Бюл. эксп. биол. мед. – 2012. – Т. 12. – С. 705-708.
- 12.Павлов Д.А., Горлова А.Ю., Ушакова В.М., Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Иноземцев А.Н., Чехонин В.П. / Влияние хронического действия ультразвука переменных частот на уровни агрессии у тревожности у мышей линии СВА и BALB/c // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2017. – Т.163. – С. 400-403.
- 13.Симонов П. В. Эмоциональный мозг. М.: Наука, 1981, 216 с.
- 14.Смулевич А.Б. / Депрессии и коморбидные расстройства. // М., 1997. 155 с.
- 15.Стволинский С.Л., Федорова Т.Н., Бережной Д.С., Логвиненко А.А., Музычук О.А., Иноземцев А.Н. Карнозин (β -аланил-l-гистидин) повышает эффективность обучения в условиях окислительного стресса, связанного с выработкой условного рефлекса с отрицательным подкреплением // Нейрохимия. – 2014. – Т. 31, № 4. – С. 328–334.
- 16.Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г. / Определение уровня тревожности крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля. // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2013. – Т. 10. – С. 489-493.
- 17.Судаков К.В. Системные механизмы эмоционального стресса. М.: Медицина, 1982, 232 с.
- 18.Сукиасян С.Г., Маргарян С.П., Манасян Н.Г. / О соматопсихических соотношениях при депрессиях в первичном звене здравоохранения: соматическая и психическая депрессии. // Российский психиатрический журнал. – 2007. – Т.3. – С. 58-63.

19. Ушакова В.М., Горлова А.В., Зубков Е.А., Морозова А.Ю., Зоркина Я.А., Павлов Д.А., Иноземцев А.Н., Чехонин В.П. / Экспериментальные модели депрессивного состояния. // Журн. высш. нерв. деят. – 2019. – Т. 69(7). – С. 230-247.
20. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Русановский В.В. / Поведенческие и нейрохимические последствия социальной изоляции. // Обзоры по клинической нейрофизиологии и лекарственной терапии. – 2003. – Т. 2(4). – С. 26-44.
21. Язуина Н.А., Комлева Ю.К., Салмина А.Б., Петрова М.М., Морозова Г.А., Малиновская Н.А., Герцог Г.Е. / Современные экспериментальные модели депрессии. // Биомед. – 2013. – Т.1. – С.66-77.
22. Aitken R.J., Roman S.D. / Antioxidant systems and oxidative stress in the testes // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2008. – V. 1. – P. 15–24.
23. Al-Harbi K.S. / Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. // Patient Prefer Adherence. – 2012. – V. 6. – P. 369-388.
24. Amchova P., Kucerova J., Giugliano V., Babinska Z., Zanda M.T., Scherma M., Dusek L., Fadda P., Micale V., Sulcova A., Fratta W., Fattore L. / Enhanced self-administration of the CB1 receptor agonist WIN55,212-2 in olfactory bulbectomized rats: evaluation of possible serotonergic and dopaminergic underlying mechanisms // Front.Pharmacol. – 2014. – V. 5. – P. 44.
25. Antikainen R., Hänninen T., Honkalampi K., Hintikka J., Koivumaa-Honkanen H., Tanskanen A., Viinamäki H. / Mood improvement reduces memory complaints in depressed patients. // Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. – 2001. – V. 251(1). – P. 6-11.
26. Aso E., Ozaita A., Valdizan E.M., Ledent C., Pazos A., Maldonado R. / BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice // J.Neurochem. – 2008. – V. 105. – P. 565-572.

27. Autry A.E., Monteggia L.M. / Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. // Pharmacol. – 2012. – V. 64. – P. 238-258.
28. Avitsur R., Maayan R., Weizman A. / Neonatal stress modulates sickness behavior: role for proinflammatory cytokines. // J. Neuroimmunol. – 2013. – V. 257. – P. 59–66.
29. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. / Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. // Oxid Med Cell Longev. – 2014: 360438.
30. Becker HC. / Animal models of alcohol withdrawal // Alcohol. Res. Health. – 2000. V. 24(2). – P. 105-113.
31. Beery A.K., Kauferb D. / Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. // Neurobiol Stress. – 2015. – V. 1. – P. 116–127.
32. Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O. / Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. // Journal of Affective Disorders. – 2001. – V. 64. – P. 43–51.
33. Bouayed J., Rammal H., Younos C., Soulimani R. / Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice // Eur J Pharmacol. – 2007. – V. 564. – P. 146–149.
34. Bourin M., Petit-Demoulière B., Dhonnchadha B.N., Hascöet M. / Animal models of anxiety in mice. // Fundam Clin Pharmacol. – 2007. – V. 21. – P. 567-574.
35. Brudzynski S.M. / Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. // Curr. Opin. Neurobiol. – 2013. – V. 23(3). – P. 310-317.
36. Brudzynski S.M., Fletcher N.H. Rat ultrasonic vocalization: short-range communication. Handbook of Mammalian Vocalization. Elsevier; London: 2010. pp. 69–76.

37. Bruzos-Cidón C., Llamosas N., Ugedo L., Torrecilla M. / Dysfunctional inhibitory mechanisms in locus coeruleus neurons of the wistar kyoto rat // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2015. – V. 18(7). – P. 1-34.
38. Burgess N., Maguire E., O'Keefe J. / The human hippocampus and spatial and episodic memory. // *Neuron.* – 2002. – V. 35(4). – P. 25-41.
39. Butters M.A., Becker J.T., Nebes R.D., Zmuda M.D., Mulsant B.H., Pollock B.G., Reynolds C.F. / Changes in cognitive functioning following treatment of late-life depression. // *Am J Psychiatry.* – 2000. – V. 157. – P. 1949-1954.
40. Butters M.A., Becker J.T., Nebes R.D., Zmuda M.D., Mulsant B.H., Pollock B.G., Reynolds C.F. / Changes in cognitive functioning following treatment of late-life depression. // *Am J Psychiatry.* – 2000. – V. 157. – P. 1949-1954.
41. Campbell S., MacQueen G. / The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. // *J Psychiatry Neurosci.* – 2004. – V. 29. – P. 417–426.
42. Cardozo P.F., Song S., Parthasarathy A., Hazzi C., Naidu K., Ramos R.J. / Oxidative DNA damage in the aging mouse brain // *Mov Disord.* – 1999. – V. 14. – P. 972–980.
43. Castagné V., Moser P., Roux S., Porsolt R.D. / Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. // *Curr Protoc Neurosci.* – 2011. – Chapter 8.
44. Castillo-Gómez E., Coviello S., Perez-Rando M., Curto Y., Carceller H., Salvador A., Nacher J. / Streptozotocin diabetic mice display depressive-like behavior and alterations in the structure, neurotransmission and plasticity of medial prefrontal cortex interneurons. // *Brain Res Bull.* – 2015. – V. 116. – P. 45-56.
45. Celada P., Puig M., Amargós-Bosch M., Adell A., Artigas F. / The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. // *J. Psychiatry. Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – P. 252-265.

46. Chourbaji S., Zacher C., Sanchis-Segura C., Dormann C., Vollmayr B., Gass P. / Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice // *Brain. Res. Brain. Res. Protoc.* - 2015. – V. 16. – P. 70–78.
47. Chrousos G.P., Gold P.W. / The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. // *J. Am. Med. Assoc.* – 1992. – V. 267. – P. 1244–1252.
48. Cline B.H., Anthony D.C., Lysko A., Dolgov O., Anokhin K., Schroeter C., Malin D., Kubatiev A., Steinbusch H.W., Lesch K.P., Strekalova T. / Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia // *Behav Brain Res.* – 2015. – V. 276. – P. 118-129.
49. Constantini F., D’Amato F. / Ultrasonic vocalization in mice and rats: social contexts and functions. // *Acta Zool.* – 2006. – V. 52. – P. 619–633.
50. Coryell W., Nopoulos P., Drevets W., Andreasen N. – Subgenual Prefrontal Cortex Volumes in Major Depressive Disorder and Schizophrenia: Diagnostic Specificity and Prognostic Implications. // *American Journal of Psychiatry.* – 2005. – V. 162(9). – P. 1706-1712.
51. Cryan J.F, Mombereau C. / In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice // *Mol. Psychiatry.* – 2004. – V. 9. – P. 326–357.
52. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. / Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clin Chim Acta.* – 2003. – V. 329. – P. 23-38.
53. de Kloet E.R., Joëls M., Holsboer F. / Stress and the brain: from adaptation to disease. // *Nat Rev Neurosci.* – 2005. – Vol. 6(6). – P. 463-75.
54. Dhar A.K., Barton D.A. / Depression and the Link with Cardiovascular Disease. // *Front Psychiatry.* – 2016. – V. 21. – P. 7-33.
55. Djordjevic J., Djordjevic A., Adzic M., Radojicic M.B. / Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. // *Neuropsychobiology.* – 2012. – V. 66(2). – P. 112-119.

56. Drugan R.C., Christianson J.P., Warner T.A., Kent S. / Resilience in shock and swim stress models of depression // *Front.Behav.Neurosci.* – 2013. – V. 7. – P. 1-8.
57. Duffy S.L., Lagopoulos J., Cockayne N., Hermens D.F., Hickie I.B., Naismith S.L. / Oxidative stress and depressive symptoms in older adults: A magnetic resonance spectroscopy study // *J Affect Disord.* – 2015. – V. 180. – P. 29-35.
58. Duman R.S. / Neurobiology of Stress, Depression, and Rapid Acting Antidepressants: Remodeling Synaptic Connections. // *Depress Anxiety.* – 2014 – V. 31(4). – P. 291–296.
59. Duncan K.D., Schlichting M.L. / Hippocampal representations as a function of time, subregion, and brain state. // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2018. – V. 153. – P. 40-56.
60. Earnheart J.C., Schweizer C., Crestani F., Iwasato T., Itohara S., Mohler H., Luscher B. / GABAergic Control of Adult Hippocampal Neurogenesis in Relation to Behavior Indicative of Trait Anxiety and Depression States // *Journal of Neuroscience.* – 2007. – V. 27. – P. 3845–3854.
61. El-Hage W., Leman S., Camus V., Belzung C. / Mechanisms of antidepressant resistance // *Front Pharmacol.* – 2013. – V. 4. – P. 146.
62. Ennaceur A., Michalikova S., Chazot P.L. / Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty and to an object recognition task in an open space and an enclosed space. // *Behav Brain Res.* – 2009. – V. 197(2). – P. 417-434.
63. Estrela D.C., Silva W., A.M., Guimarães A.T.B., Mendes B.O., Castro A.L.S., Torres L.S., Malafaia G. / Predictive behaviors for anxiety and depression in female Wistar rats subjected to cafeteria diet and stress. // *Physiology and Behavior.* – 2015. – V. 15. – P. 252-263.
64. Fan L.B., Blumenthal J.A., Watkins L.L., Sherwood A. / Work and home stress: associations with anxiety and depression symptoms. // *Occup Med (Lond).* – 2015. – V. 65(2). – P. 110-116.

65. Fatemi S.H., Folsom T.D., Reutiman T.J., Vazquez G. / Phosphodiesterase signaling system is disrupted in the cerebella of subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. // *Schizophr Res.* – 2010. – V. 119(1-3). – P. 266-267.
66. Fatemi S.H., Folsom T.D., Rooney R.J., Thuras P.D. / mRNA and protein expression for novel GABAA receptors θ and $\rho 2$ are altered in schizophrenia and mood disorders; relevance to FMRP-mGluR5 signaling pathway. // *Transl Psychiatry.* – 2013. – V. 3. – e271.
67. Fava M., Kendler K. / Major depressive disorder // *Neuron.* – 2000. – V. 28. – P. 335-341.
68. Ferrari A., Charlson F., Norman R., Patten S., Freedman G., Murray C., Vos T., Whiteford H. / Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: Findings from the global burden of disease study // *PLoS Med.* – 2013. – V. 10(11). – e1001547.
69. Fincham F., Hokoda A., Sanders R. / Learned helplessness, test anxiety, and academic achievement: a longitudinal analysis // *Child. Dev.* – 1989. – V. 60(1). – P. 138-45.
70. Fischer C.W., Liebenberg N., Elfving B., Lund S., Wegener G. / Isolation-induced behavioural changes in a genetic animal model of depression. // *Behav Brain Res.* – 2012. – V. 230(1). – P. 85-91.
71. Fontes M.A., Xavier C.H., Marins F.R., Limborço-Filho M., Vaz G.C., Müller-Ribeiro F.C., Nalivaiko E. / Emotional stress and sympathetic activity: Contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. // *Brain Research.* – 2014. – V. 1554. – P. 49-58.
72. Frazer A., Morilak D.A. / What should animal models of depression model? // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2005. – V. 29. – P. 515-523.
73. Gibson S.A., Korade Z., Shelton R.S. / Oxidative Stress and Glutathione Response in Tissue Cultures from Persons with Major Depression // *J Psychiatr Res.* – 2012. – V. 46(10). – P. 1326–1332.

74. Gómez-Lázaro E., Arregi A., Beitia G., Vegas O., Azpiroz A., Garmendia L.
/ Individual differences in chronically defeated male mice: behavioral, endocrine, immune, and neurotrophic changes as markers of vulnerability to the effects of stress. // *Stress*. – 2011. – V. 14(5). – P. 537-548.
75. Goodwin G.M., Phil D. / Depression and associated physical diseases and symptoms. // *Dialogues ClinNeurosci*. – 2006. – V. 8(2). – P. 259–265.
76. Goto T., Toyoda A.A. / Mouse Model of Subchronic and Mild Social Defeat Stress for Understanding Stress-induced Behavioral and Physiological Deficits // *J. Vis. Exp*. – 2015. – V. 105.
77. Grønli J., Fiske E., Murison R., Bjorvatn B., Sørensen E., Ursin R., Portas C.M. / Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. // *Behav Brain Res*. – 2007. – V. 181(1). – P. 42-51.
78. Gunther U., Benson J., Benke D., Fritschy J.M., Reyes G., Knoflach F., Crestani F., Aguzzi A., Arigoni M., Lang Y., Bluethmann H., Mohler H., Luscher B. / Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. – V. 92. – P. 7749–7753.
79. Halliwell B. / Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? // *J Neurochem*. – 2006. – V. 97. – P. 1634–1658.
80. Hamilton J., Siemer M., Gotlib I. / Amygdala volume in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. // *Mol Psychiatry*. – 2008. – V. 13(11). – P. 993-1000.
81. Hashimoto K., Shimizu E., Iyo M. / Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. // *Brain Res Rev*. – 2004. – V. 45(2). – P. 104-114.
82. Hendrickx H., McEwen B.S., Ouderaa F. / Metabolism, mood and cognition in aging: the importance of lifestyle and dietary intervention. // *Neurobiol Aging*. – 2005. – V. 26. – Suppl. 1–5.

83. Hoshaw B.A., Malberg J.E., Lucki I. / Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. // *Brain Research*. – 2005. – V. 1037. – P. 204–208.
84. Hovatta I., Tennant R.S., Helton R., Marr R.A., Singer O., Redwine J.M., Ellison J.A., Schadt E.E., Verma I.M., Lockhart D.J., Barlow C. / Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice // *Nature*. – 2005. – V. 438. – P. 662–666.
85. Huang H.J., Zhu X.C., Han Q.Q., Wang Y.L., Yue N., Wang J., Yu R., Li B., Wu G.C., Liu Q., Yu J. / Ghrelin alleviates anxiety- and depression-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress in rodents. // *Behav Brain Res*. – 2017. – V. 30. – P. 333–343.
86. Iniguez S.D., Aubry A., Riggs L.M., Alipio J.B., Zanca R.M., Flores-Ramirez F.J., Hernandez M.A., Nieto S.J., Musheyev D., Serrano P.A. / Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. // *Neurobiol Stress*. – 2016. – V. 5. – P. 54–64.
87. Jacob K.S. / Depression: a major public health problem in need of a multi-sectoral response. // *Indian J Med Res*. – 2012. – V. 136. – P. 537–539.
88. Jacobsen J.P., Medvedev I.O., Caron M.G. / The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. – 2012. – V. 367. – P. 2444–2459.
89. Jarosik J., Legutko B., Unsicker K., von Bohlen Und Halbach O. / Antidepressant-mediated reversal of abnormal behavior and neurodegeneration in mice following olfactory bulbectomy // *Exp. Neurol*. – 2007. – V. 204(1). – P. 20–28.
90. Johnson S.A., Fournier N.M., Kalynchuk L.E. / Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. // *Behav Brain Res*. – 2006. – V. 168(2). – P. 280–288.

91. Ju H.B., Kang E.C., Jeon D.W., Kim T.H., Moon J.J., Kim S.J., Choi J.M., Jung D.U. / Associations Among Plasma Stress Markers and Symptoms of Anxiety and Depression in Patients with Breast Cancer Following Surgery // *Psychiatry Investig.* – 2018. – V. 15(2). – P. 133-140.
92. Kanner A.M. / Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. // *Biol Psychiatry.* – 2003. – V. 54(3). – P. 388-398.
93. Kelly J., Wrynn A., Leonard B. / The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update // *Pharmacol. Ther.* – 1997. – Vol. 74(3). – P. 299-316.
94. Kessler R.C., Sampson N.A., Berglund P., Gruber M.J., Al-Hamzawi A., Andrade L., Bunting B., Demyttenaere K., Florescu S., de Girolamo G., Gureje O., He Y., Hu C., Huang Y., Karam E., Kovess-Masfety V., Lee S., Levinson D., Medina Mora M.E., Moskalewicz J., Nakamura Y., Navarro-Mateu F., Browne M.A., Piazza M., Posada-Villa J., Slade T., Ten Have M., Torres Y., Vilagut G., Xavier M., Zarkov Z., Shahly V., Wilcox M.A. / Anxious and non-anxious major depressive disorder in the World Health Organization World Mental Health Surveys. // *Epidemiol Psychiatr Sci.* – 2015. – V. 24. – P. 210-226.
95. Knyazev G.G., Savostyanov A.N., Bocharov A.V., Rimareva J.M. / Anxiety, depression, and oscillatory dynamics in a social interaction model. // *Brain Research.* – 2016. – V. 1644. – P. 62-69.
96. Koolhaas J.M., Coppens C.M., de boer S.F., Buwada B., Meerlo P., Timmermans P.J.A. / The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress // *J. Vis. Exp.* – 2013. – Vol. 77. – e4367.
97. Kubera M., Obuchowicz E., Goehler L., Brzeszcz J., Maes M. / In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. // *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2011. – V. 35. – P. 744–759.

98. Kuipers S., Bramham C. / Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. // *Curr Opin Drug Discov Devel.* – 2006. – V. 9(5). – P. 580-586.
99. Kuloglu M., Atmaca M., Tezcan E., Gecici O., Ustundag B., Bulut S. / Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder // *Neuropsychobiology.* – 2002. – V. 46. – P. 186–189.
100. Lam R.W., Kennedy S.H., McIntyre R.S., Khullar A. / Cognitive dysfunction in major depressive disorder: effects on psychosocial functioning and implications for treatment. // *Can J Psychiatry.* – 2014. – V. 59(12). – P. 649-654.
101. Lee A. J., Jiffar T., Kupferman M.E. / Novel role for BDNF-TrkB in the regulation of chemotherapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(1). – e30246.
102. Lee B., Kim Y. / The Roles of BDNF in the Pathophysiology of Major Depression and in Antidepressant Treatment. // *Psychiatry Investig.* – 2010. – V. 7. – P. 231-235.
103. Lee S.Y., Lee S.J., Han C., Patkar A.A., Masand P.S., Pae C.U. / Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* – 2013. – V. 46. – P. 224–235.
104. Liu F., Liu YP., Lei G., Liu P., Chu Z., Gao C.G., Dang Y.H. / Antidepressant effect of recombinant NT4-NAP/AAV on social isolated mice through intranasal route // *Oncotarget.* – 2016. – V. 8(6).
105. Livak K.D., Schmittgen T.D. / Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. // *Methods.* – 2001. – V. 25. – P. 402-408.
106. Llorca A., Malonda E., Samper P. / The role of emotions in depression and aggression. // *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* – 2016. – V. 21(5). – P. 559–564.

107. Lohoff F.W. / Overview of the genetics of major depressive disorder. // *Curr Psychiatry Rep.* – 2010. – V. 12(6). – P. 539-546.
108. Lukkes J.L., Watt M.J., Lowry C.A., Forster G.L. / Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. // *Front Behav Neurosci.* – 2009. – V. 3. – P. 18.
109. Maes M., Kubera M., Uytterhoeven M., Vrydags N., Bosmans E. / Increased plasma peroxides as a marker of oxidative stress in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). // *Med Sci Monit.* – 2011. – V. –17(4). – SC11-5.
110. Maguire J. / Stress-induced plasticity of GABAergic inhibition. // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – V. 8. – P.157-169.
111. Mällo T., Kõiv K., O'Leary A., Eller M., Harro J. / Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. // *Behav Brain Res.* – 2007. – V. 177(2). – P. 269-281.
112. Mansari M., Guiard B., Chernoloz O., Ghanbari R., Katz N., Blier P. / Relevance of Norepinephrine–Dopamine Interactions in the Treatment of Major Depressive Disorder. // *CNS Neurosci Ther.* – 2010. – V. 16. – P. 1–17.
113. Martinowich K., Manji H., Lu B. / New insights into BDNF function in depression and anxiety. // *Nat Neurosci.* – 2007. – V. 10(9). – P. 1089-1093.
114. McAllister A.K., Katz L.C., Lo D.C. / Neurotrophins and synaptic plasticity. // *Annu Rev Neurosci.* – 1999. – V. 22. – P. 295–318.
115. McEwen B.S., Stellar E. / Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. // *Arch Intern Med.* – 1993. – V. 153(18). – P. 2093-2101.
116. McKenzie L.E., Polur R.N., Wesley C., Allen J.D., McKeown R.E., Zhang J. / Social contacts and depression in middle and advanced adulthood: findings from a US national survey, 2005-2008. // *Int J Soc Psychiatry.* – 2013. – V. 59(7). – P. 627-635.

117. Meyrueix L., Durham G., Miller J., Smalley K.M., Warren J.C. / J Association between Depression and Aggression in Rural Women. // *Health Dispar Res Pract.* – 2015. – V. 8(4). – P. 136-144.
118. Minor T.R., Hanff T.C. / Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats // *Behav.Brain.Res.* – 2015. – V. 286. – P. 184-191.
119. Mohanty J.G., Bhamidipaty S., Evans M.K., Rifkind J.M. / A Fluorometric semi-microplate assay of protein carbonyls in blood plasma // *Anal Biochem.* – 2010. – V. – 400(2). – P. 289–294.
120. Molendijk M., Bus B., Spinhoven P., Penninx B., Kenis G., Prickaerts J., Voshaar R., Elzinga B. / Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state-trait issues, clinical features and pharmacological treatment. // *Mol Psychiatry.* – 2011. – V. 16(11). – P. 1088-1095.
121. Molendijk M.L., de Kloet E.R. / Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. // *Behav Brain Res.* – 2019. – V. 364. – P. 1-10.
122. Möller M., Du Preez J.L., Viljoen F.P., Berk M., Emsley R., Harvey B.H. / Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. // *Brain Behav Immun.* – 2013. – V. 30. – P. 156-167.
123. Moreau J. / Simulating the anhedonia symptom of depression in animals. // *Dialogues ClinNeurosci.* – 2002. – V. 4(4). – P. 351–360.
124. Monteggia, L.M., Barrot, M., Powell, C.M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R.W., Nestler, E.J. / Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101(29). – P. 10827-10832.
125. Morozova A., Zubkov E., Strekalova T., Kekelidze Z., Storozeva Z., Schroeter C.A., Bazhenova N., Lesch K.P., Cline B.H., Chekhonin V. / Ultrasound of alternating frequencies and variable emotional impact evokes depressive syndrome in mice and rats. // *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2016. – V. 68. – P. 52–63.

126. Morris M.C., Compas B.E., Garber J. / Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis // *Clin. Psychol.Rev.* – 2012. – V. 32(4). – P.301-315.
127. Mucignat-Caretta C., Bondi' M., Caretta A. / Animal models of depression: olfactory lesions affect amygdala, subventricular zone, and aggression // *Neurobiol. Dis.* – 2004. – V. 16(2). – P. 386-395.
128. Murray E., Wise S., Drevets W. / Localization of dysfunction in major depressive disorder: prefrontal cortex and amygdala. // *Biol Psychiatry.* – 2011. – V. 69(12). – P. 43-54.
129. Murrough J.W., Mao X., Collins K.A., Kelly C., Andrade G., Nestadt P., Levine S.M., Mathew S.J., Shungu D.C. / Increased ventricular lactate in chronic fatigue syndrome measured by ¹H MRS imaging at 3.0 T. II: comparison with major depressive disorder. // *NMR Biomed.* – 2010. – V. 23(6). – P. 643-650.
130. Nam H., Clinton S.M., Jackson N.L., Kerman I.A. / Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat // *Front. Behav. Neurosci.* – 2014. – V. 8. – P. 109.
131. Neis V.B., Bettio L.B., Moretti M., Rosa P.B., Olescowicz G., Fraga D.B., Gonçalves F.M., Freitas A.E., Heinrich I.A., Lopes M.W., Leal R.B., Rodrigues A.L.S. / Single administration of agmatine reverses the depressive-like behavior induced by corticosterone in mice: Comparison with ketamine and fluoxetine. // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2018. – V. 173. – P. 44-50.
132. Neumann I.D., Wegener G., Homberg J.R., Cohen H., Slattery D.A., Zohar J., Olivier J.D., Mathe A.A. / Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2011. – V. 35. – P. 1357–1375.
133. Ng F., Berk M., Dean O., Bush A.I. / Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications // *Int J Neuropsychopharmacol.* – 2008. – V. 11. – P. 951-876.

134. Nutt D., Wilson S., Paterson L. / Sleep disorders as core symptoms of depression. // *Dialogues Clin Neurosci.* – 2008. – V. 10(3). – P. 329-336.
135. Olsen R.W., Sieghart W. / GABAA Receptors: Subtypes Provide Diversity of Function and Pharmacology // *Neuropharmacology.* – 2009. – V. 56. – P. 141–148.
136. Overstreet D.H. / Modeling depression in animal models. // *Methods Mol Biol.* – 2012. – V. 829. – P. 125-144.
137. Overstreet D.H., Wegener G. / The flinders sensitive line rat model of depression--25 years and still producing // *Pharmacol. Rev.* – 2013. V. 65(1). – P. 143-155.
138. Owen J.B., Butterfield D.A. / Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio // *Methods Mol Biol.* – 2010. – V. 648. – P. 269-277.
139. Patki G., Allam F.H., Atrooz F., Dao A.T., Solanki N., Chugh G., Asghar M., Jafri F., Bohat R., Alkadhi K.A., Salim S. / Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female wistar rats // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(9). – P. 835-842.
140. Phillips C. / Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. // *Neural Plasticity.* – 2017.
141. Pikó B., Pinczés T. Impulsivity - aggression - depression: study of adolescents' problem behavior in light of their personality traits. *Psychiatr Hung.* – 2014. – V. 29(1). – P. 48-55.
142. Rajkowska G., Miguel-Hidalgo J.J. / Gliogenesis and Glial Pathology in Depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2007. – V. 6(3). – P. 219–233.
143. Rallis S., Skouteris H., McCabe M., Milgrom J. / A prospective examination of depression, anxiety and stress throughout pregnancy. // *Women Birth.* – 2014. – V. 27(4). – P. 36-42.

144. Ramos A. / Animal models of anxiety: do I need multiple tests? // Trends Pharmacol Sci. – 2008. – V. 29. – P. 493-498.
145. Ratnani I.J., Vala A.U., Panchal B.N., Tiwari D.S., Karambelkar S.S., Sojitra M.G., Nagori N.N. / Association of social anxiety disorder with depression and quality of life among medical undergraduate students. // J Family Med Prim Care. – 2017. – V. 6(2). – P. 243–248.
146. Ren Q., Zhang J.C., Fujita Y., Ma M., Wu J., Hashimoto K. / Effects of TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone on sensory gating deficits in mice after administration of methamphetamine. // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2013. – V. 106. – P. 124-127.
147. Rial D., Lemos C., Pinheiro H., Duarte J.M., Gonçalves F.Q., Real J.I., Prediger R.D., Gonçalves N., Gomes C.A., Canas P.M., Agostinho P., Cunha R.A. / Depression as a Glial-Based Synaptic Dysfunction // Front Cell Neurosci. – 2015. – V. 9. – P. 521.
148. Robinson E.S.J. / Translational new approaches for investigating mood disorders in rodents and what they may reveal about the underlying neurobiology of major depressive disorder. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2018. – V. 373. – P. 1-11.
149. Rocha L., Alonso-Vanegas M., Martínez-Juárez I.E., Orozco-Suárez S., Escalante-Santiago D., Feria-Romero I.A., Zavala-Tecuapetla C., Cisneros-Franco J.M., Buentello-García R.M., Cienfuegos J. / GABAergic alterations in neocortex of patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy can explain the comorbidity of anxiety and depression: the potential impact of clinical factors.// Front Cell Neurosci. – 2015. – V. 8. – P. 442.
150. Roy A., Oldehinkel A.J., Verhulst F.C., Ormel J., Hartman C.A. / Anxiety and disruptive behavior mediate pathways from attention-deficit/hyperactivity disorder to depression. // J Clin Psychiatry. – 2004. – V. 75. – P. 108-113.
151. Salas-Magaña M., Tovilla-Zárate C.A., González-Castro T.B., Juárez-Rojop I.E., López-Narváez M.L., Rodríguez-Pérez J.M., Bello J.R. / Decrease

- in brain-derived neurotrophic factor at plasma level but not in serum concentrations in suicide behavior: A systematic review and meta-analysis // *Brain Behav.* – 2017. – V. 7(6). – e00706.
152. Sanacora G., Saricicek A. / GABAergic contributions to the pathophysiology of depression and the mechanism of antidepressant action. // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2007. – V. 6(2). – P. 127-140.
 153. Sapolsky R. / Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – V. 98(22). – P. 12320–12322.
 154. Seffer D., Schwarting R.K., Wöhr M. Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies. // *J. Neurosci. Methods.* – 2014. – V. 234. – P. 73-81.
 155. Sen S., Duman R., Sanacora G. / Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. // *Biol Psychiatry.* – 2008. – V. 64(6). – P. 527-532.
 156. Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S., Duman, R.S. / Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22(8). – 3251-3261.
 157. Simonov P.V. / Brain mechanisms of emotions. // *Neurosci Behav Physiol.* – 1997. – V. 27. – P. 405-413.
 158. Smith D., Mizumori S. / Hippocampal place cells, context, and episodic memory. // *Hippocampus.* – 2006. – V. 16(9). – P. 16-29.
 159. Smith K.S., Rudolph U. / Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. // *Neuropharmacology.* – 2012. – V. 62. – P. 54–62.
 160. Song C., Leonard B.E. / The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2005. – V. 29(4-5). – P. 627-647.

161. Stepanichev S., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N. / Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. // *Biomed Res Int.* – 2014.
162. Stryjek R., Modlińska K., Pisula W. / Species Specific Behavioural Patterns (Digging and Swimming) and Reaction to Novel Objects in Wild Type, Wistar, Sprague-Dawley and Brown Norway Rats. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(7). – e40642.
163. Sun J., Wang F., Hong G., Pang M., Xu H., Li H., Tian F., Fang R., Yao Y., Liu J. / Antidepressant-like effects of sodium butyrate and its possible mechanisms of action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress // *Neurosci.Lett.* – 2016. – V. 618. – P. 159-166.
164. Taliaz D., Stall N., Dar D.E., Zangen A. / Knockdown of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Specific Brain Sites Precipitates Behaviors Associated with Depression and Reduces Neurogenesis. // *Molecular Psychiatry.* – 2010. – V. 15(1). – P. 80–92.
165. Talwar S.K., Xu S., Hawley E.S., Weiss S., Moxon K.A., Chapin J.K. / Rat navigation guided by remote control. // *Nature.* – 2002. – V. 417. – P. 37–38.
166. Thoenen H. / Neurotrophins and activity-dependent plasticity. // *Prog. Brain Res.* – 2000. – V. 128. – P. 183-191.
167. Tochigi M., Iwamoto K., Bundo M., Sasaki T., Kato N., Kato T. / Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains // *Neurosci. Res.* – 2008. – V. 60(2). – P. 184-91.
168. Treadway M., Zald D. / Reconsidering Anhedonia in Depression: Lessons from Translational Neuroscience. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2010. – V. 35(3). – P. 537-555.
169. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. / Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – V. 39(1). – P. 44-84.

170. Valvassori S.S., Budni J., Varela R.B., Quevedo J. / Contributions of animal models to the study of mood disorders // *Rev. Bras. Psiquiatr.* – 2013. – Vol. 35. – P.121-131.
171. Varghese F.P., Brown E.S. / The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder: A Brief Primer for Primary Care Physicians. // *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* – 2001. – Vol. 3(4). – P. 151-155.
172. Verkuyl J.M., Hemby S.E., Joëls M. / Chronic stress attenuates GABAergic inhibition and alters gene expression of parvocellular neurons in rat hypothalamus. // *Eur J Neurosci.* – 2004. – V. 20. – P. 1665-1673.
173. Vishnivetskaya G.B., Skrinskaya J.A., Seif I., Popova N.K. / Effect of MAO A deficiency on different kinds of aggression and social investigation in mice // *Aggress. Behav.* – 2007. – V. 3. – P. 1-6.
174. Warner T.A., Stafford N.P., Rompala G.R., Van Hoogenstyn A.J., Elgert E., Drugan R.C. / Intermittent swim stress causes Morris water maze performance deficits in a massed-learning trial procedure that are exacerbated by reboxetine // *Pharmacol.Biochem.Behav.* – 2013. – V. 113. – P. 12-19.
175. Wei Q., Hebda-Bauer E., Pletsch A., Luo J., Hoversten M., Osetek A., Evans S., Watson S., Seasholtz A., Akil H. / Overexpressing the glucocorticoid receptor in forebrain causes an aging-like neuroendocrine phenotype and mild cognitive dysfunction // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – P. 8836–8844.
176. Weina H., Yuhu N., Christian H., Birong L., Feiyu S., Le W. / Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. // *Brain Res.* – 2018. – V. 1694. – P. 55-62.
177. Willner P. / The validity of animal models of depression. // *Psychopharmacology (Berl).* – 1984. – V. 83(1). – P. 1-16.
178. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. / Glutathione metabolism and its implications for health // *J Nutr.* – 2004. – V. 134 (3). – P. 489-492.

179. Wurtman R.J. / Genes, stress, and depression. // *Metabolism*. – 2005. – V. 54(5). – P. 9-16.
180. Wysowski D., Pitts M., Beitz J. / An analysis of reports of depression and suicide in patients treated with isotretinoin // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2001. – V. 45(4). – P. 515-519.
181. Xie X., Shen Q., Ma L., Chen Y., Zhao B., Fu Z. / Chronic corticosterone-induced depression mediates premature aging in rats. // *J Affect Disord.* – 2018. – V. 229. – P. 254-261.
182. Yacoubi M., Rappeneau V., Champion E., Malleret G., Vaugeois J. / The H/Rouen mouse model displays depression-like and anxiety-like behaviors // *Behav. Brain. Res.* – 2013. – V. 256. – P. 43-50.
183. Yang, C., Shirayama, Y., Zhang, J.C., Ren, Q., Hashimoto, K. / Regional differences in brain-derived neurotrophic factor levels and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2015. – V. 18(7).
184. Zhang M., Liu Y., Zhao M., Tang W., Wang X., Dong Z., Yu S. / Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. // *J Headache Pain.* – 2017. – V. 18. – P. 1-27.
185. Zhang J.C., Wu J., Fujita Y., Yao W., Ren Q., Yang C., Li S.X., Shirayama Y., Hashimoto K. Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. – *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2015. – V. 18(4).
186. Zheng J. Bizzozero O.A. / Accumulation of protein carbonyls within cerebellar astrocytes in murine experimental autoimmune encephalomyelitis // *J Neurosci Res.* – 2010. – V. 88(15). – P. 3376–3385.