Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «СИРИУС»

На правах рукописи



Котова Мария Михайловна

Динамика нейровоспаления в патогенезе депрессивно-подобного состояния у Danio rerio в модели хронического непредсказуемого стресса

1.5.24. Нейробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Мусиенко Павел Евгеньевич

Федеральная территория «Сириус» - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... 13

1.1 Острый и хронический стресс..... 13

1.2 Гормональная регуляция стресса 15

1.3 Влияние стресса на нервную систему грызунов и человека 20

1.3.1. *Влияние стресса на гиппокамп* 20

1.3.2. *Влияние стресса на префронтальную кору* 24

1.3.3. *Влияние стресса на миндалевидное тело* 26

1.3.4. *Влияние стресса на нервную систему Danio rerio* 26

1.4 Виды аффективных расстройств, теории их возникновения и их распространенность..... 28

1.4.1. *Виды аффективных расстройств* 28

1.4.2. *Распространенность аффективных расстройств* 30

1.4.3. *Терапия аффективных расстройств* 31

1.5 Механизмы развития аффективного состояния при хроническом стрессе..... 33

1.6 Роль нейровоспаления в патогенезе хронического стресса..... 37

1.6.1. *Классификация микроглии* 37

1.6.2. Классификация астроглии 39

1.6.3. Классификация глиальных клеток у Danio rerio..... 40

1.6.4. Механизмы развития нейровоспаления 41

1.7 Животные модели хронического стресса..... 44

1.8 Временная динамика и дозозависимость эффектов стресса 48

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 50

2.1 Содержание животных 50

2.2 Схема исследования 51

2.3 Хронический непредсказуемый стресс 57

2.4 Введение препаратов 62

2.5 Поведенческие тесты 64

2.5.1. *Тест нового аквариума* 64

2.5.2. *Тест иммобилизации хвоста* 65

2.6 Анализ уровня моноаминов 66

2.7 Анализ уровня кортизола в теле рыбы 67

2.8 Анализ уровня экспрессии генов 68

2.8.1. *Выделение тотальной РНК* 68

2.8.2. Проведение обратной транскрипции 69

2.8.3. Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) 69

2.9 Анализ уровня проницаемости ГЭБ 72

2.10 Статистический анализ 73

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ХРОНИЧЕСКОГО НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО СТРЕССА 74

3.1 Результаты 74

3.2. Обсуждение 79

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В МОДЕЛИ ХНС2 88

4.1 Результаты 88

4.2 Обсуждение 99

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В МОДЕЛЯХ ХНС5 И ХНС12 107

5.1 Результаты 107

5.2 Обсуждение 115

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 123

ВЫВОДЫ 127

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 128

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 130

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Данные статистического анализа для экспериментальной серии, описанной в главе 3 154

ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Данные статистического анализа для экспериментальной серии 2, описанной в главе 4 158

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Данные статистического анализа для экспериментальной серии 3, описанной в главе 5 165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Аффективные расстройства, включая депрессию и тревожные расстройства, относятся к числу наиболее распространенных заболеваний нервной системы [1, 2]. По данным Всемирной организации здравоохранения, они диагностируются примерно у 4 – 6 % мирового населения [3, 4]. Несмотря на широкую распространенность этих состояний, существующие терапевтические подходы остаются недостаточно эффективными. В частности, примерно у трети пациентов развивается резистентность к стандартной терапии депрессии, что подчеркивает необходимость разработки новых подходов к фармакологической коррекции аффективных расстройств [5-7].

Существующая проблема терапевтической резистентности частично может быть объяснена тем, что большинство антидепрессантов воздействуют преимущественно на моноаминергическую систему, не затрагивая другие патофизиологические механизмы, такие как нейровоспаление, нарушение нейропластичности или эпигенетические модификации [5-7]. В связи с этим все большее внимание уделяют противовоспалительным препаратам, способным модулировать активность глии и подавлять нейровоспаление [8, 9]. Однако эффективность такого подхода может существенно зависеть от стадии патологического процесса. При этом большинство доклинических исследований на лабораторных животных сосредоточено на изучении отдельных временных точек хронического стресса [10, 11]. В то же время в реальных условиях хронический стресс часто носит непрерывный характер, а развивающийся патологический процесс сопровождается последовательным изменением вовлеченных патогенетических механизмов [12-14]. Понимание временной динамики этих изменений имеет принципиальное значение, поскольку сдвиги в патогенезе на разных этапах воздействия стресса могут существенно влиять на эффективность

терапевтических стратегий, делая одни механизмы чувствительными для фармакологической коррекции и формируя резистентность к другим.

Выбор модельного объекта также имеет принципиальное значение для исследования механизмов развития аффективной патологии при длительном стрессовом воздействии. Традиционные модели на грызунах, несмотря на высокую трансляционную валидность, требуют значительных временных и ресурсных затрат для проведения длительных экспериментов. Рыбы *Danio rerio* представляют собой перспективную альтернативную модель, сочетающую высокую степень консервативности нейроэндокринных и иммунных систем с млекопитающими, коротким репродуктивным циклом и возможностью проведения высокопроизводительного скрининга [15-17].

Таким образом, актуальность настоящего исследования определяется необходимостью изучения временной динамики формирования аффективной патологии при пролонгированном хроническом стрессе, характеризации изменений патогенетических механизмов на разных стадиях стресс-индуцированной патологии и определения зависимости терапевтического эффекта противовоспалительных препаратов от длительности патологического процесса с использованием модели *Danio rerio*. Несмотря на имеющиеся данные о влиянии острого и хронического стресса на поведенческие и молекулярные параметры у данного вида, вопросы временной динамики пролонгированного стресса и эффективности противовоспалительной терапии остаются недостаточно изученными. Решение этих задач позволит углубить понимание патофизиологии аффективных расстройств и создать научную основу для разработки новых терапевтических подходов, учитывающих стадию заболевания.

Степень разработанности темы

Хронический стресс признан одним из ключевых факторов риска развития аффективных расстройств. Длительное воздействие стресса приводит к стойким изменениям в нейроэндокринной, моноаминергической и иммунной системах

головного мозга, что в конечном итоге сопровождается поведенческими и когнитивными нарушениями [18-21]. Однако, несмотря на значительный объем экспериментальных данных, патофизиологические механизмы, опосредующие переход от острой стресс-реакции к устойчивой аффективной патологии, остаются недостаточно изученными.

Особый интерес в этом контексте представляет изучение нейровоспаления как одного из ключевых механизмов стресс-индуцированной аффективной патологии [22, 23]. Современные данные свидетельствуют о том, что изменения функциональной активности микроглии и астроцитов, сопровождающиеся изменением продукции провоспалительных медиаторов, играют существенную роль в развитии как тревожных, так и депрессивных состояний [24-26]. Однако временные характеристики нейровоспалительного ответа, его связь с поведенческими и нейрохимическими изменениями остаются ограниченными.

Несмотря на растущее число исследований аффективной патологии на модели *Danio rerio* [14, 27-30], особенности временной динамики поведенческих, нейрохимических и молекулярных изменений при пролонгированном хроническом стрессе изучены недостаточно. Кроме того, не установлено, как эффективность противовоспалительной фармакологической коррекции зависит от стадии формирования аффективной патологии.

ЦЕЛЬЮ диссертационного исследования являлось изучение динамики нейровоспаления при формировании аффективной патологии в модели хронического стресса у *Danio rerio*.

Для достижения цели были поставлены следующие **ЗАДАЧИ**:

1. Оценить тревожное и депрессивно-подобное состояние *Danio rerio* в модели 5- и 12-недельного хронического непредсказуемого стресса.
2. Проанализировать уровень экспрессии про- и противовоспалительных маркеров в головном мозге *Danio rerio* в модели 5- и 12-недельного хронического непредсказуемого стресса.

3. Изучить эффекты разных концентраций миноциклина и нимесулида на тревожное и депрессивно-подобное поведение, а также уровень экспрессии маркеров нейровоспаления у взрослых *Danio rerio* в модели 2-недельного хронического стресса.
4. Исследовать корректирующие эффекты миноциклина и нимесулида на поведение, молекулярно-генетические и нейрохимические изменения у *Danio rerio* в модели 5- и 12-недельного хронического непредсказуемого стресса.

Научная новизна исследования

Впервые проведен комплексный анализ временной динамики формирования аффективной патологии при пролонгированном хроническом непредсказуемом стрессе (5 и 12 недель) у *Danio rerio*, включающий оценку поведенческих, нейрохимических и молекулярно-генетических параметров. Продемонстрировано, что патологический процесс зависит от длительности действия стресса, а именно ранняя фаза (5 недель) сопровождается выраженной провоспалительной реакцией, тогда как поздняя фаза (12 недель) характеризуется снижением нейровоспаления и депрессивно-подобным фенотипом, что свидетельствует о смене доминирующих патофизиологических механизмов. Впервые показано, что эффективность противовоспалительной терапии (миноциклин, нимесулид) зависит от стадии патологического процесса. Наиболее выраженные эффекты препаратов наблюдаются на ранней стадии, сопровождающейся активным нейровоспалением, тогда как на стадии сформировавшегося депрессивного фенотипа эффективность действия препаратов снижается.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении представлений о временной динамике формирования аффективной патологии при пролонгированном хроническом стрессе на модели *Danio rerio*. В работе была

охарактеризована последовательная смена поведенческих, нейрохимических и молекулярно-генетических маркеров аффективного состояния при разных сроках действия стресса. Полученные данные вносят вклад в развитие концепции участия нейровоспаления при аффективных расстройствах, демонстрируя, что активация провоспалительных маркеров характерна преимущественно для ранней фазы аффективной патологии, при которой развивается тревожный фенотип. Практическая значимость работы определяется возможностью использования полученных результатов для оптимизации терапевтических стратегий при коррекции аффективных расстройств. Установленная зависимость эффективности противовоспалительных препаратов от длительности действия хронического стресса обосновывает необходимость учёта стадии развития патологического процесса при назначении терапии.

Методология и методы исследования

Проведение экспериментов на животных в рамках данного исследования было одобрено биоэтическим комитетом Университета «Сириус» (решение № 9.2 от 10.03.2025 г.). Работа выполнена в строгом соответствии с международными рекомендациями ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) по описанию результатов экспериментов на животных и PREPARE (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence) по планированию исследований и экспериментальных процедур на животных. Для исследования тревожного и депрессивно-подобного поведения использовались тесты нового аквариума и тесты иммобилизации хвоста соответственно. Анализ экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Содержание биогенных аминов мозга и их метаболитов измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для анализа проницаемости гематоэнцефалического барьера изготавливались криосрезы и оценивалась площадь теленцефалона с положительным флуоресцентным сигналом Эванса синего относительно общей площади исследуемой области. Уровень кортизола в тканях тела оценивался методом иммуноферментного анализа.

Степень достоверности результатов исследований

При выполнении диссертационного исследования использованы общепринятые физиологические, биохимические и молекулярно-биологические методы. Достоверность представленных данных подтверждается достаточной величиной выборок животных и использованием соответствующих методов статистической обработки. При написании обзора литературы и обсуждении результатов использована современная литература по теме исследования.

Положения, выносимые на защиту

- В условиях хронического стресса у *Danio rerio* наблюдаемый переход от тревожно-подобного к депрессивно-подобному поведению сопровождается специфической динамикой нейровоспаления, а именно, повышенной воспалительной активностью в раннем периоде, которая угасает при долговременном действии стресса.
- Эффективность коррекции противовоспалительными препаратами у *Danio rerio* зависит от стадии развития аффективной патологии и достигает максимума в период активного нейровоспаления.

Личный вклад автора

Автор внесла ключевой вклад на всех этапах проведения исследования и оформления работы. Котова М.М. принимала участие в планировании экспериментов, проведении всех физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований, статистической обработке данных, написании статей и тезисов докладов. Результаты исследований были представлены автором на российских и международных конференциях.

Апробация материалов диссертации

Результаты диссертационного исследования были представлены на 9 международных и всероссийских конференциях, включая конференцию «ПЕПТИДЫ, ГОРМОНЫ И НЕРВНАЯ СИСТЕМА» (2023), International Conference NEUROSCIENCE WEEK (2024), LIFT - Школа молодых ученых (2024), V Всероссийскую молодежную школу-конференцию «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» (2025), Форум генетических технологий «Сириус. ТехноГенетика» (2025), конференцию «Самойловские чтения. Современные проблемы физиологии» (2026), Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус Биотех» (2026), XXV съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (2026), Форум генетических технологий «Сириус. ТехноГенетика» (2026).

По теме диссертационного исследования опубликовано 3 научные работы в журналах, индексируемых базами данных РИНЦ, Web of Science и Scopus и рекомендуемых ВАК Министерства науки и высшего образования РФ:

1. **Котова М.М.**, Апухтин К.В., Никитин С.В., Калуев А.В. К вопросу о функциональной гетерогенности микроглии и астроглии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2024. – Т. 110. – № 11. – С. 1824–1845. doi: 10.31857/S0869813924110025
2. **Kotova M. M**., Amikishiev S. V., Apukhtin K. V., Galstyan D. S., de Abreu M. S., Stewart A. M., Yang L., Kalueff A. V. Prolonged 5-week and 12-week chronic stress differentially modulates CNS expression of pro- and anti-neuroinflammatory biomarkers, brain monoamines and affective behavior in adult zebrafish // Journal of Comparative Physiology B. – 2025. – V. 195. – № 3. – P. 305–321. doi: 10.1007/s00360-025-01613-4
3. **Kotova M. M.**, Kolesnikova T. O., Amikishiev S. V., Riga V. D., de Abreu M. S., Musienko P. E., Kalueff A.V. Neurobehavioral Effects of Two Distinct Anti-Inflammatory Drugs in a Two-Week Chronic Stress Model in Zebrafish // Brain Sciences. – 2026. – V. 16. – № 8. – Art. 815. doi: 10.3390/brainsci16080815

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 153 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения, выводов и приложений. Список литературы включает 378 источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами и 27 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Острый и хронический стресс

Стресс представляет собой фундаментальный эволюционный механизм, обеспечивающий адаптацию и выживание организма в условиях изменяющейся среды. Факторы среды, вызывающие стрессовую реакцию, принято называть стрессорами. В зависимости от интенсивности и продолжительности воздействия, стрессоры могут приводить к развитию двух качественно различных состояний: эустресса (умеренного стресса, мобилизующего адаптационные ресурсы организма) и дистресса (патологического стресса, сопровождающегося истощением компенсаторных механизмов и развитием повреждений) [31]. Биологическая концепция стресса и представление о нем как о неспецифическом ответе организма на любое предъявляемое требование были введены Гансом Селье в 1936 году [32]. Он описал механизм стресс – реакции, которую он представил в виде общего адаптационного синдрома, состоящего из трех последовательных стадий: тревоги, сопротивления и истощения [33].

В настоящее время концепция стресса значительно расширилась и включает в себя психологические и социальные компоненты. В частности, благодаря работам Ричарда Лазаруса была сформулирована теория когнитивной оценки, предполагающая, что стрессовая реакция зависит от субъективного восприятия угрозы [34]. Этот подход принципиально изменил понимание стресса, трансформировав его из сугубо физиологического феномена (в трактовке Селье) в комплексный психофизиологический процесс, в котором значительную роль играют эмоциональные и когнитивные факторы [34].

В зависимости от продолжительности воздействия стресс подразделяется на два основных типа – острый и хронический, различающиеся по своим характеристикам и последствиям [35]. Длительность острого стресса, как правило, составляет от нескольких минут до нескольких часов, тогда как хронический стресс длится дни, недели, месяцы или даже годы. Однако четкая временная граница, разделяющая эти два типа воздействия, отсутствует [35].

Ключевым звеном ответа на стресс является гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГН) ось. При остром стрессе активация оси приводит к каскадному выбросу кортикотропин-рилизинг-фактора (КРФ) гипоталамусом, адренокортикотропного гормона (АКТГ) гипофизом и, в конечном итоге, глюкокортикоидов корой надпочечников [36, 37]. Эффекты глюкокортикоидов реализуются через два типа рецепторов: минералокортикоидные (МР, тип 1) и глюкокортикоидные (ГР, тип 2). МР обладают высоким сродством и насыщаются при низких (базальных) уровнях гормона, обеспечивая оценку новизны и инициацию ответа. ГР имеют более низкое сродство и активируются при стрессовых концентрациях, отвечая за завершение стрессовой реакции и восстановление гомеостаза через механизмы отрицательной обратной связи [38].

При хроническом стрессе наблюдается изменение регуляции ГГН-оси, характеризующееся нарушением механизмов отрицательной обратной связи. Хронически повышенные уровни глюкокортикоидов оказывают нейротоксическое воздействие, особенно на структуры, ответственные за торможение оси (гиппокамп и префронтальную кору). Это создает порочный круг: повреждение регуляторных центров приводит к еще большему нарушению регуляции эндокринного ответа и формированию так называемой «аллостатической нагрузки» [39].

В отличие от гомеостаза, аллостаз позволяет организму адаптироваться к стрессу за счет временных изменений физиологических параметров. Однако при длительном стрессе такие постоянные перенастройки истощают ресурсы и вызывают кумулятивные повреждения систем организма, что и называется аллостатической нагрузкой [40].

Так, если острый стресс представляет собой кратковременную, преимущественно адаптивную мобилизацию ресурсов («бей или беги»), то хроническое воздействие ведет к истощению регуляторных систем и развитию патологических состояний [41]. Таким образом, понимание механизмов перехода от адаптации к дезадаптации критически важно для разработки методов профилактики и терапии стресс-индуцированных расстройств.

1.2 Гормональная регуляция стресса

Основную роль в опосредовании воздействия стресса на нервную систему играют глюкокортикоиды. У человека, других млекопитающих и рыб *Danio rerio* (zebrafish, зебраданио) основным глюкокортикоидным гормоном является кортизол, а его неактивной формой выступает кортизон. В то же время у грызунов, включая крыс и мышей, основным глюкокортикоидом является кортикостерон, что необходимо учитывать при трансляции данных на человека.

Кортизол в организме выполняет ряд ключевых функций. Во-первых, изменяет метаболизм и обеспечивает мобилизацию энергетических резервов, за счет усиления глюконеогенеза, гликогенолиза и липолиза [42]. Также кортизол снижает утилизацию глюкозы периферическими тканями и при этом усиливает транспорт глюкозы в головной мозг, который реализуется за счет увеличения экспрессии транспортера Glut1 клетками эндотелия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [43, 44].

Во-вторых, кортизол обеспечивает иммуносупрессию при остром стрессе. При этом подавляются каскады реакций на нескольких уровнях, включая презентацию антигенов, пролиферацию лимфоцитов и выработку цитокинов и провоспалительных медиаторов [45]. В-третьих, кортизол подавляет работу желудочно-кишечного тракта и репродуктивной системы, как менее важных функциональных систем в условиях острого стресса [46, 47].

Активность кортизола в головном мозге определяется не только концентрацией самого гормона и количеством МР и ГР, но также уровнем кортикостероидсвязывающего глобулина (КСГ) в крови, активностью Р-гликопротеина, ответственного за множественную лекарственную устойчивость и активностью 11-гидроксистероиддегидрогеназы (11-ГДГ). КСГ представляет собой гликопротеин плазмы, который связывает около 80–90% циркулирующего кортизола, ограничивая его способность воздействовать на ткани-мишени (печень, мышцы, жировая ткань, иммунные клетки). Соответственно снижение уровня КСГ в плазме приводит к симптомам гиперкортизолемии в тканях, что было ранее показано в моделях на мышах [48]. Кроме того, выявлена локальная экспрессия

КСГ в центральной нервной системе (ЦНС), которая регулирует доступность кортизола на местном уровне, независимо от системной концентрации [49]. В частности, секреция КСГ показана в гиппокампе, коре больших полушарий, а также в крупноклеточных нейронах гипоталамуса, синтезирующих нейропептиды (вазопрессин, окситоцин, кортиколиберин, тиреолиберин)[50]. Примечательно, что таким образом осуществляется модуляция локального нейровоспалительного ответа за счет регуляции уровня кортизола и его иммуносупрессивного эффекта.

Помимо плазменных механизмов регуляции, доступность кортизола в ЦНС контролируется на уровне гематоэнцефалического барьера посредством активных транспортных систем. Р-гликопротеин (также известный как CD243) представляет собой мембранный АТФ-зависимый насос из семейства ABC-транспортеров, который играет ключевую роль в формировании множественной лекарственной устойчивости [51]. Взаимодействие Р-гликопротеина с глюкокортикоидами имеет двунаправленный характер. Так с одной стороны активация ГР и МР кортизолом запускает экспрессию гена *ABCB1*, что приводит к увеличению синтеза и активности Р-гликопротеина. За счет этого, при хроническом стрессе, во время увеличения уровня кортизола происходит усиленное выведение терапевтических препаратов из ЦНС, включая антидепрессанты. Это в свою очередь является одним из механизмов развития фармакорезистентной депрессии [51-53]. С другой стороны, Р-гликопротеин ограничивает концентрацию кортизола в головном мозге, активно транспортируя его обратно в кровоток, что, таким образом, препятствует эффективному торможению ГГН-оси [54]. Так, при нокауте гена Р-гликопротеина у мышей увеличивается содержание кортикостерона в мозге, что ведет к изменению чувствительности рецепторов и нарушению регуляции всей системы, вовлеченной в стресс-ответ. Таким образом, встречающиеся в популяции однонуклеотидные полиморфизмы гена *ABCB1* у человека потенциально могут влиять на индивидуальную чувствительность к действию стресса [53].

Локальная активность кортизола и кортикостерона в тканях строго регулируется ферментами 11-гидроксистероиддегидрогеназы 1-го и 2-го типов (11-ГДГ1 и 11-ГДГ2). 11-ГДГ1 катализирует восстановление неактивного кортизона

(11-дегидрокортикостерона) в активный кортизол (кортикостерон), образуя таким образом, активные формы глюкокортикоидов, и усиливая их локальное действие. Напротив, 11-ГДГ2 осуществляет обратную реакцию, инактивируя действие гормонов и защищая ткани от их избыточного действия [55]. При остром стрессе увеличивается активность 11-ГДГ2, обеспечивая быструю инактивацию кортизола и ограничивая его действие. В частности, данный механизм был показан в ЦНС *Danio rerio [56]*. При хроническом стрессе происходит увеличение экспрессии 11-ГДГ1 в ЦНС грызунов, и в частности в гиппокампе, что обратно коррелирует с когнитивными функциями [57]. Подтверждением этой связи служат данные о том, что мыши с нокаутом гена 11-ГДГ1 устойчивы к возрастным и стресс-индуцированным когнитивным нарушениям, в отличие от мышей дикого типа [58].

Кроме кортизола и другие участники ГГН - системы оказывают собственное действие при осуществлении стресс-реакции. В частности, КРФ и его родственные пептиды, урокортины, модулируют поведенческие реакции на стресс в дополнение к активации ГГН - оси [59]. КРФ широко экспрессируется в лимбической системе, включая миндалевидное тело, гиппокамп и ядро ложа конечной полоски (BNST), где он усиливает тревожность и реакции избегания [60, 61]. В некоторых контекстах КРФ также способен стимулировать дофаминергическую передачу, модулируя мотивационное поведение в условиях стресса [62].

Семейство урокортинов взаимодействует преимущественно с рецептором КРФ 2-го типа (КРФР2), роль которого в стрессовом ответе многогранна и зависит от локализации в ЦНС. Так, урокортин-1, экспрессируемый в ядре Эдингера-Вестфаля (парасимпатическое ядро глазодвигательного нерва в среднем мозге), активируется при хроническом стрессе и, по-видимому, участвует в адаптивной (компенсаторной) фазе стресс – ответа [59]. В то время как активация рецепторов КРФР1 преимущественно ассоциируется с немедленной тревожной реакцией на стрессор, система «урокортин– КРФР2», как полагают, контролирует отсроченные адаптивные процессы, способствуя восстановлению гомеостаза и обладая анксиолитическим потенциалом [59].

Второй ключевой гормональной системой, опосредующей действие стресса является симпатоадреналовая система (САС). К ней относится адреналин, секретируемый мозговым веществом надпочечников, а также норадреналин – медиатор симпатической нервной системы, который также может вырабатываться мозговым веществом надпочечников [63]. При стрессе гипоталамус запускает активацию симпатической системы, которая стимулирует секрецию гормонов надпочечников, обеспечивая совместный выброс катехоламинов. Норадреналин и адреналин относятся к группе катехоламинов, и могут действовать через 3 типа рецепторов, связанных с G-белками (α1, α2 и β), обеспечивая разнообразие физиологических реакций [63]. В частности, происходит рост частоты и увеличение силы сердечных сокращений, что повышает сердечный выброс [64]. Одновременно происходит вазокострикция или вазодилатация гладкой мускулатуры сосудов, регулируя перераспределение кровотока. Эти реакции, вместе с бронходилатацией обеспечивают повышенную оксигенацию скелетных мышц конечностей и органов, критически важных в ситуации выживания, таких как головной мозг и сердце. При этом, однако, снижается кровоснабжение кожи, органов желудочно-кишечного тракта, выделительной и репродуктивной систем [64].

Наряду с уже перечисленными эффектами, адреналин и норадреналин, как и кортизол оказывают влияние на метаболизм, увеличивая количество свободной глюкозы в крови, что достигается путем активации гликогенолиза (активация фосфорилазы гликогена) и глюконеогенеза (индукция фосфоенолпируваткарбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы) в печени [65]. Также активируются ферменты липолиза (адипоцитарная триглицеридная липаза и гормон-чувствительная липаза), обеспечивая мобилизацию свободных жирных кислот в качестве альтернативного источника энергии [65].

Также катехоламины повышают активность нервной системы. В частности, норадреналин, синтезируемый нейронами голубого пятна (*locus coeruleus*) повышает уровень бдительности и фокусировки в момент острого стресса, а также обеспечивает стресс-вызванную анальгезию [66]. Адреналин модулирует

активность миндалины и гиппокампа, формируя память об угрозе, при этом действуя через активацию блуждающего нерва и циркумвентрикулярные органы (области головного мозга, лишенные ГЭБ) [67, 68].

Первой на стрессор реагирует САС, тогда как ГГН – ось подключается второй. Так пик катехоламинов в крови наблюдается спустя несколько минут после начала стресса, но они сами имеют короткий период выведения, и реакция длится десятки минут. Пик кортизола наблюдается в крови спустя 15 - 30 минут начала стресс-реакции и сам гормон действует в течение нескольких часов [69]. Несмотря на разные временные рамки действия данные гормональные системы нельзя разделить между собой, так как они действуют синергично. Так, кортизол повышает чувствительность адренорецепторов к катехоламинам и индуцирует синтез ключевых ферментов катехоламинового синтеза, тогда как катехоламины способствуют секреции КРФ [70].

Тем не менее помимо ГГН и САС систем есть и другие гормоны и нейромодуляторы, вовлеченные в регуляцию стресс-реакции. В частности, показана вовлеченность антидиуретического гормона (АДГ, вазопрессин) в регуляцию преимущественно эмоционального стресса [71]. Так, АДГ потенцирует действие КРФ на гипофиз, увеличивая секрецию АКТГ [72]. Также АДГ модулирует активность миндалины и префронтальной коры – главных регуляторов тревоги и страха, таким образом вовлекаясь в патогенез стресс-ассоциированных тревожных и депрессивных расстройств [73].

Показано участие опиоидной системы в стресс-вызванной анальгезии [74], и вовлечение в патогенез стресс-зависимых нарушений памяти [75]. Кроме того, при остром стрессе опиоиды, действуя на μ-рецепторы снижают активность нейронов голубого пятна, таким образом противодействуя избыточной активации стресс-реакции [76].

У *Danio rerio*, как и у млекопитающих показано участие ГГН системы в качестве ключевого регулятора стресс-реакции, включая как системное действие кортизола, так и действие КРФ на поведение животных [77-79]. Более того, несмотря на произошедшую у костистых рыб дупликацию генома, гены

глюкокортикоидного и минералкортикоидного рецептора обнаружены у *Danio rerio* в единственном экземпляре (*nr3c1* и *nr3c2* соответственно), также, как и у грызунов и человека [78]. Также показано участие САС в регуляции острого стресса, которая развивается еще в эмбриональный период развития *Danio rerio* [15, 80, 81].

Таким образом, ответ на стресс представляет собой не изолированное действие отдельных гормонов, а скоординированную активность многокомпонентной нейроэндокринной сети, в которой глюкокортикоиды, катехоламины, КРФ, урокортины, вазопрессин, опиоиды и другие модуляторы функционируют в тесной временной и функциональной взаимосвязи. Важно, что ключевые элементы этой системы демонстрируют высокую степень эволюционной консервативности у *Danio rerio*, что делает их валидной и трансляционно значимой моделью для изучения нейроэндокринных механизмов стресса.

1.3 Влияние стресса на нервную систему грызунов и человека

ЦНС является одной из важнейших мишеней действия стресса. При этом ответ на стресс зависит от длительности воздействия стресса, и опосредуются действием глюкокортикоидов, симпатоадреналовой системы, провоспалительных цитокинов и других паракринных и эндокринных регуляторов.

Наиболее чувствительными к действию стресса зонами ЦНС являются гиппокамп, префронтальная кора и миндалина.

1.3.1. *Влияние стресса на гиппокамп*

Гиппокамп - это парная архикортикальная структура медиальной височной доли, представляющая собой эволюционно древнюю, но функционально высоко специализированную формацию лимбической системы. Анатомически гиппокамп образует изогнутую дугу, состоящую из трёх основных подполей: зубчатой извилины, полей Аммонова рога (CA3, CA2, CA1) и субикулума, которые связаны однонаправленной схемой проведения сигнала от энторинальной коры в

субикулум и с возвращением в энторинальную кору [82]. Функционально гиппокамп интегрирует 3 процесса, включая формирование декларативной (эпизодической) памяти, формирование когнитивной пространственной карты и оценку эмоциональной значимости событий [82-84]. Таким образом нарушение работы гиппокампа при хроническом стрессе отражается в нарушении данных процессов.

В работах на грызунах нарушения работы гиппокампа можно отследить в поведенческих тестах. Например, это выражается в ухудшении выполнения задачи в лабиринте Морриса, лабиринте Барнса и радиальном лабиринте, направленных на оценку пространственной памяти [85-88]. Также можно наблюдать дефицит контекстуального запоминания страха [82, 89] и снижение дискриминации схожих локаций или объектов в тесте распознавания локации объекта (novel object location) [90, 91]. У людей аналогичные нарушения обнаруживаются при тестировании вербальной декларативной памяти и эпизодического вспоминания у пациентов с депрессией или ПТСР [92-94]. Важно подчеркнуть, что эти когнитивные дефициты носят первичный характер и не сводятся к вторичным эффектам психомоторной заторможенности и ангедонии. Нарушения памяти являются специфичными для гиппокамп-зависимых функций и сохраняются даже при исключении влияния на результат таких факторов, как тревожность и мотивация [95, 96].

Высокая чувствительность гиппокампа к действию стресса может объясняться несколькими факторами. Во-первых, гиппокамп является областью мозга с большим количеством ГР и МР [97]. Это делает гиппокамп прямой мишенью для циркулирующих глюкокортикоидов, которые через геномные и негеномные механизмы модулируют экспрессию генов, цитоскелетную динамику и синаптическую передачу [98]. Кроме того, была показана региональная специфичность 11-ГДГ2, инактивирующего активный кортизол. Данный фермент активно экспрессируется в областях мозга, связанных с действием альдостерона, снижая доступность кортизола (кортикостерона) для минералкортикоидных рецепторов [99]. У взрослых грызунов не показана экспрессия гена 11-ГДГ2 в гиппокампе, что наряду с ростом экспрессии 11-ГДГ1 при хроническом стрессе

обеспечивает гиперактивацию системы ГГН системы и может объяснять чувствительность гиппокампа к действию стресса [99].

Во-вторых, гиппокампальная формация содержит крупные множественные глутаматергические синапсы между гранулярными клетками зубчатой извилины и дендритными шипиками пирамидных нейронов CA3, которые называют мшистыми волокнами [100]. При хроническом стрессе наблюдается переход этой системы в новое устойчивое состояние повышенной синаптической активности с возникающей положительной обратной связью, что способствует развитию эксайтотоксичности [100, 101]. Критическая роль глутаматергической системы в опосредовании стресс-индуцированного ремоделирования подтверждается экспериментальными работами: блокада NMDA – рецепторов (N-метил-D-аспартат-рецепторы) специфически в нейронах CA3 предотвращает дендритную ретракцию, индуцированную хроническим иммобилизационным стрессом, как в CA3, так и в CA1 [102].

Уязвимость гиппокампа к действию хронического стресса проявляется изменением ультраструктуры и функциональными нарушениями, которые выражаются в виде изменения когнитивных способностей. При остром стрессе (от минут до 3–5 дней) гиппокамп демонстрирует адаптивные и полностью обратимые структурные перестройки, отражающие механизмы быстрой поведенческой адаптации без необратимого повреждения нейронных сетей [103]. Ключевым морфологическим изменением в данном случае является увеличение плотности дендритных шипиков и укорочение апикальных дендритов в поле CA3 с одновременным упрощением ветвления, опосредованное быстрой активацией ГР и последующей модуляцией актинового цитоскелета через кофилин и комплекс Arp2/3 [100, 104]. Весь процесс опосредован изменениями в экспрессии генов спинофилина и *Cdc42 (*малая ГТФаза семейства Rho), а также в экспрессии белка homer1, которые являются молекулярными регуляторами синаптической пластичности [19]. Некоторые данные также демонстрируют региональную зависимость процесса морфологической модуляции шипиков. Так при остром стрессе наблюдается увеличение плотности шипиков в зоне CA1, при

одновременном снижении в CA3 [104]. Также в зубчатой извилине может наблюдаться облегчение долговременной потенциации, опосредованное действием норадреналина и КРФ, что способствует усилению синаптической пластичности [103]. Важно, что все описанные изменения полностью обратимы в течение 24–72 часов после устранения стрессора и сопровождаются восстановлением когнитивных способностей, если они были нарушены при стрессе. [105].

Хроническое воздействие стресса индуцирует дезадаптивное структурное ремоделирование гиппокампа, характеризующееся прогрессирующей атрофией дендритов и потерей синаптических контактов [106]. Наиболее выраженные изменения локализуются в поле CA3, где наблюдается устойчивое укорочение апикальных дендритов (до 30% от контроля) и упрощение их ветвления [100, 107, 108]. Параллельно снижается плотность дендритных шипиков на 20-30 %. При этом также происходит сдвиг в сторону незрелых/тонких форм, отражающий нарушение баланса долговременной потенциации и депрессии (LTP/LTD) [106, 109, 110]. На макроструктурном уровне эти клеточные изменения проявляются снижением объёма гиппокампа как у грызунов [107, 111], так и у пациентов с большим депрессивным расстройством [112, 113]. В отличие от острого стресса, структурные изменения при хроническом воздействии закрепляются эпигенетически. Таким образом наблюдается гиперметилирование промоторов генов *Bdnf (*brain-derived neurotrophic factor*)* и *Nr3c1* (ГР), деацетилирование гистонов H3/H4 и изменение профиля микроРНК, что объясняет долгосрочную устойчивость когнитивных и эмоциональных дефицитов даже после прекращения стрессора [114-118].

Характерной особенностью гиппокампа является поддержание процесса нейрогенеза во взрослом возрасте. Этот многоступенчатый процесс включает пролиферацию предшественников, дифференцировку клеток в нейрональном направлении, их дальнейшую миграцию в гранулярный слой и функциональную интеграцию в существующие нейронные сети, где новые нейроны вносят вклад в паттерн-сепарацию, контекстуальную память и эмоциональную регуляцию [119, 120]. Острый стресс вызывает подавление пролиферации нейральных

предшественников через быструю активацию ГР и индукцию ингибиторов клеточного цикла (p21, p57), однако этот эффект полностью обратим. Так, после устранения стрессора пролиферация восстанавливается в течение 24–72 часов без значимого снижения выживаемости уже родившихся нейронов [121-124]. Хронический стресс приводит к стойкому и дозозависимому подавлению как пролиферации, так и выживаемости новых нейронов (до 50–70% снижения), нарушению их миграции и интеграции функциональные нейронные сети гиппокампа [107].

Тем не менее, остаточная пластичность сохраняется: комбинированные интервенции (антидепрессанты, аэробные нагрузки, обогащённая среда) способны частично восстановить дендритную архитектуру и нейрогенез, хотя полное возвращение к исходным морфометрическим параметрам практически никогда не наблюдается. Это, в свою очередь, подчеркивает необходимость раннего терапевтического вмешательства [125-127].

1.3.2. *Влияние стресса на префронтальную кору*

Префронтальная кора (ПФК) представляет собой ключевую структуру, вовлеченную в регуляцию рабочей памяти, исполнительных функций и поведения. У человека и приматов префронтальную кору делят на несколько анатомических областей. Дорсолатеральная префронтальная кора (длПФК) отвечает за формирование поведенческой программы состоящей из согласованной последовательности действий, необходимых для достижения целей [128], и критически зависит от состояния рабочей памяти [129]. У грызунов не показано наличие дорсолатеральной префронтальной коры аналогичной коре приматов. За выполнение когнитивных функций длПФК у грызунов отвечает медиальная ПФК [130].

Медиальная префронтальная кора (мПФК) выступает ключевым узлом нисходящего исполнительного контроля, интегрируя сенсорные и эмоциональные сигналы отвечая за регуляцию внимания, ингибиторный контроля, рабочую и

долговременную память, когнитивную гибкость и принятие решений. Эти функции обеспечиваются её обширными взаимными синаптическими связями с лимбическими и подкорковыми структурами (гиппокамп, миндалина, таламус, базальные ганглии), что позволяет формировать адаптивные поведенческие стратегии и поддерживать устойчивость когнитивных сетей [131].

Как и гиппокамп, ПФК демонстрирует инвертированную U-образную (двухфазную) зависимость от влияния стресса. Так, острый стресс у крыс способствует улучшению рабочей памяти. При этом происходит долговременная потенциация синаптических токов, опосредованных NMDA-рецепторами и AMPA – рецепторами (рецепторы α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты), которая запускается в пирамидных нейронах ПФК через активацию ГР [132-135]. Однако часть работ демонстрирует, что острый умеренный стресс наоборот ухудшает рабочую память, посредством чрезмерной стимуляции дофаминергических и норадренергических рецепторов [136], причем как у грызунов, так и людей [137].

Хронический стресс приводит к нарушению рабочей памяти и снижению нисходящего влияния мПФК на принятие решений [138-140]. При этом нарушения опосредованы снижением глутаматергической синаптической передачи [138, 141] и изменением дофаминовой сигнализации[142].

Хронический стресс вызывает обратимое структурное ремоделирование нейронов мПФК. Так было показано укорочение апикальных дендритов, которое, однако, восстанавливается после прекращения стресса у молодых животных [110, 143]. Сам процесс ремоделирования опосредован возбуждающими аминокислотами и эндоканнабиноидами [102]. Влияние стресса на ПФК показано не только на животных моделях, но и у человека. Так, в клинических исследованиях демонстрируется снижение объема мПФК у пациентов, страдающих депрессивным расстройством [110].

1.3.3. *Влияние стресса на миндалевидное тело*

Миндалевидное тело (миндалина, амигдала) представляет собой ключевую структуру лимбической системы, вовлеченную в обработку эмоциональной информации, формирование страха и тревоги, а также в регуляцию нейроэндокринного ответа на стресс.

Острый стресс увеличивает активность миндалины у человека, отчасти за счет ингибирования сдерживающих нисходящих проекций ПФК [144, 145]. Работы на грызунах показывают, что повышенная активность миндалины при остром стрессе функционально приводит к развитию тревожной реакции [146]. При этом сам процесс опосредован эффектами КРФ, одним из которых является высвобождение тканевого активатора плазминогена. Тканевой активатор плазминогена (tPA) участвует в ремоделировании синаптических шипиков дендритов, плотность которых снижается в медиальной миндалине под действием хронического стресса [102]. Однако особого внимания заслуживает воздействие стресса на базолатеральную миндалину (БЛМ), которая является ключевым узлом формирования страха и тревожности [147]. БЛМ, наоборот, отвечает на хронический стресс гипертрофией дендритов [108], независимо от тканевого активатора плазминогена, но при участии BDNF [102].

Глюкокортикоиды оказывают двунаправленное действие на функцию и ультраструктуру миндалины в зависимости от дозы и длительности воздействия. Так, однократное введение высокой дозы кортикостерона имитирует эффекты хронического стресса, вызывая повышение тревожности и удлинение дендритов в БЛМ [148]. Однако постепенное воздействие умеренных доз кортикостерона на фоне стресса наоборот предотвращает развитие повышенной тревожности и увеличение плотности шипиков в БЛМ у грызунов [102, 149].

1.3.4. *Влияние стресса на нервную систему Danio rerio*

В ЦНС *Danio rerio* отсутствуют вышеописанные структуры, такие как гиппокамп и БЛМ, так как при эмбриональном развитии эверсия теленцефалона у

костистых рыб (в отличие от эвагинации у тетрапод) создает уникальную топографию, при которой гомологичные структуры расположены в ином пространственном порядке [150, 151]. Однако консервативность молекулярных маркеров и функциональных контуров позволяет корректно транслировать данные на млекопитающих [152].

Так, функциональным аналогом гиппокампа млекопитающих у *Danio rerio* является дорсолатеральный паллиум, который демонстрирует сходную с гиппокампом роль в пространственной памяти и контекстуальном обучении [153, 154]. При этом в дорсолатеральном паллиуме обнаружены Prox1-позитивные нейроны, которые гомологичны гранулярным клеткам зубчатой извилины [152]. Дорсомедиальный паллиум *Danio rerio* экспрессирует маркеры вентрального/латерального паллиума тетрапод и функционально соответствует миндалине, участвуя в обработке угрозы и эмоциональном обучении [152, 155, 156].

Также, у костистых рыб отсутствует ламинарная (слоистая) организация коры, характерная для млекопитающих, в связи с чем прямого структурного гомолога мПФК в классическом анатомическом понимании не выявлено. Однако современные данные позволяют выделить функциональные аналоги, реализующие сходные с мПФК задачи. Наиболее обоснованными кандидатами выступают дорсальный и центральный отделы паллиума, а также вентро-латеральные зоны субпаллиума [152, 157, 158]. Функциональная значимость этих зон подтверждается их вовлеченностью в регуляцию высших когнитивных функций [157].

В экспериментальных работах на *Danio rerio* показано, что наиболее чувствительной зоной к действию стресса является теленцефалон, который объединяет все вышеперечисленные области, функционально гомологичные гиппокампу, миндалине и ПФК [29, 159, 160].

Таким образом, хронический стресс индуцирует дезадаптивные структурно-функциональные изменения в эволюционно консервативных нейронных контурах, ответственных за когнитивный контроль, эмоциональную регуляцию и память. Несмотря на видовые анатомические различия, функциональная гомология между

структурами мозга млекопитающих и теленцефалоном *Danio rerio* подтверждает трансляционную ценность данной модели для изучения патогенеза депрессивно-подобных состояний. Однако представленные данные преимущественно отражают нейрональные и нейроэндокринные аспекты стресс-индуцированной пластичности.

1.4 Виды аффективных расстройств, теории их возникновения и их распространенность

1.4.1. *Виды аффективных расстройств*

Под аффектом в клинической практике понимается устойчивый эмоциональный фон (настроение), определяющий реакцию организма на внешние и внутренние стимулы. Соответственно, аффективные расстройства (расстройства настроения) представляют собой группу психиатрических заболеваний, характеризующихся стойким нарушением регуляции эмоций и патологическими колебаниями настроения, которые возникают автономно от внешних обстоятельств [161]. Исторически первым данное состояние описал немецкий психиатр Эмиль Крепелин, классифицировав его как маниакально-депрессивный расстройство, однако позднее стал использоваться термин «аффективные расстройства» [162]. В настоящее время в МКБ-11 аффективные расстройства подразделяются на подгруппы биполярных и депрессивных расстройств. При этом в современной клинической практике и нейробиологии аффективные расстройства тесно пересекаются с тревожными расстройствами. Они обладают высокой коморбидностью и имеют общие механизмы развития. В совокупности аффективные и тревожные расстройства являются одними из наиболее распространенных психиатрических заболеваний, существенно влияющих на качество жизни людей [1, 2].

Депрессивные расстройства характеризуются стойким снижением настроения, потерей интереса к привычной деятельности и наличием ряда физических симптомов [1]. К основным подтипам относятся большое депрессивное

расстройство (БДР), персистирующее депрессивное расстройство (дистимия) и биполярная депрессия. БДР проявляется выраженными депрессивными эпизодами, включающими подавленное настроение, утомляемость и когнитивные нарушения [163]. Дистимия представляет собой хроническую, но менее тяжелую форму депрессии [164]. Биполярная депрессия включает депрессивные эпизоды на фоне маниакальных или гипоманиакальных фаз [165].

Биполярные расстройства характеризуются колебаниями настроения от мании или гипомании до депрессии. Основные подтипы включают биполярное расстройство I и II типа, а также циклотимию. При биполярном расстройстве I типа развиваются маниакальные эпизоды, иногда сопровождающиеся психозом. II тип сопровождается гипоманией без полного маниакального синдрома. Циклотимическое расстройство имеет более легкое течение, но также включает периоды гипомании и депрессии [165].

Тревожные расстройства проявляются чрезмерной тревогой, страхом и поведением избегания. К ним относятся генерализованное тревожное расстройство (ГТР), паническое расстройство, социальная тревожность, специфические фобии и посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) [166]. ГТР сопровождается стойкой тревогой, беспокойством и нарушением сна. Паническое расстройство характеризуется повторяющимися паническими атаками и часто сочетается с агорафобией (страхом скопления людей). Социальная тревожность проявляется страхом перед социальными ситуациями, а специфические фобии - интенсивным страхом перед определенными объектами или ситуациями. ПТСР развивается после психологической травмы и включает навязчивые воспоминания, избегающее поведение и гипервозбуждение [166]. Тревожные расстройства часто сочетаются с депрессивными и имеют общие патогенетические механизмы [167].

Аффективные и тревожные расстройства нередко имеют общие клинические проявления, включая склонность к переживанию негативных эмоций, а также когнитивный дефицит (в частности, снижение внимания и памяти), что обусловливает высокую коморбидность депрессивных и тревожных состояний [1, 168].

Все аффективные расстройства, включая БДР и биполярное расстройство, а также тревожные расстройства, можно рассматривать как заболевания, связанные с нарушением регуляции стресса. При этих состояниях нейронные сети отвечающие за контроль стресс-реакции, функционируют неоптимально, что приводит к ее дисрегуляции [169].

Все перечисленные расстройства имеют гетерогенную полигенную природу, однако идентификация конкретных генов, ответственных за подтипы патологии и реакцию на терапию, остается сложной задачей. Хотя генетическая предрасположенность играет важную роль, критическое значение имеет взаимодействие генов с факторами среды, особенно с хроническим стрессом и психологическими травмами [170]. Это подчеркивает сложную взаимосвязь между наследственностью и внешними воздействиями в формировании аффективных заболеваний.

1.4.2. *Распространенность аффективных расстройств*

Распространенность биполярного расстройства в мире оценивается в пределах от 0,4% до 1,1% и остается относительно стабильной во всем мире, аналогично шизофрении, что подчеркивает их выраженную генетическую основу [171]. Однако, по данным национальной статистики, в 2019 году в России диагноз биполярного аффективного расстройства имели лишь около 0,008% населения, что в 90 – 150 раз ниже общемировых оценок [172]. Депрессия и тревожные расстройства встречаются значительно чаще, чем биполярное расстройство, что подтверждается более высокими показателями их распространенности [171, 173].

Высокая распространенность хронического стресса, тревоги и депрессии, а также их частая коморбидность среди взрослого населения вызывают серьезную озабоченность. Сочетание этих психических расстройств существенно увеличивает экономическое бремя как для пациентов, так и для систем здравоохранения. На частоту возникновения данных состояний влияют социально-демографические характеристики, социокультурные факторы и масштабные внешние стрессоры, в

частности пандемия COVID-19 [1, 2, 173, 174]. В период пандемии COVID-19 распространенность депрессии, тревоги и стресса значительно возросла, составив 28,18%, 29,57% и 25,18% соответственно. Эти показатели существенно превышают допандемический уровень (до 2020 года), что подчеркивает острую необходимость поиска и разработки новых терапевтических стратегий [2, 173].

В России распространенность этих состояний также значительна. По данным исследования ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации) среди населения 35 - 74 лет, субклиническая тревога выявлена у 19,3%, клиническая - у 6,8%, субклиническая депрессия - у 15,9%, клиническая - у 4,5% респондентов в России [175]. Особую уязвимость демонстрируют определенные группы населения: женщины, пожилые люди (55-74 лет), лица с низким уровнем образования и дохода [175-177]. В городских районах, как правило, отмечаются более высокие показатели тревоги и депрессии, вероятно из-за воздействия специфических урбанистических стрессоров, таких как социальная изоляция, шумовое загрязнение, скученность населения и хроническое сенсорное перенапряжение [176]. Более того, в разных регионах России наблюдается значительная вариабельность: от высоких показателей в Республике Северная Осетия-Алания до низких в Тюмени [178].

1.4.3. *Терапия аффективных расстройств*

Терапия аффективных расстройств, как правило, включает сочетание фармакотерапии и психотерапии [6]. Тем не менее, существующие методы лечения нередко оказываются недостаточно эффективными. Во-первых, применение классических антидепрессантов, таких как трициклические (ТЦА), ингибиторы моноаминооксидазы (ИМАО) и селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), сопровождается развитием множественных побочных эффектов. Это обусловлено их неспецифичностью и взаимодействием не только с целевыми моноаминергическими системами, но и с холинергическими, адренергическими и гистаминергическими рецепторами [5]. Во-вторых, примерно

у 30% пациентов развивается резистентная к терапии депрессия, характеризующаяся устойчивостью к традиционным методам лечения, включая препараты традиционных классов (ТЦА, СИОЗС, ИМАО). Это подчеркивает острую необходимость поиска новых фармакологических мишеней и разработки лекарственных средств, в том числе с использованием доклинических исследований на животных моделях [5-7]. Несмотря на эту очевидную потребность, за последние годы не было достигнуто значимых успехов в разработке принципиально новых стратегий терапии, и в качестве лечения первой линии по-прежнему применяются препараты традиционных классов [179]. Отчасти ограниченный успех в поиске эффективных антидепрессантов частично объясняется тем, что существующие гипотезы о депрессии не учитывают сложные механизмы взаимодействия, участвующие как в этиологии аффективных расстройств, так и при терапевтическом ответе [7].

Несмотря на активный поиск новых терапевтических подходов, проблема лечения аффективных расстройств в Российской Федерации актуальность. Хотя распространенность тревоги и депрессии в России остается высокой, важно учитывать более широкий контекст психического здоровья в стране. Такие факторы, как социально-экономический статус, пол и региональные различия, играют ключевую роль в распределении этих расстройств. Отдельной проблемой остается недостаточная диагностика биполярного аффективного расстройства (БАР): по официальным данным, его распространенность в России в десятки раз ниже общемировых оценок, что обусловлено низкой осведомленностью населения, стигматизацией психических заболеваний и ограниченным доступом к специализированной психиатрической помощи.

Перечисленные выше ограничения традиционной фармакотерапии, включая резистентность у трети пациентов, выраженные побочные эффекты и отсутствие принципиально новых препаратов, в полной мере затрагивают и российскую клиническую практику. Пациенты не получают адекватного лечения из-за неэффективности или непереносимости существующих средств, а стигматизация и низкая приверженность терапии приводят к хронификации расстройств и

дальнейшему утяжелению состояния. В этих условиях поиск новых патофизиологических мишеней, выходящих за рамки классических гипотез возникновения патологии, приобретает не только научное, но и выраженное клинико-социальное значение.

1.5 Механизмы развития аффективного состояния при хроническом стрессе

Развитие тревожных и депрессивных расстройств при хроническом стрессе представляет собой результат каскада взаимосвязанных нейробиологических изменений, затрагивающих эндокринную, нейромедиаторную, иммунную и молекулярно-генетическую регуляцию центральной нервной системы. Ключевым инициирующим звеном развития патологического каскада выступает дисрегуляция ГГН-оси. Этот эндокринный сдвиг создаёт нейрохимическую среду, благоприятную для развития патофизиологических изменений в ключевых чувствительных к стрессу структурах ЦНС [18].

Отрицательная обратная связь ГГН системы осуществляется за счет активации ГР в гипоталамусе и ингибирования экспрессии генов, кодирующих КРФ и АКТГ [18]. Также отрицательная обратная связь усиливается за счет связывания ГР в гиппокампе, который подавляет базальную активность ГГН-оси и ее реактивность при стрессе. На молекулярном уровне активация ГР приводит к инициации транскрипции ко-шаперонного комплекса FKBP5, который, в свою очередь, препятствует ядерной транслокации рецепторного комплекса ГР, и таким образом снижает чувствительность рецептора к действию кортизола [180]. При хроническом стрессе действие FKBP5 снижает чувствительность гипоталамуса и гиппокампа к действию кортизола нарушая механизм отрицательной обратной связи, приводя к увеличению уровня кортизола, циркулирующего в системном кровотоке [18].

Чувствительность ГР и его способность перемещаться в ядро также контролируются посттрансляционными модификациями, в частности

фосфорилированием рецептора по специфическим сериновым остаткам (Ser224, Ser232). Модели хронического мягкого стресса на крысах демонстрируют значительное снижение фосфорилирования ГР по ключевым активирующим сайтам в префронтальной коре, что напрямую ограничивает способность рецептора активировать целевые гены (например, ген серин/треонин-протеинкиназы *Sgk1*) и восстанавливать гомеостаз ГГН-оси [18].

Также хронический стресс нарушает функционирование эндоканнабиноидной системы, которая в норме поддерживает отрицательную обратную связь ГГН-оси за счет активации каннабиноидного рецептора 1-го типа (CB1). Хроническое повышение уровня кортизола подавляет эндоканнабиноидную передачу сигналов, что напрямую способствует формированию тревожно-подобного фенотипа [181].

Кортизол модулирует работу моноаминовых систем, включая серотонинергическую, норадренергическую и дофаминергическую, дисфункция которых напрямую связана с патогенезом депрессии по современным представлениям [20].

Экспериментальные данные демонстрируют, что истощение запасов серотонина воспроизводит депрессивную симптоматику у человека, а при хроническом стрессе наблюдается нарушение баланса между пресинаптическими серотониновыми ауторецепторами 5-HT1A и постсинаптическими рецепторами, что в конечном итоге снижает выброс медиатора [20]. Повышенный уровень кортикостерона с одной стороны увеличивает экспрессию транспортера серотонина SERT, таким образом снижая уровень медиатора в синаптической щели и ослабляя его эффекты [182], а с другой стороны напрямую регулирует экспрессию ауторецепторов серотонина 5-HT1 [183].

Согласно норадренергической гипотезе депрессии, снижение уровня норадреналина в ЦНС является основой ключевых симптомов БДР, таких как ангедония, утрата энергии и мотивации [20]. При хроническом стрессе, из-за нарушения работы отрицательной обратной связи повышается уровень не только кортизола, но и других участников ГГН-оси. Высокий уровень КРФ в свою очередь

активирует норадренергические проекции голубого пятна в гиппокамп и префронтальную кору, что приводит к избыточному выбросу норадреналина и формированию симптомов тревоги и гипервозбуждения [20]. Однако длительное воздействие стрессора истощает норадренергическую передачу, что проявляется психомоторной заторможенностью и когнитивным дефицитом [20].

Мезолимбическая дофаминергическая система особенно чувствительна к хроническому стрессу. Исследования демонстрируют, что стресс-индуцированные изменения в дофаминергических сетях напрямую модулируют депрессивноподобное поведение [184]. У пациентов с депрессивным расстройством показано, снижение уровня метаболитов дофамина в ликворе, наряду с уменьшением плотности дофаминовых транспортеров и связывания D2-рецепторов в стриатуме [20]. Дисфункция дофаминовых рецепторов может нарушать ингибиторный контроль префронтальной коры над миндалиной, способствуя гипервозбудимости лимбических структур и формированию патологической тревоги [20]. Кроме того, показана способность кортизола в целом подавлять активность мезолимбического пути вознаграждения и мотивационные процессы [185].

Хронический стресс также оказывает супрессивное влияние на взрослый нейрогенез в гиппокампе, приводя к снижению пролиферации, дифференциации и созревания новых нейронов. Этот процесс ассоциирован с усилением окислительного стресса, активацией апоптоза и запуском воспалительных каскадов, что вносит вклад в формирование тревожного и депрессивно-подобного поведения. Стресс-индуцированные изменения экспрессии генов в префронтальной коре и гиппокампе напрямую влияют на нейропластичность, усугубляя депрессивную симптоматику [186, 187]. В частности, эти сдвиги опосредованы способностью кортизола подавлять экспрессию нейротрофических факторов (в первую очередь, BDNF), критически необходимых для поддержания нейрогенеза и синаптической пластичности [188, 189].

Долговременные изменения экспрессии генов, индуцированные стрессом, во многом опосредованы эпигенетическими механизмами, включая ацетилирование и

метилирование гистонов, а также метилирование ДНК. При депрессивных расстройствах выявлены нарушения активности и экспрессии ключевых ферментов, обеспечивающих эти эпигенетические модификации, таких как гистонацетилтрансферазы (HAT), гистондеацетилазы (HDAC) и ДНК-метилтрансферазы (DNMT) [190-192]. Эти изменения оказывают комплексное влияние на нейроиммунные взаимодействия, секрецию нейротрофинов и структурную организацию синапсов, тем самым способствуя закреплению стресс-индуцированного депрессивного поведения [193].

Развитие тревожно-депрессивных фенотипов у *Danio rerio* при хроническом стрессе демонстрирует высокую степень эволюционной консервативности молекулярных и системных механизмов по сравнению с млекопитающими. Ключевым инициирующим звеном, как и у человека, выступает дисрегуляция гипоталамус–гипофиз–интерреналовой (ГПИ) оси - функционального аналога ГГН – оси. В частности, хронический стресс у рыб приводит к устойчивому повышению уровня кортизола, снижению экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в теленцефалоне и нарушению отрицательной обратной связи, что коррелирует с поведенческими признаками депрессивно-подобного состояния [28, 78, 194]. На нейромедиаторном уровне у *Danio rerio* воспроизводятся консервативные нарушения моноаминергических систем. Хронический стресс или воздействие кортизола изменяет экспрессию триптофангидроксилазы и серотонинового транспортера SERT, что сопровождается повышением тревожности, но оказывается обратимо при введении СИОЗС [194-196]. Параллельно наблюдается дисбаланс дофаминергической сигнализации, который проявляется в снижении экспрессии тирозингидроксилазы и уменьшении уровня дофамина [81, 197, 198].

Таким образом, фундаментальное сходство механизмов, запускаемых хроническим стрессом, делает *Danio rerio* релевантной моделью для трансляционных исследований аффективной патологии.

1.6 Роль нейровоспаления в патогенезе хронического стресса

Под нейровоспалением понимают комплексный иммунный ответ в центральной нервной системе, играющий значительную роль в патофизиологии как неврологических, так и психиатрических расстройств. Данный термин впервые появился в 1990-х годах для описания активации резидентных глиальных клеток и инфильтрации периферических иммунных клеток в ЦНС, преимущественно при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях [199, 200]. Ключевыми участниками нейровоспалительного процесса являются микроглия (резидентные макрофаги мозга) и астроциты, которые при активации выделяют провоспалительные цитокины и хемокины. При нарушении проницаемости гематоэнцефалического барьера к этому процессу присоединяются периферические иммунные клетки, включая Т- и В-лимфоциты, моноциты и нейтрофилы [199, 200]. В зависимости от контекста и стадии патологического процесса, цитокины и активированные глиальные клетки могут оказывать как нейропротекторное, так и нейродегенеративное действие. Несмотря на то, что нейровоспаление традиционно ассоциируется с прогрессированием патологии, в физиологических условиях оно также обеспечивает критически важные функции защиты и репарации нервной ткани [201].

1.6.1. *Классификация микроглии*

Микроглиальные клетки являются резидентными макрофагами ЦНС [202], и согласно классическим представлениям, существуют в трех основных состояниях активации: гомеостатическом (M0), провоспалительном (M1) и противовоспалительном (M2). Эти состояния характеризуются различными молекулярными путями и профилями экспрессии генов, которые динамически изменяются в ответ на сигналы микроокружения [202].

Гомеостатическое состояние (M0) представляет собой базовый фенотип микроглии, который поддерживается при отсутствии патологических стимулов. В этом состоянии микроглия характеризуется разветвленной (рамифицированной)

морфологией и играет ключевую роль в поддержании гомеостаза ЦНС [203]. В частности, М0 клетки сканируют окружающую среду, удаляют клеточный дебрис, участвуют в синаптическом прунинге, а также способствуют ангиогенезу и нейрогенезу [204, 205].

В ответ на повреждение или патологические стимулы происходит активация микроглии, сопровождающаяся приобретением клетками амебоидной формы, увеличением подвижности, а также пролиферативной и фагоцитарной активностью [203]. Активация микроглиальных клеток может быть запущена экзогенными сигналами, такими как, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), к которым относятся структуры инфекционного происхождения, бактериальные липополисахариды, патогенный генетический материал и вирусы [206]. Также активация микроглии происходит под воздействием эндогенных сигналов, а именно молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением или гибелью клеток (DAMP). К ним относятся внеклеточный АТФ, белок HMGB1, нуклеотиды, белковые агрегаты (в т.ч. β-амилоид и альфа-синуклеин), а также цитокины, секретируемые другими глиальными клетками [207, 208].

Фенотип М1 является провоспалительным и характеризуется повышенной экспрессией провоспалительных генов, включая гены индуцибельной NO-синтазы (iNOS), индуцибельной циклоксигеназы (COX-2), интерлейкина 6 (IL-6) и фактора некроза опухоли альфа (TNF-α) [209, 210]. Противовоспалительный фенотип М2 микроглии формируется под действием цитокинов IL-4, IL-13 и трансформирующего фактора роста-β (TGF-β). В этом состоянии микроглия экспрессирует специфические маркеры, такие как аргиназа 1 (ARG-1), YM-1, маннозный рецептор С-типа (CD206) и хемокин 22 с мотивом CC (CCL22) [209, 211].

В настоящее время классификация М1/М2 микроглии подвергается критике, так как функции микроглии не ограничиваются регуляцией воспалительных процессов [212]. Так, скорее используют модель непрерывного спектра активации макрофагов [202]. Вместо классификации макрофагов по дискретным состояниям активации на основе ограниченного числа фенотипических маркеров, эта модель

учитывает комбинацию характеристик макрофагов, включая профили экспрессии генов, метаболические характеристики и взаимодействие с микроокружением [213]. Наряду с классической моделью M1/M2, также выделяют новые подтипы, включая DAM, KSPG-, Hox8b-, CD11c- и TREM2+ микроглию, участвующую, регенерации, ремиелинизации и нейрогенезе. Это подчеркивает высокую фенотипическую пластичность микроглии, однако дихотомическая классификация на фенотипы M1/M2 по-прежнему широко используется в литературе [212, 214]. В данной работе также будет преимущественно использоваться данная терминология, так как она наиболее удобна и наглядна для обсуждения механизмов про- и противовоспалительной активности глиальных клеток.

1.6.2. Классификация астроглии

Астроциты являются наиболее распространенным типом глиальных клеток и регулируют широкий спектр функций в ЦНС, включая поддержание оптимальной концентрации ионов и нейротрансмиттеров во внеклеточном пространстве, участие в развитии нейронов и синапсов, а также обеспечение метаболизма нейронов [215]. Аналогично поляризации микроглии, астроциты могут принимать реактивный нейротоксичный фенотип A1 или фенотип A2, который, в свою очередь, оказывает нейропротекторное действие [216]. Индукция фенотипа A1 опосредована активированной микроглией, которая секретирует IL-1α, TNF-α и компонент системы комплемента C1q, причем для запуска этого процесса необходимо и достаточно совместное действие всех трех факторов. A1-астроциты утрачивают способность поддерживать выживаемость нейронов, их рост, синаптогенез и синаптический прунинг, а также начинают провоцировать гибель нейронов и олигодендроцитов [217]. Напротив, фенотип A2 ассоциирован с нейропротекцией и характеризуется выделением нейротрофических факторов, поддерживающих выживание и восстановление нейронов [216]. Фенотип A1 характеризуется маркерами активации системы комплемента C3 и интерферон-индуцированным гуанилат-связывающим белком 2 (GBP2), в то время как для

фенотипа A2 характерны маркеры, такие как пентраксин 3 (PTX3) и S100 кальций-связывающий белок A10 (S100A10)[218].

Аналогично ситуации с микроглией, современные исследования указывают на необходимость пересмотра классификации астроглии ввиду высокой гетерогенности их реактивных состояний [219]. Тем не менее, дихотомическая классификация A1/A2 по-прежнему широко используется в литературе, и применяется в данной работе, так как она удобна для обсуждения механизмов про- и противовоспалительной активности глиальных клеток.

1.6.3. Классификация глиальных клеток у Danio rerio

Вопрос глиальной классификации у *Danio rerio* остается дискуссионным. С одной стороны, у рыб демонстрируется фенотипическая гетерогенность клеток микро- и астроглии. В частности, в исследованиях на трансгенных линиях, экспрессирующих флуоресцентные репортеры в микроглиальных клетках, было показано наличие M1/M2 фенотипов, молекулярные маркеры которых во многом совпадают с маркерами млекопитающих [220-222]. С другой стороны, отсутствуют однозначные доказательства полного соответствия молекулярных маркеров фенотипов, а также показано присутствие уникальных для *Danio rerio* популяций клеток [223]. Тем не менее, современные работы активно используют классификацию M1/M2 для изучения и описания функций микроглии у рыб в разных патофизиологических состояниях, включая оценку таких молекулярных маркеров как iNOS, COX-2, IL-6 и TNF-α для M1-фенотипа и Arg1 и CD206 для M2-фенотипа [224-228]. Основываясь на этих данных, в текущем исследовании также применяется данная классификация и указанные маркеры для анализа воспалительного и противовоспалительного процессов в ЦНС *Danio rerio*, поскольку функциональная роль ключевых цитокинов и ферментов остается высококонсервативной.

1.6.4. Механизмы развития нейровоспаления

Хронический стресс запускает каскад нейровоспалительных и системных воспалительных реакций, играющих ключевую роль в патофизиологии тревожных и депрессивных расстройств [22, 23] (Рисунок 1.1). Центральным механизмом выступает дисрегуляция ГГН-оси, приводящая к гиперсекреции кортизола и развитию резистентности иммунных клеток к его противовоспалительному действию. Это способствует активации как периферических иммунных клеток, так и клеток резидентной микроглии. [24, 229]. Реализация данного процесса опосредована несколькими молекулярными механизмами. С одной стороны, при стрессе выделяются DAMP, которые распознаются толл-подобным рецептором 4-го типа (TLR-4) и NLR-белком, содержащим пириновый домен 3 (NLRP3), что приводит к активации микроглии. К таким молекулам, связанным с развитием депрессии относятся белок высокой мобильности группы 1 (HMGB1), внеклеточный АТФ, пуриновые основания и метаболиты, белки теплового шока (HSP), белки S100 и галектин-3 (Gal-3) [24]. Кроме того, *in vitro* работы показывают, что индуцированная кортизолом экспрессия белка FKBP5 способствует переходу микроглии в провоспалительный фенотип посредством активации сигнального пути NF-κB [230].

Активированная в провоспалительный М1-фенотип микроглия секретирует провоспалительные цитокины, включая IL-1β, IL-6 и TNF-α. Многие клинические исследования фиксируют уровень повышенных провоспалительных цитокинов у пациентов с депрессивным расстройством [24, 25]. Более того, примерно у 30% пациентов с гепатитом С развивается тяжелая депрессия в течение первых 3 месяцев после начала терапии интерфероном-альфа [231], который индуцирует клеточный апоптоз и внеклеточное высвобождение DAMP, таким образом поддерживая и усугубляя реакцию нейровоспаления [24]. IL-1β также переводит покоящиеся микроглию и астроциты в провоспалительные фенотипы [232]. Активированные астроциты перестают выполнять нейропротекторную функцию, начинают секретировать провоспалительные цитокины и активные формы кислорода (АФК). Некоторые исследования in vitro свидетельствуют о том, что А1-

астроциты напрямую секретируют нейротоксичные соединения, способствующие апоптозу нейронов [217].

Провоспалительные цитокины и высвобождаемый астроцитами фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A) снижают экспрессию и нарушают сборку клаудинов и окклюдинов, являющихся ключевыми структурными белками ГЭБ, таким образом повышая его проницаемость для иммунных клеток. Кроме того, макрофаги и активированная микроглия секретируют АФК и матриксные металлопротеиназы (ММП), способствующие дальнейшей деградации базальной мембраны ГЭБ. Это облегчает миграцию периферических иммунных клеток в ЦНС, а также связывает центральное и периферическое воспаление в единый патологический контур [24].

Помимо цитокин-опосредованного воспаления, в развитии депрессии критическую роль играет дисбаланс между продукцией свободных радикалов и антиоксидантной защитой. Высокое потребление кислорода мозгом делает его особенно уязвимым к окислительному стрессу по сравнению с другими органами и тканями [233]. Провоспалительная микроглия высвобождает активные формы кислорода, которые нарушают целостность клеточных мембран, повреждают ДНК и нарушают синтез белка [24]. В частности, активированная микроглия начинает экспрессировать iNOS, которая синтезирует оксид азота (NO) из L-аргинина. Оксид азота является вторичным мессенджером и обладает плейотропными эффектами, однако в высокой концентрации он реагирует с кислородными соединениями, образуя активные азотные радикалы и, тем самым, индуцируя окислительный стресс [234]. Кроме того, при избыточных концентрациях NO вызывает чрезмерную стимуляцию NMDA-рецепторов, провоцируя глутаматергическую эксайтотоксичность [235]. Клинические исследования показывают, что экспрессия гена *iNOS* у пациентов регионально зависима и изменяется при БДР, а введение ингибиторов iNOS ослабляет депрессивно-подобные симптомы у грызунов [24]. Более того, модуляция NO-сигнализации рассматривается в качестве терапевтической стратегии при депрессии [236]. Таким образом, экспрессия гена iNOS (*Nos2* у грызунов или его ортолог *nos2a* у *Danio rerio*) служит не только

маркером провоспалительного микроглиального состояния, но и индикатором патологического аффективного фенотипа.

Провоспалительные цитокины и АФК, секретируемые микро- и астроглией, подавляют нейрогенез в субгранулярной зоне гиппокампа, нарушая процессы пролиферации нейральных стволовых клеток, миграции нейробластов и встраивания новых нейронов [237, 238]. Взрослый нейрогенез играет ключевую роль в поддержании когнитивных способностей, и его нарушение приводит к ухудшению памяти и формированию когнитивного дефицита. В частности, подобные нарушения неоднократно демонстрировались как у пациентов с БДР, так и в экспериментальных моделях хронического стресса [237, 239, 240].

Нейровоспаление также оказывает влияние на баланс нейромедиаторов. Провоспалительные цитокины снижают доступность моноаминов за счет активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), которая увеличивает экспрессию транспортеров обратного захвата серотонина, норадреналина и дофамина, ускоряя их клиренс из синаптической щели [241]. Кроме того, провоспалительные цитокины стимулируют утилизацию кофактора тетрагидробиоптерина, необходимого для синтеза моноаминов, что истощает его запасы и ограничивает скорость других реакций, в которые он вовлечен. В частности, снижается активность триптофангидроксилазы и тирозингидроксилазы, что в конечном итоге ограничивает синтез серотонина и дофамина [242].

Активированные микроглиальные клетки повышают уровень IL-18, что приводит к увеличению экспрессии фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), которая катализирует расщепление триптофана (предшественника серотонина) по киноуриновому пути в глиальных клетках. Этот процесс снижает доступность триптофана и, таким образом, косвенно снижает синтез серотонина [243]. Образовавшийся кинуренин далее метаболизируется либо в нейропротекторную кинуреновую кислоту (преимущественно в астроцитах), либо в нейротоксичную хинолиновую кислоту и 3-гидроксикинуренин (в микроглии) [241]. Хинолиновая кислота и 3-гидроксикинуренин обладают выраженным нейротоксическим действием и в высоких концентрациях чрезмерно стимулируют NMDA-рецепторы,

вызывая глутаматергическую эксайтотоксичность [241]. Таким образом, нейровоспаление интегрировано с другими механизмами депрессии, активно воздействуя на моноаминергические и глутаматергические системы организма.

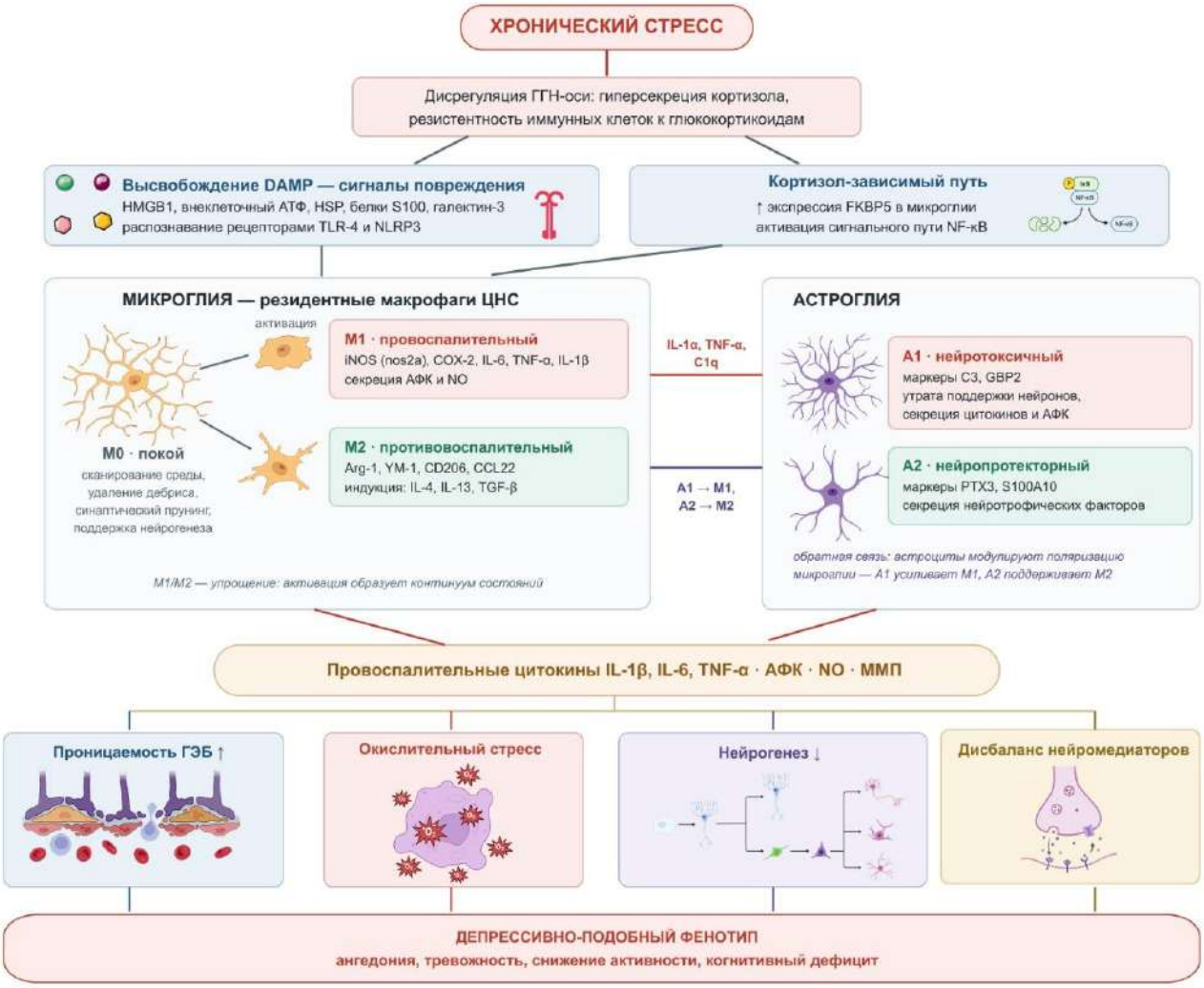


Рисунок 1.1 – Роль нейровоспаления в патогенезе депрессивных расстройств

1.7 Животные модели хронического стресса

Животные модели служат незаменимым инструментом для изучения нейронных и молекулярных механизмов, лежащих в основе стресс-индуцированных психических расстройств. Такие модели широко используются для оценки и разработки терапевтических подходов к лечению этих заболеваний,

что представляет собой задачу, практически невыполнимую при исследовании на человеке [244].

Традиционно подавляющее большинство исследований хронического стресса проводится на грызунах (мышах и крысах), в рамках различных экспериментальных парадигм. К таким парадигмам относятся: хронический стресс удержания (ХСУ), стресс социальной изоляции (ССИ), хронический стресс социального поражения (ХССП), а также хронический стресс на ранних стадиях жизни (РХС) [245-248]. Эти модели в значительной степени воспроизводят ключевые аспекты стресс-индуцированных расстройств центральной нервной системы у человека [249-251].

ХСУ является одной из наиболее часто используемых моделей хронического стресса у мышей, при котором животное иммобилизуют в контейнере на несколько часов ежедневно, повторяя эксперимент в течение нескольких дней или недель [252]. Преимущество данной модели заключается в ее относительной простоте, однако ограничение движения является физическим стрессором, тогда как большинство человеческих аффективных расстройств (депрессия, тревога, ПТСР) связаны с психосоциальными стрессорами. Вследствие этого модель ХСУ обладает низкой феноменологической валидностью, которая определяет, насколько модель стресса у грызунов отражает клиническое состояние человека [253]. Так, в данном случае модель скорее воспроизводит стресс, напоминающий состояние клаустрофобии у человека [253]. Тем не менее данная модель достаточно успешно воспроизводит депрессивную патологию и ангедонию в частности [252].

Социальность и социальные взаимодействия являются отличительными чертами и необходимым условием нормального функционирования и благополучия грызунов. Таким образом, нарушения социальной организации и иерархии используются сразу для нескольких моделей стресса [245]. Модель стресса ССИ предполагает сегрегацию животных от особей, с которыми они содержались ранее и помещение в клетку индивидуального содержания на период от нескольких часов до нескольких недель. При хроническом воздействии эта модель хорошо воспроизводит депрессивный фенотип, и имеет высокую

феноменологическую валидность, так как напрямую имитирует социальную изоляцию человека [254, 255].

Другой широко распространенной моделью психосоциального стресса является ХССП, которая имитирует ситуации «травли» и «буллинга» у человека [253]. Особенность этой парадигмы заключается в том, что она вызывает патологические поведенческие изменения только у подгруппы животных, воспроизводя индивидуальную изменчивость поведенческих реакций у человека [256]. Модель предполагает стрессирование животного посредством прямого и непрямого контакта с агрессивной особью того же вида. При этом непрямое взаимодействие является важным источником эмоционального стресса для экспериментального животного, так как оно индуцирует нейрональные механизмы стрессовой реакции [253].

Отдельно стоят парадигмы РХС, которые характеризуются стрессовым воздействием в раннем возрасте и используются для оценки отложенных долговременных эффектов стресса на физиологическое состояние и поведение животных во взрослом возрасте [257]. Одним из часто используемых в данной парадигме стрессоров является отлучение от матери или использование самок, осуществляющих недостаточный уход за потомством, в частности низкий уровень груминга и вылизывания. Депривация материнской заботы серьезно влияет на потомство, что во взрослом возрасте проявляется стойкими поведенческими и нейроэндокринными нарушениями [253].

Наиболее широко используемой моделью хронического стресса является хронический непредсказуемый стресс (ХНС). В рамках данной парадигмы животные подвергаются воздействию различных стрессоров на протяжении нескольких дней или недель, что вызывает широкий спектр поведенческих, эндокринных и физиологических изменений, отражающих симптомы психических расстройств. В целом данная модель обладает высокой феноменологической валидностью, так как в действительности человек с большей вероятностью столкнется с несколькими стрессорами разного генеза, чем с одним и тем же стрессом, повторяющимся много раз, и именно сочетание умеренных стрессоров

приводит к кумулятивному патологическому стрессу [253]. Ключевым недостатком данной модели является низкая воспроизводимость результатов как между разными лабораториями, так и внутри одной лаборатории. Это обусловлено, с одной стороны, большой вариабельностью протоколов в сочетании с высокой чувствительностью модели даже к незначительным изменениям в экспериментальном дизайне, а, с другой стороны, индивидуальной чувствительностью особей к действию стресса [251, 258]. С другой стороны, такая вариабельность имеет важное трансляционное значение, воспроизводя влияние хронического непредсказуемого стресса на человека, так как в данном случае реакция каждого индивида на ХНС также различается.

Рыбы *Danio rerio* активно используются в качестве модельного объекта для изучения последствий действия хронического стресса. Для этого были адаптированы различные модели стресса грызунов, однако наиболее используемой является также модель ХНС, которая имеет вариации по длительности действия и использованию отдельных стрессоров [10]. Список доступных стрессоров при этом достаточно обширный и включает в себя ограничение подвижности, воздействие хищника, термическое воздействие, социальную изоляцию, преследование сачком, стресс мелководья, воздействие феромона страха и другие стрессоры [259, 260]. Используются также другие модели стресса, такие как модель длительного воздействия хищника и модели социального стресса, например, длительная социальная изоляция [30, 261].

Таким образом, выбор модели хронического стресса определяется конкретными исследовательскими задачами и требует баланса между феноменологической валидностью, воспроизводимостью и практической реализуемостью. Хотя ни одна из существующих парадигм не воспроизводит полную клиническую картину депрессивных расстройств человека, модель хронического непредсказуемого стресса демонстрирует оптимальное сочетание этиологической релевантности и способности индуцировать устойчивые поведенческие, эндокринные и нейропластические изменения. Протоколы хронического стресса, успешно адаптированные для *Danio rerio*, позволяют

воспроизводить ключевые поведенческие и физиологические сдвиги, аналогичные таковым у млекопитающих. При этом использование рыб обладает рядом неоспоримых практических преимуществ, таких как высокая пропускная способность, малые размеры и возможность одновременного тестирования больших групп животных. Это делает *Danio rerio* удобным и валидным модельным объектом для изучения молекулярных механизмов стресс-индуцированных расстройств и первичного скрининга потенциальных терапевтических мишеней.

1.8 Временная динамика и дозозависимость эффектов стресса

Одной из актуальных проблем изучения хронического стресса является анализ временной динамики развития стресс-индуцированных изменений. На сегодняшний день большинство работ рассматривают фактор длительности воздействия исключительно в контексте дихотомии «острый - хронический» стресс. Однако продолжительность хронического воздействия имеет критическое значение, поскольку в клинической практике психогенное воздействие редко ограничивается несколькими неделями и может продолжаться месяцами и годами. Патофизиологические изменения при этом также могут меняться в зависимости от длительности действия стресса, и понимание этих процессов важно, так как влияет на выбор оптимальной терапевтической стратегии.

В литературе представлены данные об эффектах ХНС различной продолжительности, включающие интервалы от нескольких дней до нескольких месяцев. На основании метаанализов можно проанализировать как меняется патологический процесс с увеличением длительности ХНС [11]. Однако серьезным ограничением данного подхода является низкая воспроизводимость результатов в модели ХНС, о чем упоминалось ранее. Для объективной оценки временной динамики необходимы работы, оценивающие изменения стресс-реакции в рамках одного экспериментального исследования. Количество подобных работ ограничено, и в большинстве из них анализируются лишь краткосрочные интервалы. В частности, широко представлены исследования, оценивающие

эффекты 7- и 14-дневного стресса как на грызунах, так и на *Danio rerio* [28, 262-265]. Ряд работ на грызунах охватывает более длительные промежутки (до 3 - 5 недель) [266-271].

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению продолжительности протоколов ХНС на грызунах до 6–11 недель [272-280]. Более того, ряд этих исследований включает оценку динамики развития стресс-реакции на разных временных отрезках в рамках одного эксперимента. Так, при оценке реактивности ГГН-оси, иммунологических показателей и уровня тревожно-депрессивного поведения у мышей линии C57BL/6 в ходе увеличения длительности ХНС с 4 до 8 недель было показано, что 4-недельное воздействие не вызывает значимых патологических сдвигов, тогда как устойчивые эффекты развиваются лишь при увеличении длительности протокола [281]. В другом исследовании сравнивалось развитие депрессивно-подобных поведенческих признаков у крыс разного возраста при 4- и 7-недельном воздействии ХНС. Результаты свидетельствуют о том, что независимо от возраста животных для формирования устойчивого депрессивного фенотипа требуется более длительное стрессорное воздействие [282].

В связи с этим в современной нейробиологии все более востребованным становится изучение эффектов пролонгированного стресса. Крайне перспективным модельным объектом для решения подобных задач выступают рыбы *Danio rerio*. Благодаря особенностям их биологии, для генерации устойчивых стресс-индуцированных фенотипов у них требуется существенно меньше времени, чем у млекопитающих [10, 283]. Использование *Danio rerio* позволяет моделировать длительные протоколы ХНС, реализация которых в экспериментах на грызунах потребовала бы неоправданно высоких временных и ресурсных затрат. Это открывает новые возможности для фундаментального изучения механизмов и временной динамики развития патологии тревожных и аффективных расстройств, индуцированной длительным хроническим стрессом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Содержание животных

Взрослые половозрелые (возрастом 12–14 месяцев) короткоплавниковые особи дикого типа *Danio rerio* обоих полов (соотношение примерно 50:50) были получены от местного дистрибьютора (Tropic Aquarium, Ltd., Санкт-Петербург, Россия). Перед началом экспериментов животных содержали не менее 3 недель в стандартных условиях в больших пластиковых контейнерах объемом 110 л с поддерживаемыми параметрами среды. В частности, поддерживалась температура воды 27 ± 0,5 °C, pH 7,4 и освещение 950–960 люкс. Продолжительность светового дня составляла 12 часов (9:00 – 21:00). Все рыбы ранее не использовались в других экспериментах, получали стандартный корм TetraminPro (Tetra GmbH, Оснабрюк, Германия) дважды в день, относились к одной популяции, и были случайным образом распределены по экспериментальным группам. Эксперименты на животных одобрены комитетом по этике АНО ВО «Университет «Сириус» (протокол заседания № 9.2 от 10.03.2025) и полностью соблюдали национальные и международные принципы и правила по проведению экспериментов на животных, а также соответствовали принципам 3Rs гуманного экспериментирования.

Выбор популяции для настоящего исследования был основан на соображениях популяционной валидности и трансляционной релевантности. В частности, в то время как использование генетически гомогенных инбредных линий *Danio rerio* обеспечивает высокую воспроизводимость в нейрогенетических исследованиях, моделирование расстройств ЦНС требует имитации «реальных» человеческих патологий, которые развиваются у генетически гетерогенных клинических популяций. Таким образом, использование аутбредных популяций *Danio rerio* представляет собой более валидный и релевантный подход для целей настоящего исследования.

В ходе экспериментальных процедур каждая экспериментальная группа содержалась в отдельном аквариуме. Данная конфигурация была выбрана для

обеспечения равномерного и одновременного воздействия стрессоров, минимизируя вариабельность применения стресса между аквариумами. Для получения независимых поведенческих измерений каждая рыба тестировалась индивидуально в отдельной установке, с заменой воды между особями. Распределение животных по экспериментальным группам проводили случайным образом путем последовательного отлова особей сачком из общей емкости. Поведенческое тестирование и забор тканей проводили индивидуально для каждой особи. Анализ видеозаписей и обработку изображений, а также молекулярно-генетических и нейрохимических данных осуществляли слепым методом без информации о принадлежности образцов к экспериментальным группам до завершения измерений.

Всего во всех трех экспериментальных сериях было использовано 995 рыб. Общая смертность в этих экспериментах составила 6,7 % (67 особей из группы стресса) в настоящем исследовании. Минимальный размер выборки для поведенческого тестирования (n = 15-16 на группу) был основан на анализе статистической мощности для различия средних значений между группами 10–15, SD = 10, α = 0,05 и мощности = 0,8. Минимальный размер выборки (n = 8 на группу) для исследований экспрессии генов был рассчитан на основе анализа статистической мощности для различия средних значений между группами 10, SD = 5, α = 0,05 и мощности = 0,8. Окончательные размеры выборок варьировали из-за строго определенных критериев исключения, которые включали спонтанную смертность во время протокола ХНС, нарушение прохождения поведенческих тестов (например, выпрыгивание рыбы из установки), технические выбросы в молекулярных анализах (в частности, когда разница в значениях порогового цикла (Ct) между техническими повторностями превышала 0,5 цикла), повреждение теленцефалона при выделении мозга для анализа проницаемости ГЭБ.

2.2 Схема исследования

Настоящее исследование состоит из трех экспериментальных серий, результаты которых представлены в соответствующих главах. Целью первой серии

являлось изучение динамики нейровоспалительных процессов при формировании аффективной патологии, вызванной 5-недельным и 12-недельным хроническим непредсказуемым стрессом (ХНС5 и ХНС12) (Рисунок 2.1). В эксперименте были использованы 150 половозрелых особей *Danio rerio* (исходная численность животных на момент начала протокола хронического стресса), случайным образом распределенных на группы «контроль» и «стресс». Животные группы «стресс» в течение 12 недель подвергались воздействию по протоколу ХНС (см. таблицу 2.2). По окончании 1-й недели стресса часть животных выводилась из эксперимента (n = 16 на группу) для оценки тревожного и депрессивно-подобного поведения, а также для определения уровня кортизола в тканях тела. Этот срок наблюдения был выбран в качестве ранней контрольной временной точки для отслеживания начальной стадии развития аффективной патологии. После 5- и 12-недельного воздействия проводилась оценка поведения, на следующий день выполнялись эвтаназия и забор тканей. Образцы головного мозга и ткани тела были заморожены в жидком азоте и хранились при температуре -80 °C до проведения анализов. Для оценки динамики формирования стресс-реакции проводился анализ уровня кортизола в тканях тела и уровня экспрессии глюкокортикоидного рецептора в головном мозге. Для подтверждения формирования аффективной патологии проводился анализ уровня моноаминов и экспрессии генов, ассоциированных с депрессивно-подобным поведением, в образцах головного мозга. Для оценки нейровоспаления определялась экспрессия маркеров про- и противовоспалительной активности глии, а также оценивалась проницаемость гематоэнцефалического барьера.

Поскольку размер мозга *Danio rerio* не позволяет провести все биохимические и молекулярные анализы на одном образце, после завершения поведенческого тестирования и эвтаназии ткани каждого животного случайным образом распределялись на независимые подгруппы для проведения дальнейших анализов. Таким образом, каждый отдельный образец мозга использовался строго для одного вида исследования (либо анализ экспрессии генов, либо анализ уровня моноаминов). Анализ уровня кортизола проводился в тканях тела тех же животных,

чей мозг направлялся на молекулярный или нейрохимический анализ. Для оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера формировали отдельную подгруппу животных, участвовавших в поведенческом тестировании, но не в анализе уровня кортизола в связи с введением красителя Эванса синего. Результаты данной серии представлены в главе 3.



Рисунок 2.1 – План экспериментальной серии 1, посвященной анализу эффектов хронического непредсказуемого стресса (ХНС) длительностью 1, 5 и 12 недель на поведение, молекулярно-генетические и нейрохимические показатели взрослых *Danio rerio*

Вторая серия экспериментов была направлена на подбор оптимальных концентраций противовоспалительных препаратов в условиях 2-недельной модели ХНС (ХНС2) (Рисунок 2.2). Для фармакологической коррекции были выбраны два препарата из различных классов, эффективно подавляющих нейровоспаление. Тетрациклиновый антибиотик миноциклин был выбран в связи с его выраженной способностью ингибировать активацию микроглии [284]. В качестве нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП) был использован нимесулид, оказывающий преимущественно противовоспалительное действие за счет ингибирования индуцибельной циклооксигеназы (ЦОГ-2). Кроме того, в моделях *in vitro* была продемонстрирована способность нимесулида модулировать воспалительные реакции, опосредованные астроглией [285, 286].

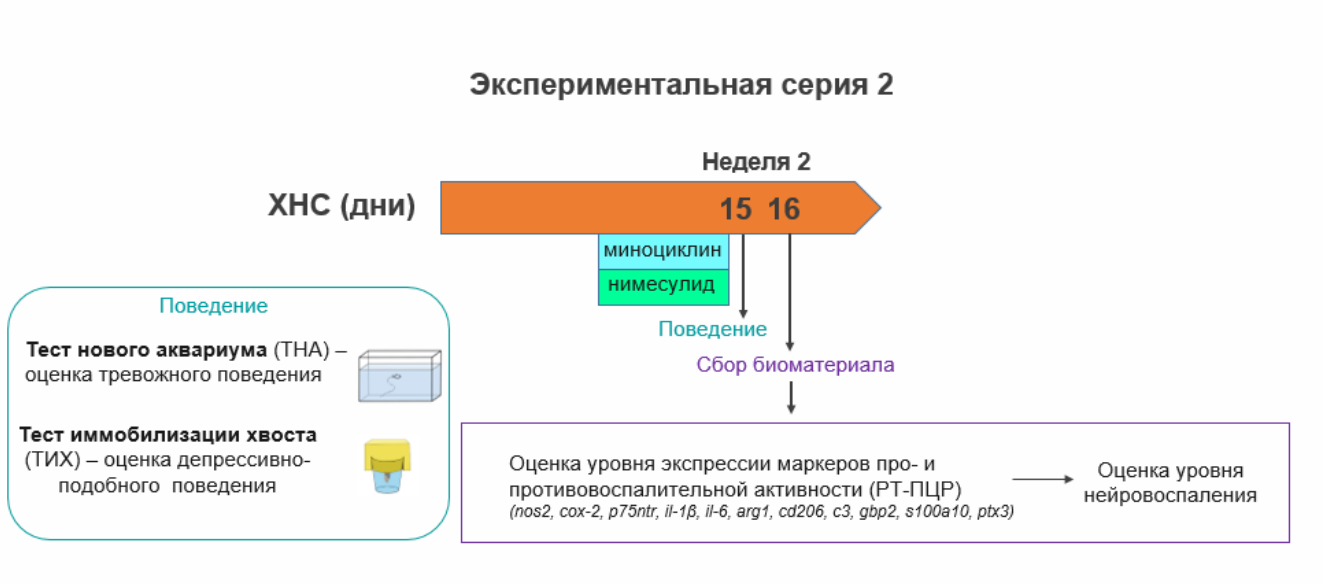


Рисунок 2.2 – План экспериментальной серии 2, посвященной анализу острых и хронических эффектов введения миноциклина и нимесулида в разных концентрациях на поведение и уровень экспрессии генов – маркеров нейровоспаления в модели непредсказуемого хронического стресса в течение 2 недель (ХНС2) на взрослых *Danio rerio*

Вторая серия состоит из 8 экспериментов. Всего в рамках всех экспериментальных серий было использовано 465 особей *Danio rerio*. Эксперимент 1 посвящен оценке эффектов 2-недельного ХНС. Данная длительность протокола была выбрана для тестирования фармакологической коррекции, поскольку, согласно литературным данным, она является наиболее короткой, но при этом способной приводить к развитию устойчивых признаков аффективной патологии у рыб [28, 263]. Эксперимент 2 был направлен на подбор оптимальной безопасной концентрации миноциклина при его субхроническом (7-дневном) введении. Эксперименты 3 и 4 оценивают эффекты различных концентраций миноциклина, отобранных по результатам второго этапа, при их применении на модели ХНС2. Эксперимент 5 включал подбор нетоксичной концентрации нимесулида при 7-дневной экспозиции. Эксперименты 6–8 анализировали эффекты различных концентраций нимесулида в модели ХНС2. Схема всех 8 экспериментов представлена в таблице 2.1. Результаты второй серии описаны в главе 4.

Таблица 2.1 – Описание второй экспериментальной серии, представленной в главе 4. Количество животных в группе указано на момент оценки поведения

N	Группы (n)	Воздействие стресса	Фармакологическое воздействие	Методы исследования	Описание эксперимента
1	Контроль (n = 27)	Нет	Нет	Оценка поведения, Анализ экспрессии генов	Оценка эффектов ХНС2
	Стресс (n = 27)	1-14 день	Нет		
2	Контроль (n = 14)	Нет	Нет	Оценка поведения	Подбор безопасной эффективной концентрации миноциклина
	Миноциклин 25 мг/л (n = 10)	Нет	1 – 7 день		
	Миноциклин 50 мг/л (n = 10)	Нет	1 – 7 день		
	Миноциклин 100 мг/л (n = 10)	Нет	1 – 7 день		
3	Контроль (n = 13)	Нет	Нет	Оценка поведения, Анализ экспрессии генов	Анализ эффективности концентрации миноциклина (50 мг/л, 2 недели) в модели ХНС2
	Миноциклин 50 мг/л (n = 13)	Нет	1 – 14 день		
	Стресс (n = 8)	1-14 день	Нет		
	Стресс + миноциклин 50 мг/л (n = 9)	1-14 день	1 – 14 день		
4	Контроль (n = 15)	Нет	Нет	Оценка поведения	Анализ эффективности концентрации миноциклина (25 мг/л, 1 неделя) в модели ХНС2
	Миноциклин 25 мг/л (n = 15)	Нет	8 – 14 день		
	Стресс (n = 15)	1-14 день	Нет		
	Стресс+ миноциклин 25 мг/л (n = 15)	1-14 день	8 – 14 день		
5	Контроль (n = 11)	Нет	Нет	Оценка поведения	Подбор безопасной эффективной концентрации нимесулида
	Нимесулид 1 мг/л (n = 10)	Нет	1 – 7 день		
	Нимесулид 5 мг/л (n = 10)	Нет	1 – 7 день		
6	Контроль (n = 15)	Нет	Нет	Оценка поведения	Анализ эффективности концентрации нимесулида (5 мг/л, 2 недели) в модели ХНС2
	Нимесулид 5 мг/л (n = 13)	Нет	1 – 14 день		
	Стресс (n = 14)	1 – 14 день	Нет		
	Стресс + нимесулид 5 мг/л (n = 5)	1 – 14 день	1 – 14 день		

Продолжение таблицы 2.1

N	Группы (n)	Воздействие стресса	Фармакологическое воздействие	Методы исследования	Описание эксперимента
7	Контроль (n = 12)	Нет	Нет	Оценка поведения	Анализ эффективности концентрации нимесулида (2,5 мг/л, 2 недели) в модели ХНС2
	Нимесулид 2,5 мг/л (n = 10)	Нет	1 – 14 день		
	Стресс (n = 13)	1 – 14 день	Нет		
	Стресс + нимесулид 2,5 мг/л (n = 3)	1 – 14 день	1 – 14 день		
8	Контроль (n = 13)	Нет	Нет	Оценка поведения, Анализ экспрессии генов	Анализ эффективности концентрации нимесулида (2,5 мг/л, 1 неделя) в модели ХНС2
	Нимесулид 2,5 мг/л (n = 10)	Нет	8 – 14 день		
	Стресс (n = 14)	1 – 14 день	Нет		
	Стресс + нимесулид 2,5 мг/л (n = 13)	1 – 14 день	8 – 14 день		

Целью третьей серии работы являлась оценка эффективности подобранных концентраций противовоспалительных препаратов на разных стадиях развития аффективной патологии в моделях ХНС5 и ХНС12 (Рисунок 2.3). Всего в рамках данной серии было использовано 380 взрослых особей *Danio rerio*. Животные из группы «стресс» подвергались протоколу ХНС в течение 5 или 12 недель. По окончании 4-й и 11-й недель стресса часть животных получала фармакологическую коррекцию в течение одной недели, при этом аналогичному воздействию подвергалась и часть контрольной группы. Для фармакологической коррекциии использовались миноциклин и нимесулид, а также флуоксетин (СИОЗС) в качестве препарата сравнения. По завершении протоколов ХНС5 и ХНС12 проводилась оценка тревожного и депрессивно-подобного поведения. На следующий день проводили эвтаназию и забор тканей, образцы головного мозга замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °C до проведения анализов. Образцы использовали для определения интенсивности обмена моноаминов в ЦНС, анализа

экспрессии генов-мишеней и проницаемости ГЭБ. Результаты третьей серии представлены в главе 5.

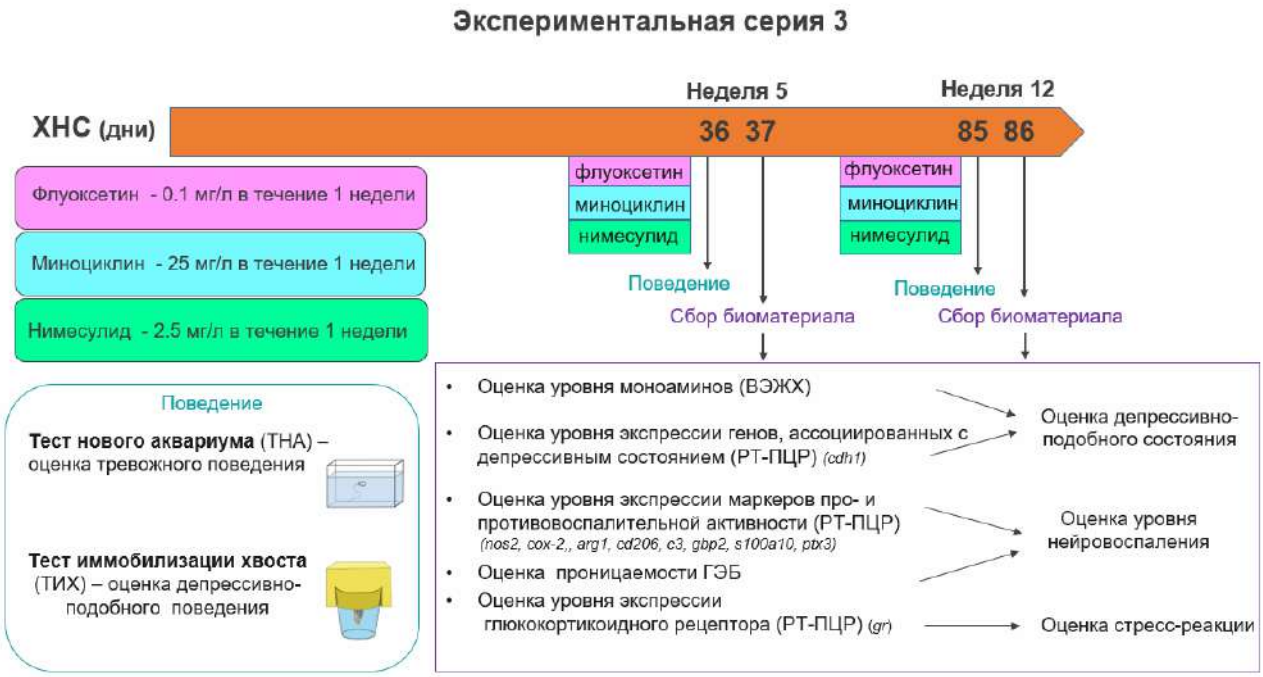


Рисунок 2.3 – План экспериментальной серии 3, посвященной анализу эффектов миноциклина и нимесулида поведенческие, молекулярно-генетические и нейрохимические стресс-индуцированные изменения в модели непредсказуемого хронического стресса (ХНС) на взрослых *Danio rerio*

2.3 Хронический непредсказуемый стресс

Экспериментальные рыбы содержались в лабораторных аквариумах объемом 20 л и ежедневно, в течение 12 недель, подвергались воздействию различных стрессоров. В протокол были включены следующие виды воздействий: скученность (10 рыб/Л в контейнерах объемом 20 л), стресс новизной в сочетании со скученностью (помещение в незнакомые пластиковые емкости объемом 8 л зеленого, синего или красного цвета при плотности 10 рыб/л), кратковременная экспозиция на воздухе (1 минута на воздухе в сачке), преследование сачком, температурный стресс (охлаждение до 10 °C и гипертермия при 35 °C в контейнерах объемом 5 л), визуальное предъявление хищника (*Oreochromis niloticus*), воздействие химическими сигналами хищника (вода из аквариумов с хищниками после 7-дневного содержания), контакт с незнакомыми рыбами другой

линии *Danio rerio* (зеленые, желтые и розовые линии *GloFish*), помещение в среду с новыми объектами (35 пластиковых игрушек «Киндер-сюрприз»), снижение уровня воды (до 30–60 % от нормы), воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) (аквариум оборачивался светодиодной лентой, расположенной на расстоянии 10 см от дна; всего 300 светодиодов красного, зеленого, синего и белого цветов, работающих в случайном режиме с частотой смены цвета 0,5–2 Гц; интенсивность света составляла около 300 люкс у стенок аквариума), воздействие постоянным ярким светом (1500 люкс, создаваемым двумя лампами накаливания мощностью 60 Вт, расположенными на высоте 2 см над поверхностью воды), воздействие электрического тока (0,1 В/см), механическое встряхивание (30 с, 10 рыб в пробирке объемом 50 мл при 1000 об/мин), воздействие феромона тревоги (0,5 мл/Л), социальная изоляция (1 рыба в пластиковом стакане объемом 90 мл), а также лишение пищи и содержание в темноте.

Контрольные животные содержались в тех же условиях, что и экспериментальная группа, но не подвергались стрессовым воздействиям на протяжении всего периода исследования. Полный график применения стрессоров в протоколе ХНС12 представлен в таблице 2.2.

Протокол ХНС12 допускал незначительные изменения в последовательности предъявления стрессоров между первой и третьей экспериментальными сериями, при этом общий набор стрессоров и частота их применения оставались строго неизменными. Протокол ХНС2 (таблица 2.3) отличался повышенной интенсивностью и был адаптирован для ускоренного формирования аффективного фенотипа, для быстрой оценки эффективности противовоспалительных препаратов.

Таблица 2.2 – Протокол ХНС12, используемый в первой и третьей экспериментальных сериях исследования

День 1 – Скученность (10 рыб/л) в течение 6 ч
День 2 – Яркий свет + новые объекты в домашнем аквариуме в течение 6 часов
День 3 – Прерывистый мигающий свет (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 6 ч
День 4 – Скученность + стресс новизной в красных восьмилитровых аквариумах (10 рыб/Л) в течение 6 ч
День 5 – Добавление в домашний аквариум 30% воды, содержащей химические сигналы хищника, на 6 ч
День 6 – Преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 минут
День 7 – Голод в течение 24 ч + 3 сессии 1-минутной экспозиции на воздухе
День 8 – Яркий свет + новые объекты в домашнем аквариуме в течение 6 ч
День 9 – Скученность в течение 6 ч
День 10 – Социальная изоляция в течение 24 ч
День 11 – Добавление в домашний аквариум 30% воды, содержащей химические сигналы хищника + новые объекты в течение 8 ч
День 12 – Голод в течение 24 ч
День 13 – 3 сессии преследования сачком в течение 20 минут с 30-минутным перерывом
День 14 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 8 ч
День 15 – Скученность (10 рыб/л) в сочетании со стрессом новизной в зеленых восьмилитровых аквариумах в течение 8 ч
День 16 – Яркий свет + новые объекты в домашнем аквариуме в течение 6 ч
День 17 – Добавление в домашний аквариум 30% воды, содержащей химические сигналы хищника на 8 ч
День 18 – Голод в течение 24 ч
День 19 – Преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 минут
День 20 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 8 ч
День 21 – 3 сессии 1-минутного удара электрическим током
День 22 – Социальная изоляция в течение 8 ч
День 23 – Скученность (10 рыб/л) + контакт с рыбами других линий (зеленые и розовые GloFish) в течение 8 ч
День 24 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 8 ч
День 25 – Темнота в домашнем аквариуме в течение 24 ч
День 26 – Механическое встряхивание (10 рыб в 50-мл пробирке при 1000 об/мин) в течение 30 с
День 27 – Яркий свет в течение 24 ч
День 28 – Стресс скученности + стресс новизной в желтых восьмилитровых аквариумах (10 рыб/Л) в течение 8 ч
День 29 – Мелководье (60% от нормального уровня воды в домашнем аквариуме) + 40% воды, содержащей химические сигналы хищника, в течение 8 ч
День 30 – Социальная изоляция в течение 24 ч
День 31 – Воздействие холодной воды (10°C) в течение 1 минуты
День 32 – Темнота в домашнем аквариуме в течение 24 ч
День 33 – Преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 минут

Продолжение таблицы 2.2

День 34 – 3 сессии 1-минутного удара электрическим током
День 35-36 – Яркий свет + 30% воды, содержащей химические сигналы хищника, в течение 48 ч
День 37 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 24 ч
День 38 – Мелководье + контакт с рыбами других линий в течение 12 ч
День 39 – 3 сессии преследования сачком продолжительностью 10 мин с 30-минутным перерывом
День 40 – Голод в течение 24 ч + 3 сессии 1-минутной экспозиции на воздухе
День 41 – 3 сессии воздействия высокой температурой воды (35 °С) продолжительностью 1 мин с 30-минутным перерывом
День 42 – Механическое встряхивание в течение 30 с + стресс новизной в зеленых восьмилитровых аквариумах в течение 8 ч
День 43 – Мелководье + стресс новизной в оранжевых восьмилитровых аквариумах в течение 8 ч
День 44 – Социальная изоляция в течение 24 ч
День 45 – Стресс новизной в голубых восьмилитровых аквариумах + новые объекты + воздействие ярким светом в течение 8 ч
День 46 – 3 сессии 2-минутного удара электрическим током + воздействие холодной воды (10°С) в течение 1 минуты
День 47-48 – Голод+ воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 48 ч
День 49 – 3 сессии 1-минутного воздействия высокой температуры в воде (35 °С) с 30 – минутным перерывом + мелководье в течение 8 ч
День 50 – Содержание в темноте + 30% воды, содержащей химические сигналы хищника, в течение 24 ч
День 51 – Преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 минут + 3 сессии 1-минутной экспозиции на воздухе
День 52 – Яркий свет в течение 24 ч
День 53 – Механическое встряхивание в течение 1 мин
День 54 – 55 Социальная изоляция в течение 48 ч
День 56 – 3 сессии 1-минутного воздействия высокой температуры в воде (35 °С) с 30-минутным перерывом + 3 сессии 2-минутного удара электрическим током
День 57 – Воздействие холодной воды (10°С) в течение 1 минуты + 3 сессии 1-минутной экспозиции на воздухе
День 58 – Скученность в 3 аквариумах со сменой цвета емкости каждые 3 ч в течение 9 ч
День 59 – 3 сессии преследования сачком продолжительностью 20 мин с 30-минутным перерывом + вода, содержащая химические сигналы хищника, в течение 24 ч
День 60-61 – Голод + воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) в течение 48 ч
День 62 – 3 сессии механического встряхивания продолжительностью 1 мин с 30-минутным перерывом
День 63 – Содержание в темноте в течение 24 ч
День 64 – 3 сессии воздействия холодной воды (10°С) в течение 2 минут с 30-минутным перерывом
День 65 – Яркий свет + вода, содержащая химические сигналы хищника, + новые объекты в течение 24 ч
День 66 – Стресс новизной в оранжевом аквариуме + мелководье в течение 24 ч

Продолжение таблицы 2.2

День 67 – 5 сессий 1-минутной экспозиции на воздухе + преследование сачком в течение 30 минут День 68-69 – Социальная изоляция + голод в течение 48 ч День 70 – Яркий свет в течение 24 ч День 71 – Скученность в 3 аквариумах + новый объект в течение 9 ч День 72 – 3 сессии механического встряхивания продолжительностью 1 мин с 30-минутным перерывом День 73 – 3 сессии преследования сачком продолжительностью 10 мин с 30-минутным перерывом + 3 сессии воздействия холодной водой (10 °C) продолжительностью 1 мин с 30-минутным перерывом День 74-75 – Голод + воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) в течение 48 ч День 76 – Стресс новизной в голубых аквариумах + мелководье + контакт с рыбами других линий в течение 24 ч День 77 – 5 сессий 1-минутной экспозиции на воздухе + вода, содержащая химические сигналы хищника, в течение 24 ч День 78 – Стресс новизной в красных аквариумах в течение 24 часов + 3 сессии воздействия высокой температуры в воде (35 °C) продолжительностью 1 мин День 79 – Преследование сачком в течение 30 минут + 3 сессии механического встряхивания продолжительностью 1 мин День 80 – 5 сессий 1-минутной экспозиции на воздухе + 3 сессии 2-минутного удара электрическим током День 81 – 3 сессии 1-минутного воздействия высокой температуры в воде (35 °C) + 3 сессии воздействия холодной воды (10°C) в течение 1 мин День 82-83 – Голод + содержание в темноте в течение 48 ч День 84 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) в течение 24 ч + 3 сессии механического встряхивания продолжительностью 1 мин

Таблица 2.3 – Протокол ХНС2, используемый во второй экспериментальной серии исследования

День 1 – Яркий свет в течение 8 ч + воздействие низкой температурой (10 °С) в течение 24 ч + однократное добавление феромона тревоги (5 мл экстракта, полученного от интактных рыб-доноров).
День 2 – Мелководье (30 % от нормального уровня воды) в течение 24 ч + механическое встряхивание (10 рыб в 50-мл пробирке при 1000 об/мин) в течение 30 с.
День 3 – Преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 мин + 3 сессии удара током продолжительностью 1 мин + голод в течение 24 ч.
День 4 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) в течение 8 ч + мелководье в течение 24 ч.
День 5 – Социальная изоляция в течение 24 ч + голод в течение 24 ч.
День 6 – Воздействие холодной водой (10 °С) + 3 сессии 1-минутной экспозиции на воздухе + механическое встряхивание в течение 30 с.
День 7 – Контакт с рыбами других линий (GloFish) в течение 8 ч + мелководье в течение 24 ч + 3 сессии удара током продолжительностью 1 мин
День 8 – Воздействие высокой температурой воды (32 °С) в течение 8 ч + преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 мин
День 9 – Скученность (10 рыб/л) в сочетании со стрессом новизной в течение 8 ч + 3 сессии электростимуляции продолжительностью 1 мин.
День 10 – Социальная изоляция в течение 24 ч + голод в течение 24 ч.
День 11 – Воздействие холодной водой (10 °С) + механическое встряхивание в течение 30 с + добавление феромона тревоги в домашний аквариум
День 12 – Яркий свет в течение 8 ч + воздействие высокой температурой воды (32 °С) в течение 8 ч
День 13 – Воздействие прерывистым мигающим светом (стробоскопический режим) вокруг домашнего аквариума в течение 24 ч + преследование сачком в домашнем аквариуме в течение 20 мин
День 14 – Воздействие повышенной температурой воды (28 °С) в течение 8 ч + 3 сессии удара током продолжительностью 1 мин + 3 сессии 1-минутной экспозиции на воздухе

2.4 Введение препаратов

Введение фармакологических веществ осуществляли иммерсионным способом (через воду), что является стандартным подходом для рыб *Danio rerio* и обеспечивает стабильное поступление действующих веществ через жабры. В качестве растворителя для препаратов использовали диметилсульфоксид (ДМСО, ООО «ПанЭко», Москва, Россия). Рабочую концентрацию ДМСО в аквариумной воде поддерживали на уровне 0,02% (об/об). Данная концентрация была выбрана, поскольку она обеспечивает адекватную растворимость действующих веществ, оставаясь при этом поведенчески инертной и не влияющей на базовые показатели физиологии *Danio rerio* [287]. Для поддержания стабильной концентрации

препаратов проводилась ежедневная полная замена воды. В дни, когда протокол ХНС предполагал перенос животных в другие емкости (например, для механического встряхивания), стрессорное воздействие проводилось либо непосредственно в среде, содержащей препарат, либо животные немедленно возвращались в исходную экспозиционную среду, что обеспечивало непрерывность фармакологического воздействия. Контрольные группы животных получали воду с аналогичным содержанием ДМСО без добавления препарата.

В экспериментальной серии 2 (Эксперимент 2) оценивали влияние концентраций миноциклина (ООО «АВВА РУС», г. Киров, Россия) на интактных животных в течение 1 недели (25, 50 и 100 мг/л). Данные концентрации для были выбраны на основании литературных данных, полученных в основном на грызунах, поэтому потребовали дополнительной проверки [288, 289]. При этом оценивалась безопасность и эффективность препарата, на основании которых для были выбраны две концентрации для дальнейшей проверки эффектов препарата в модели ХНС2 (25 и 50 мг/л). Критериями безопасности препарата считался комплекс показателей, а именно выживаемость группы в течение периода экспозиции, отсутствие признаков токсичности (потеря равновесия, хаотичное или судорожное плавание, гипервентиляция жабр) и сохранение нормального пищевого поведения. Эффективность действия препарата оценивалась по количеству изменённых параметров (или количеству параметров, возвращенных к уровню контроля в моделях ХНС) и по интенсивности выраженных изменений. В модели ХНС2 было протестировано два варианта продолжительности воздействия препаратов: 1 неделя (начиная с 8-го дня ХНС2) и 2 недели (на протяжении всего протокола) (см. таблицу 2.1).

В экспериментальной серии 2 (Эксперимент 5) оценивали эффекты нимесулида (ООО «АВВА РУС», г. Киров, Россия) в концентрациях 1 и 5 мг/л в отсутствие стресса в течение 1 недели. Данные концентрации также были выбраны на основании литературных данных [290, 291]. В последующих экспериментах на модели ХНС2 оценивали концентрации 2,5 и 5 мг/л. Сокращение концентрации до 2,5 мг/л обусловлено высокой токсичностью концентрации 5 мг/л в модели ХНС2.

Так же, как в случае с миноциклином, было проанализировано два варианта продолжительности воздействия препарата: начиная с 8-го дня действия стресса и на протяжении всех 2 недель стресса в модели ХНС2 (см. таблицу 2.1).

Для экспериментальной серии 3 были выбраны следующие рабочие концентрации и сроки воздействия: миноциклин в концентрации 25 мг/л (воздействие в течение 1 недели) и нимесулид в концентрации 2,5 мг/л (воздействие в течение 1 недели). Также в качестве препарата сравнения использовался флуоксетин (СИОЗС) в концентрации 0,1 мг/л в течение 1 недели. Концентрация и продолжительность воздействия флуоксетина были выбраны на основании литературных данных, посвященных оценке эффектов данного препарата в моделях ХНС у *Danio rerio* [27, 292].

2.5 Поведенческие тесты

Поведенческий анализ проводился в период с 10:00 до 18:00. Сначала проводили тест нового аквариума, после чего с интервалом не менее 60 минут, тест иммобилизации хвоста. Интервал между окончанием стрессового воздействия и началом поведенческого тестирования составлял не менее 14 часов. Тестирование групп проводилось в одинаковой последовательности, начиная с контрольной. Все тесты выполняли в том же помещении, где содержались животные, что позволяло минимизировать дополнительный стресс от транспортировки. Температура воды в установках для поведенческих тестов поддерживалась на уровне 27 ± 0,5 °C, pH 7,4, освещенность составляла 950–960 люкс.

2.5.1. *Тест нового аквариума*

Тест нового аквариума (ТНА) проводился в акриловом прямоугольном резервуаре (высота 20 × длина 20 × ширина 5 см), заполненном водой на высоту 19 см и условно разделенном на две равные горизонтальные зоны (верхнюю и нижнюю) (Рисунок 2.4). Животное помещали в установку и в течение 5 минут вели видеозапись поведения с помощью камеры SJ4000 (SJCAM, Гонконг, Китай), фиксируя общее пройденное расстояние (см), скорость (см/с), количество входов в

верхнюю часть, время, проведенное в верхней части (с), латентный период выхода в верхнюю часть (с) установки, количество и продолжительность периодов замирания (с) (состояние неподвижности), продолжительность периодов высокой подвижности (с). Вход в верхнюю зону установки фиксировался в момент пересечения границы зон центром тела животного. Эпизод замирания (состояния неподвижности) определялся как период, в течение которого скорость перемещения не превышала 1,75 см/с. Под высокой подвижностью (с) в данном случае понималась продолжительность периодов подвижности более 60 %, где подвижность - это процент изменений в области регистрируемого животного по сравнению с предыдущей временной точкой. Анализ поведенческого тестирования выполняли с использованием программного обеспечения Noldus EthoVision XT17.5 (Noldus IT, Вагенинген, Нидерланды).

2.5.2. *Тест иммобилизации хвоста*

Для теста "иммобилизация хвоста *Danio rerio*" (ТИХ) каудальная половина тела рыбы (на уровне начала основания спинного плавника) фиксировалась во влажной вискозной губке (длина 8 х 4 высота х 5 ширина, см), имеющей посередине разрез глубиной 2 см. Губка крепилась к верхней части стакана с помощью двух дополнительных надрезов по бокам. Ростральную часть тела оставляли свободно подвешенной в вертикальном положении в небольшом прозрачном стакане размером 7 × 5,5-4,8 см (Рисунок 2.4). Животные помещались в установку на 5 минут, в течение которых велась видеозапись поведения. При этом оценивалась активность и латентный период первого эпизода движения (с). Активность рассчитывали, как среднее количество пикселей, измененных между каждой парой последовательных видеокадров, по отношению к размеру пикселей всей арены установки и выражали как средний процент (%) измененных пикселей за испытание. Анализ поведенческого тестирования выполняли с использованием программного обеспечения Noldus EthoVision XT17.5 (Noldus IT, Вагенинген, Нидерланды).

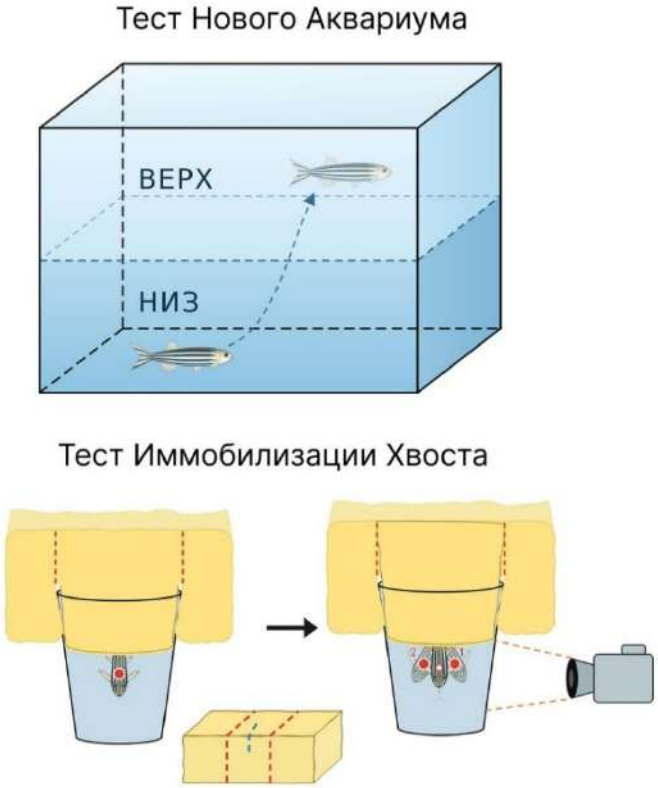


Рисунок 2.4 – Схема поведенческих установок, используемых в настоящем исследовании

2.6 Анализ уровня моноаминов

Уровень моноаминов в мозге взрослых *Danio rerio* был проанализирован с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В исследовании оценивался уровень норадреналина, серотонина, дофамина, а также их метаболитов, в частности 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК).

Ткани мозга взвешивали и гомогенизировали в ледяном 0,1 М растворе перхлорной кислоты (Sigma-Aldrich, США) из расчета 10 мкл на 1 мг массы ткани, с добавлением внутреннего стандарта 3,4-дигидроксибензиламина (ДГБА) в конечной концентрации 100 нг/мл. Гомогенизацию проводили ультразвуком в течение 10 с (ультразвуковой гомогенизатор Qsonica, США). Полученный

гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 14 000 об/мин и 4 °C, после чего супернатант фильтровали через центрифужные фильтры Durapore-PVDF с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США).

Хроматографический анализ проводили на системе HTEC-500 (Eicom, Япония) с колонкой CA-5ODS и электрохимическим детектором с угольным рабочим электродом WE-3G при приложенном потенциале +650 мВ. Подвижная фаза содержала 0,1 М фосфатный буфер, 400 мг/л октансульфоната натрия, 50 мг/л этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 17% метанола; значение pH (4,5) корректировали фосфорной кислотой. Все реагенты для приготовления подвижной фазы были приобретены у Sigma-Aldrich.

Рассчитанные концентрации моноаминов и их метаболитов нормировали с учетом индивидуальных концентраций внутреннего стандарта (ДГБА). В первой экспериментальной серии результаты представлены в абсолютных значениях (пг/мг массы ткани мозга). В третьей экспериментальной серии, в связи с заменой хроматографической колонки и электрохимического электрода между временными точками, прямое сравнение абсолютных значений между собой было бы некорректным. Поэтому в данной серии все данные были нормированы на значения соответствующей контрольной группы и представлены в виде процентов (%) от контроля. Дополнительно рассчитывали соотношения концентраций 5-ГИУК/серотонин и ДОФУК/дофамин, отражающие интенсивность метаболизма соответствующих моноаминов в мозге.

2.7 Анализ уровня кортизола в теле рыбы

Экстракцию кортизола из тканей тела *Danio rerio* проводили согласно протоколу, ранее описанному в [293]. Кратко, тела гомогенизировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера с использованием ультразвукового гомогенизатора. Гомогенат каждого образца переносили в стеклянную пробирку объемом 10 мл, после чего кортизол экстрагировали трехкратно диэтиловым эфиром (по 5 мл). Уровень кортизола в организме измеряли с использованием коммерческого набора

для иммуноферментного анализа (ИФА) кортизола (кат. № K210, Chema, Москва, Россия). Выбор данного набора был основан на ранее подтвержденной валидности использования человеческих тест-систем для определения кортизола у *Danio rerio* [294]. Анализ проводили в строгом соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США). Концентрацию кортизола определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартов из набора. Полученные значения нормализовали с учетом массы исследуемого образца и представляли в виде абсолютной концентрации кортизола (нг/г массы тела), согласно [294].

2.8 Анализ уровня экспрессии генов

2.8.1. *Выделение тотальной РНК*

Выделение тотальной РНК из образцов головного мозга *Danio rerio* проводили с использованием реагента «ExtractRNA» (Евроген, Россия). К образцам цельного мозга добавляли 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), после чего проводили кратковременную ультразвуковую гомогенизацию при охлаждении на льду. К полученному гомогенату добавляли 500 мкл реагента «ExtractRNA» и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Для разделения фаз образцы центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g. Затем добавляли 0,2 мл хлороформа, встряхивали вручную в течение 15 с и центрифугировали 10 мин при 12 000 g и 4 °C. После этого к отобранному супернатанту добавляли 0,5 мл хлороформа, встряхивали в течение 15 с и повторно центрифугировали при тех же параметрах. К полученному супернатанту добавляли 0,25 мл изопропанола, перемешивали и центрифугировали для осаждения РНК (10 мин, 12 000 g, 4 °C). Супернатант удаляли, а к осадку добавляли 0,5 мл 80% этанола. После ресуспендирования проводили центрифугирование в течение 5 мин при максимальной скорости. Супернатант удаляли, а осадок с РНК подсушивали в течение 3–5 мин при комнатной температуре и растворяли в 10 мкл воды,

свободной от РНКаз. Концентрацию РНК определяли при длине волны 260 нм на спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo Scientific, США). Для удаления примесей геномной ДНК препараты РНК обрабатывали ДНКазой I (New England Biolabs, США) согласно протоколу производителя.

2.8.2. Проведение обратной транскрипции

Подготовку реакционных смесей проводили на льду. В индивидуальные пробирки объемом 0,2 мл добавляли 2 мкл праймеров из набора, 2500 нг тотальной РНК и деионизованную воду, свободную от нуклеаз, доводя общий объем до 11 мкл. Смесь прогревали при 70 °С в течение 2 мин с использованием твердотельного термостата «Термит», после чего пробирки помещали на лед. Далее в пробирки добавляли 9 мкл заранее приготовленной смеси, состоящей из 4 мкл буфера для реакции, 2 мкл DTT, 2 мкл dNTP и 1 мкл MMLV-ревертазы. Далее смесь в пробирках аккуратно перемешивали пипетированием, инкубировали 60 мин при 37 °С, затем 10 мин при 70 °С, после чего пробирки помещали на лед.

2.8.3. Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-анализ проводили с использованием реактивов qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в амплификаторе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Термофишер, США) согласно инструкциям производителя. На 1 реакцию использовали 50 нг кДНК, подготовку реакционных смесей проводили на льду. Протокол амплификации включал: первичную инкубацию при 95 °С в течение 5 мин для активации ДНК-полимеразы Taq, затем 40 циклов: денатурация при 95 °С в течение 30 с, отжиг при 62 °С в течение 20 с, элонгация при 72 °С в течение 1 мин. После завершения амплификации проводили анализ кривой плавления для верификации специфичности продукта. В качестве отрицательного контроля при проведении ПЦР использовали реакционные смеси без матрицы (NTC).

Количественный анализ экспрессии генов проводили методом 2^(−ΔΔCt). Уровень экспрессии каждого гена нормировали на средние геометрические значения референсных генов, после чего результаты представляли в процентах

относительно контрольной группы. При этом каждое отдельное значение контрольной группы также нормировали на среднее по контролю. В качестве референсных генов использовали β-актин (*actb*) и рибосомальный белок L13 (*rpl13*). Выбор данных генов основывался на литературных сведениях о стабильности экспрессии данных генов в различных тканях, включая головной мозг, согласно которым *actb* и *rpl13* характеризовались относительно высокой стабильностью экспрессии [295]. Также стабильность выбранных референсных генов при воздействии миноциклина показана в исследованиях на грызунах, а в случае флуоксетина подтверждена на *Danio reri*o [296, 297]. Дополнительно в настоящем исследовании оценивали относительную стабильность экспрессии выбранных референсных генов путем анализа разности пороговых циклов (ΔCt) между ними. При сравнении контрольных и экспериментальных групп в пределах 5- и 12-недельных серий хронического непредсказуемого стресса статистически значимых межгрупповых различий исследованных показателей выявлено не было. Эффективность амплификации всех используемых пар праймеров находилась в диапазоне от 95 до 105%. Все реакции проводили в трёх технических повторностях. Технические повторности с отклонением значения Ct более чем на 0,5 цикла от среднего значения исключали из дальнейшего анализа.

Всего в работе была исследована экспрессия 18 целевых генов. В первой серии для оценки воспалительной активности в качестве целевых генов были выбраны маркеры провоспалительного фенотипа микроглии М1 (индуцированная NO-синтаза *nos2a*, циклооксигеназа *cox-2*, провоспалительный интерлейкин *il-1β)* маркеры противовоспалительного фенотипа микроглии М2 (аргиназа *arg1*, маннозный рецептор *cd206*), маркеры провоспалительного фенотипа астроглии А1 (белок системы комплемента *c3*, гуанилат-связывающий белок *gbp2*), маркеры противовоспалительного фенотипа астроглии А2 (кальций-связывающий белок А10 *s100a10*, пентраксин *ptx3*), а также рецептор нейротрофинов *p75 p75ntr u il-6*. Функции белков, кодируемых данными генами, эволюционно консервативны, а их роль в нейровоспалительных процессах подтверждена как у *Danio rerio*, так и у млекопитающих, что обосновывает их использование в качестве валидных

маркеров нейровоспаления. Также в работе оценивались глюкокортикоидный рецептор *gr*, эпигенетические модификаторы (ДНК-метилтрансферазы *dnmt3a/b*, гистонацетилтрансфераза *hat1*, гистондеацетилаза *hdac4*) и кросс-таксонные маркеры депрессии (кадгерин Е *cdh1*, глутаматный рецептор *gria1*) [221, 224, 226-228, 298, 299]. Во второй и третьей экспериментальных сериях список целевых генов был скорректирован, согласно результатам, первой экспериментальной серии. Полный список исследуемых генов и праймеров представлен в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Список праймеров используемых в исследовании

Гены	Прямая последовательность	Обратная последовательность
M1 микроглия		
nos2a	TCAGGTACGGTGTCTTTGGC	CTCTTCCTGATCCGCCACTG
cox2	TTCTTCCAGCATTTCTCTCAC	TTTGTGTTGAACCTCCAGCGTCTC
il1β	TTCCCCAAGTGCTGCTTATT	AAGTTAAAACCGCTGTGGTCA
M2 микроглия		
arg1	TCCGTTCTCCAAAGGACAGC	GACTCGTCGTTGGGAAGGTT
cd206	CGACACAGATGGCAGATGGAAGAC	ACGCTTCTTTGACTCAGGACAGTTC
A1 астроглия		
c3	TGATTCTGGCTCGCAGTGATGATG	CATGGCTGAGGCTGGACAGTTATC
gbp2	GGTCCTGGAGGCCAAACTCA	AGCCCGGCAAAAACAACGTG
A2 астроглия		
s100a10	CCTGCTGCCGTAGACAAGAT	TGGTAGAGTTGTTCGCAGGC
ptx3	AGCATCCGGGAACAGCTGAG	AAGCAATCCATGGGGCGAGA
Другие провоспалительные маркеры		
p75NTR	TCTGTCAAGATTTCGATGCTCCT	GCTCTCCGTAGGATTGTCCG
il6	TCAACTTCTCCAGCGTGATG	TCTTTCCCTCTTTTCCTCCTG
Глюкокортикоидный рецептор		
gr	ACAGCTTCTTCCAGCCTCAG	CCGGTGTTCTCCTGTTTGAT

Продолжение таблицы 2.4

Гены	Прямая последовательность	Обратная последовательность
Эпигенетические ферменты		
dnmt3a	GGTTGTGCTCAGGCGGCTATTAG	AGGTCCAGTCATCTCTGCGTCTC
dnmt3b	ACCATTCCAGCAGCAGCAACAG	ACCTCGGCCATCCTCGTATTCTG
hat1	TTGACTGCGTTGAGCCAGATGATG	AGATCCTCTCCTGCCTCCACATTG
hdac4	CATCGCCCTCCCTTCCAAACATC	GCACTGCCATCCTGTCACCATC
Референсные гены		
actb	CATCAGGGTGTCATGGTTGGT	TCTCTTGCTCTGAGCCTCATCA
rpl13	AGTAGTCAGGTGTCCGACCA	GTGCGGTATTCCTTCAGCCT

2.9 Анализ уровня проницаемости ГЭБ

Для оценки проницаемости ГЭБ отдельной подгруппе животных из той же исходной когорты внутрибрюшинно вводили 1% раствор Эванса синего (Sigma-Aldrich) в объеме 10 мкл на 100 мг массы тела. Через 20 минут после инъекции рыб эвтаназировали в ледяной воде и декапитировали. На льду проводили диссекцию с выделением головного мозга, который далее фиксировали в 10% забуференном формалине (Биовитрум, Москва, Россия) в течение 24 ч. Для анализа был выбран теленцефалон, поскольку эта зона является одной из наиболее чувствительных к стрессу областей мозга у *Danio rerio*, функционально гомологичной гиппокампу и префронтальной коре млекопитающих, которые, в свою очередь, чувствительны к стрессу у грызунов [29, 159, 160].

Образцы последовательно переносили в 15% раствор сахарозы на 4 ч, затем в 30% раствор сахарозы на 4 ч, после чего помещали в среду Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek USA, Torrance, США) для приготовления криостатных срезов и замораживали при температуре -80 °C. Далее из образцов получали горизонтальные гистологические срезы толщиной 10 мкм с использованием криостата Leica CM1520 (Leica Biosystems, Deer Park, США). На глубине 200–950 мкм от дорсальной поверхности головного мозга забирали каждый третий срез, и далее для анализа отбирали 2-3 среза, не содержащих артефактов. Данные

полученные для отдельного среза при статистическом анализе усредняли для каждого животного. Визуализацию препаратов мозга проводили с помощью системы Celena X (Logos Biosystems, Кёнгидо, Южная Корея) с использованием фильтра Cy5/lp и объектива с увеличением 10X. Для обеспечения сопоставимости данных все изображения получали при строго одинаковых параметрах съемки, а именно фиксированном времени экспозиции 300 мс, интенсивности освещения 500 и усилении сигнала 18 дБ. Анализ изображений выполняли в программном обеспечении Fiji ImageJ [300]. Процент площади флуоресценции красителя на каждом срезе оценивали с применением метода пороговой сегментации IsoData, как описано в работах [301, 302].

2.10 Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Нормальность распределения данных оценивали с помощью теста Шапиро-Уилка. Выбросы выявляли и удаляли с использованием метода ROUT (Robust regression and Outlier removal), встроенного в GraphPad Prism. Количество удалённых выбросов составило 0-2 на группу.

Для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический критерий Манна-Уитни, для сравнения трёх и более групп - критерий Краскела-Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна для попарных сравнений. Для анализа взаимодействия двух факторов (группа и длительность стресса) использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA), далее применяли апостериорный тест Сидака. Выбор дисперсионного анализа был обусловлен его устойчивостью к умеренным нарушениям нормальности распределения и однородности дисперсий при достаточном размере выборки.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты сравнений при непараметрическом анализе представляли в виде медианы и межквартильного размаха, а результаты многофакторного дисперсионного анализа - в виде среднего значения и стандартного отклонения.

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ХРОНИЧЕСКОГО НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО СТРЕССА

3.1 Результаты

В Таблицах А.1-А.5 (приложение А) приведены статистически значимые эффекты, наблюдаемые в данном исследовании. В настоящей главе оценивали временную динамику поведенческих, нейрохимических и молекулярно-генетических изменений при формировании аффективной патологии, вызванной 5-недельным (ХНС5) и 12-недельным (ХНС12) хроническим непредсказуемым стрессом у взрослых *Danio rerio*. В эксперименте использовали 150 животных, случайным образом распределённых на группы «контроль» (К) и «стресс» (С). В качестве ранней контрольной точки использовали 1-недельное воздействие (ХНС1). Результаты поведенческого анализа проиллюстрированы на рисунке 3.1, экспрессии генов - на рисунках 3.2–3.3, уровня моноаминов и кортизола на рисунке 3.2 и 3.4, проницаемости ГЭБ – на рисунке 3.5.

Поведенческий анализ показал, что в тесте нового аквариума (ТНА) в ХНС1 статистически значимых различий между группами не выявлено. У стрессированных животных, в точках ХНС5 и ХНС12, наблюдалось достоверное снижение времени, проведенного в верхней зоне аквариума, по сравнению с группой ХНС1. У животных группы их группы стресс в точке ХНС12 отмечалось снижение количества переходов по сравнению с группой стресса в ХНС1 и увеличение латентного периода выхода в верхнюю зону установки по сравнению с группами стресса в ХНС1 и ХНС5. Сравнение контрольных и стрессированных животных выявило снижение частоты выхода в верхнюю зону установки и увеличение длительности замираний в ХНС5 и ХНС12, а также увеличение латентного периода в ХНС12. В тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) снижение активности по сравнению с контролем наблюдалось только в группе ХНС12, тогда как в группе ХНС5 достоверных различий не выявлено (Рисунок 3.1, Таблица А.1).

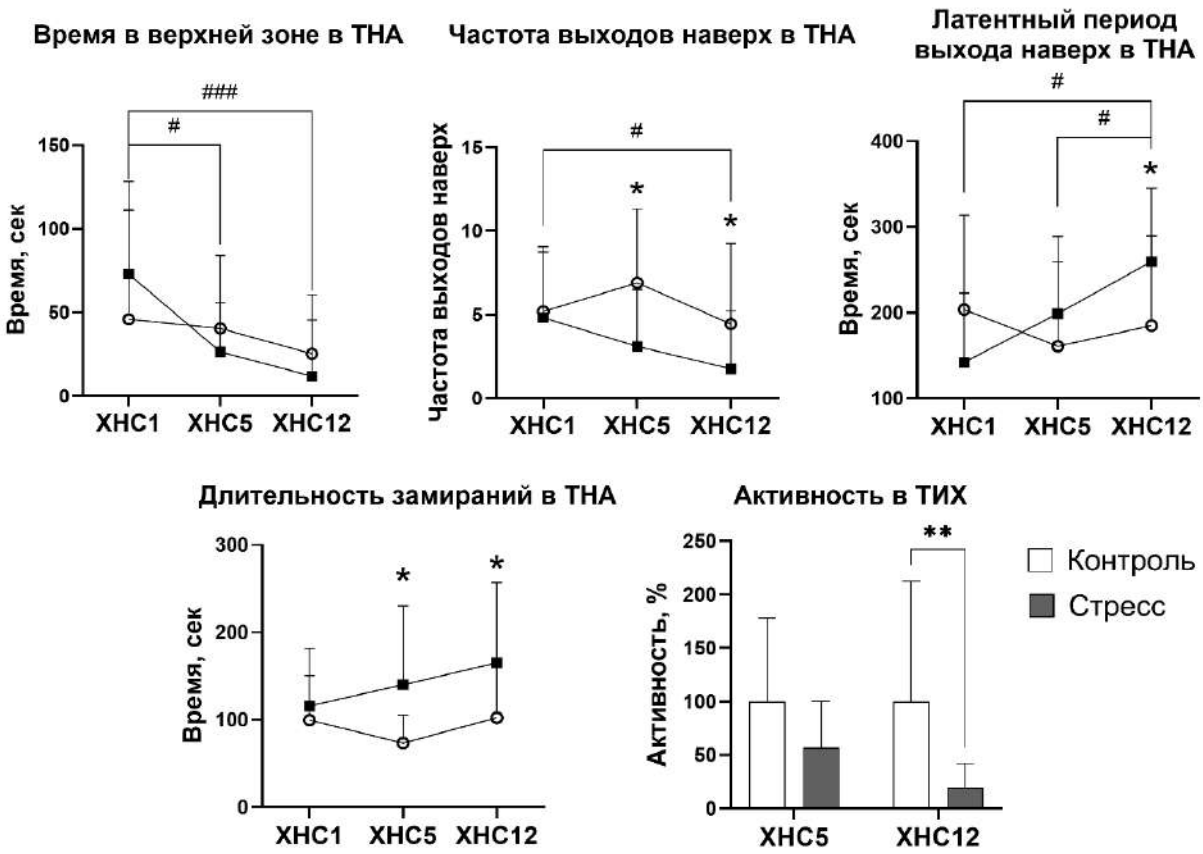


Рисунок 3.1 – Эффекты ХНС1, ХНС5, ХНС12 на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ). Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Стресс и Время) с апостериорным тестом Сидака. # - $p < 0.05$, ### - $p < 0.001$ (внутри группы «Стресс»), * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ (между группами «Контроль» и «Стресс»), (см. Таблицу А.1 с результатами статистического анализа). Данные активности представлены в процентном изменении от контроля. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (ХНС1 n=16, ХНС5 n=21, ХНС12 n=36)

Были выявлены значимые эффекты ХНС на уровень кортизола в тканях тела (Рисунок 3.2, Таблица А.2), который оставался неизменным после ХНС5 (но сопровождался повышенной экспрессией глюкокортикоидного рецептора в мозге) и снижался после ХНС12 (без изменения экспрессии глюкокортикоидного рецептора) по сравнению с контрольной группой.

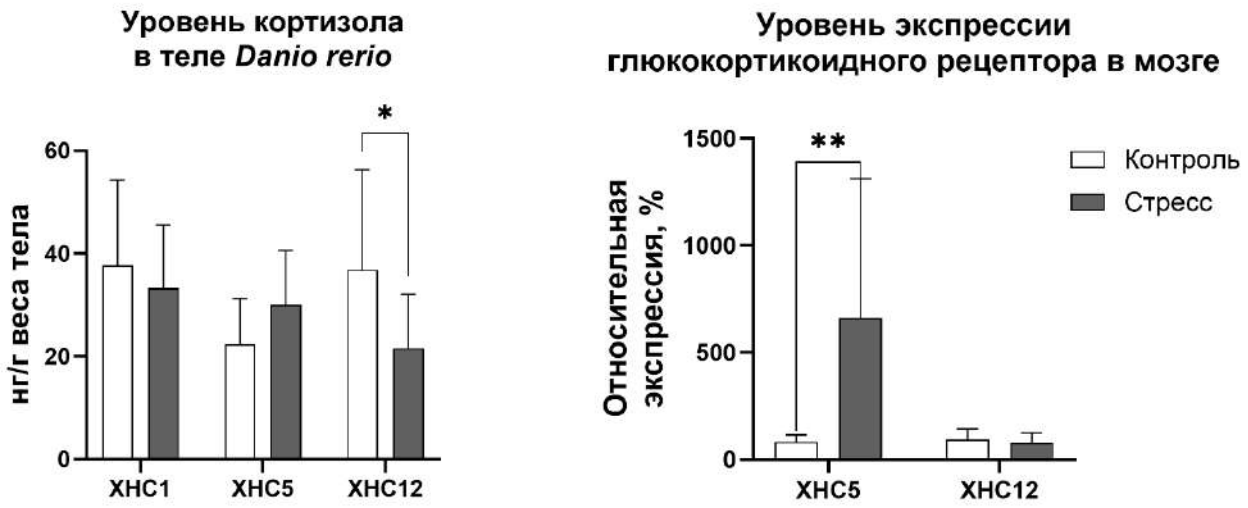


Рисунок 3.2 – Эффекты ХНС на уровень кортизола в теле и экспрессию ГР (*gr*) в мозге *Danio rerio*. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Стресс и Время) с апостериорным тестом Сидака, *p<0.05, **p<0.01 (см. Таблицы А.2 и А.3 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. (Для кортизола: ХНС1 n = 7, ХНС5 n = 10, ХНС12 n = 10 на группу) (Для уровня экспрессии ГР n = 7 на группу)

Уровень экспрессии двух провоспалительных маркеров *(nos2a* и *cox2*) и одного противовоспалительного маркера (*s100a10*) были повышены после ХНС5, в то время как после ХНС12 наблюдалось повышение уровня экспрессии противовоспалительных маркеров (*cd206*, *s100a10* и *ptx3*). Также наблюдается повышение уровня экспрессии гена *cdh1*, ассоциированного с депрессией, и гена эпигенетического фермента *hdac4* (Рисунок 3.3, Таблица А.3).

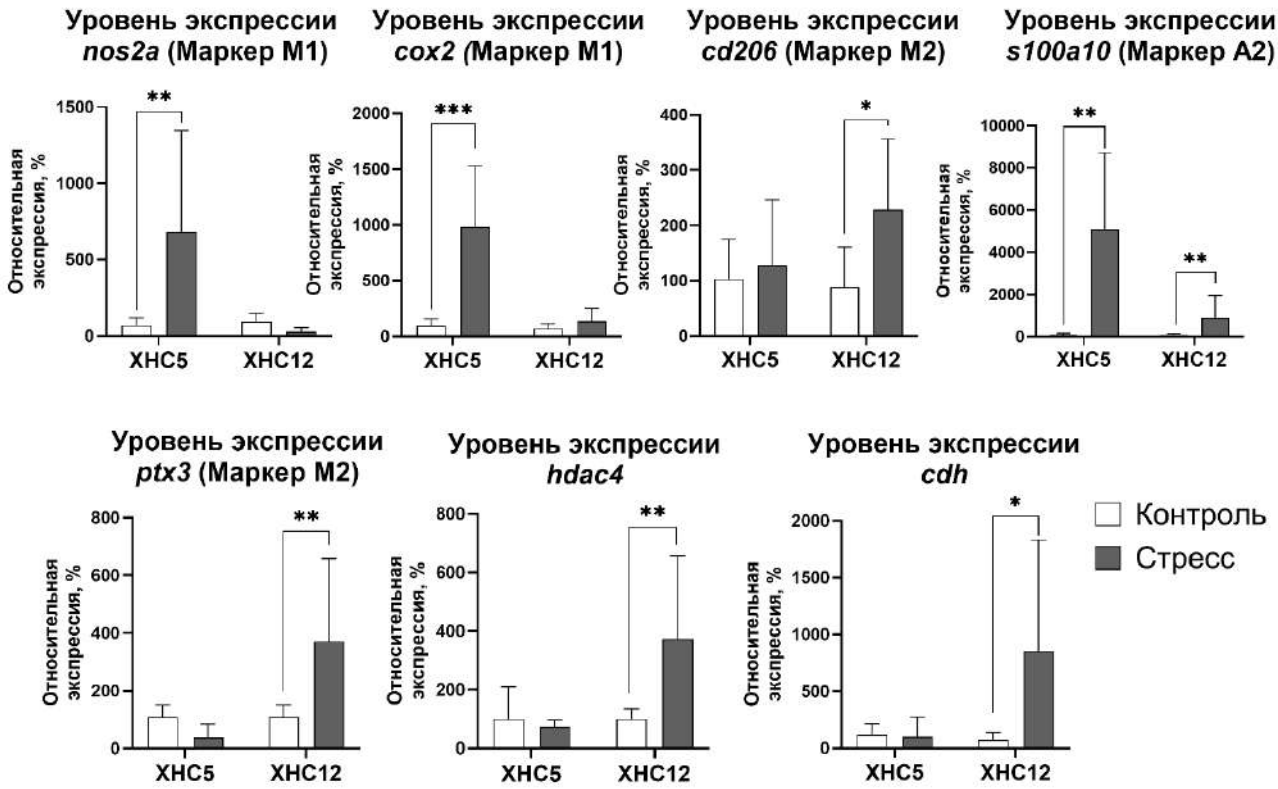


Рисунок 3.3 – Эффекты XHC5 и XHC12 на уровень экспрессии генов-биомаркеров нейровоспаления (*nos2a, cox2, cd206, s100a10, ptx3*), генов, ассоциированных с депрессивным состоянием (*cdh*) и генов ферментов эпигенетики (*hdac4*) в мозге *Danio rerio*. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Стресс и Время) с апостериорным тестом Сидака, U-критерий (для *s100a10*), *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 (см. Таблицу А.3 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5-7 на группу)

Вдобавок были отмечены статистически значимые эффекты XHC на уровень моноаминов в мозге *Danio rerio*. Так, XHC5 увеличил уровень норадреналина, а XHC12 снизил соотношение 5-ГИУК/серотонин по сравнению с контрольной группой, что указывает на снижение интенсивности метаболизма серотонина. Уровни дофамина и интенсивность его метаболизма оставались неизменными как при XHC5, так и при XHC12 (Рисунок 3.4, Таблица А.4).

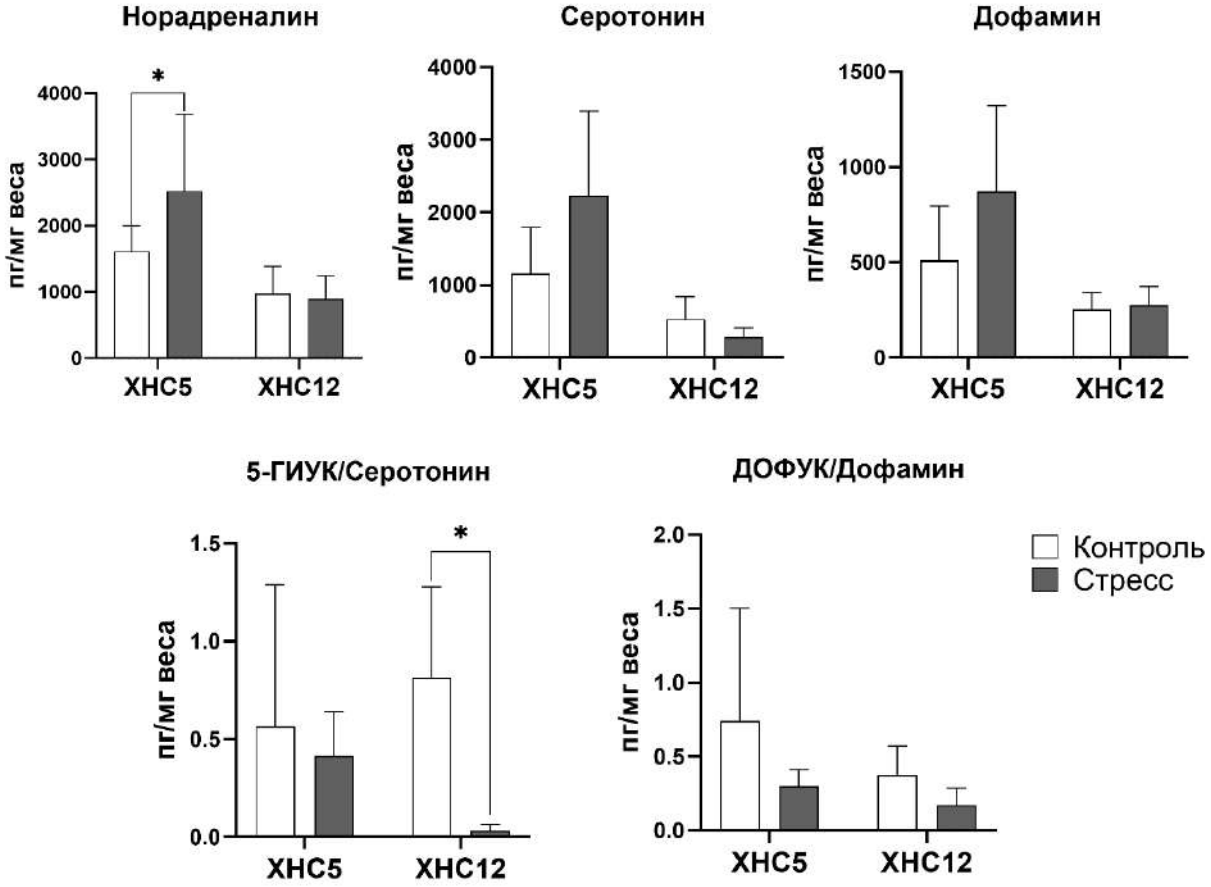


Рисунок 3.4 – Эффекты ХНС на уровень моноаминов и интенсивность их метаболизма в мозге *Danio rerio*. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Стресс и Время) с апостериорным тестом Сидака, *p<0.05 (см. Таблицу А.4 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5-7 на группу)

Также были зафиксированы изменения в проницаемости ГЭБ. Процент площади флуоресценции Эванса синего в теленцефалоне *Danio rerio* статистически значимо увеличен по сравнению с контролем при воздействии ХНС5, но не ХНС12 (Рисунок 3.5, Таблица А.5).

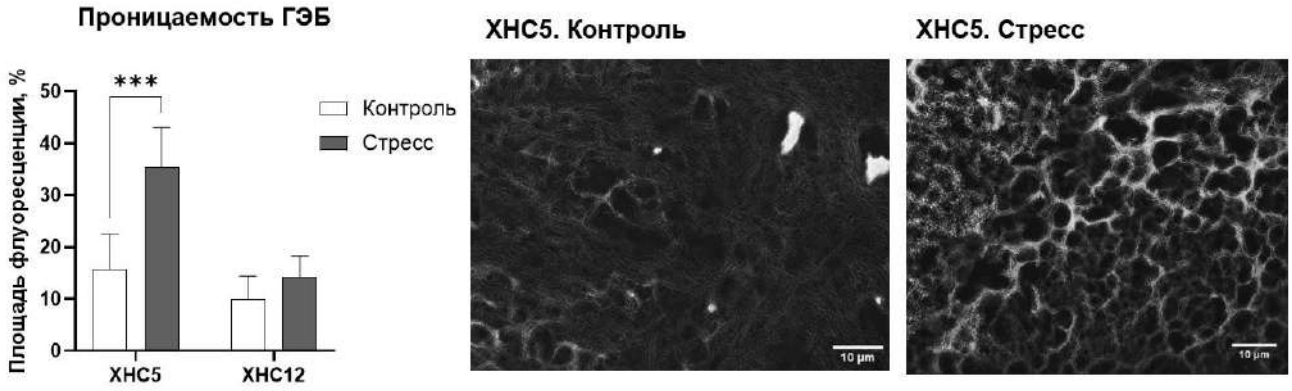


Рисунок 3.5 – Эффекты ХНС на проницаемость гематоэнцефалического барьера теленцефалона *Danio rerio.* Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Стресс и Время) с апостериорным тестом Сидака, ***p<0.001 (см. Таблицу А.5 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5 на группу)

3.2. Обсуждение

Новизна настоящего исследования заключается в изучении временной динамики поведенческих и нейрохимических и молекулярно–генетических изменений, ассоциированных с нейровоспалением, в зависимости от продолжительности хронического непредсказуемого стресса (ХНС) у взрослых особей *Danio rerio*. При анализе эффектов воздействия ХНС1 было показано, что в данной временной точке не наблюдается никаких поведенческих и физиологических изменений в ответ стресс, что согласуются с литературными сведениями о том, что для формирования устойчивых стресс-индуцированных фенотипов в животных моделях требуется, как правило, не менее 10–14 дней воздействия [245]. Молекулярные, нейрохимические и гистологические исследования в данной временной точке (1 неделя) не были проведены ввиду отсутствия статистически значимых различий при анализе поведения *Danio rerio*.

Тесты для оценки поведения *Danio rerio* являются валидными аналогами широко используемых тестов для оценки поведения грызунов, что обеспечивает трансляционную сопоставимость полученных данных. ТНА функционально соответствует тесту «открытое поле» для грызунов, и используется для анализа локомоторной активности и уровня тревожности [303]. В данной парадигме

нижняя зона аквариума выступает в роли «безопасной» области (аналогично периферии в тесте «открытое поле»), поэтому предпочтение пребывания в ней расценивается как маркер повышенной тревожности. ТИХ является аналогом теста «Принудительное плавание», который используется для оценки эффективности действия антидепрессантов у грызунов [304]. Так оба теста оценивают насколько активно животное пытается выбраться из искусственно созданных неблагоприятных условий [304, 305].

В группах ХНС5 и ХНС12 стрессированные животные реже выходили в верхнюю зону установки и демонстрировали повышенную длительность замираний по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3.1), что указывает на формирование тревожного фенотипа. Анализ временной динамики показал, что рыбы из групп ХНС5 и ХНС12 проводили меньше времени в верхней части аквариума и демонстрировали больший латентный период выхода наверх в тесте ТНА по сравнению с группой ХНС1 (Рисунок 3.1). При этом животные группы ХНС12 демонстрировали наиболее выраженные изменения, включая снижение количества выходов в верхнюю зону и увеличение латентного периода по сравнению не только с ХНС1, но и с ХНС5. Эти данные отражают рост тревожности по мере увеличения продолжительности стресса. Кроме того, после ХНС12 (но не ХНС5) наблюдалось снижение общей активности рыб в тесте ТИХ, что соответствует проявлению состояния «отчаяния», одного из двух главных симптомов депрессивного фенотипа в животных моделях наряду с ангедонией [306] (Рисунок 3.1). Совокупность этих результатов указывает на формирование тревожно-подобного поведения, которое при пролонгированном стрессе (12 недель) трансформируется в депрессивно-подобный фенотип.

Данная динамика согласуется с данными моделей хронического стресса у грызунов [307-309]. Установлено, что протоколы пролонгированного стресса индуцируют последовательный переход от тревожно-подобных к депрессивно-подобным проявлениям, отражая прогрессирование аффективной патологии во времени [167, 310]. Аналогичная клиническая картина характерна и для человека. Эпидемиологические исследования подтверждают, что тревожные симптомы

нередко предшествуют развитию большого депрессивного расстройства [311]. Хотя концепция коморбидности традиционно рассматривает тревогу и депрессию как отдельные нозологические единицы, современные клинические и нейробиологические данные свидетельствуют, что развитие депрессивного расстройства редко происходит без предшествующего периода повышенной тревожности [167, 312].

В исследованиях на *Danio rerio* 5-недельный протокол ХНС хорошо зарекомендовал себя как модель, индуцирующая стойкое тревожно-подобное поведение [14, 294], что было подтверждено и в настоящей работе. Однако демонстрация устойчивого депрессивно-подобного фенотипа после 12-недельного ХНС у *Danio rerio* представлена впервые. Таким образом, нами впервые описана последовательная динамика перехода от тревожно-подобного к депрессивно-подобному состоянию в ходе пролонгированного хронического стресса у *Danio rerio*. Эта закономерность воспроизводит паттерны, наблюдаемые у млекопитающих и в клинической практике, что подчеркивает эволюционную консервативность механизмов развития аффективной патологии.

Несмотря на отсутствие значимых изменений системного уровня кортизола после ХНС5, экспрессия гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*) в головном мозге была достоверно повышена, что может свидетельствовать о гиперчувствительности тканей к действию ключевого гормона стресса. Напротив, после воздействия ХНС12 наблюдалось значимое снижение уровня кортизола без изменений экспрессии *gr*, что, предположительно, указывает на истощение функциональных резервов гипоталамо-гипофизарно-интерреналовой оси (Рисунок 3.2). Данное кажущееся противоречие на самом деле отражает хорошо описанную в литературе динамику. Так, при пролонгированном стрессе первоначальная гиперактивация оси сменяется её истощением и гипофункцией. Этот феномен полностью согласуется с клиническими данными о гипоактивации ГГН-оси и снижении уровня кортизола при ряде стресс-ассоциированных психических расстройств, в частности при посттравматическом стрессовом расстройстве (ПТСР) с коморбидной депрессией [313-315].

Нейрохимический анализ показал, что ХНС5 повышает уровень норадреналина в головном мозге *Danio rerio*, что подтверждает активацию САС на данном этапе (Рисунок 3.4). Эти данные согласуются с литературными сведениями о роли норадренергической системы в формировании тревожного поведения. Так у грызунов избыточная норадренергическая передача ассоциирована с повышением тревожности [316, 317]. Кроме того, норадреналин способен напрямую модулировать активность микроглиальных клеток, способствуя развитию нейровоспаления при хроническом стрессе [318], что создает функциональную связь между активацией САС и глиальным ответом.

Анализ моноаминергического профиля после ХНС12 выявил значимое снижение интенсивности обмена серотонина в головном мозге рыб, что подтверждает формирование депрессивно-подобного фенотипа на нейрохимическом уровне (Рисунок 3.4). Следует отметить, что интерпретация этих данных требует учета видовых особенностей и клинической гетерогенности депрессии. В клинической практике депрессивные расстройства представляют собой неоднородную группу. В частности, если для большинства пациентов характерно повышение интенсивности метаболизма серотонина [319] то существует подтип депрессии (часто ассоциированный с атипичной симптоматикой, психомоторной заторможенностью и коморбидной тревогой), при котором наблюдается снижение серотонинергической передачи [320]. Именно такой профиль обнаруживается у *Danio rerio* после пролонгированного стресса [14, 198]. Данное различие может быть также объяснено тем, что у человека изменения серотонинергической передачи носят регионально-специфичный характер и варьируют в зависимости от исследуемой области мозга [321], тогда как у рыб анализ проводится на уровне целого головного мозга, что отражает усредненную картину метаболизма серотонина.

Дополнительным подтверждением формирования аффективной патологии на фоне ХНС12 служит статистически значимое повышение экспрессии гена *cdh1*, кодирующего Е-кадгерин (Рисунок 3.3). Этот ген ассоциирован с аффективной патологией как у человека, так и у *Danio rerio* [299], что на уровне молекулярно-

генетических маркеров подтверждает вероятный депрессивно-подобный характер наблюдаемых нами изменений.

Наши результаты также демонстрируют, что ХНС5 повышает экспрессию маркерных генов провоспалительного М1 фенотипа микроглии *(nos2a* и *cox-2*), что может свидетельствовать о наличии нейровоспаления на данном этапе (Рисунок 3.3). Необходимо отметить, что, хотя *nos2a* и *cox2* традиционно рассматриваются как маркеры активации микроглии, их экспрессия также может происходить в других клетках ЦНС, включая нейроны и астроциты, а также в макрофагах, проникающих из системного кровотока через поврежденный гематоэнцефалический барьер. Тем не менее, учитывая, что микроглия является основной резидентной иммунной клеткой ЦНС, и принимая во внимание, что данные гены относятся к классическим маркерам провоспалительного М1-фенотипа, мы предполагаем, что наблюдаемое повышение экспрессии отражает преимущественно микроглиальную активацию.

Данное предположение подкрепляется рядом молекулярных предпосылок. Во-первых, доказано, что именно микроглия вовлечена в формирование нейровоспалительного ответа у *Danio rerio* [322]. В частности, *nos2a* можно рассматривать как подтвержденный маркер провоспалительной активации микроглии, поскольку было показано, что иммунная стимуляция вызывает *nos2a*-зависимое повышение продукции NO в микроглии, выявляемое методом прижизненной флуоресцентной визуализации [323]. Данный ген является ортологом гена iNOS у млекопитающих и индуцируется провоспалительными стимулами [298], а также используется как маркер М1-фенотипа макрофагов у костистых рыб [324]. Что касается *cox-2*, он кодирует фермент циклооксигеназу -2, который является частью воспалительного пути, а его экспрессия индуцируется после LPS-стимуляции, что подтверждает роль данного гена в качестве маркера нейровоспаления [325]. Тем не менее, мы не можем сделать окончательный вывод именно о микроглиальной активации, так как даже для *nos2a* показана активация в том числе в астроцитарной глии *Danio rerio* при воспалении [326]. Таким образом, полученные данные указывают на развитие нейровоспаления, но для точного

подтверждения активации именно микроглии в нашей работе необходимы дальнейшие гистологические исследования с применением методов визуализации клеток.

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными на млекопитающих, что подтверждает трансляционную значимость выявленных механизмов. В частности, при хроническом стрессе у мышей развитие тревожно-депрессивного поведения сопровождается повышенной экспрессией гена *Nos2*, тогда как его фармакологическое ингибирование приводит к редукции поведенческих нарушений [327-329]. Роль циклоксигеназы-2 также подтверждается на уровне клинических и доклинических данных. Так показано участие данного фермента в развитии депрессии у людей, а его ингибирование демонстрирует эффективность в снижении тревожного и депрессивно-подобного поведения у грызунов, подвергшихся длительному стрессу [330-332].

Интересно, что уже на 5-й неделе стресса у рыб повышается экспрессия гена *s100a10*, который у млекопитающих является маркером нейропротективного противовоспалительного фенотипа астроглии (A2) (Рисунок 3.3). Это может указывать на ранний запуск эндогенных компенсаторных механизмов в ответ на развивающееся нейровоспаление. Напротив, после ХНС12 экспрессия *s100a10* сохраняется, а также возрастает уровень *cd206* и *ptx3*, которые у млекопитающих используются в качестве маркерных генов противовоспалительного и репаративного фенотипа микроглии (M2) и астроглии (A2) соответственно. Такое изменение профиля экспрессии может свидетельствовать о попытке переключения глиального ответа в противовоспалительное русло на поздних стадиях стресса (Рисунок 3.3). Аналогично ситуации с провоспалительными маркерами, анализ экспрессии в гомогенате цельного мозга не позволяет однозначно связать изменения *s100a10*, *cd206* и *ptx3* исключительно с астроцитами или микроглией. Однако эволюционная консервативность иммунных механизмов и имеющиеся молекулярные данные создают предпосылки для использования этих генов в качестве маркеров противовоспалительной и репаративной активации глии у *Danio rerio*. В частности, ген *s100a10* у *Danio rerio* доказан в качестве

нейропротективного маркера, ассоциированного с регенерацией спинного и головного мозга. При этом показано, что он экспрессируется в gfap-положительных клетках, несущих астроцитарные маркеры [333, 334]. Однако экспрессия *s100a10* также выявлялась в микроглии при иммунном ответе [335], что не позволяет полностью исключить ее вклад. Тем не менее, мы можем сделать вывод, что устойчивое повышение этого гена в нашей модели преимущественно отражает активацию нейропротекторных программ. Экспрессия гена *cd206* достоверно показана у М2-макрофагов *Danio rerio*, а его потеря приводит к нарушению репаративных функций [336, 337]. Более того, *cd206* напрямую предлагается в качестве специфичного маркера М2-фенотипа макрофагов у костистых рыб [338], а в ЦНС он экспрессируется преимущественно в микроглии по сравнению с другими клеточными типами [339]. Наконец, для *ptx3* у *Danio rerio* описаны ортологи, экспрессирующиеся в ЦНС. Также показано участие этого гена в репаративных процессах у *Danio rerio*. В частности, *ptx3*-положительные клетки ассоциированы с репаративными макрофагами на периферии [340, 341], а сам ген участвует в регуляции иммунного ответа у костистых рыб [342, 343]. Несмотря на отсутствие на данный момент работ, однозначно доказывающих экспрессию *ptx3* именно в астроцитах *Danio rerio*, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что координированное повышение экспрессии *s100a10*, *cd206* и *ptx3* отражает запуск общих молекулярных механизмов подавления воспаления и запуска тканевой репарации в ответ на пролонгированный стресс.

Литературные данные подтверждают важную роль этих генов в резистентности к стрессу. Ген *S100a10* вовлечен в регуляцию механизмов, предотвращающих развитие депрессивного состояния. Так, нокаутные по данному гену мыши демонстрируют депрессивно-подобное поведение, тогда как его сверхэкспрессия вызывает противоположные эффекты [344]. Повышение экспрессии *Cd206* в префронтальной коре характерно для устойчивых к стрессу мышей по сравнению с восприимчивыми особями [345]. Экспрессия *ptx3* значительно снижена в сыворотке крови пациентов с депрессией и в гиппокампе мышей после хронического стресса, тогда как ее искусственная гиперэкспрессия

уменьшает депрессивное поведение [346]. Совокупность этих данных на грызунах показывает, что подавление провоспалительных мишеней и активация противовоспалительных генов опосредуют уменьшение аффективных нарушений, что также находит подтверждение в клинике (например, снижение тревоги и депрессии у пациентов с рассеянным склерозом на фоне терапии метилпреднизолоном [347]).

Однако в нашей модели на *Danio rerio* наблюдается иная картина. Так, увеличение экспрессии противовоспалительных/нейропротекторных генов (*cd206, s100a10, ptx3*) при 12-недельном ХНС не привело к компенсации и предотвращению депрессивно-подобного фенотипа. Таким образом, активация противовоспалительных путей при 12-недельном ХНС оказывается недостаточной для предотвращения развития депрессивно-подобного фенотипа.

Известно, что хронический стресс способен увеличивать проницаемость ГЭБ у грызунов [348], что усугубляет нейровоспаление за счет проникновения провоспалительных цитокинов и периферических иммунных клеток из системного кровотока в паренхиму мозга [349, 350]. Наши результаты демонстрируют повышение проницаемости ГЭБ у *Danio rerio* после ХНС5 (Рисунок 3.5), что полностью согласуется с данными ПЦР-анализа об активации провоспалительных маркеров на данном этапе. Таким образом, повышение проницаемости ГЭБ служит независимым подтверждением развития нейровоспалительного ответа как у млекопитающих, так и у рыб. Напротив, после ХНС12 проницаемость ГЭБ возвращается к контрольным значениям, что коррелирует с наблюдаемым сдвигом в экспрессии глиальных маркеров в сторону противовоспалительных фенотипов.

Эпигенетические ферменты, включая ДНК-метилтрансферазы и модификаторы гистонов, играют ключевую роль в модуляции тревожных и депрессивных состояний, вызванных хроническим стрессом, влияя на экспрессию генов в ЦНС и, в конечном итоге, на поведенческие реакции как у человека, так и в животных моделях [351, 352]. Предыдущие исследования показали, что хронический стресс изменяет экспрессию этих эпигенетических регуляторов. В частности, воздействие 1-недельного стресса повышает экспрессию генов *dnmt3a,*

dnmt3b, hdac4 и *hat1* в головном мозге *Danio rerio* [227]. Хотя в настоящем исследовании ХНС5 не вызвал значимых изменений экспрессии этих генов, после 12-недельного воздействия была выявлена гиперэкспрессия гена *hdac4* (Рисунок 3.3), что позволяет связать данный эпигенетический модификатор с формированием депрессивно-подобного поведения у рыб при пролонгированном стрессе.

Этот результат полностью согласуется с данными, полученными на моделях хронического стресса у грызунов, где повышенная экспрессия гена *Hdac4* ассоциирована с депрессивным поведением и когнитивными нарушениями, тогда как нокаут этого гена предотвращает развитие стресс-индуцированного тревожного поведения, восстанавливая его до контрольного уровня [353]. Более того, искусственная сверхэкспрессия *Hdac4* в гиппокампе крыс вызывает исключительно депрессивно-подобное, но не тревожное поведение [354], что находится в полном соответствии с нашими данными: у *Danio rerio* повышенная экспрессия *hdac4* и депрессивный фенотип были обнаружены исключительно после ХНС12, но не на более ранних стадиях стресса.

Таким образом, основными результатами данной главы исследования являются демонстрация временной динамики перехода от тревожно-подобного к депрессивно-подобному фенотипу у *Danio rerio* в условиях пролонгированного хронического стресса и выявление соответствующей временной динамики нейровоспалительной реакции. Формирование депрессивно-подобного фенотипа при 12-недельном стрессе подтверждается на нескольких уровнях, а именно на поведенческом, нейрохимическом и молекулярно-генетическом. При этом нейровоспалительная реакция, характеризующаяся активацией провоспалительных маркеров и повышением проницаемости ГЭБ на 5-й неделе стресса, при пролонгированном воздействии стресса (12 недель) сменяется активацией противовоспалительных маркеров. Тем не менее, активация противовоспалительных путей не обеспечивает эффективной нейропротекции, которая бы снижала симптоматику депрессивного фенотипа.

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В МОДЕЛИ ХНС2

4.1 Результаты

Полные данные о статистически значимых эффектах, выявленных в настоящем исследовании, представлены в таблицах Б.1–Б.7 (приложение Б). В настоящей главе оценивали способность противовоспалительных препаратов миноциклина и нимесулида корректировать поведенческие и молекулярные нарушения в модели 2-недельного хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) у взрослых *Danio rerio*. Исследование состояло из 8 экспериментов. Эксперимент 1 был посвящён оценке эффектов ХНС2 на поведение и экспрессию генов – маркеров нейровоспаления. Эксперименты 2–4 оценивали влияние различных концентраций миноциклина (25, 50 и 100 мг/л) при 1- и 2-недельном введении. Эксперименты 5–8 оценивали влияние различных концентраций нимесулида (1, 2,5 и 5 мг/л) при 1- и 2-недельном введении. В каждом эксперименте сравнивали от двух до четырёх групп: контроль (К), стресс (С), препарат (М или Н) и стресс + препарат (СМ или СН). Результаты поведенческого анализа проиллюстрированы на рисунках 4.1–4.10, результаты экспрессии генов на рисунках 4.2, 4.4 и 4.11.

Результаты Эксперимента 1, посвященному анализу эффектов ХНС2 на поведение и экспрессию генов – маркеров нейровоспаления, иллюстрированы на рисунках 4.1–4.2. Поведенческий анализ показал, что ХНС2 вызывает статистически значимое увеличение общей пройденной дистанции и времени, проведённого в верхней зоне аквариума в ТНА, сопровождающееся снижением латентного периода выхода в верхнюю зону установки. Кроме того, у рыб из группы «стресс» отмечалось уменьшение длительности периодов замираний и увеличение продолжительности эпизодов высокой подвижности в ТНА. При этом в ТИХ наблюдалось снижение средней активности (Рисунок 4.1, Таблица Б.1).

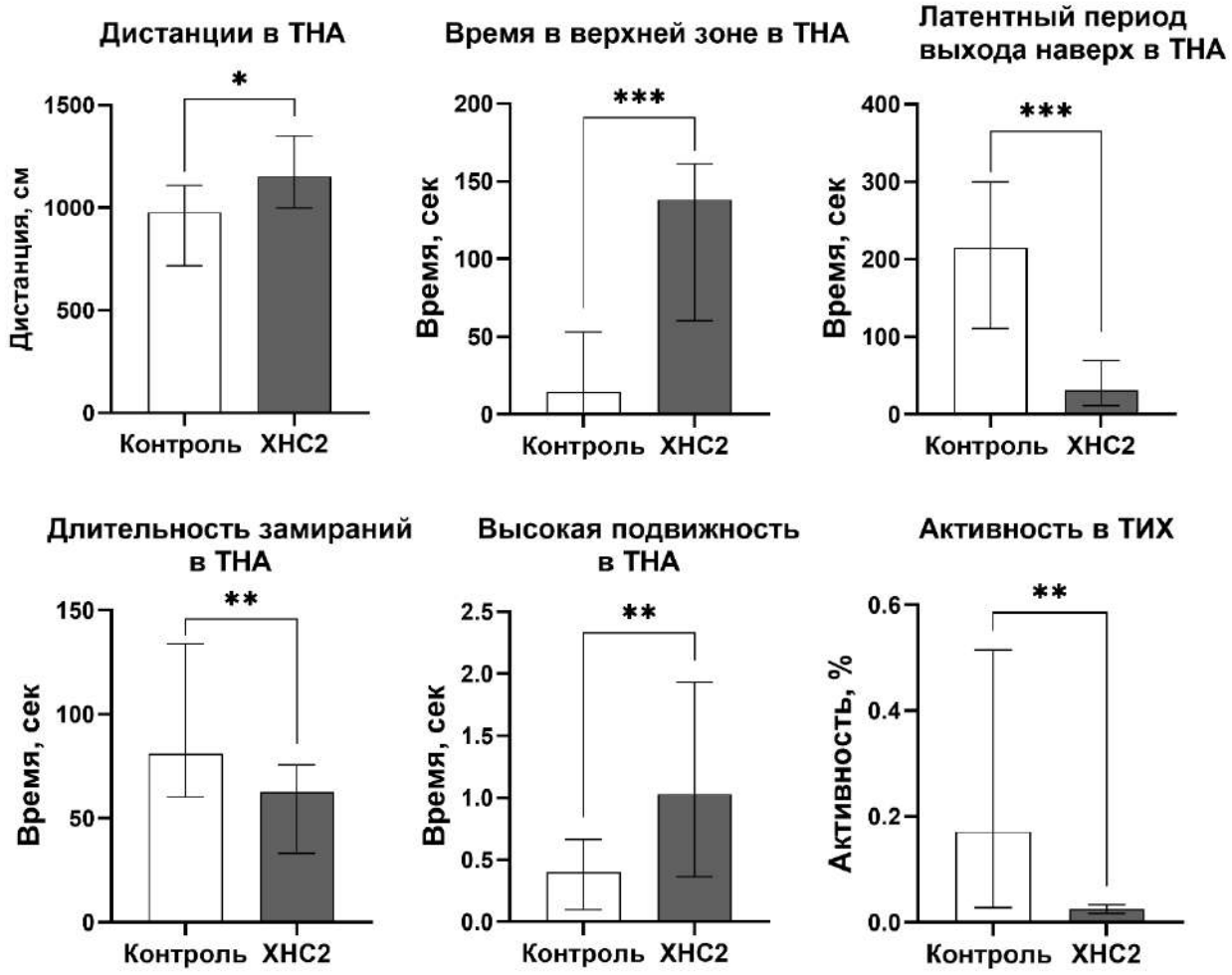


Рисунок 4.1 – Эффекты ХНС2 на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и ТИХ. Эксперимент 1. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Критерий Манна-Уитни. (см. Таблицу Б.1 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 27 на группу)

Анализ экспрессии генов - маркеров нейровоспалительной активности в головном мозге *Danio rerio* показал, что ХНС2 вызывает снижение экспрессии противовоспалительных маркеров (*arg1, cd206*, *ptx3*), и провоспалительного маркера (*gbp2*). Кроме того, ХНС2 приводил к значимому снижению экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*) (Рисунок 4.2, Таблица Б.1).

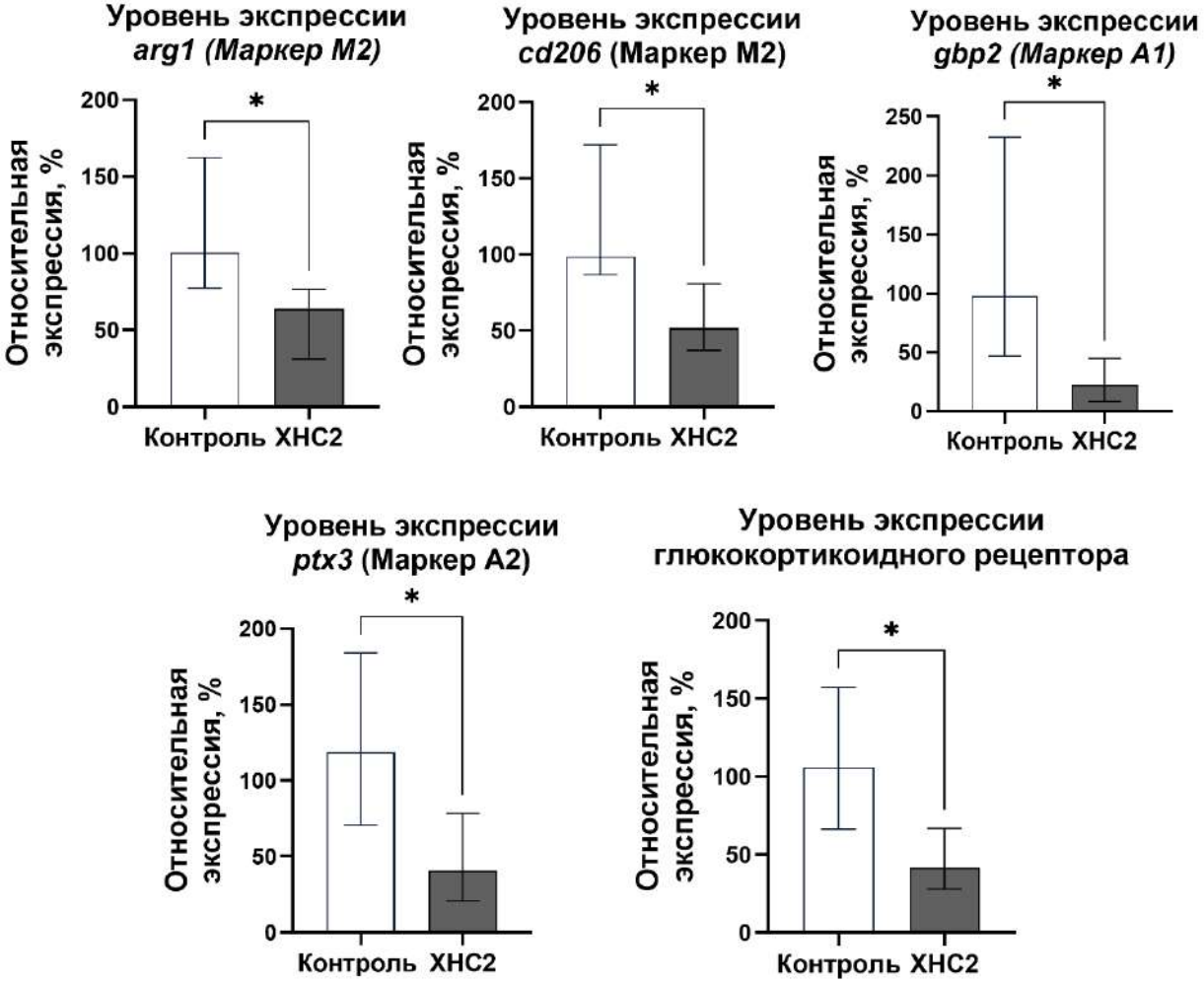


Рисунок 4.2 – Эффекты ХНС2 на уровень экспрессии генов – маркеров нейровоспаления и уровень экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора в мозге *Danio rerio*. Эксперимент 1. *p<0.05, Критерий Манна-Уитни. (см. Таблицу Б.1 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 5 - 7 на группу)

Эксперимент 2 был посвящён анализу влияния различных концентраций миноциклина, вводимого в течение 1 недели, на поведение взрослых *Danio rerio.* Результаты показали, что концентрации 50 и 100 мг/л вызывают снижение общей пройденной дистанции в ТНА. Концентрация 100 мг/л также приводила к уменьшению продолжительности эпизодов высокой подвижности. При этом концентрация 25 мг/л не оказывала значимого влияния на поведенческие показатели в ТНА (Рисунок 4.3, Таблица Б.2).

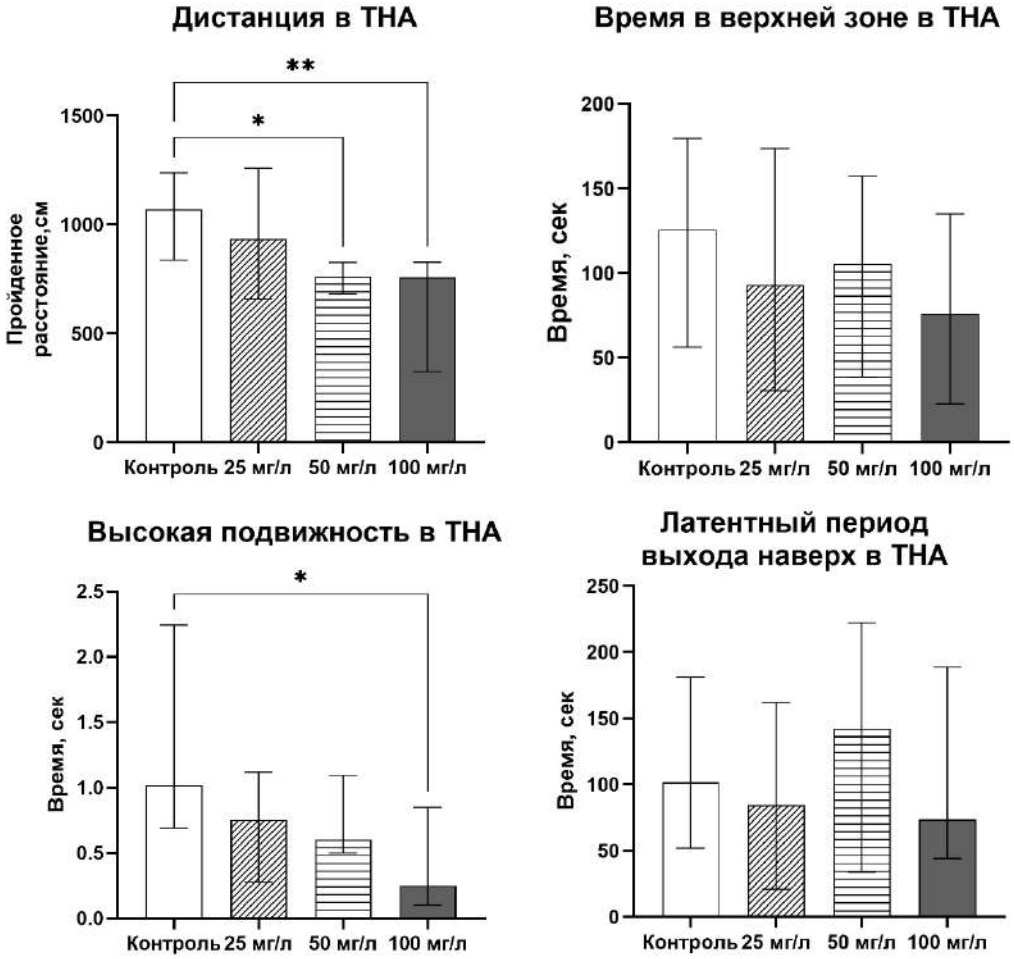


Рисунок 4.3 – Влияние различных концентраций миноциклина на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА. Эксперимент 2. *p<0.05, **p<0.01. Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.2 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 10 – 15 на группу)

Эксперимент 3 был посвящён анализу влияния 2-недельного воздействия миноциклина (50 мг/л) на поведение и экспрессию генов – маркеров нейровоспаления в модели ХНС2 у взрослых *Danio rerio*.

Поведенческий анализ показал, что 2-недельный ХНС (С) не вызывал статистически значимых изменений поведенческих показателей ни в ТНА, ни в ТИХ по сравнению с контрольной группой. При этом воздействие миноциклина (М) приводило к снижению общей пройденной дистанции и увеличению продолжительности замираний в ТНА (Рисунок 4.4, Таблица Б.3).

Анализ экспрессии генов выявил следующие изменения: в группе миноциклина (М) наблюдалось снижение экспрессии генов *nos2a* и *arg1* (провоспалительные маркеры) и повышение экспрессии *s100a10* (нейропротекторный маркер) по сравнению с контролем. В группе стресса (С) отмечалось снижение экспрессии *nos2a, arg1* и *ptx3* при одновременном повышении экспрессии *cd206* (противовоспалительный маркер). В группе стресс + миноциклин (СМ) выявлено снижение экспрессии *nos2a, cox2*, *arg1* и *ptx3* по сравнению с контролем (Рисунок 4.5, Таблица Б.3).

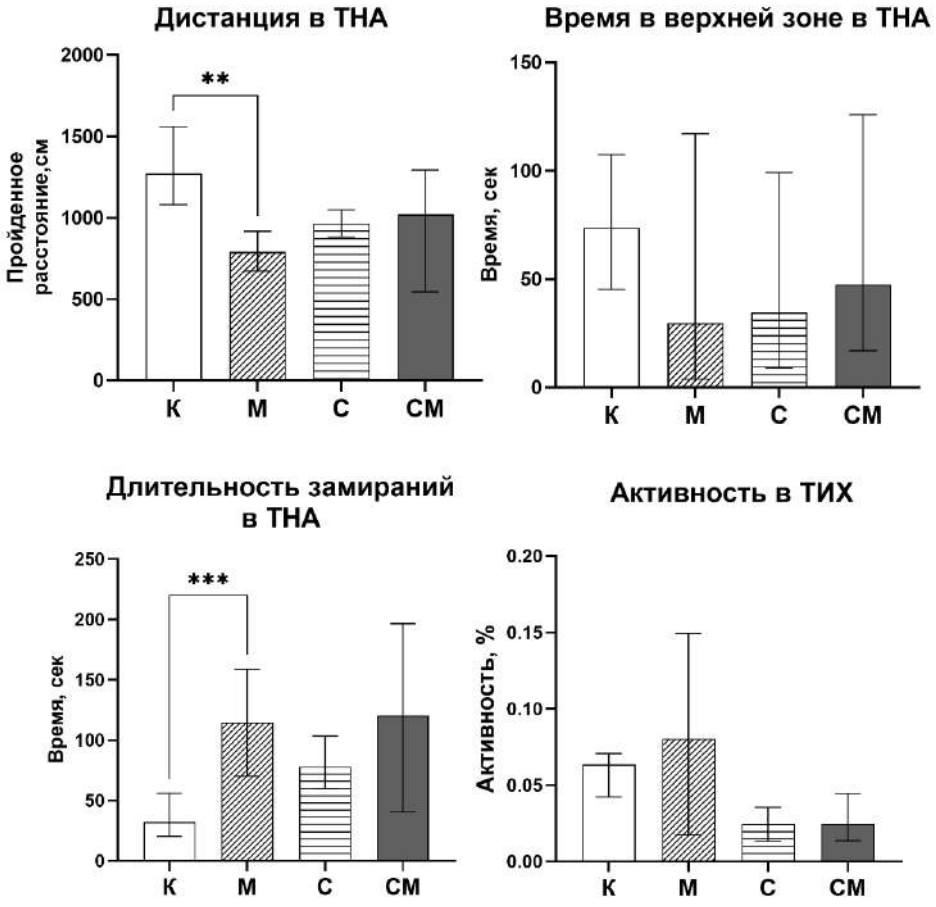


Рисунок 4.4 – Влияние воздействия миноциклина (50 мг/л; 2 недели) на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и ТИХ в модели ХНС2. Эксперимент 3. К – контроль, м – миноциклин, с – стресс, см – стресс + миноциклин. **p<0.01. Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.3 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 8 – 13 на группу)

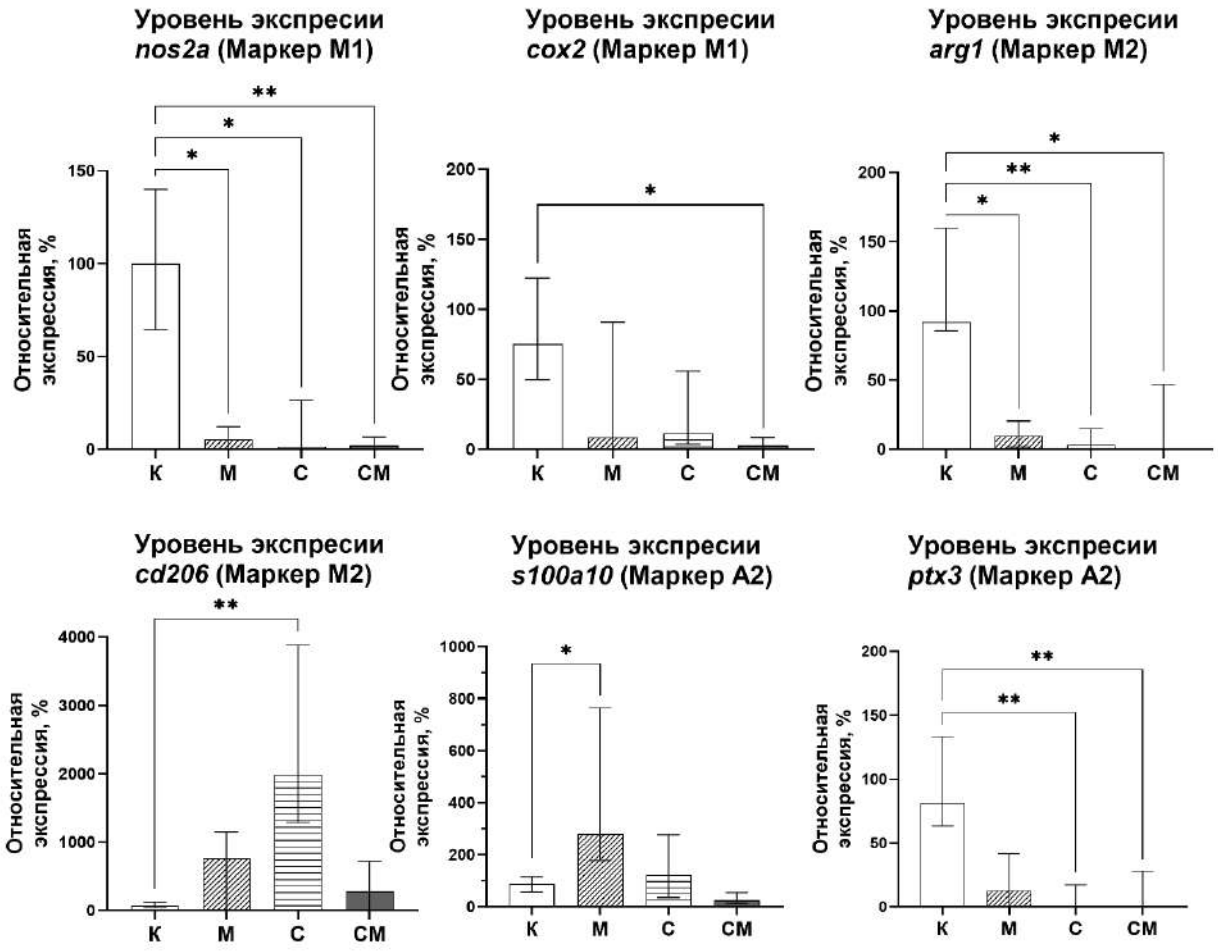


Рисунок 4.5 – Влияние воздействия миноциклина (50 мг/л; 2 недели) на уровень экспрессии генов – маркеров нейровоспаления в мозге взрослых *Danio rerio*. Эксперимент 3. К – контроль, м – миноциклин, с – стресс, см – стресс + миноциклин. *p<0.05, **p<0.01 Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.3 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 5 – 7 на группу)

Эксперимент 4 был посвящён анализу влияния 1-недельного воздействия миноциклина (25 мг/л) на поведение взрослых *Danio rerio* в модели ХНС2. Анализ выявил статистически значимое увеличение времени пребывания животных в верхней зоне установки в группе совместного воздействия стресса и миноциклина (СМ) по сравнению с группой стресса (С) в ТНА. Статистически значимых различий между группами в ТИХ не обнаружено (Рисунок 4.6, Таблица Б.4).

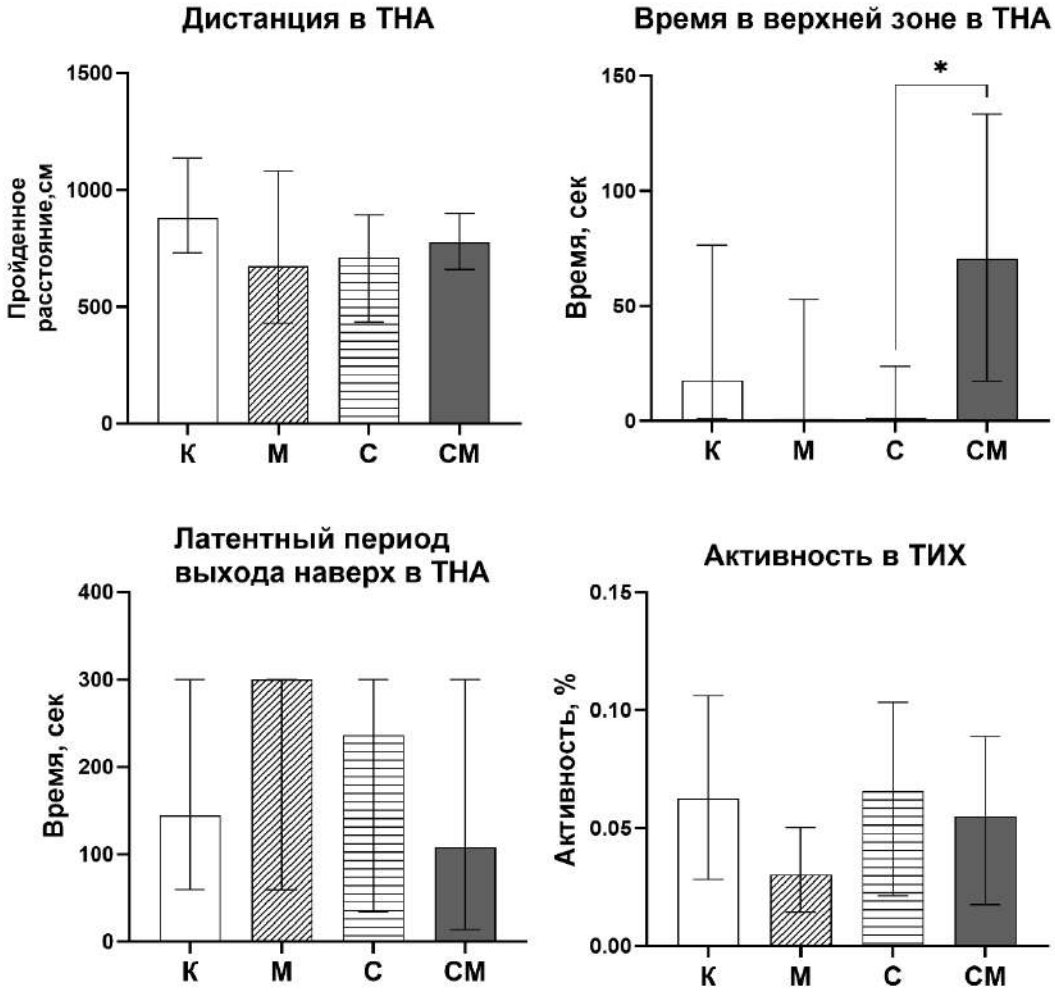


Рисунок 4.6 – Влияние воздействия миноциклина (50 мг/л; 1 неделя) на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и ТИХ в модели ХНС2. Эксперимент 4. К – контроль, м – миноциклин, с – стресс, см – стресс + миноциклин. *$p<0.05$, Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.4 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана и межквартильный размах (n = 15 на группу)

Эксперимент 5 был посвящён анализу влияния двух концентраций нимесулида (1 и 5 мг/л), вводимого в течение 1 недели, на поведение взрослых *Danio rerio*. Поведенческий анализ не выявил статистически значимых различий между группами в ТНА (Рисунок 4.7, Таблица Б.2).

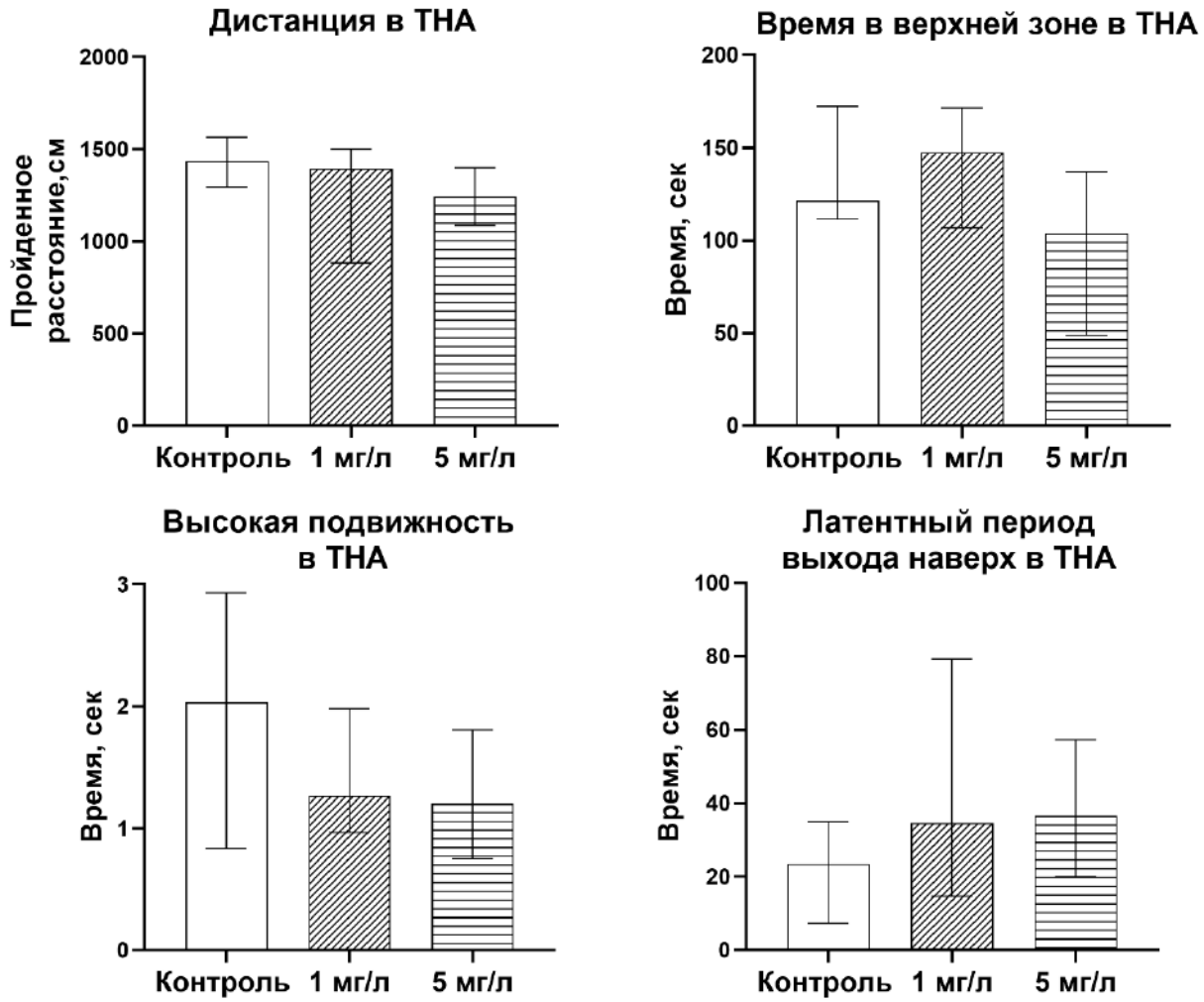


Рисунок 4.7 – Влияние различных концентраций нимесулида на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА. Эксперимент 5. Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.2 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 10 – 11 на группу)

Эксперимент 6 был посвящён анализу влияния 2-недельного воздействия нимесулида (5 мг/л) на поведение взрослых *Danio rerio* в модели ХНС2. Поведенческий анализ в ТНА показал, что группа стресса (С) демонстрировала увеличение времени, проведённого в верхней зоне аквариума, наряду со снижением латентного периода выхода наверх по сравнению с контрольной группой (К). Группа нимесулида (Н) не отличалась от контроля ни по одному из исследованных параметров. В группе стресс + нимесулид (СН) наблюдалось статистически значимое снижение латентного периода выхода наверх по

сравнению с контролем и увеличение продолжительности замираний по сравнению с группой стресса. Примечательно, что в группе СН была отмечена высокая смертность животных уже после первой недели воздействия (Рисунок 4.8, Таблица Б.5).

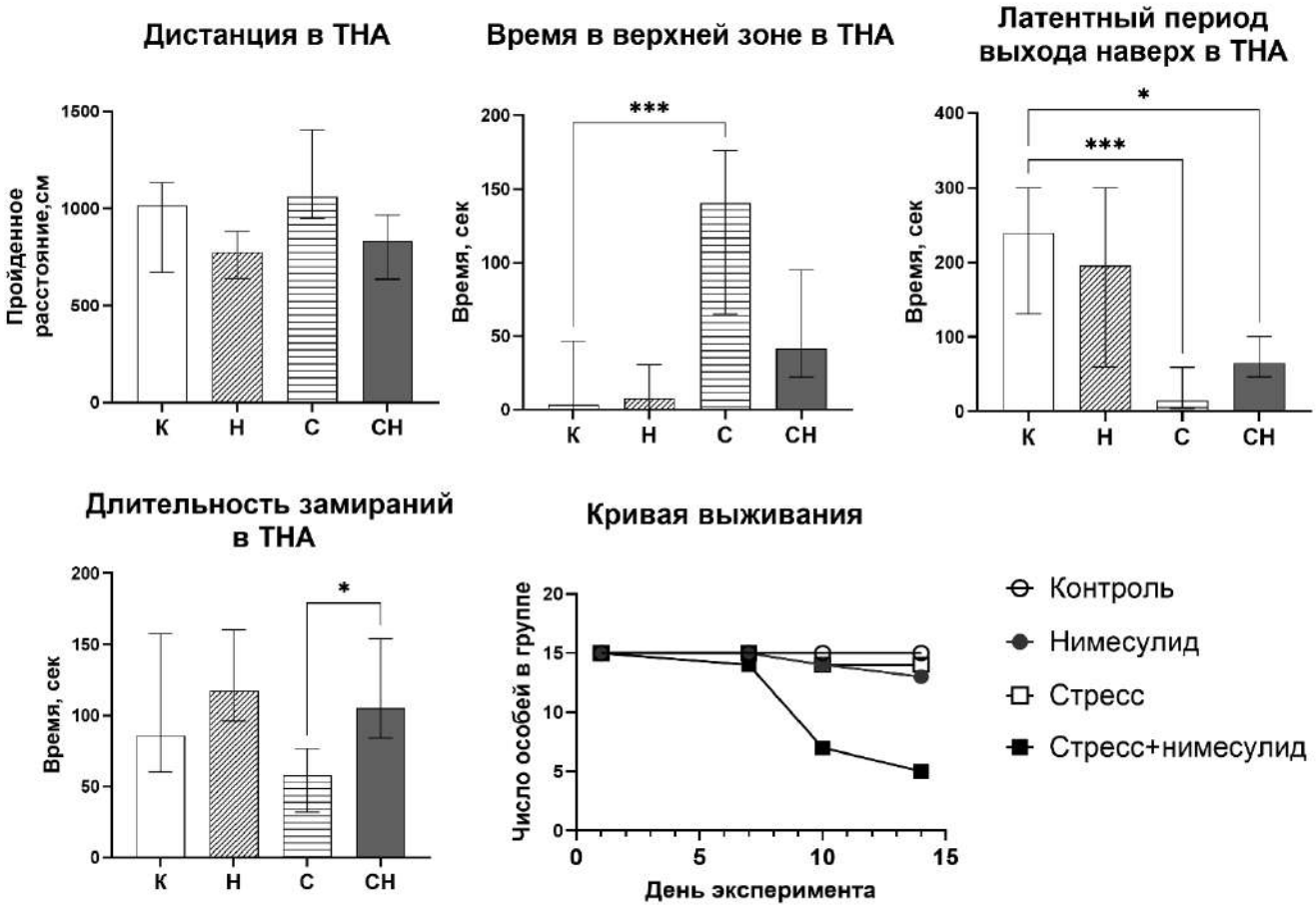


Рисунок 4.8 – Влияние воздействия нимесулида (5 мг/л; 2 недели) на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА. Эксперимент 6. *p<0.05, ***p<0.001.Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.5. Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 5 – 15 на группу)

Эксперимент 7 был посвящён анализу влияния 2-недельного воздействия нимесулида (2,5 мг/л) на поведение взрослых *Danio rerio* в модели ХНС2. Поведенческий анализ в ТНА показал, что группа стресса (С) демонстрировала увеличение общей пройденной дистанции, времени, проведённого в верхней зоне установки, и продолжительности эпизодов высокой подвижности по сравнению с

контролем. Группа нимесулида (Н) не отличалась от контроля ни по одному из исследованных параметров. В группе стресс + нимесулид (СН) наблюдалось статистически значимое увеличение латентности первого выхода наверх и продолжительности эпизодов высокой подвижности по сравнению с контролем. Так же, как и в Эксперименте 6, в группе СН была отмечена высокая смертность животных после первой недели воздействия (Рисунок 4.9, Таблица Б.6).

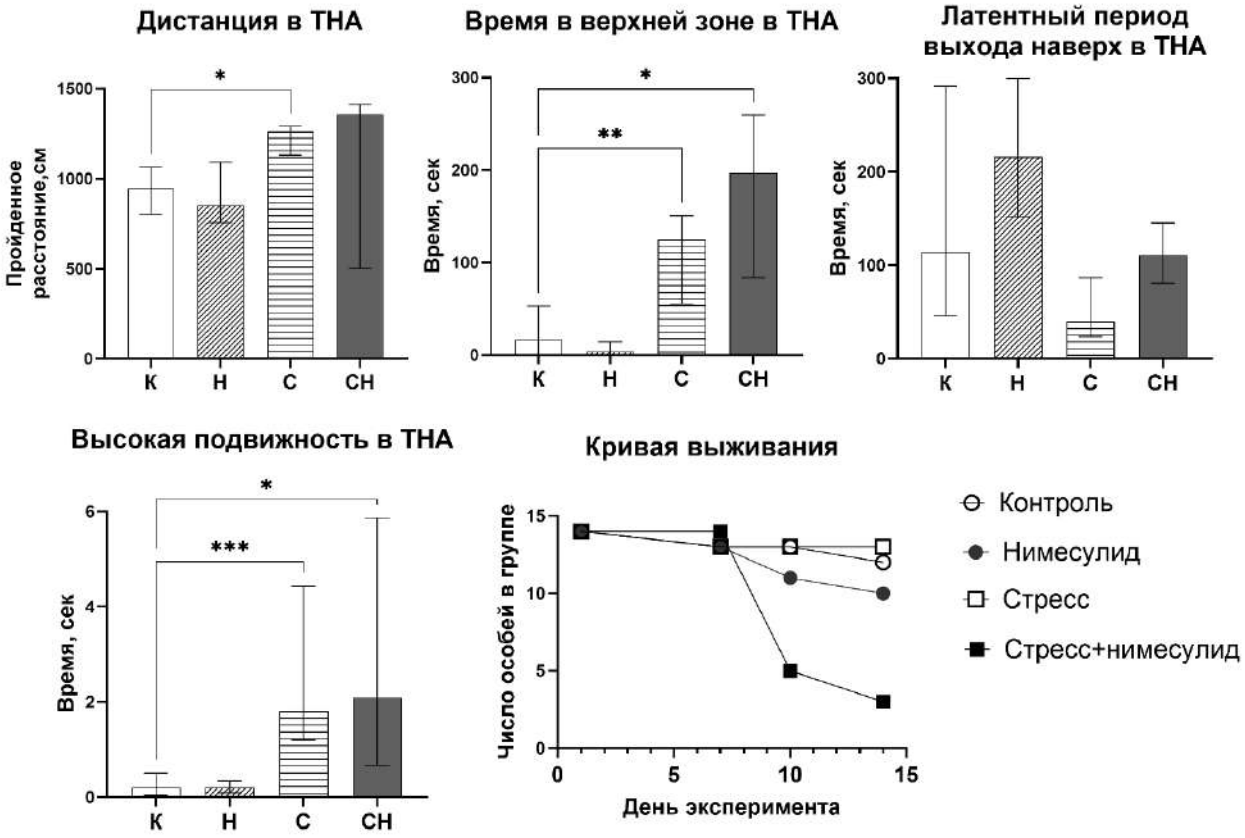


Рисунок 4.9 – Влияние воздействия нимесулида (2,5 мг/л; 2 недели) на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА. Эксперимент 7. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.6 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 3 – 13 на группу)

Эксперимент 8 был посвящён анализу влияния 1-недельного воздействия нимесулида (2,5 мг/л) на поведение и экспрессию генов – маркеров нейровоспаления в модели ХНС2 у взрослых *Danio rerio*.

Поведенческий анализ показал, что группы стресса (С) и нимесулида (Н) не отличались от контрольной группы ни по одному из исследованных параметров в ТНА и ТИХ. Группа совместного воздействия стресса и нимесулида (СН) демонстрировала увеличение времени, проведённого в верхней зоне установки, по сравнению с контролем и увеличение частоты замираний по сравнению с группой нимесулида в ТНА (Рисунок 4.10, Таблица Б.7).

Анализ экспрессии генов выявил следующие изменения. В группе стресса (С) отмечалось снижение экспрессии маркеров провоспалительной активности (*cox2*, *il1b*) по сравнению с контролем. В группе стресс + нимесулид (СН) выявлено повышение экспрессии маркера провоспалительной активности *nos2a* и маркера противовоспалительной /нейропротекторной активности *s100a10* по сравнению с контролем, а также увеличение экспрессии провоспалительного маркера *il1b* по сравнению с группой стресса (Рисунок 4.11, Таблица Б.7).

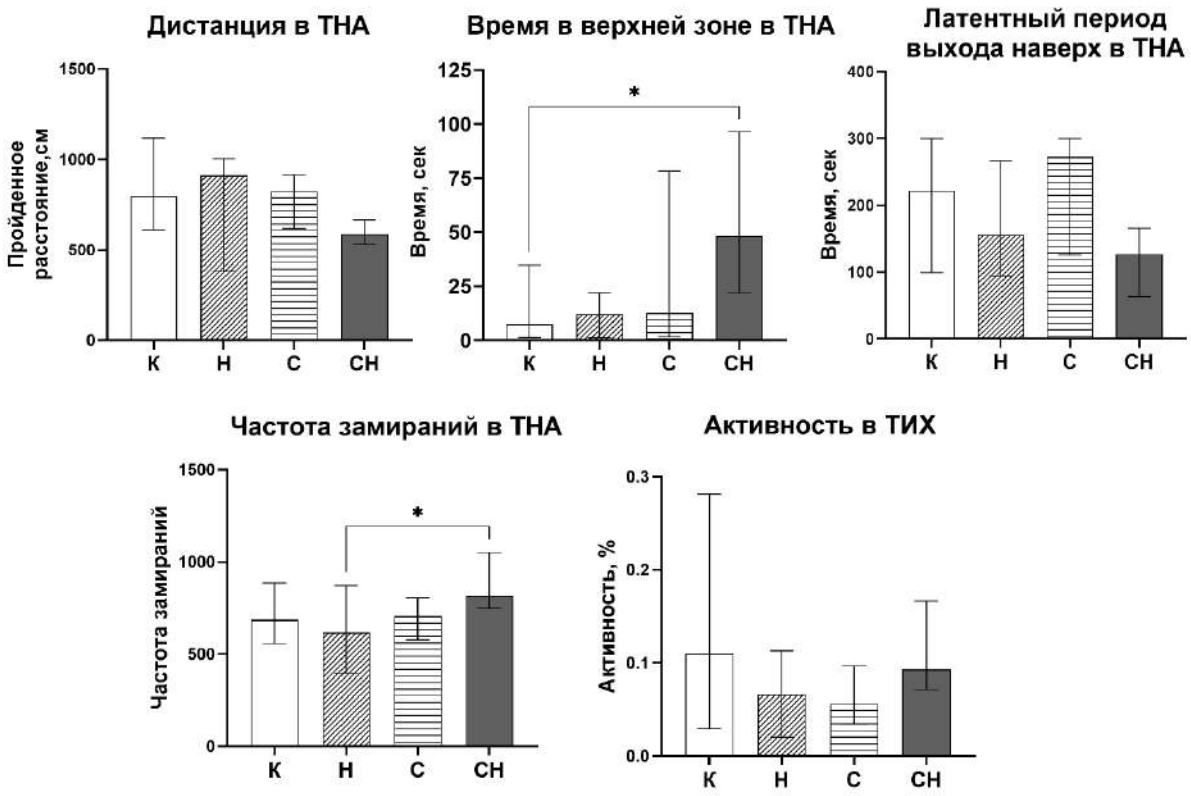


Рисунок 4.10 – Влияние воздействия нимесулида (2,5 мг/л; 1 неделя) на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и ТИХ. Эксперимент 8. *p<0.05. Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.7 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 10 – 14 на группу)

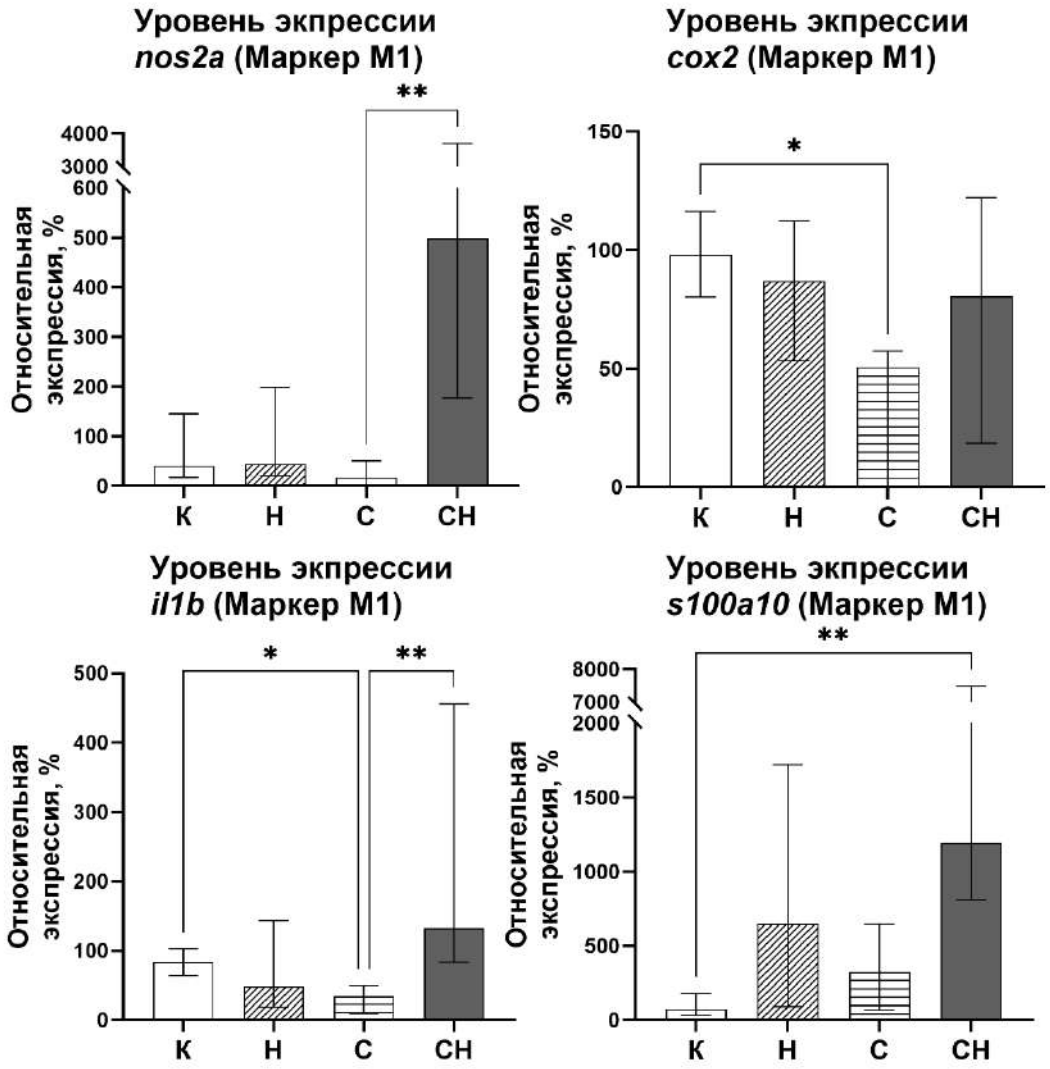


Рисунок 4.11 – Влияние воздействия нимесулида (2,5 мг/л; 1 неделя) на уровень экспрессии генов – маркеров нейровоспаления в *Danio rerio* в ТНА и ТИХ. Эксперимент 8. *p<0.05, **p<0.01. Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. (см. Таблицу Б.7 с результатами статистического анализа). Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 5– 7 на группу)

4.2 Обсуждение

Проведённое исследование было направлено на подбор оптимальных концентраций миноциклина и нимесулида, а также продолжительности их воздействия в модели ХНС2 у *Danio rerio.* Полученные результаты выявили ряд важных закономерностей, касающихся как поведенческих эффектов самих препаратов, так и их взаимодействия со стрессом.

Эксперимент 1 демонстрирует влияние ХНС2 на поведение *взрослых Danio rerio* в ТНА и ТИХ. На первый взгляд, может показаться, что рыбы в группе стресса демонстрируют анксиолитический эффект. Так, увеличение времени, проводимого в верхней (наиболее стрессогенной) зоне аквариума, снижение латентного периода первого выхода наверх и уменьшение длительности периодов замираний (фризинга) стандартно интерпретируются как снижение уровня тревожности. Однако повышение длительности эпизодов высокой подвижности в ТНА имеет противоположную, анксиогенную природу (Рисунок 4.1). Параметр «высокая подвижность» в данном контексте характеризует состояние эрратического поведения, то есть хаотичных, беспорядочных движений *Danio rerio*, которые являются маркером острого стресса и тревоги [294]. Кроме того, в тесте ТИХ ХНС2 вызвал достоверное снижение общей активности, что классически интерпретируется как поведение отчаяния и может свидетельствовать о начале формирования депрессивного фенотипа (Рисунок 4.1).

Таким образом, поведенческий профиль 2-недельного стресса носит противоречивый характер. Данное состояние, по-видимому, может являться переходным: оно балансирует между фазой активной резистентности к стрессу и началом развития аффективного патогенеза с формированием поведения отчаяния (что проявляется в ТИХ).

Этот поведенческий парадокс, по-видимому, находит частичное отражение на молекулярном уровне. В головном мозге рыб после ХНС2 мы наблюдали снижение экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*) (Рисунок 4.2). Подобная супрессия *gr* может рассматриваться как потенциальный маркер аффективной патологии, и, вероятно, отражает развитие глюкокортикоидной резистентности, то есть состояния, при котором первоначальная адаптация к росту уровня кортизола сменяется нарушением механизмов отрицательной обратной связи. Литературные данные подтверждают связь сниженной экспрессии *gr* с ранними стадиями аффективного патогенеза в модели ХНС у *Danio rerio* и грызунов [28, 262]. Вместе с тем анализ литературных источников показывает, что изменения экспрессии *gr* при хроническом стрессе носят крайне противоречивый

характер. Так в одних исследованиях регистрируется снижение уровня этого рецептора, а в других - его повышение [265, 355-357]. В текущей работе в главе 3 также показано, что ХНС5 увеличивает экспрессию *gr*, что контрастирует с данными по 2-недельному стрессу. Можно предположить, что такая вариабельность обусловлена разной стадией стресс-индуцированного патогенеза, которая в свою очередь зависит от длительности стрессового воздействия и от используемого протокола. Однако для проверки данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования с использованием единого протокола стрессирования и детального анализа уровня экспрессии на разных этапах формирования аффективного патогенеза.

Примечательно, что при этом на 2-й неделе стресса еще проявляются признаки классического нейровоспаления. Напротив, наблюдается тенденция к подавлению экспрессии как провоспалительных, так и противовоспалительных маркеров, что может свидетельствовать о временной функциональной супрессии иммунных механизмов ЦНС на этапе активной нейроэндокринной адаптации (Рисунок 4.2). С позиции концепции аллостатической нагрузки [40], 2-недельный стресс, по-видимому, может соответствовать фазе аллостаза – активной, но еще обратимой адаптации организма к изменяющимся условиям, когда мобилизуются нейроэндокринные системы (кортизол), но системы нейровоспаления еще не задействованы. Переход к 5-недельному стрессу вызывает нарушение адаптации и развитие аллостатической перегрузки, что проявляется формированием тревожного, а затем и депрессивно-подобного фенотипа.

Отдельно стоит отметить, что эффекты ХНС2 характеризуются высокой вариабельностью и не всегда одинаково воспроизводятся между разными экспериментами данной серии. Как обсуждалось в обзоре литературы, одной из ключевых проблем моделей ХНС на животных является низкая воспроизводимость результатов не только между лабораториями, но и внутри одной научной группы [251, 258]. Однако, опираясь на полученные нами данные, можно предположить, что эта вариабельность не является исключительно методологическим артефактом. Возможно, она отражает биологическую суть «переходного» состояния между

фазой устойчивости к стрессу и стадией развернутого аффективного патогенеза. Показательно, что даже в тех экспериментах, где не удавалось зафиксировать статистически значимых сдвигов в поведении, на молекулярном уровне (по данным ПЦР - РВ) мы неизменно наблюдали схожие изменения в экспрессии генов, что позволяет предположить наличие скрытого патологического процесса, возможно, опережающего поведенческие проявления.

Эксперименты 2–4 были посвящены подбору эффективной и нетоксичной концентрации миноциклина для коррекции аффективной патологии. Эксперимент 2 продемонстрировал, что концентрации 50 и 100 мг/л при однонедельном воздействии вызывают выраженный седативный эффект у *Danio rerio*, тогда как концентрация 25 мг/л не влияла на поведение (Рисунок 4.3). Для дальнейшего анализа были отобраны две концентрации: 25 мг/л (как поведенчески инертная) и 50 мг/л (как минимальная концентрация, вызывающая достоверный эффект).

В Эксперименте 3 оценивали влияние миноциклина в концентрации 50 мг/л при 2-недельном воздействии на фоне ХНС2. Препарат вновь оказал седативный эффект на поведение рыб (Рисунок 4.4). Оценить специфический корректирующий (анксиолитический или антидепрессивный) эффект миноциклина в данной парадигме не представлялось возможным, поскольку сам по себе 2-недельный стресс в этом эксперименте не оказал значимого влияния на поведение.

На молекулярно-генетическом уровне миноциклин (без воздействия стресса) снижал экспрессию как провоспалительного (*nos2a*), так и противовоспалительного *(arg1*) маркеров. Как обсуждалось в Главе 3, анализ экспрессии в гомогенате цельного мозга не позволяет однозначно отнести эти изменения исключительно к микроглии, однако совокупность молекулярных предпосылок указывает на то, что наблюдаемый эффект может быть опосредован преимущественно глиальными клетками. Кроме того, миноциклин известен своей способностью подавлять именно микроглиальное нейровоспаление. Наблюдаемая нами картина не позволяет сделать вывод о переключении микроглии в противовоспалительный фенотип. Напротив, наблюдаемое снижение экспрессии всех изученных маркеров, ассоциированных с воспалительной активностью глии,

свидетельствует о том, что миноциклин в данных условиях оказывает общее супрессивное влияние на транскрипционную активность, связанную с воспалительными процессами. При введении на фоне стресса препарат снижал экспрессию *cox2* и нормализовал уровень *cd206*. Кроме того, миноциклин повышал экспрессию нейропротективного маркера *s100a10* (Рисунок 4.5). Как обсуждалось в Главе 3, ген *S100a10* обладает выраженным антидепрессивным действием. Так его сверхэкспрессия предотвращает развитие депрессивно-подобного поведения, тогда как нокаут приводит к ангедонии и поведению отчаяния [344]. Таким образом, можно предположить, что стимуляция экспрессии *s100a10* миноциклином служит дополнительным нейропротекторным механизмом, компенсирующим действие стресса.

Тем не менее, поскольку на 2-й неделе стресса не наблюдается признаков активного нейровоспаления, модель ХНС2 оказывается недостаточно чувствительной для оценки противовоспалительного корректирующего потенциала миноциклина. Учитывая, что поведенческие эффекты 2-недельного воздействия миноциклина (50 мг/л) (Рисунок 4.4) не отличались от эффектов 1-недельного курса (Рисунок 4.3) (Эксперимент 2), для последующих экспериментов было принято решение сократить продолжительность воздействия до 1 недели.

В Эксперименте 4 тестировали концентрацию 25 мг/л при 1-недельном воздействии на фоне ХНС2. Как и ожидалось, введение этой концентрации не влияло на поведение *Danio rerio*. Вместе с тем, на фоне стрессового воздействия миноциклин в данной концентрации продемонстрировал корректирующий анксиолитический эффект, проявившийся в статистически значимом увеличении времени пребывания животных в верхней зоне установки в ТНА по сравнению с группой стресса (Рисунок 4.6). Кроме того, наблюдалась визуально выраженная тенденция к снижению латентного периода выхода в верхнюю зону до уровня, близкого к контролю, однако это различие не достигло статистической значимости при апостериорном анализе (Таблица Б.4).

Несмотря на отсутствие выраженных поведенческих сдвигов в группе стресса для дальнейших исследований на моделях пролонгированного стресса

(ХНС5 и ХНС12) была выбрана именно схема «25 мг/л в течение 1 недели». Данный выбор был обусловлен тем, что более высокая концентрация (50 мг/л) оказывает неспецифическое седативное действие, которое может маскировать истинные терапевтические эффекты препарата, тогда как концентрация 25 мг/л, не обладая поведенческой активностью при введении контрольным животным (то есть без стрессового воздействия), способна оказывать некоторый корректирующий эффект на фоне ХНС2.

Следует отметить, что молекулярно-генетический анализ в Эксперименте 4 не проводился. Это решение было обосновано тем, что Эксперимент 3 уже продемонстрировал способность миноциклина (50 мг/л) достоверно снижать экспрессию провоспалительных маркеров микроглии, что подтверждает молекулярную активность препарата у *Danio rerio.* Поскольку концентрация 25 мг/л остаётся значительно выше рабочих концентраций, описанных в литературе для рыб (1–5 мг/л) [358, 359], и была выбрана на основе данных исследований на грызунах (25–50 мг/кг) [360], можно с высокой уверенностью предположить сохранение её молекулярной активности.

Эксперименты 5-8 были посвящены подбору эффективной и нетоксичной концентрации нимесулида для коррекции аффективной патологии. Эксперимент 5 продемонстрировал, что концентрации 1 и 5 мг/л при воздействии в течение 1 недели не оказали влияния на поведение *Danio rerio* в ТНА (Рисунок 4.7). Для дальнейшего анализа была выбрана концентрация 5 мг/л как поведенчески инертная.

Эксперимент 6 оценивал влияние нимесулида в концентрации 5 мг/л при 2-недельном воздействии на фоне ХНС2. Воздействие нимесулида не оказало влияния на поведение, однако воздействие на фоне стресса нормализовало ряд параметров, изменённых под действием ХНС2, возвращая их к уровню контроля. Вместе с тем, после 2 недель совместного воздействия ХНС2 и нимесулида наблюдалась высокая смертность животных (Рисунок 4.8). В связи с этим было принято решение повторить эксперимент, снизив концентрацию нимесулида в два раза (Эксперимент 7). При концентрации 2,5 мг/л нимесулид при 2-недельном

воздействии на фоне стресса также нормализовал один из параметров, изменённых в группе стресса. Однако и в этом случае наблюдалась повышенная смертность животных уже после 1 недели совместного воздействия ХНС2 и нимесулида (Рисунок 4.9). Поэтому далее было решено сократить период воздействия до 1 недели.

Эксперимент 8 оценивал влияние нимесулида в концентрации 2,5 мг/л при 1-недельном воздействии на фоне ХНС2. Введение препарата на фоне стресса увеличивало время, проводимое животными в верхней зоне аквариума (Рисунок 4.10), что с одной стороны усиливает эффект, характерный для ХНС2, однако не может расцениваться как негативное явление, поскольку увеличение времени в верхней зоне ТНА традиционно интерпретируется как анксиолитический эффект. При этом в данном эксперименте стресс сам по себе не вызвал значимых изменений поведения в этом параметре.

Анализ экспрессии генов - маркеров нейровоспаления в Эксперименте 8 продемонстрировал неоднозначные результаты. С одной стороны, нимесулид на фоне стресса нормализовал экспрессию двух провоспалительных маркеров, возвращая их к уровню контроля. С другой стороны, препарат достоверно повышал экспрессию ещё одного провоспалительного маркера. Возможно, данное наблюдение является отражением компенсаторной реакции клеток глии на блокаду основного ферментативного пути. Вместе с тем, нимесулид на фоне стресса достоверно повышал экспрессию гена *s100a10* (Рисунок 4.11). Как обсуждалось ранее этот ген участвует в обеспечении стрессоустойчивости, и его индукция рассматривается как важный механизм эндогенной нейропротекции. Таким образом, нимесулид демонстрирует сложный, многонаправленный профиль действия: наряду с частичным подавлением провоспалительной сигнализации, препарат стимулирует нейропротективные механизмы нервной системы.

Для дальнейшей работы была выбрана концентрация 2,5 мг/л при воздействии в течение 1 недели, поскольку данная концентрация не оказывает негативного влияния на поведение и демонстрирует способность нормализовать уровень экспрессии некоторых маркеров нейровоспаления. Следует также

отметить, что воздействие нимесулида длительностью более 1 недели на фоне стресса сопровождается высокой смертностью, по-видимому, связанной с гепатотоксичностью препарата, которая потенцируется хроническим стрессом, как ранее было показано в исследованиях на грызунах [361-363].

Таким образом, основными результатами данной главы являются подбор оптимальных концентраций и сроков воздействия миноциклина и нимесулида в модели 2-недельного хронического стресса у *Danio rerio* и выявление их дозозависимых эффектов. Показано, что миноциклин в концентрации 50 мг/л оказывает седативное действие, но достоверно подавляет экспрессию провоспалительных маркеров (*nos2a, cox2*) и повышает экспрессию нейропротективного маркера (*s100a10*), тогда как концентрация 25 мг/л оказывает некоторый анксиолитический эффект при введении на фоне стресса. В отношении нимесулида выявлена выраженная токсичность при длительном применении, проявляющаяся высокой смертностью животных, по-видимому, связанной с гепатотоксичностью, потенцируемой стрессом. При этом нимесулид демонстрирует парадоксальную двойственность действия на маркеры нейровоспаления, сочетая подавление одних провоспалительных генов (*cox2, il1b*) с индукцией других (*nos2a*), но одновременно стимулируя экспрессию нейропротективного маркера *s100a10*. Для дальнейших исследований в моделях пролонгированного стресса (Глава 5) были выбраны концентрации 25 мг/л для миноциклина и 2,5 мг/л для нимесулида при 1-недельном сроке воздействия, что позволяет минимизировать неспецифические эффекты и оценить их корректирующий потенциал.

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В МОДЕЛЯХ ХНС5 И ХНС12

5.1 Результаты

Полные данные о статистически значимых эффектах, выявленных в настоящем исследовании, представлены в таблицах В.1-В.4 (приложение В). В настоящей главе оценивали способность миноциклина (25 мг/л) и нимесулида (2,5 мг/л), вводимых 1-недельным курсом, корректировать тревожно-подобный (модель ХНС5) и депрессивно-подобный (модель ХНС12) фенотипы у взрослых *Danio rerio* в сравнении с классическим антидепрессантом флуоксетином. В каждой временной точке сравнивали восемь групп: контроль (К), флуоксетин (Ф), нимесулид (Н), миноциклин (М), стресс (С), стресс + флуоксетин (СФ), стресс + нимесулид (СН) и стресс + миноциклин (СМ). Результаты поведенческого анализа проиллюстрированы на рисунках 5.1-5.2, экспрессии генов на рисунках 5.3-5.4, уровня моноаминов на рисунке 5.5, проницаемости ГЭБ на рисунке 5.6.

В модели ХНС5 стресс (С) увеличивал длительность замираний и эпизодов высокой подвижности в ТНА. Введение флуоксетина (Ф) увеличивало время, проведенное в верхней зоне аквариума, и снижало латентный период первого выхода наверх по сравнению с контролем. Введение миноциклина (М) увеличивало длительность периодов высокой подвижности в ТНА, тогда как введение нимесулида (Н) не оказывало статистически значимых эффектов. Введение флуоксетина на фоне стресса (СФ) приводило к наиболее выраженному изменению поведенческих показателей. Животные этой группы демонстрировали наибольшее время пребывания в верхней зоне, наименьший латентный период первого выхода наверх, а также снижение длительности замираний, повышение которой наблюдалось в группе стресса (С). При этом препарат не снижал длительность эпизодов высокой подвижности, которая была увеличена в группе стресса (С). Введение нимесулида на фоне стресса (СН) увеличивало время пребывания в верхней зоне и снижало латентный период первого выхода наверх по сравнению с контролем. Кроме того, по сравнению с группой стресса, данный препарат

увеличивал частоту выходов в верхнюю зону и уменьшал длительность замираний. Введение миноциклина на фоне стресса (СМ) увеличивало время пребывания в верхней зоне, а также снижало длительность замираний и длительность периодов высокой подвижности, до уровня контрольных значений. В ТИХ статистически значимых различий между группами в модели ХНС5 выявлено не было (Рисунок 5.1, 5.2, Таблица В.1).

В модели ХНС12 стресс (С) вызывал комплекс поведенческих нарушений, который проявлялся в снижении времени пребывания в верхней зоне и частоты выходов наверх, увеличении латентного периода выхода наверх и длительности замираний в ТНА, а также в снижении активности в ТИХ по сравнению с контролем. Введение препаратов животным оказывало специфическое влияние. Так, нимесулид (Н) снижал время пребывания в верхней зоне в ТНА и активность в ТИХ, тогда как миноциклин (М) увеличивал латентный период первого выхода наверх. Введение флуоксетина на фоне стресса (СФ) возвращало большинство изменённых поведенческих показателей к уровню контроля. Введение нимесулида на фоне стресса (СН) также возвращало сниженные показатели времени пребывания в верхней зоне и частоту выходов наверх, а также активность в ТИХ к контрольным значениям, однако препарат не снижал увеличенный латентный период выхода наверх. Напротив, миноциклин на фоне стресса (СМ) не оказывал корригирующего действия. Животные этой группы не только сохраняли сниженное время пребывания в верхней зоне и низкую активность в ТИХ, но и демонстрировали еще большую длительность замираний по сравнению с группой стресса (Рисунок 5.1, 5.2, Таблица В.1).

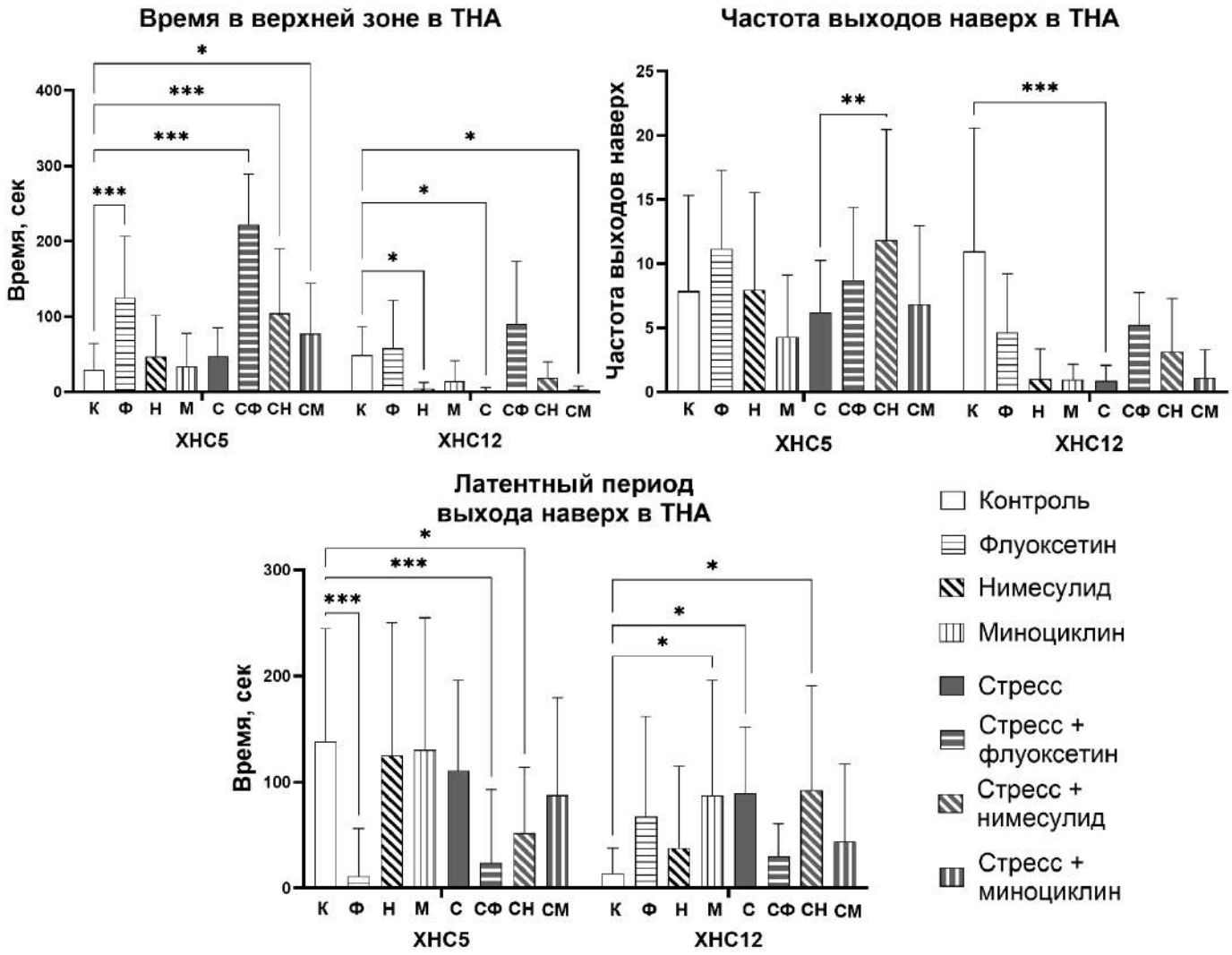


Рисунок 5.1 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) в моделях ХНС5 и ХНС12. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака. *- $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$. (см. Таблицу В.1 с результатами статистического анализа). Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (n = 20 на группу)

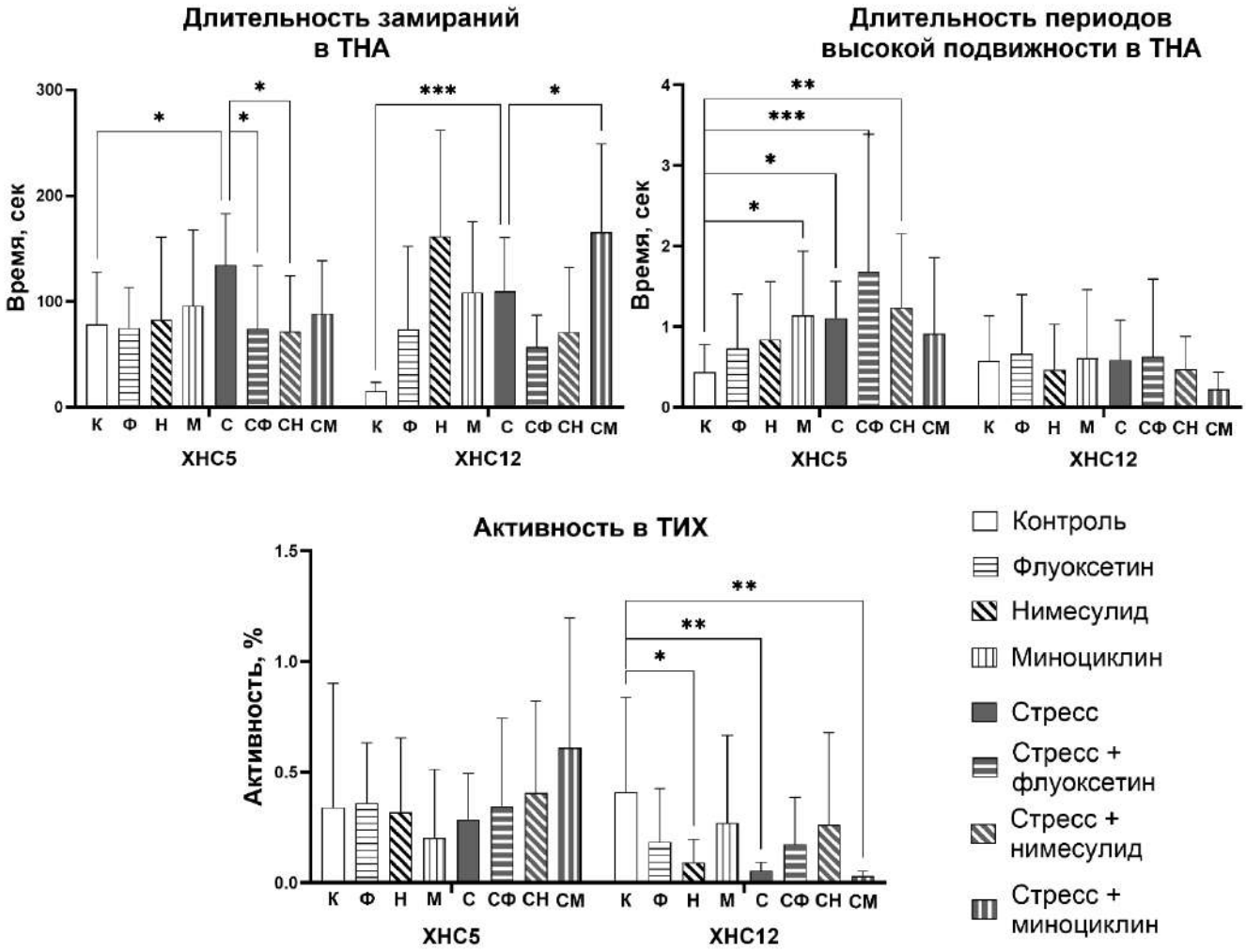


Рисунок 5.2 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) в моделях ХНС5 и ХНС12. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака.*- $p<0,05$,** - $p<0,01$,*** - p<0,001 (см. Таблицу В.1 с результатами статистического анализа). Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (n = 20 на группу)

В модели ХНС5 стресс (С) вызывал выраженные изменения на молекулярно-генетическом уровне. По сравнению с контролем повышалась экспрессия провоспалительных маркеров *(nos2a*, *cox2*), нейропротективного маркера (*s100a10*), гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*) и эпигенетического фермента *hdac4*. Все три препарата эффективно подавляли стресс-индуцированную гиперэкспрессию *nos2a*, так как в группах СФ, СН и СМ его уровень достоверно

снижался по сравнению с группой стресса. Флуоксетин, нимесулид и миноциклин также нормализовали экспрессию *hdac4*, повышенную под действием стресса (СФ, СН, СМ). Нимесулид дополнительно снижал стресс-индуцированную экспрессию *s100a10* (СН). Вместе с тем введение миноциклина на фоне стресса (СМ) не нормализовало уровень экспрессии *cox2*, повышенный в результате действия стресса. При этом введение нимесулида и миноциклина на фоне стресса (СН, СМ) нормализовало уровень экспрессии гена *gr* до значений контрольной группы (Рисунок 5.3, 5.4, Таблица В.2).

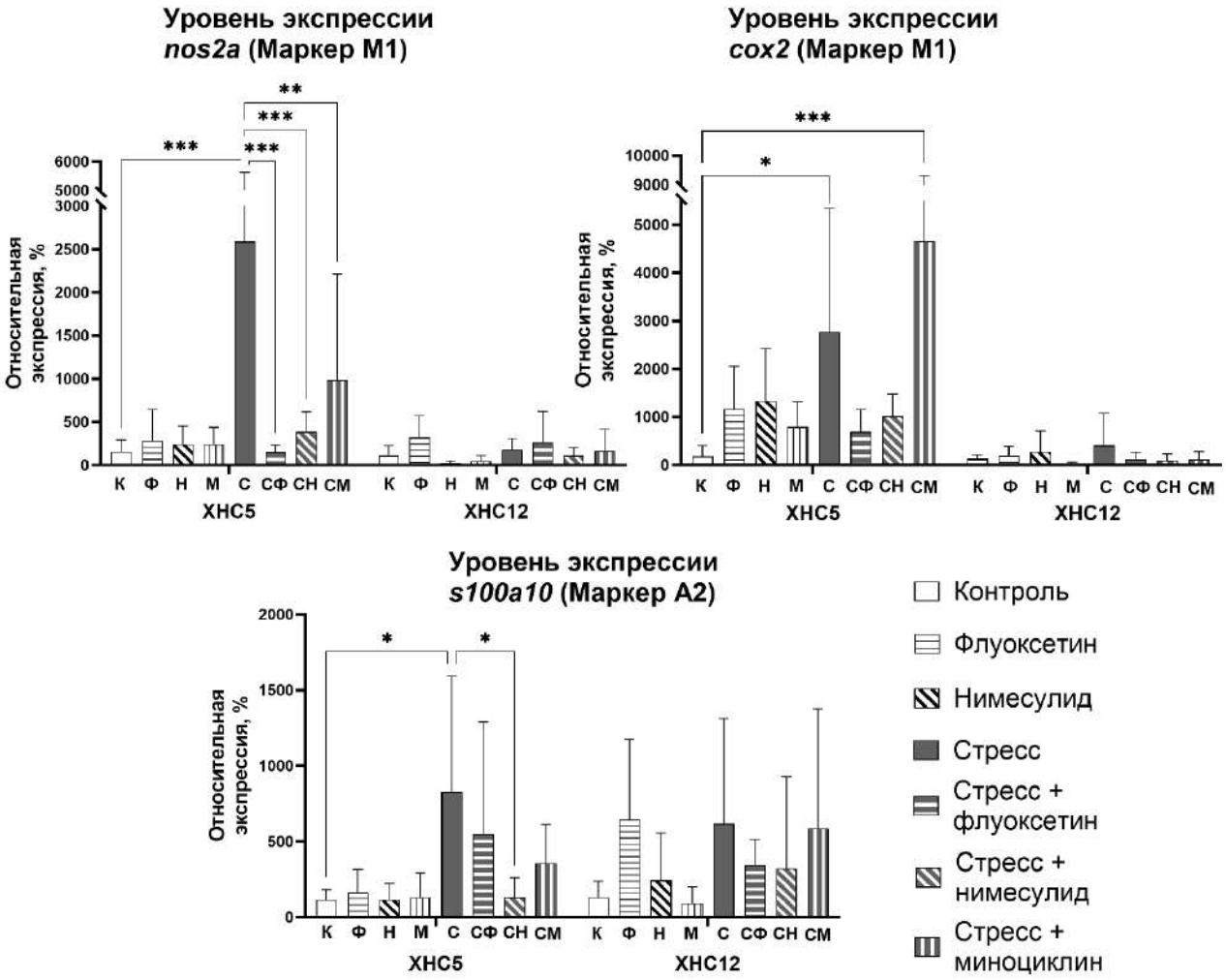


Рисунок 5.3 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на уровень экспрессии генов – маркеров нейровоспаления в мозге взрослых *Danio rerio* в моделях ХНС5 и ХНС12. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н - нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака. *- $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$. (см. Таблицу В.2 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 7-10 на группу)

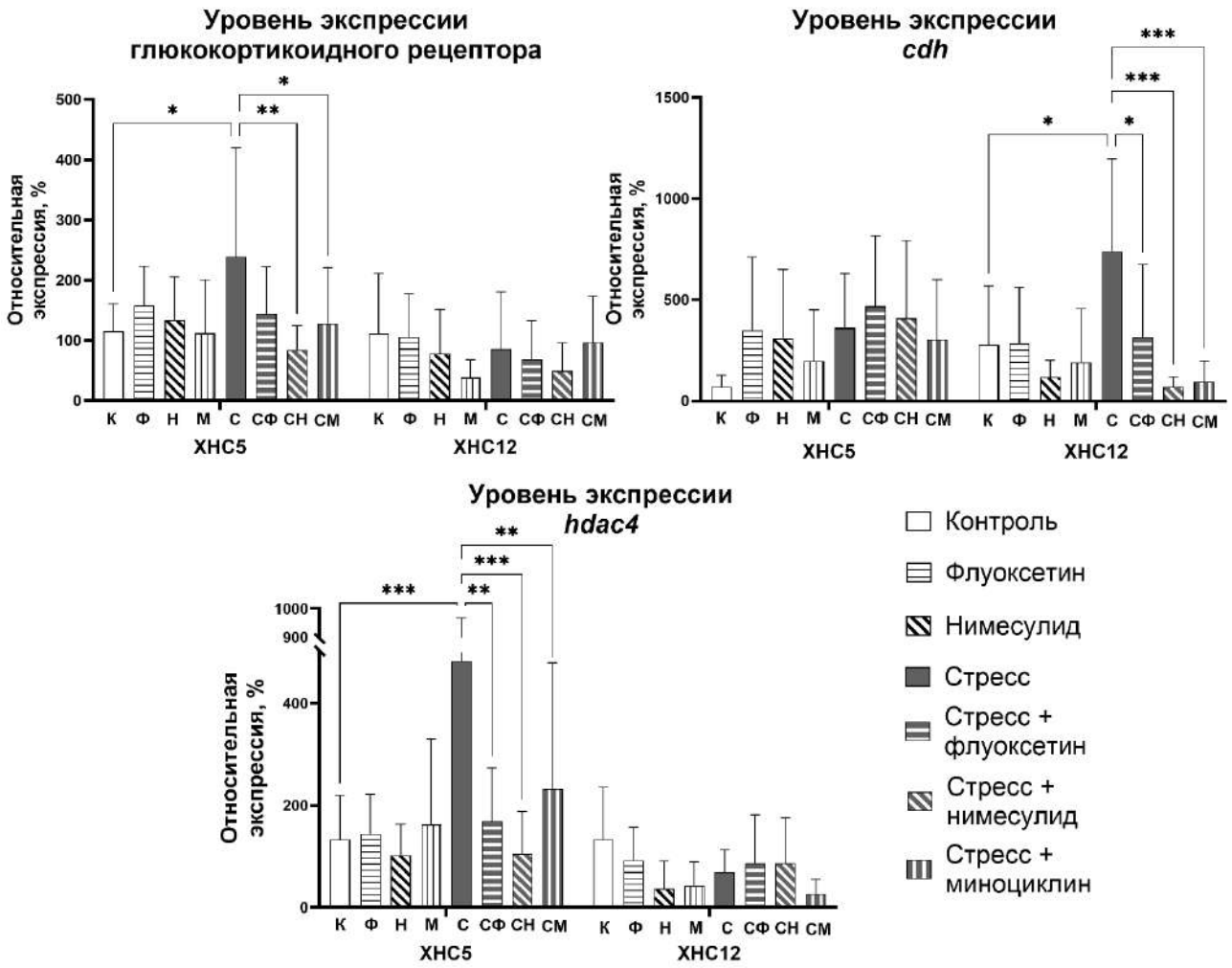


Рисунок 5.4 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на уровень экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*), гена *cdh* и гена эпигенетического фермента *hdac4* в мозге взрослых *Danio rerio* в моделях ХНС5 и ХНС12. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака. *- $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - p<0,001. (см. Таблицу В.2 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 7-10 на группу)

В модели ХНС12 признаки нейровоспаления, характерные для 5-й недели стресса, не наблюдались. В частности, уровни экспрессии *nos2a* и *cox2* в группе стресса (С) не отличались от контрольных значений. Однако стресс (С) достоверно повышал экспрессию гена *cdh1*, кодирующего Е-кадгерин и ассоциированного с развитием депрессивно-подобного состояния. Все три исследуемых препарата нормализовали экспрессию *cdh1*, возвращая ее уровню контроля. При этом эффект

нимесулида и миноциклина оказался наиболее выраженным (группы СН и СМ, $p < 0,001$ по сравнению с группой стресса). Анализ экспрессии генов *hdac4, s100a10* и *gr* в модели ХНС12 не выявил достоверных различий между экспериментальными группами (Рисунок 5.3, 5.4, Таблица В.2).

Нейрохимический анализ продемонстрировал специфическое влияние исследуемых препаратов на метаболизм моноаминов. В модели ХНС5 нимесулид и миноциклин достоверно повышали соотношение 5-ГИУК/серотонин, что отражает увеличение интенсивности метаболизма серотонина. Данный эффект наблюдался как при введении препаратов без стрессового воздействия (группы Н и М), так и на фоне действия ХНС (группы СН и СМ). При этом уровень норадреналина достоверно не изменялся.

В модели ХНС12 стресс (С) вызывал повышение уровня норадреналина по сравнению с контролем, что свидетельствует о стресс-индуцированной активации симпатоадреналовой системы. Введение нимесулида и миноциклина на фоне стресса (группы СН и СМ) нормализовало этот показатель, возвращая уровень норадреналина к контрольным значениям. Интенсивность метаболизма дофамина, оцениваемая по соотношению ДОФУК/дофамин, не отличалась от контрольных значений ни в одной из экспериментальных групп и временных точек (Рисунок 5.5, Таблица В.3).

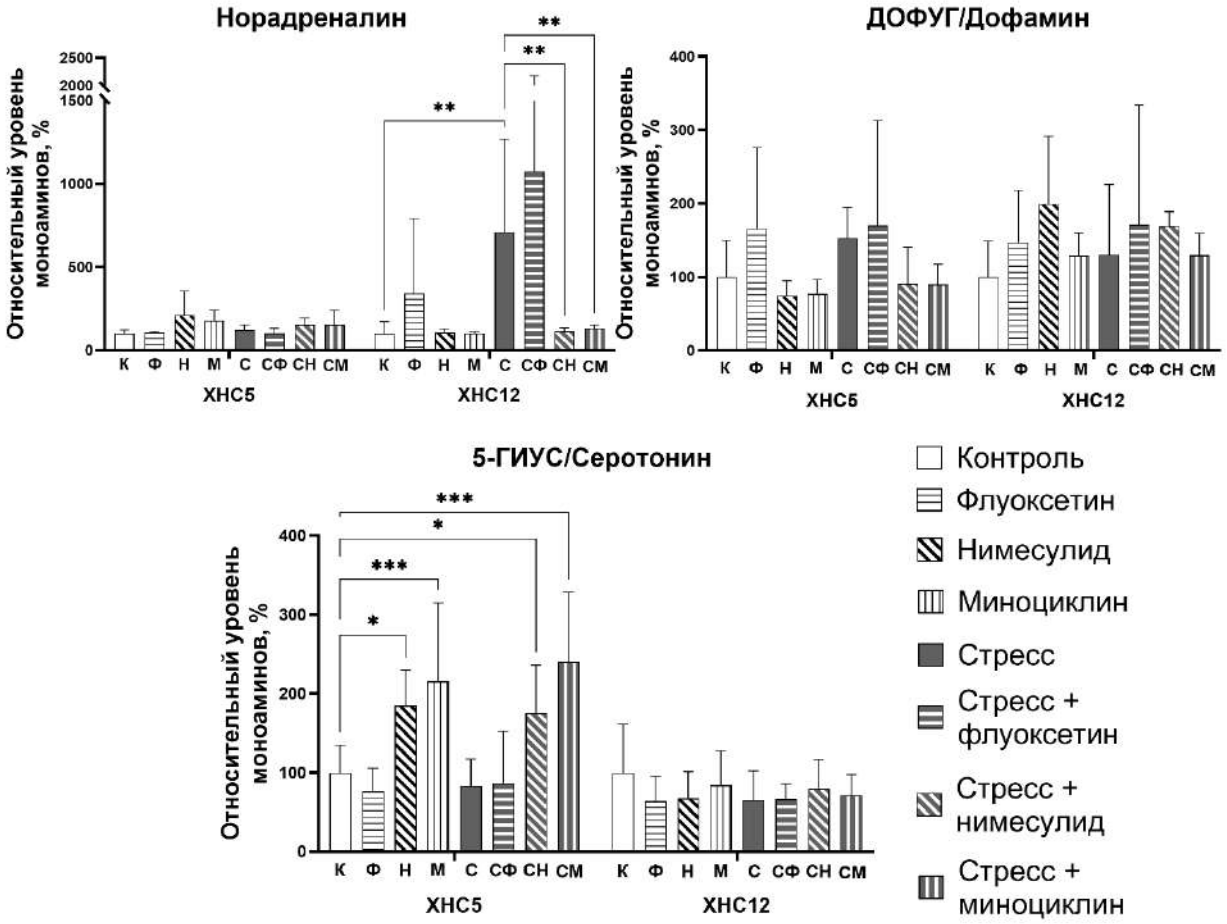


Рисунок 5.5 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на уровень моноаминов и их оборот (норадреналин, соотношение 5-ГИУК/серотонин, соотношение ДОФУК/дофамин) в мозге взрослых *Danio rerio* в моделях ХНС5 и ХНС12. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака. *- $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$ (см. Таблицу В.3 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 7 на группу)

Данные о влиянии ХНС и фармакологических препаратов на проницаемость ГЭБ представлены на рисунке 5.6. В модели ХНС5 ни стресс, ни введение исследуемых препаратов не оказывали влияния на проницаемость ГЭБ. В модели ХНС12 стресс (С) увеличивал проницаемость ГЭБ по сравнению с контрольной группой. При этом введение флуоксетина, нимесулида и миноциклина на фоне стресса (СФ, СН и СМ) нормализовало этот показатель, возвращая проницаемость ГЭБ к уровню контроля (Рисунок 5.6, Таблица В.4).

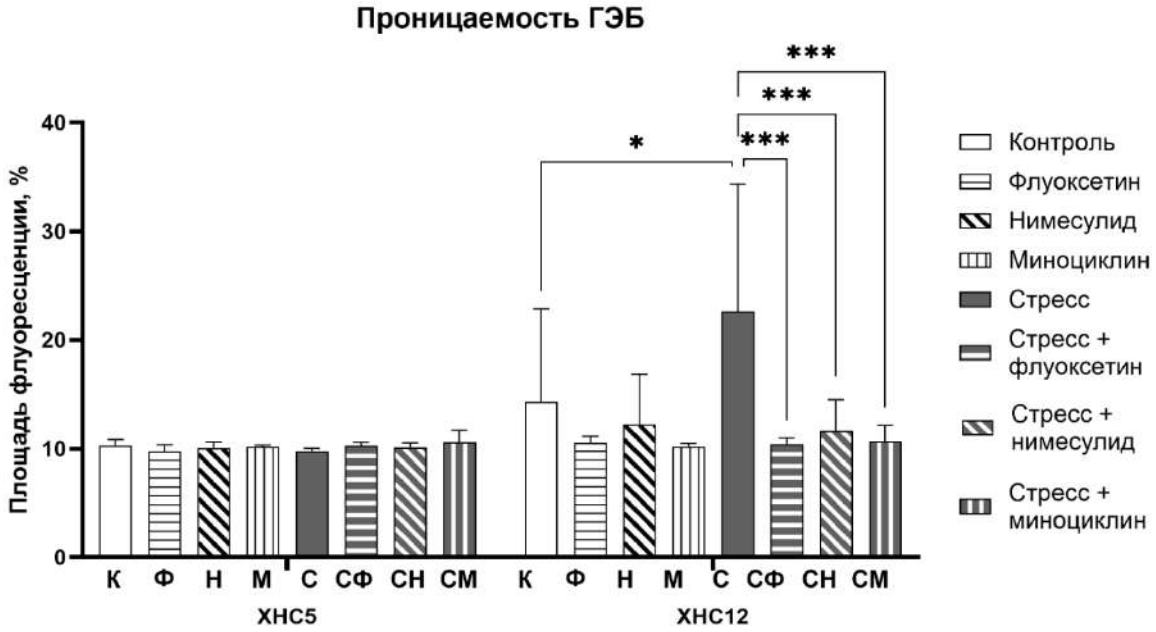


Рисунок 5.6 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на проницаемость ГЭБ в мозге взрослых *Danio rerio* в моделях ХНС5 и ХНС12. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака.*- $p<0,05$, *** - $p<0,001$ (см. Таблицу В.4 с результатами статистического анализа). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5 на группу)

5.2 Обсуждение

Настоящая глава посвящена оценке терапевтического потенциала миноциклина и нимесулида в моделях пролонгированного хронического стресса, соответствующих тревожно-подобной (ХНС5) и депрессивно-подобной (ХНС12) стадиям формирования аффективной патологии. В качестве препарата сравнения использовали флуоксетин, классический антидепрессант группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина, широко применяемый в клинической практике и валидированный на модели *Danio rerio*. Такой дизайн позволил оценить эффективность противовоспалительной коррекции, а также сопоставить её с действием эталонного антидепрессанта на разных стадиях аффективного патогенеза.

Результаты, демонстрирующие влияние длительности ХНС на формирование аффективного патогенеза у *Danio rerio*, в настоящей серии (Глава 5) несколько отличаются от данных первой экспериментальной серии (Глава 3). Далее мы разберем эти особенности последовательно.

Результаты поведенческого анализа свидетельствуют о формировании тревожно-подобного фенотипа при ХНС5. Несмотря на то, что стресс не вызвал снижения времени, проводимого животными в верхней зоне установки и не увеличил значение латентного периода (которые являются основными параметрами, характеризующими уровень тревожности у *Danio rerio*), мы наблюдаем увеличение длительности замираний и длительности периодов высокой подвижности (Рисунок 5.1, 5.2). Эти параметры также ассоциированы с фенотипом тревоги у *Danio rerio* [294, 364]. Примечательно, что повышение длительности замираний является устойчивым маркером стресс-индуцированной тревожности, поскольку аналогичные изменения были выявлены нами ранее в Главе 3 при анализе поведенческих эффектов ХНС5 (Рисунок 3.1).

ХНС12 формирует выраженный тревожно-подобный фенотип, который характеризуется снижением частоты выходов и времени пребывания в верхней зоне аквариума, а также увеличением латентного периода и длительности замираний. Дополнительно пролонгированный стресс индуцирует депрессивно-подобное поведение, проявляющееся в снижении активности в тесте ТИХ (Рисунок 5.1, 5.2). Таким образом, поведенческие данные подтверждают зависимость эффектов от длительности стрессового воздействия. В то время как 5 недель ХНС формируют преимущественно тревожно-подобный профиль, к 12-й неделе он усугубляется и трансформируется в комплексное тревожно-депрессивное состояние.

На уровне экспрессии генов анализ показал, что ХНС5 индуцирует экспрессию провоспалительных маркеров *(nos2a, cox2*), что, вероятно, свидетельствует о наличии воспалительной активности в ЦНС (Рисунок 5.3). Одновременно с этим выявлено повышение экспрессии нейропротективного маркера *s100a10* и гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*) после 5 недель стресса,

а также гена *cdh1*, ассоциированного с депрессивным расстройством, после 12 недель стресса. Эти данные полностью воспроизводят результаты, полученные в Главе 3 (Рисунок 5.3, 5.4). При этом после ХНС12 не выявлено роста экспрессии маркеров противовоспалительной активности, который был зафиксирован ранее. В данном случае мы просто фиксируем отсутствие выраженного нейровоспаления на позднем этапе стрессового воздействия. Кроме того, установлена иная динамика экспрессии гена *hdac4*. Если в Главе 3 его повышение выявлялось после 12 недель стресса, то в настоящем эксперименте оно демонстрируется уже после 5 недель (Рисунок 5.4).

Анализ нейрохимических параметров также выявил определенные сдвиги. В данной серии не показано изменение интенсивности метаболизма серотонина после 12 недели стресса. Вместо этого происходит увеличение уровня норадреналина, которое ранее выявлялось после 5 недели ХНС (Рисунок 5.5). Примечательно, что также повышение проницаемости ГЭБ, которое в Главе 3 наблюдалось на 5-й неделе, в настоящем эксперименте обнаружено только на 12-й неделе (Рисунок 5.6).

Обобщая эти данные, можно заключить, что наиболее устойчивыми к воспроизведению являются параметры экспрессии провоспалительных генов (*nos2a, cox2*), нейропротективного гена *s100a10*, глюкокортикоидного рецептора (*gr*) и *cdh1*, ассоциированного с депрессивным состоянием. Остальные параметры, изученные нами, хоть и воспроизводятся в целом, но варьируют в пределах изученных временных точек. Предположительно, это может быть связано с разной чувствительностью партии рыб к хроническому стрессу. Различия в чувствительности между партиями животных являются хорошо описанным в литературе явлением и могут существенно влиять на поведенческие и молекулярные ответы на хронический стресс [275, 276, 365, 366]. Так, в частности, показано, что изменение проницаемости ГЭБ зависит от стрессоустойчивости мышей и может не проявляться у устойчивых особей [349]. Кроме того, есть ряд работ, которые показывают, что проницаемость ГЭБ в целом не изменяется после хронического стресса [367]. Возможно, рыбы данной серии были более устойчивы

в целом, и мы наблюдаем более растянутые во времени патогенетические изменения. Так, в начале выявляются изменения экспрессии генов (в том числе провоспалительных), которые затем вызывают нарушение ГЭБ и повышение норадреналина. Можно предположить, что эти процессы затянулись до 12 недели стресса, при этом еще не начался рост активации противовоспалительной активности и снижение интенсивности метаболизма серотонина, наблюдаемые нами в Главе 3. С другой стороны, нельзя исключить, что вариабельные параметры не являются обязательными патогенетическими изменениями, а отражают индивидуальные различия в ответ на стрессовое воздействие. В этом случае только устойчиво воспроизводимые параметры можно рассматривать как ключевые компоненты патогенеза. Тем не менее, для проверки обеих гипотез нужны дополнительные повторные серии с предварительным скринингом стрессоустойчивости животных. - проверить

Эффективность препарата сравнения (флуоксетина) подтвердила адекватность использованных моделей хронического стресса. В частности, флуоксетин при введении контрольным животным и при введении на фоне стресса (СФ) демонстрировал классический анксиолитический и антидепрессивный профиль, а именно увеличивал время пребывания в верхней зоне аквариума, снижал латентный период выхода наверх в ТНА и нормализовал изменённые под действием стресса поведенческие показатели в обеих временных точках (Рисунок 5.1, 5.2). Это согласуется с многочисленными исследованиями на грызунах и рыбах, подтверждающими эффективность флуоксетина в коррекции стресс-индуцированных аффективных нарушений [27, 283, 292, 368-371], и служит внутренним контролем корректности постановки эксперимента.

Ключевым результатом главы является демонстрация того, что эффективность противовоспалительной коррекции у *Danio rerio* зависит от стадии формирования аффективной патологии. В модели ХНС5, соответствующей тревожно-подобному состоянию с активным нейровоспалением, миноциклин и нимесулид оказывали более выраженное корректирующее действие. На уровне поведения наиболее отчётливый анксиолитический эффект продемонстрировал

нимесулид, а именно, на фоне стресса (СН) он увеличивал время пребывания и частоту выходов в верхнюю зону аквариума, снижал латентный период выхода наверх и уменьшал длительность замираний (Рисунок 5.1, 5.2). Миноциклин также оказал некоторый корректирующий эффект на поведение, но он был менее выражен, чем эффект нимесулида, так как нормализовал меньше параметров в ТНА. В частности, введение миноциклина на фоне стресса увеличило время, проводимое животными в верхней зоне установки, и привело значения длительности замираний и длительности периодов высокой подвижности к уровню контроля (Рисунок 5.1, 5.2).

На молекулярно-генетическом уровне оба препарата достоверно подавляли стресс-индуцированную гиперэкспрессию провоспалительного маркера *nos2a* и эпигенетического фермента *hdac4*, возвращая их к контрольным значениям (Рисунок 5.3, 5.4). Это указывает на способность миноциклина и нимесулида подавлять провоспалительную активность в ЦНС *Danio rerio* именно на той стадии стресса, когда развивается нейровоспаление (Глава 3). Полученные результаты согласуются с данными на грызунах, где миноциклин и ингибиторы ЦОГ-2 снижают выраженность стресс-индуцированного нейровоспаления и сопутствующего тревожно-депрессивного поведения [284, 285, 372-374]. Таким образом, фармакологическое ингибирование ЦОГ-2 не только подавляет молекулярные маркеры нейровоспаления, но и способствует снижению тревожности, что согласуется с гипотезой о причинно-следственной связи между нейровоспалением и формированием тревожно-подобного фенотипа.

Также важным наблюдением стало то, что оба противовоспалительных препарата нормализовали стресс-индуцированную гиперэкспрессию гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*) (Рисунок 5.4). Повышение экспрессии *gr* является маркером нарушения регуляции ГГН-оси и дезадаптации стресс-реакции [355]. Способность миноциклина и нимесулида возвращать уровень *gr* к контрольным значениям может свидетельствовать об их возможности не только подавлять локальное нейровоспаление, но и восстанавливать чувствительность тканей мозга к глюкокортикоидам.

Вместе с тем, эффекты противовоспалительных препаратов на молекулярном уровне оказались избирательными. Совместное введение миноциклина и стресса (СМ) не оказало корректирующего действия на уровень экспрессии *cox2*, несмотря на подавление *nos2a* (Рисунок 5.3). Этот результат контрастирует с рядом литературных данных, указывающих на способность миноциклина подавлять экспрессию *cox2* [375, 376]. Вероятно, выбранная концентрация препарата или специфика временной точки оказались достаточными для модуляции NO-зависимых путей, но недостаточными для преодоления стресс-индуцированной активации *cox2*. Кроме того, нимесулид снижал стресс-индуцированную экспрессию нейропротективного маркера астроглии *s100a10* (СН), что, по-видимому, может отражать уменьшение потребности в эндогенных компенсаторных механизмах на фоне общего подавления нейровоспаления (Рисунок 5.3). Эти данные предположительно свидетельствуют о том, что противовоспалительная терапия оказывает комплексное, разнонаправленное воздействие на глиальный ответ, а не простое подавление воспаления.

Принципиально иная картина наблюдалась в модели ХНС12, соответствующей депрессивно-подобному фенотипу. Как было показано в главе 3, к 12-й неделе стресса нейровоспаление сменяется активацией противовоспалительных генов. В настоящем исследовании уровни провоспалительных маркеров (*nos2a, cox2*) в группе стресса не были повышены (Рисунок 5.3). Закономерным следствием этого стала неэффективность противовоспалительной терапии на поведенческом уровне. В частности, миноциклин на фоне стресса (СМ) не корректировал анксиогенный и депрессивно-подобный фенотип. Напротив, флуоксетин (СФ), действующий через серотонинергический, а не противовоспалительный механизм, эффективно нормализовал поведение и на этой стадии. Нимесулид на фоне стресса (СН) оказал некоторый корректирующий эффект на уровне поведения, но он значительно менее выражен по сравнению с флуоксетином или даже по сравнению с действием нимесулида на 5 неделе стресса, так как проявлялось в нормализации некоторых, но далеко не всех параметров, нарушенных действием ХНС12 (Рисунок 5.1, 5.2).

Тем не менее на молекулярном и нейрохимическом уровнях противовоспалительные препараты сохраняли определённую активность и в модели ХНС12. Все три препарата возвращали к норме повышенную под действием стресса экспрессию гена *cdh1* (Рисунок 5.4), молекулярного маркера депрессивного состояния, ассоциированного с аффективной патологией у человека и *Danio rerio* [299]. Кроме того, нимесулид и миноциклин нормализовали стресс-индуцированное повышение уровня норадреналина, отражающее гиперактивацию симпатоадреналовой системы (Рисунок 5.5). Также все препараты нормализовали проницаемость ГЭБ (Рисунок 5.6). Таким образом, на 12-й неделе стресса противовоспалительные препараты сохраняют способность модулировать отдельные стресс-индуцированного патогенеза, однако этого оказывается недостаточно для коррекции уже сформировавшегося устойчивого депрессивно-подобного фенотипа.

Отдельного внимания заслуживает влияние противовоспалительных препаратов на обмен серотонина. В модели ХНС5 нимесулид и миноциклин повышали соотношение 5-ГИУК/серотонин, что свидетельствует об усилении интенсивности метаболизма серотонина (Рисунок 5.5). Учитывая ключевую роль серотонинергической системы в патогенезе аффективных расстройств, данный эффект может представлять собой дополнительный, не связанный напрямую с подавлением нейровоспаления, механизм анксиолитического действия этих препаратов на ранней стадии стресса. Это согласуется с литературными данными, демонстрирующими способность нимесулида модулировать серотонинергическую систему через увеличение экспрессии кальциневрина, который регулирует активность SERT и тем самым влияет на обмен серотонина [377]. Кроме того, подавление нейровоспаления может снимать индуцированное цитокинами ингибирование синтеза серотонина (через путь IDO), что также отражается на общем метаболизме нейромедиатора [243]. Примечательно, что флуоксетин не оказал влияния на интенсивность метаболизма серотонина. Это может быть связано с активацией компенсаторных механизмов в ответ на повышение концентрации серотонина в синаптической щели. Известно, что при длительном

повышении уровня серотонина происходит десенситизация его рецепторов (в частности, 5-HT_1A, 5-HT_1B, 5-HT_2A и 5-HT_2C), а также изменение экспрессии генов, кодирующих триптофангидроксилазу 2 (TPH2), SERT и моноаминоксидазу (MAO). В частности, было показано, что двухнедельное введение флуоксетина мышам может приводить к снижению экспрессии генов SERT и MAO-A, при этом уровни самого серотонина и 5-ГИУК остаются неизменными [378].

Таким образом, основным результатом данной главы является демонстрация существования у *Danio rerio* «терапевтического окна» для противовоспалительной коррекции аффективных расстройств, определяемого стадией нейровоспалительного процесса. Противовоспалительные препараты эффективны преимущественно на ранней стадии развития аффективной патологии (ХНС5), когда нейровоспаление находится в активной фазе. Эффективность противовоспалительной терапии на 5-й неделе, но не на 12-й, дополнительно подтверждает значимость нейровоспаления как одного из патогенетических процессов на ранней стадии формирования аффективной патологии. Напротив, на поздней стадии (ХНС12), когда выраженной провоспалительной активации не наблюдается, противовоспалительные препараты оказываются менее эффективными, что может свидетельствовать о снижении вклада нейровоспаления в патогенетические механизмы на данном этапе. При этом антидепрессант флуоксетин сохраняет эффективность на обеих стадиях, что подчёркивает различия в механизмах действия препаратов группы СИОЗС и противовоспалительной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая диссертационная работа была посвящена исследованию временной динамики формирования аффективной патологии в условиях пролонгированного хронического непредсказуемого стресса у *Danio rerio* и оценке терапевтического потенциала противовоспалительных препаратов на разных стадиях патологического процесса.

В первой экспериментальной главе была охарактеризована временная динамика поведенческих, нейрохимических и молекулярно-генетических изменений при формировании аффективной патологии. Показано, что к 5-й неделе стресса развивается тревожно-подобный фенотип, сопровождающийся активацией провоспалительных маркеров (*nos2a*, *cox2*). На 12-й неделе стресса тревожно-подобное поведение сменяется депрессивно-подобным фенотипом, при этом наблюдается переход к противовоспалительному ответу.

Во второй экспериментальной главе были определены оптимальные концентрации и режимы введения противовоспалительных препаратов (миноциклина и нимесулида) в модели 2-недельного хронического стресса. Показано, что 2-недельный хронический стресс, по-видимому, находится в переходной фазе между активной резистентностью и началом формирования аффективного патогенеза, что проявляется в противоречивом поведенческом фенотипе и снижении воспалительной активности. Выявлено, что миноциклин обладает дозозависимым седативным эффектом, при этом концентрация 25 мг/л оказывает небольшой анксиолитический эффект при введении препарата на фоне стресса. Для нимесулида обнаружена выраженная токсичность при длительном применении, проявляющаяся высокой смертностью животных. При сокращении курса до 1 недели нимесулид демонстрирует способность модулировать экспрессию маркеров нейровоспаления.

В третьей экспериментальной главе была оценена терапевтическая эффективность противовоспалительных препаратов на разных стадиях формирования аффективной патологии. Показано, что на ранней стадии

хронического стресса (5 недель), характеризующейся тревожно-подобным поведением, миноциклин и нимесулид эффективно подавляют стресс-индуцированную гиперэкспрессию провоспалительных маркеров и оказывают анксиолитическое действие. На поздней стадии (12 недель), соответствующей депрессивно-подобному фенотипу, противовоспалительные препараты сохраняют лишь частичное влияние на молекулярные звенья патогенеза (нормализуют экспрессию *cdh1*, уровень норадреналина), однако в изученных концентрациях и при выбранном режиме введения этого оказывается недостаточно для коррекции уже сформировавшегося депрессивно-подобного поведения. При этом антидепрессант флуоксетин сохраняет эффективность на обеих стадиях, что подчеркивает различия в механизмах действия серотонинергической и противовоспалительной терапии.

Центральным выводом настоящей работы является доказательство того, что эффективность противовоспалительной терапии у *Danio rerio* при аффективных расстройствах зависит от стадии развития патологического процесса. Установлено, что вмешательство, направленное на подавление нейровоспаления, оказывает максимальный терапевтический эффект на ранних стадиях стресс-индуцированной патологии, характеризующихся выраженной провоспалительной реакцией. На поздних этапах, когда выраженная провоспалительная активность снижается и формируются устойчивые поведенческие нарушения, противовоспалительные препараты в использованных концентрациях и режимах введения, сохраняют лишь частичное влияние на молекулярные звенья патогенеза, недостаточное для коррекции сформировавшегося депрессивно-подобного фенотипа.

Следует отметить некоторые ограничения проведённого исследования. Во-первых, временная динамика стресс-ответа характеризуется межсерийной вариабельностью. Предположительно, это обусловлено разной исходной чувствительностью партий животных к хроническому стрессу, что требует дальнейшей экспериментальной верификации в новых сериях с обязательным предварительным скринингом стрессоустойчивости. Во-вторых, предложенная в работе концепция «переходной фазы стресса» для модели ХНС2 гипотезой,

подтверждение которой требует исследований, отслеживающих поведенческие и молекулярные изменения на множестве временных точек хронического непредсказуемого стресса. В-третьих, для молекулярного анализа использовалась классификация M1/M2 и A1/A2, основанная на устоявшемся применении данных генов в качестве маркеров глии в литературе по грызунам. При этом наличие эволюционно консервативных механизмов регуляции воспалительного и репаративного ответа глии, а также сходство функциональной роли ряда исследуемых генов у рыб и млекопитающих создают предпосылки для использования данной классификационной модели при исследовании *Danio rerio*. Однако, поскольку экспрессия мРНК в гомогенате всего мозга не позволяет однозначно установить клеточно-специфическую поляризацию, будущие исследования с применением гистологических подходов, таких как иммуногистохимия или секвенирование РНК единичных клеток, необходимы для подтверждения клеточной локализации и более полной валидации соответствующих фенотипических состояний. В-четвёртых, в настоящем исследовании не проводилась отдельная оценка половых различий, поскольку основной целью работы являлась характеристика временной динамики стресс-индуцированных изменений и эффектов противовоспалительной терапии, а размер выборки для молекулярно-генетического и нейрохимического анализа не позволял провести статистически достоверное сравнение между самцами и самками. Учитывая известные половые различия в реакциях на стресс и эффективности фармакологических вмешательств, детальное изучение влияния пола на молекулярные и поведенческие изменения при хроническом стрессе у *Danio rerio* представляет собой важное направление для будущих исследований. Также для нейрохимического анализа методом ВЭЖХ использовался гомогенат всей мозговой ткани, что обусловлено малыми размерами органа у *Danio rerio*. Данный подход не позволяет оценить региональные различия в уровне моноаминов между отдельными структурами, вносящими различный вклад в регуляцию аффективного состояния. Кроме того, совместное содержание животных каждой экспериментальной группы в одном аквариуме обеспечивало единообразие

условий стрессового и фармакологического воздействия, однако не позволяло исключить влияние аквариумного эффекта на исследуемые показатели. Наконец, хотя *Danio rerio* является хорошо валидированной моделью для изучения аффективных расстройств, видовые различия между рыбами и млекопитающими ограничивают прямую экстраполяцию полученных результатов на человека.

ВЫВОДЫ

1. При увеличении длительности стресса с 5 до 12 недель у рыб *Danio rerio* наблюдается переход от тревожного к депрессивно-подобному поведению, при этом рост уровня экспрессии маркеров нейровоспаления наблюдается только на 5 неделе хронического непредсказуемого стресса.
2. Анксиолитический эффект миноциклина на поведение в модели 2-недельного стресса достигается при введении препарата в концентрации 25 мг/л в течение 1 недели. Нимесулид в концентрации 2,5 мг/л при 1-недельном введении на фоне 2-недельного стресса не вызывает повышения тревожности и проявляет разнонаправленное модулирующее действие на маркеры нейровоспаления.
3. Миноциклин оказал слабовыраженный анксиолитический эффект на 5 неделе стресса, и не оказал анксиолитического и антидепрессивного эффекта на 12 неделе стресса. При этом миноциклин частично снизил экспрессию маркеров нейровоспаления на 5 неделе стресса.
4. Нимесулид оказал выраженный анксиолитический эффект на 5 неделе стресса, и слабо выраженные анксиолитический и антидепрессивный эффекты на 12 неделе стресса. При этом введение нимесулида снизило экспрессию маркеров нейровоспаления, повышенных при воздействии 5-недельного стресса.
5. Нейровоспаление у *Danio rerio* наблюдается в период до формирования устойчивого депрессивно-подобного фенотипа, что определяет временную зависимость эффективности использования противовоспалительной терапии от длительности хронического стресса

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

11-ГДГ – 11-гидроксистероиддегидрогеназа

5-ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота

АДГ – антидиуретический гормон

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АФК – активные формы кислорода

БДР – большое депрессивное расстройство

БЛМ – базолатеральная миндалина

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГГН – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось

ГР – глюкокортикоидный рецептор

ГТР – генерализованное тревожное расстройство

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота

длПФК – дорсолатеральная префронтальная кора

ИМАО – ингибиторы моноаминоксидазы

КСГ – кортикостероидсвязывающий глобулин

КРФ – кортикотропин-рилизинг-фактор

мПФК – медиальная префронтальная кора

МР – минералокортикоидный рецептор

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

ПФК – префронтальная кора

ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство

РХС – хронический стресс на ранних стадиях жизни

ССИ – стресс социальной изоляции

ТИХ – тест иммобилизации хвоста

ТНА – тест нового аквариума

ТЦА – трициклические антидепрессанты

ХНС – хронический непредсказуемый стресс

ХССП – хронический стресс социального поражения

ХСУ – хронический стресс удержания

ЦНС – центральная нервная система

ЦОГ2 – циклооксигеназа 2

СИОЗС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина

AMPA – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовые рецепторы

Arg-1 – аргиназа 1

BDNF – нейротрофический фактор мозга

C3 – компонент комплемента 3

CB1 – каннабиноидный рецептор 1

CD206 – маннозный рецептор

COX2 – циклооксигеназа 2

DAMP – повреждение-ассоциированные молекулярные паттерны

DNMT – ДНК-метилтрансферазы

FKBP5 – FK506-связывающий белок 5

GBP2 – гуанилат-связывающий белок 2

HAT – гистонацетилтрансферазы

HDAC – гистондеацетилазы

IL-1β – интерлейкин 1 бета

IL-6 – интерлейкин 6

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

NMDA – N-метил-D-аспартатные рецепторы

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PTX3 – пентраксин 3

S100A10 – кальций-связывающий белок A10

TGF-β – трансформирующий фактор роста бета

TNF-α – фактор некроза опухоли альфа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McGrath J. J., Lim C. C. W., Plana-Ripoll O., Holtz Y., Agerbo E., Momen N. C., Mortensen P. B., Pedersen C. B., Abdulmalik J., Aguilar-Gaxiola S., Al-Hamzawi A., Alonso J., Bromet E. J., Bruffaerts R., Bunting B., de Almeida J. M. C., de Girolamo G., De Vries Y. A., Florescu S., Gureje O., Haro J. M., Harris M. G., Hu C., Karam E. G., Kawakami N., Kiejna A., Kovess-Masfety V., Lee S., Mneimneh Z., Navarro-Mateu F., Orozco R., Posada-Villa J., Roest A. M., Saha S., Scott K. M., Stagnaro J. C., Stein D. J., Torres Y., Viana M. C., Ziv Y., Kessler R. C., de Jonge P. Comorbidity within mental disorders: a comprehensive analysis based on 145 990 survey respondents from 27 countries // Epidemiol Psychiatr Sci. — 2020. — Aug 12. — V. 29. — P. e153.
2. Mahmud S., Mohsin M., Dewan M. N., Muyeed A. The Global Prevalence of Depression, Anxiety, Stress, and Insomnia Among General Population During COVID-19 Pandemic: A Systematic Review and Meta-analysis // Trends Psychol. — 2023. — V. 31, № 1. — P. 143-170.
3. World Health Organization. Anxiety disorders. — 2025. — URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders (дата обращения: 16.07.2026).
4. World Health Organization. Depressive disorder (depression). — 2025. — URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression (дата обращения: 16.07.2026).
5. Pacher P., Kecskemeti V. Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? // Current medicinal chemistry. — 2004. — V. 11, № 7. — P. 925-943.
6. Voineskos D., Daskalakis Z. J., Blumberger D. M. Management of treatment-resistant depression: challenges and strategies // Neuropsychiatric disease and treatment. — 2020. — P. 221-234.
7. Kajumba M. M., Kakooza-Mwesige A., Nakasujja N., Koltai D., Canli T. Treatment-resistant depression: molecular mechanisms and management // Molecular biomedicine. — 2024. — V. 5, № 1. — P. 43.
8. Bhatt S., Devadoss T., Jha N. K., Baidya M., Gupta G., Chellappan D. K., Singh S. K., Dua K. Targeting inflammation: a potential approach for the treatment of depression // Metabolic Brain Disease. — 2023. — V. 38, № 1. — P. 45-59.
9. Mac Giollabhui N., Madison A. A., Lydston M., Lenoel Quang E., Miller A. H., Liu R. T. Effect of anti-inflammatory treatment on depressive symptom severity and anhedonia in depressed individuals with elevated inflammation: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // American Journal of Psychiatry. — 2026. — V. 183, № 1. — P. 70-79.
10. Gallas-Lopes M., Bastos L. M., Benvenutti R., Panzenhagen A. C., Piato A., Herrmann A. P. Ten years of unpredictable chronic stress in zebrafish: a systematic review and meta-analysis // bioRxiv. — 2022. — P. 2022.12. 12.520151.
11. White A. G., Elias E., Orozco A., Robinson S. A., Manners M. T. Chronic Stress-Induced Neuroinflammation: Relevance of Rodent Models to Human Disease // International Journal of Molecular Sciences. — 2024. — V. 25, № 10. — P. 5085.
12. Godoy L. D., Rossignoli M. T., Delfino-Pereira P., Garcia-Cairasco N., de Lima Umeoka E. H. A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications // Frontiers in behavioral neuroscience. — 2018. — V. 12. — P. 127.
13. Tian R., Hou G., Li D., Yuan T.-F. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health // The Scientific World Journal. — 2014. — V. 2014, № 1. — P. 780616.
14. Demin K. A., Lakstygal A. M., Krotova N. A., Masharsky A., Tagawa N., Chernysh M. V., Ilyin N. P., Taranov A. S., Galstyan D. S., Derzhavina K. A., Levchenko N. A., Kolesnikova T. O., Mor M. S., Vasyutina M. L., Efimova E. V., Katolikova N., Prjibelski A. D., Gainetdinov R. R., de Abreu M. S., Amstislavskaya T. G., Strekalova T., Kalueff A. V. Understanding complex dynamics of behavioral, neurochemical and transcriptomic changes induced by prolonged

chronic unpredictable stress in zebrafish // Scientific Reports. — 2020. — 2020/11/17. — V. 10, № 1. — P. 19981.
15. Demin K. A., Taranov A. S., Ilyin N. P., Lakstygal A. M., Volgin A. D., de Abreu M. S., Strekalova T., Kalueff A. V. Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish // Stress. — 2021. — V. 24, № 1. — P. 1-18.
16. Chowdhury S., Saikia S. K. Use of zebrafish as a model organism to study oxidative stress: a review // Zebrafish. — 2022. — V. 19, № 5. — P. 165-176.
17. Stewart A. M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerlai R., Kalueff A. V. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside // Trends in neurosciences. — 2014. — V. 37, № 5. — P. 264-278.
18. Cattaneo A., Riva M. A. Stress-induced mechanisms in mental illness: A role for glucocorticoid signalling // J Steroid Biochem Mol Biol. — 2016. — Jun. — V. 160. — P. 169-74.
19. Chen F., Polsinelli B., Nava N., Treccani G., Elfving B., Müller H. K., Musazzi L., Popoli M., Nyengaard J. R., Wegener G. Structural Plasticity and Molecular Markers in Hippocampus of Male Rats after Acute Stress // Neuroscience. — 2020. — 2020/07/01/. — V. 438. — P. 100-115.
20. Liu Y., Zhao J., Guo W. Emotional Roles of Mono-Aminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders // Frontiers in Psychology. — 2018. — V. 9. — P. 2201.
21. Knezevic E., Nenic K., Milanovic V., Knezevic N. N. The role of cortisol in chronic stress, neurodegenerative diseases, and psychological disorders // Cells. — 2023. — V. 12, № 23. — P. 2726.
22. Sah A., Singewald N. The (neuro)inflammatory system in anxiety disorders and PTSD: Potential treatment targets // Pharmacol Ther. — 2025. — May. — V. 269. — P. 108825.
23. Sălcudean A., Bodo C.-R., Popovici R.-A., Cozma M.-M., Păcurar M., Crăciun R.-E., Crisan A.-I., Enatescu V.-R., Marinescu I., Cimpian D.-M., Nan A.-G., Sasu A.-B., Anculia R.-C., Strete E.-G. Neuroinflammation—A Crucial Factor in the Pathophysiology of Depression—A Comprehensive Review // Biomolecules. — 2025. — V. 15, № 4. — P. 502.
24. Hassamal S. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories // Frontiers in Psychiatry. — 2023. — 2023-May-11. — V. 14. — P. 1130989.
25. Kappelmann N., Lewis G., Dantzer R., Jones P., Khandaker G. Antidepressant activity of anti-cytokine treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials of chronic inflammatory conditions // Molecular psychiatry. — 2018. — V. 23, № 2. — P. 335-343.
26. Peng Z., Peng S., Lin K., Zhao B., Wei L., Tuo Q., Liao D., Yuan T., Shi Z. Chronic stress-induced depression requires the recruitment of peripheral Th17 cells into the brain // Journal of Neuroinflammation. — 2022. — V. 19, № 1. — P. 186.
27. Demin K. A., Kolesnikova T. O., Galstyan D. S., Krotova N. A., Ilyin N. P., Derzhavina K. A., Levchenko N. A., Strekalova T., de Abreu M. S., Petersen E. V., Seredinskaya M., Cherneyko Y. V., Kositsyn Y. M., Sorokin D. V., Zabegalov K. N., Mor M. S., Efimova E. V., Kalueff A. V. Modulation of behavioral and neurochemical responses of adult zebrafish by fluoxetine, eicosapentaenoic acid and lipopolysaccharide in the prolonged chronic unpredictable stress model // Sci Rep. — 2021. — Jul 12. — V. 11, № 1. — P. 14289.
28. Piato Â. L., Capiotti K. M., Tamborski A. R., Oses J. P., Barcellos L. J., Bogo M. R., Lara D. R., Vianna M. R., Bonan C. D. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (Danio rerio): behavioral and physiological responses // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2011. — V. 35, № 2. — P. 561-567.
29. Pietsch C., Konrad J., Wernicke von Siebenthal E., Pawlak P. Multiple faces of stress in the zebrafish (Danio rerio) brain // Frontiers in Physiology. — 2024. — V. 15. — P. 1373234.
30. Zhdanov A. V., Khatsko S. L., Zabegalov K. N., Bytov M. V., Demin K. A., Galstyan D. S., de Abreu M. S., Amstislavskaya T. G., Kalueff A. V. Modeling Stress-Related Disorders in

Zebrafish Using Prolonged Predator Exposure and Prolonged Unpredictable Stress // Journal of Neuroscience Research. — 2025. — V. 103, № 6. — P. e70048.
31. Bienertova-Vasku J., Lenart P., Scheringer M. Eustress and distress: neither good nor bad, but rather the same? // BioEssays. — 2020. — V. 42, № 7. — P. 1900238.
32. Porcelli A. J., Delgado M. R. Stress and Decision Making: Effects on Valuation, Learning, and Risk-taking // Curr Opin Behav Sci. — 2017. — Apr. — V. 14. — P. 33-39.
33. Selye H. Stress and the general adaptation syndrome // Br Med J. — 1950. — Jun 17. — V. 1, № 4667. — P. 1383-92.
34. Stanojlović O., Sutulovic N., Mladenović D., Zubelić A., Hrnčić D., Rasic-Markovic A., Veskovic M. Neurophysiology of stress: From historical to modern approach // Medicinska istrazivanja. — 2022. — 01/01. — V. 55. — P. 51-57.
35. Rohleder N. Stress and inflammation – The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects // Psychoneuroendocrinology. — 2019. — 2019/07/01/. — V. 105. — P. 164-171.
36. Herman J. P. Central Nervous System Regulation of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis Stress Response // The Handbook of Stress, 2011. — P. 29-46.
37. Alkadhi K. Brain Physiology and Pathophysiology in Mental Stress // International Scholarly Research Notices. — 2013. — V. 2013, № 1. — P. 806104.
38. McEwen B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain // Physiol Rev. — 2007. — Jul. — V. 87, № 3. — P. 873-904.
39. Herman J. P. Chapter 19 - Corticolimbic stress regulatory circuits, hypothalamo–pituitary–adrenocortical adaptation, and resilience // Stress Resilience / Chen A.Academic Press, 2020. — P. 291-309.
40. Danese A., McEwen B. S. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease // Physiology & behavior. — 2012. — V. 106, № 1. — P. 29-39.
41. MCEWEN B. S. Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders // Annals of the New York Academy of Sciences. — 2004. — V. 1032, № 1. — P. 1-7.
42. Guia R. M. d., Rose A. J., Herzig S. Glucocorticoid hormones and energy homeostasis // Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. — 2014. — V. 19, № 2. — P. 117-128.
43. Kuo T., McQueen A., Chen T.-C., Wang J.-C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids // Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man / Wang J.-C., Harris C. — New York, NY: Springer New York, 2015. — P. 99-126.
44. McCall A. L. Chapter 22 - Glucose Transport // Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology / Fink G.Academic Press, 2019. — P. 293-307.
45. Sternberg E. M., Chrousos G. P. W., Ronald L, Gold P. W. The Stress Response and the Regulation of Inflammatory Disease // Annals of Internal Medicine. — 1992. — V. 117, № 10. — P. 854-866.
46. Kyrou I., Tsigos C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction // Hormones. — 2008. — V. 7, № 4. — P. 287-293.
47. Leigh S. J., Uhlig F., Wilmes L., Sanchez-Diaz P., Gheorghe C. E., Goodson M. S., Kelley-Loughnane N., Hyland N. P., Cryan J. F., Clarke G. The impact of acute and chronic stress on gastrointestinal physiology and function: a microbiota–gut–brain axis perspective // The Journal of Physiology. — 2023. — V. 601, № 20. — P. 4491-4538.
48. Gulfo J., Pérez de San Román J., Ledda A., Junyent F., Ramírez M. J., Gil-Bea F. J., Esteve M., Grasa M. Corticosteroid-binding-globulin (CBG)-deficient mice show high pY216-GSK3β and phosphorylated-Tau levels in the hippocampus // PLOS ONE. — 2021. — V. 16, № 2. — P. e0246930.
49. Sivukhina E. V., Jirikowski G. F. Adrenal steroids in the brain: Role of the intrinsic expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in the stress response // Steroids. — 2014. — 2014/03/01/. — V. 81. — P. 70-73.

50. Sivukhina E. V., Jirikowski G. F., Bernstein H. G., Lewis J. G., Herbert Z. Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin // Horm Metab Res. — 2006. — Apr. — V. 38, № 4. — P. 253-9.
51. Mossel P., Bartels A. L., de Deyn P. P., Luurtsema G. The Role of P-Glycoprotein at the Blood–Brain Barrier in Neurological and Psychiatric Disease // PET and SPECT in PsychiatrySpringer, 2020. — P. 45-81.
52. Löscher W., Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family // NeuroRx. — 2005. — V. 2, № 1. — P. 86-98.
53. Müller M. B., Keck M. E., Binder E. B., Kresse A. E., Hagemeyer T. P., Landgraf R., Holsboer F., Uhr M. ABCB1 (MDR1)-Type P-Glycoproteins at the Blood–Brain Barrier Modulate the Activity of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenocortical System: Implications for Affective Disorder // Neuropsychopharmacology. — 2003. — 2003/11/01. — V. 28, № 11. — P. 1991-1999.
54. Karssen A. M., Meijer O. C., van der Sandt I. C. J., Lucassen P. J., de Lange E. C. M., de Boer A. G., de Kloet E. R. Multidrug Resistance P-Glycoprotein Hampers the Access of Cortisol But Not of Corticosterone to Mouse and Human Brain // Endocrinology. — 2001. — V. 142, № 6. — P. 2686-2694.
55. Wyrwoll C. S., Holmes M. C., Seckl J. R. 11β-hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress // Front Neuroendocrinol. — 2011. — Aug. — V. 32, № 3. — P. 265-86.
56. Flatt E. Investigating the Role of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Mediating the Stress-Specific Effects of Cortisol on Neurogenesis in Adult Zebrafish (Danio rerio); University of Guelph, 2023.
57. Vodička M. The effect of stress on regulation and regeneration of glucocorticoids in animal models differing in response of hypothalamo-pituitary-adrenal axis: Ph.D. thesis; Charles University, Faculty of Science. — Prague, 2021. — 84 p
58. Seckl J. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase and the brain: Not (yet) lost in translation // Journal of Internal Medicine. — 2024. — V. 295, № 1. — P. 20-37.
59. Dedic N., Chen A., Deussing J. M. The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response // Curr Mol Pharmacol. — 2018. — V. 11, № 1. — P. 4-31.
60. Sajdyk T. J., Schober D. A., Gehlert D. R., Shekhar A. Role of corticotropin-releasing factor and urocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses // Behavioural brain research. — 1999. — V. 100, № 1-2. — P. 207-215.
61. Refojo D., Schweizer M., Kuehne C., Ehrenberg S., Thoeringer C., Vogl A. M., Dedic N., Schumacher M., von Wolff G., Avrabos C., Touma C., Engblom D., Schütz G., Nave K.-A., Eder M., Wotjak C. T., Sillaber I., Holsboer F., Wurst W., Deussing J. M. Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1 // Science. — 2011. — V. 333, № 6051. — P. 1903-1907.
62. Lemos J. C., Wanat M. J., Smith J. S., Reyes B. A., Hollon N. G., Van Bockstaele E. J., Chavkin C., Phillips P. E. Severe stress switches CRF action in the nucleus accumbens from appetitive to aversive // Nature. — 2012. — Oct 18. — V. 490, № 7420. — P. 402-6.
63. Goldstein D. S. Adrenal Responses to Stress // Cellular and Molecular Neurobiology. — 2010. — 2010/11/01. — V. 30, № 8. — P. 1433-1440.
64. Motiejunaite J., Amar L., Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines // Annales d'Endocrinologie. — 2021. — 2021/06/01/. — V. 82, № 3. — P. 193-197.
65. Carnagarin R., Matthews V. B., Herat L. Y., Ho J. K., Schlaich M. P. Autonomic Regulation of Glucose Homeostasis: a Specific Role for Sympathetic Nervous System Activation // Current Diabetes Reports. — 2018. — 2018/09/19. — V. 18, № 11. — P. 107.
66. Tsigos C., Chrousos G. P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress // Journal of psychosomatic research. — 2002. — V. 53, № 4. — P. 865-871.

67. Hajisoltani R., Meftahi G. H. Epinephrine injected into the basolateral amygdala affects anxiety-like behavior and memory performance in stressed rats // Neuroscience Letters. — 2024. — V. 819. — P. 137590.
68. William Tank A., Lee Wong D. Peripheral and central effects of circulating catecholamines // Comprehensive Physiology. — 2015. — V. 5, № 1. — P. 1-15.
69. Belda X., Fuentes S., Daviu N., Nadal R., Armario A. Stress-induced sensitization: the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and beyond // Stress. — 2015. — V. 18, № 3. — P. 269-279.
70. Kvetnanský R., Pacák K., Fukuhara K., Viskupic E., Hiremagalur B., Nankova B., Goldstein D. S., Sabban E. L., Kopin I. J. Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system // Annals of the New York Academy of Sciences. — 1995. — 1995/12//. — V. 771. — P. 131-158.
71. Scott L. V., Dinan T. G. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: Implications for the pathophysiology of depression // Life Sciences. — 1998. — 1998/04/24/. — V. 62, № 22. — P. 1985-1998.
72. Lee A. K., Tse F. W., Tse A. Arginine Vasopressin Potentiates the Stimulatory Action of CRH on Pituitary Corticotropes via a Protein Kinase C–Dependent Reduction of the Background TREK-1 Current // Endocrinology. — 2015. — V. 156, № 10. — P. 3661-3672.
73. Csikota P., Fodor A., Balázsfi D., Pintér O., Mizukami H., Weger S., Heilbronn R., Engelmann M., Zelena D. Vasopressinergic control of stress-related behavior: studies in Brattleboro rats // Stress. — 2016. — 2016/07/03. — V. 19, № 4. — P. 349-361.
74. al'Absi M., Nakajima M., Bruehl S. Stress and pain: modality-specific opioid mediation of stress-induced analgesia // Journal of Neural Transmission. — 2021. — 2021/09/01. — V. 128, № 9. — P. 1397-1407.
75. Torres-Berrio A., Nava-Mesa M. O. The opioid system in stress-induced memory disorders: From basic mechanisms to clinical implications in post-traumatic stress disorder and Alzheimer's disease // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2019. — 2019/01/10/. — V. 88. — P. 327-338.
76. Valentino R. J., Van Bockstaele E. Endogenous opioids: The downside of opposing stress // Neurobiology of Stress. — 2015. — 2015/01/01/. — V. 1. — P. 23-32.
77. Zhang X., Zhong Y., Tian H., Wang W., Ru S. Impairment of the cortisol stress response mediated by the hypothalamus–pituitary–interrenal (HPI) axis in zebrafish (Danio rerio) exposed to monocrotophos pesticide // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. — 2015. — V. 176. — P. 10-16.
78. Pavlidis M., Theodoridi A., Tsalafouta A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, Danio rerio // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2015. — V. 60. — P. 121-131.
79. Faught E., Vijayan M. M. Coordinated action of corticotropin-releasing hormone and cortisol shapes the acute stress-induced behavioural response in zebrafish // Neuroendocrinology. — 2022. — V. 112, № 1. — P. 74-87.
80. Eto K., Mazilu-Brown J. K., Henderson-MacLennan N., Dipple K. M., McCabe E. R. Development of catecholamine and cortisol stress responses in zebrafish // Molecular genetics and metabolism reports. — 2014. — V. 1. — P. 373-377.
81. Tao H., Zhang Y. Y., Shen Y. J., Chen Q. L., Liu Z. H. Subacute temperature stress altered the fear response of male zebrafish by disrupting HPI/cortisol axis and NE/5-HT/DA neurotransmitter systems // Environmental Biology of Fishes. — 2025. — V. 108, № 7. — P. 1099-1115.
82. Fanselow M. S., Dong H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? // Neuron. — 2010. — 2010/01/14/. — V. 65, № 1. — P. 7-19.
83. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory // Neuron. — 2004. — Sep 30. — V. 44, № 1. — P. 109-20.

84. Squire L. R., Wixted J. T. The cognitive neuroscience of human memory since H.M // Annu Rev Neurosci. — 2011. — V. 34. — P. 259-88.
85. Wu J., Liu C., Zhang L., He B., Shi W.-P., Shi H.-L., Qin C. Chronic restraint stress impairs cognition via modulating HDAC2 expression // Translational Neuroscience. — 2021. — V. 12, № 1. — P. 154-163.
86. Nishimura J.-I., Endo Y., Kimura F. A long-term stress exposure impairs maze learning performance in rats // Neuroscience letters. — 1999. — V. 273, № 2. — P. 125-128.
87. Richter S. H., Zeuch B., Lankisch K., Gass P., Durstewitz D., Vollmayr B. Where have I been? Where should I go? Spatial working memory on a radial arm maze in a rat model of depression // PloS one. — 2013. — V. 8, № 4. — P. e62458.
88. Kim D. J., Louis N. S., Molaro R. A., Hudson G. T., Chorley R. C., Anderson B. J. Repeated unpredictable threats without harm impair spatial working memory in the Barnes maze // Neurobiology of Learning and Memory. — 2017. — V. 137. — P. 92-100.
89. Sandi C., Merino J. J., Cordero M. I., Touyarot K., Venero C. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1 // Neuroscience. — 2001. — V. 102, № 2. — P. 329-339.
90. Bowman R. E. Stress-Induced Changes in Spatial Memory are Sexually Differentiated and Vary Across the Lifespan // Journal of Neuroendocrinology. — 2005. — V. 17, № 8. — P. 526-535.
91. Luine V. Recognition memory tasks in neuroendocrine research // Behavioural brain research. — 2015. — V. 285. — P. 158-164.
92. Gałecki P., Talarowska M., Anderson G., Berk M., Maes M. Mechanisms underlying neurocognitive dysfunctions in recurrent major depression // Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. — 2015. — V. 21. — P. 1535.
93. Chen J., Wei Z., Han H., Jin L., Xu C., Dong D., Lu J., Wan G., Peng Z. An Effect of Chronic Stress on Prospective Memory via Alteration of Resting-State Hippocampal Subregion Functional Connectivity // Sci Rep. — 2019. — Dec 23. — V. 9, № 1. — P. 19698.
94. Barch D. M., Harms M. P., Tillman R., Hawkey E., Luby J. L. Early childhood depression, emotion regulation, episodic memory, and hippocampal development // J Abnorm Psychol. — 2019. — Jan. — V. 128, № 1. — P. 81-95.
95. McEwen B. S., Sapolsky R. M. Stress and cognitive function // Curr Opin Neurobiol. — 1995. — Apr. — V. 5, № 2. — P. 205-16.
96. Rock P. L., Roiser J. P., Riedel W. J., Blackwell A. D. Cognitive impairment in depression: a systematic review and meta-analysis // Psychol Med. — 2014. — Jul. — V. 44, № 10. — P. 2029-40.
97. REUL J. M. H. M., KLOET E. R. D. Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation // Endocrinology. — 1985. — V. 117, № 6. — P. 2505-2511.
98. Popoli M., Yan Z., McEwen B. S., Sanacora G. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission // Nat Rev Neurosci. — 2011. — Nov 30. — V. 13, № 1. — P. 22-37.
99. Murck H., Lehr L., Hahn J., Braunisch M. C., Jezova D., Zavorotnyy M. Adjunct Therapy With Glycyrrhiza Glabra Rapidly Improves Outcome in Depression—A Pilot Study to Support 11-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Inhibition as a New Target // Frontiers in Psychiatry. — 2020. — V. 11, № 605949.
100. Magariños A. M., Verdugo J. M., McEwen B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1997. — Dec 9. — V. 94, № 25. — P. 14002-8.
101. McEwen B. S. Stress and hippocampal plasticity // Annu Rev Neurosci. — 1999. — V. 22. — P. 105-22.

102. McEwen B. S., Nasca C., Gray J. D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex // Neuropsychopharmacology. — 2016. — 2016/01/01. — V. 41, № 1. — P. 3-23.
103. Joëls M., Pu Z., Wiegert O., Oitzl M. S., Krugers H. J. Learning under stress: how does it work? // Trends Cogn Sci. — 2006. — Apr. — V. 10, № 4. — P. 152-8.
104. Sebastian V., Estil J. B., Chen D., Schrott L. M., Serrano P. A. Acute Physiological Stress Promotes Clustering of Synaptic Markers and Alters Spine Morphology in the Hippocampus // PLOS ONE. — 2013. — V. 8, № 10. — P. e79077.
105. Aguayo F. I., Tejos-Bravo M., Díaz-Véliz G., Pacheco A., García-Rojo G., Corrales W., Olave F. A., Aliaga E., Ulloa J. L., Avalos A. M., Román-Albasini L., Rojas P. S., Fiedler J. L. Hippocampal Memory Recovery After Acute Stress: A Behavioral, Morphological and Molecular Study // Frontiers in Molecular Neuroscience. — 2018. — V. 11, № 283.
106. Xu W., Yao X., Zhao F., Zhao H., Cheng Z., Yang W., Cui R., Xu S., Li B. Changes in Hippocampal Plasticity in Depression and Therapeutic Approaches Influencing These Changes // Neural Plasticity. — 2020. — V. 2020, № 1. — P. 8861903.
107. Schoenfeld T. J., McCausland H. C., Morris H. D., Padmanaban V., Cameron H. A. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume // Biological Psychiatry. — 2017. — 2017/12/15/. — V. 82, № 12. — P. 914-923.
108. Vyas A., Mitra R., Shankaranarayana Rao B. S., Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons // J Neurosci. — 2002. — Aug 1. — V. 22, № 15. — P. 6810-8.
109. Chen J.-R., Wang T.-J., Huang H.-Y., Chen L.-J., Huang Y.-S., Wang Y.-J., Tseng G.-F. Fatigue reversibly reduced cortical and hippocampal dendritic spines concurrent with compromise of motor endurance and spatial memory // Neuroscience. — 2009. — V. 161, № 4. — P. 1104-1113.
110. Qiao H., Li M.-X., Xu C., Chen H.-B., An S.-C., Ma X.-M. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models // Neural Plasticity. — 2016. — V. 2016, № 1. — P. 8056370.
111. Kalisch R., Schubert M., Jacob W., Keßler M. S., Hemauer R., Wigger A., Landgraf R., Auer D. P. Anxiety and Hippocampus Volume in the Rat // Neuropsychopharmacology. — 2006. — 2006/05/01. — V. 31, № 5. — P. 925-932.
112. Videbech P., Ravnkilde B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies // American journal of psychiatry. — 2004. — V. 161, № 11. — P. 1957-1966.
113. Roddy D. W., Farrell C., Doolin K., Roman E., Tozzi L., Frodl T., O'Keane V., O'Hanlon E. The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression // Biological Psychiatry. — 2019. — 2019/03/15/. — V. 85, № 6. — P. 487-497.
114. Mifsud K. R., Gutièrrez-Mecinas M., Trollope A. F., Collins A., Saunderson E. A., Reul J. M. H. M. Epigenetic mechanisms in stress and adaptation // Brain, Behavior, and Immunity. — 2011. — 2011/10/01/. — V. 25, № 7. — P. 1305-1315.
115. Nasca C., Zelli D., Bigio B., Piccinin S., Scaccianoce S., Nisticò R., McEwen B. S. Stress dynamically regulates behavior and glutamatergic gene expression in hippocampus by opening a window of epigenetic plasticity // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2015. — V. 112, № 48. — P. 14960-14965.
116. Seo M. K., Ly N. N., Lee C. H., Cho H. Y., Choi C. M., Nhu L. H., Lee J. G., Lee B. J., Kim G.-M., Yoon B. J., Park S. W., Kim Y. H. Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus // Neuropharmacology. — 2016. — 2016/06/01/. — V. 105. — P. 388-397.
117. Palma-Gudiel H., Córdova-Palomera A., Leza J. C., Fañanás L. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: a critical review // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. — 2015. — V. 55. — P. 520-535.

118. Zhou M., Wang M., Wang X., Liu K., Wan Y., Li M., Liu L., Zhang C. Abnormal expression of MicroRNAs induced by chronic unpredictable mild stress in rat hippocampal tissues // Molecular neurobiology. — 2018. — V. 55, № 2. — P. 917-935.
119. Ming G.-l., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions // Neuron. — 2011. — V. 70, № 4. — P. 687-702.
120. Kempermann G., Song H., Gage F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus // Cold Spring Harbor perspectives in biology. — 2015. — V. 7, № 9. — P. a018812.
121. Egeland M., Zunszain P. A., Pariante C. M. Molecular mechanisms in the regulation of adult neurogenesis during stress // Nature Reviews Neuroscience. — 2015. — V. 16, № 4. — P. 189-200.
122. Schoenfeld T. J., Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis // Experimental Neurology. — 2012. — 2012/01/01/. — V. 233, № 1. — P. 12-21.
123. Pechnick R. N., Zonis S., Wawrowsky K., Pourmorady J., Chesnokova V. p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2008. — V. 105, № 4. — P. 1358-1363.
124. Heine V. M., Maslam S., Zareno J., Joëls M., Lucassen P. J. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible // European Journal of Neuroscience. — 2004. — V. 19, № 1. — P. 131-144.
125. Van Bokhoven P., Oomen C., Hoogendijk W., Smit A., Lucassen P., Spijker S. Reduction in hippocampal neurogenesis after social defeat is long-lasting and responsive to late antidepressant treatment // European Journal of Neuroscience. — 2011. — V. 33, № 10. — P. 1833-1840.
126. Schloesser R. J., Lehmann M., Martinowich K., Manji H. K., Herkenham M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress // Molecular Psychiatry. — 2010. — 2010/12/01. — V. 15, № 12. — P. 1152-1163.
127. Meng Y., Du J., Liu N., Qiang Y., Xiao L., Lan X., Ma L., Yang J., Yu J., Lu G. Epigenetic modulation: research progress on histone acetylation levels in major depressive disorders // Journal of Drug Targeting. — 2023. — V. 31, № 2. — P. 142-151.
128. Fuster J. M. Prefrontal cortex // Comparative neuroscience and neurobiologySpringer, 2008. — P. 107-109.
129. McEwen B. S., Morrison J. H. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course // Neuron. — 2013. — Jul 10. — V. 79, № 1. — P. 16-29.
130. Kesner R. P., Churchwell J. C. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function // Neurobiol Learn Mem. — 2011. — Oct. — V. 96, № 3. — P. 417-31.
131. Jobson D. D., Hase Y., Clarkson A. N., Kalaria R. N. The role of the medial prefrontal cortex in cognition, ageing and dementia // Brain Communications. — 2021. — V. 3, № 3. - Art. fcab125.
132. Yuen E. Y., Liu W., Karatsoreos I. N., Feng J., McEwen B. S., Yan Z. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2009. — V. 106, № 33. — P. 14075-14079.
133. Yuen E. Y., Liu W., Karatsoreos I. N., Ren Y., Feng J., McEwen B. S., Yan Z. Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory // Molecular psychiatry. — 2011. — V. 16, № 2. — P. 156-170.
134. Henckens M. J., van Wingen G. A., Joëls M., Fernández G. Time-dependent corticosteroid modulation of prefrontal working memory processing // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2011. — V. 108, № 14. — P. 5801-5806.
135. Musazzi L., Treccani G., Popoli M. Functional and Structural Remodeling of Glutamate Synapses in Prefrontal and Frontal Cortex Induced by Behavioral Stress // Frontiers in Psychiatry. — 2015. — V. 6, № 60.

136. Arnsten A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function // Nat Rev Neurosci. — 2009. — Jun. — V. 10, № 6. — P. 410-22.
137. Qin S., Hermans E. J., van Marle H. J., Luo J., Fernández G. Acute psychological stress reduces working memory-related activity in the dorsolateral prefrontal cortex // Biol Psychiatry. — 2009. — Jul 1. — V. 66, № 1. — P. 25-32.
138. McKlveen J. M., Morano R. L., Fitzgerald M., Zoubovsky S., Cassella S. N., Scheimann J. R., Ghosal S., Mahbod P., Packard B. A., Myers B. Chronic stress increases prefrontal inhibition: a mechanism for stress-induced prefrontal dysfunction // Biological psychiatry. — 2016. — V. 80, № 10. — P. 754-764.
139. Negrón-Oyarzo I., Aboitiz F., Fuentealba P. Impaired functional connectivity in the prefrontal cortex: A mechanism for chronic stress-induced neuropsychiatric disorders // Neural plasticity. — 2016. — V. 2016, № 1. — P. 7539065.
140. Mika A., Mazur G. J., Hoffman A. N., Talboom J. S., Bimonte-Nelson H. A., Sanabria F., Conrad C. D. Chronic stress impairs prefrontal cortex-dependent response inhibition and spatial working memory // Behavioral neuroscience. — 2012. — V. 126, № 5. — P. 605.
141. Yuen E. Y., Wei J., Liu W., Zhong P., Li X., Yan Z. Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex // Neuron. — 2012. — Mar 8. — V. 73, № 5. — P. 962-77.
142. Mizoguchi K., Yuzurihara M., Ishige A., Sasaki H., Chui D.-H., Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction // Journal of Neuroscience. — 2000. — V. 20, № 4. — P. 1568-1574.
143. Cook S. C., Wellman C. L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex // Journal of neurobiology. — 2004. — V. 60, № 2. — P. 236-248.
144. Cousijn H., Rijpkema M., Qin S., Van Marle H. J., Franke B., Hermans E. J., van Wingen G., Fernández G. Acute stress modulates genotype effects on amygdala processing in humans // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2010. — V. 107, № 21. — P. 9867-9872.
145. Hossein S., Cooper J. A., DeVries B. A., Nuutinen M. R., Hahn E. C., Kragel P. A., Treadway M. T. Effects of acute stress and depression on functional connectivity between prefrontal cortex and the amygdala // Molecular psychiatry. — 2023. — V. 28, № 11. — P. 4602-4612.
146. Lovelock D. F., Deak T. Acute stress imposed during adolescence yields heightened anxiety in Sprague Dawley rats that persists into adulthood: Sex differences and potential involvement of the Medial Amygdala // Brain Research. — 2019. — 2019/11/15/. — V. 1723. — P. 146392.
147. Yang Y., Wang J.-Z. From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits // Frontiers in Neural Circuits. — 2017. — 2017-October-31. — V. 11. — P. 86.
148. Mitra R., Sapolsky R. M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2008. — Apr 8. — V. 105, № 14. — P. 5573-8.
149. Rao R. P., Anilkumar S., McEwen B. S., Chattarji S. Glucocorticoids protect against the delayed behavioral and cellular effects of acute stress on the amygdala // Biol Psychiatry. — 2012. — Sep 15. — V. 72, № 6. — P. 466-75.
150. Turner K. J., Hawkins T. A., Henriques P. M., Valdivia L. E., Bianco I. H., Wilson S. W., Folgueira M. A Structural Atlas of the Developing Zebrafish Telencephalon Based on Spatially-Restricted Transgene Expression // Front Neuroanat. — 2022. — V. 16. — P. 840924.
151. Mueller T., Dong Z., Berberoglu M. A., Guo S. The dorsal pallium in zebrafish, Danio rerio (Cyprinidae, Teleostei) // Brain research. — 2011. — V. 1381. — P. 95-105.
152. Ganz J., Kroehne V., Freudenreich D., Machate A., Geffarth M., Braasch I., Kaslin J., Brand M. Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis // F1000Res. — 2014. — V. 3. — P. 308.

153. Mazzitelli-Fuentes L. S., Román F. R., Castillo Elías J. R., Deleglise E. B., Mongiat L. A. Spatial learning promotes adult neurogenesis in specific regions of the zebrafish pallium // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2022. — V. 10. — P. 840964.
154. Wullimann M. F. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review // Integrative Zoology. — 2009. — V. 4, № 1. — P. 123-133.
155. Lal P., Kawakami K. Integrated behavioral, genetic and brain circuit visualization methods to unravel functional anatomy of zebrafish amygdala // Frontiers in neuroanatomy. — 2022. — V. 16. — P. 837527.
156. von Trotha J. W., Vernier P., Bally-Cuif L. Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish // European Journal of Neuroscience. — 2014. — V. 40, № 9. — P. 3302-3315.
157. Torigoe M., Islam T., Kakinuma H., Fung C. C. A., Isomura T., Shimazaki H., Aoki T., Fukai T., Okamoto H. Zebrafish capable of generating future state prediction error show improved active avoidance behavior in virtual reality // Nature Communications. — 2021. — 2021/09/29. — V. 12, № 1. — P. 5712.
158. Haug M. F., Gesemann M., Mueller T., Neuhauss S. C. Phylogeny and expression divergence of metabotropic glutamate receptor genes in the brain of zebrafish (Danio rerio) // Journal of Comparative Neurology. — 2013. — V. 521, № 7. — P. 1533-1560.
159. Huang V., Butler A. A., Lubin F. D. Telencephalon transcriptome analysis of chronically stressed adult zebrafish // Scientific reports. — 2019. — V. 9, № 1. — P. 1379.
160. Reddy B. R., Babu N. S., Das T., Bhattacharya D., Murthy C. L. N., Kumar A., Idris M. M., Chakravarty S. Proteome profile of telencephalon associates attenuated neurogenesis with chronic stress induced mood disorder phenotypes in zebrafish model // Pharmacology Biochemistry and Behavior. — 2021. — 2021/05/01/. — V. 204. — P. 173170.
161. The American Psychiatric Association publishing textbook of mood disorders. / Nemeroff C. B., Schatzberg A. F., Rasgon N., Strakowski S. M.: American Psychiatric Pub, 2022.
162. Mood disorders: a practical guide. / Ghaemi S. N.: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
163. Wang X., Su Y., Liu Q., Li M., Zeighami Y., Fan J., Adams G. C., Tan C., Zhu X., Meng X. Unveiling diverse clinical symptom patterns and neural activity profiles in major depressive disorder subtypes // EBioMedicine. — 2025. — V. 116.
164. Schramm E., Klein D. N., Elsaesser M., Furukawa T. A., Domschke K. Review of dysthymia and persistent depressive disorder: history, correlates, and clinical implications // The Lancet Psychiatry. — 2020. — V. 7, № 9. — P. 801-812.
165. Phillips M. L., Kupfer D. J. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions // The Lancet. — 2013. — V. 381, № 9878. — P. 1663-1671.
166. Domschke K., Zwanzger P. Taxonomy of anxiety disorders—a comparison of ICD-10 and ICD-11 // Der Nervenarzt. — 2025. — 2025/12/01. — V. 96, № 1. — P. 1-5.
167. Krupnik V. Depression as a Failed Anxiety: The Continuum of Precision-Weighting Dysregulation in Affective Disorders // Front Psychol. — 2021. — V. 12. — P. 657738.
168. Dalby M., Vitezic M., Plath N., Hammer-Helmich L., Jiang Y., Tian C., Dhamija D., Wilson C. H., Hinds D., Aslibekyan S., Auton A., Babalola E., Bell R. K., Bielenberg J., Bryc K., Bullis E., Coker D., Partida G. C., Das S., Elson S. L., Filshtein T., Fletez-Brant K., Fontanillas P., Freyman W., Faaborg A., Fuller S. T., Gandhi P. M., Granka J. M., Heilbron K., Hernandez A., Hicks B., Jewett E. M., Kukar K., Lin K.-H., Lowe M., McCreight J. C., McIntyre M. H., Micheletti S. J., Moreno M. E., Mountain J. L., Nandakumar P., Noblin E. S., O'Connell J., Huang Y., Kim J. S., Lane V., Petrakovitz A. A., Poznik G. D., Schumacher M., Shastri A. J., Shelton J. F., Shi J., Shringarpure S., Tchakouté C. T., Tran V., Tung J. Y., Wang X., Wang W., Wilton P., Wong C., Sullivan P. F., Buckholtz J. W., Smoller J. W., andMe Research T. Characterizing mood disorders in the AFFECT study: a large, longitudinal, and phenotypically rich genetic cohort in the US // Translational Psychiatry. — 2022. — 2022/03/25. — V. 12, № 1. — P. 121.

169. McEwen B. S., Akil H. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders // J Neurosci. — 2020. — Jan 2. — V. 40, № 1. — P. 12-21.
170. Fries G. R., Saldana V. A., Finnstein J., Rein T. Molecular pathways of major depressive disorder converge on the synapse // Mol Psychiatry. — 2023. — Jan. — V. 28, № 1. — P. 284-297.
171. Oliva V., Fico G., De Prisco M., Gonda X., Rosa A. R., Vieta E. Bipolar disorders: an update on critical aspects // Lancet Reg Health Eur. — 2025. — Jan. — V. 48. — P. 101135.
172. Martynikhin I. A. The Use of ICD-10 for Diagnosing Mental Disorders In Russia, According to National Statistics and a Survey of Psychiatrists' Experience // Consort Psychiatr. — 2021. — V. 2, № 2. — P. 35-44.
173. Alqahtani I. M., Al-Garni A. M., Abumelha M. S., Alsagti S. A., Alshehri F. A. D., Alqahtani A. A., Alkhidhran S. S. S. Prevalence of depression, anxiety, and stress among the general population during COVID-19 pandemic: A systematic review // J Family Med Prim Care. — 2023. — Jun. — V. 12, № 6. — P. 1030-1037.
174. Mihić L., Janičić B., Marchetti I., Novović Z., Sica C., Bottesi G., Belopavlović R., Jakšić N. Comorbidity among depression, anxiety and stress symptoms in naturalistic clinical samples: A cross-cultural network analysis // Clin Psychol Psychother. — 2024. — Jan-Feb. — V. 31, № 1. — P. e2927.
175. Evstifeeva S., Shalnova S., Kutsenko V., Balanova Y., Imaeva A., Kapustina A., M.B K., Maksimov S., Muromtseva G., Litinskaya O., Pokrovskaya M., Yarovaya E., Filichkina E., Soplenkova A., Gomanova L., Doludin Y., Efimova E., Borisova A., Karamnova N., Drapkina O. Anxiety and depression: ten-year changes of prevalence and its association with demographic and socio-economic characteristics according to the ESSE-RF study // Cardiovascular Therapy and Prevention. — 2023. — 12/28. — V. 22. — P. 3796.
176. Bikbov M. M., Gilmanshin T. R., Kazakbaeva G. M., Iakupova E. M., Panda-Jonas S., Zainullin R. M., Fakhretdinova A. A., Tuliakova A. M., Gilemzianova L. I., Khakimov D. A., Miniazeva L. A., Jonas J. B. Prevalence of depression, anxiety and suicidal ideas and associated factors, in particular sensory impairments, in a population of Bashkortostan in Russia // Sci Rep. — 2023. — Oct 12. — V. 13, № 1. — P. 17256.
177. Gafarov V., Panov D., Gromova E., Krymov E., Gagulin I., Gafarova A. Sex Differences and Trends in Prevalence of Anxiety, Depression and Vital Exhaustion in Russia / Siberia from 1994 To 2017 // International Journal of Medical Science and Clinical Invention. — 2021. — 03/18. — V. 8. — P. 5288-5298.
178. Shal'nova S. A., Evstifeeva S. E., Deev A. D., Artamova G. V., Gatagonova T. M., Dupliakov D. V., Efanov A., Zhernakova Iu V., Konradi A. O., Libis R. A., Minakov E. V., Nedogoda S. V., Oshchepkova E. V., Romanchuk S. V., Rotar O. P., Trubacheva I. A., EV S. H., Boitsov S. A. [The prevalence of anxiety and depression in different regions of the Russian Federation and its association with sociodemographic factors (according to the data of the ESSE-RF study)] // Ter Arkh. — 2014. — V. 86, № 12. — P. 53-60.
179. Bui E., King F., Melaragno A. Pharmacotherapy of anxiety disorders in the 21st century: a call for novel approaches // General Psychiatry. — 2019. — V. 32, № 6. — P. e100136.
180. Zannas A. S., Wiechmann T., Gassen N. C., Binder E. B. Gene–Stress–Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications // Neuropsychopharmacology. — 2016. — 2016/01/01. — V. 41, № 1. — P. 261-274.
181. Yarar E. Role and function of endocannabinoid system in major depressive disease // Medical Cannabis and Cannabinoids. — 2021. — V. 4, № 1. — P. 1-12.
182. Scholl J. L., Solanki R. R., Watt M. J., Renner K. J., Forster G. L. Chronic administration of glucocorticoid receptor ligands increases anxiety-like behavior and selectively increase serotonin transporters in the ventral hippocampus // Brain Research. — 2023. — 2023/02/01/. — V. 1800. — P. 148189.

183. Lanfumey L., Mongeau R., Cohen-Salmon C., Hamon M. Corticosteroid–serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. — 2008. — 2008/08/01/. — V. 32, № 6. — P. 1174-1184.
184. Tye K. M., Mirzabekov J. J., Warden M. R., Ferenczi E. A., Tsai H.-C., Finkelstein J., Kim S.-Y., Adhikari A., Thompson K. R., Andalman A. S. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour // Nature. — 2013. — V. 493, № 7433. — P. 537-541.
185. Montoya E. R., Bos P. A., Terburg D., Rosenberger L. A., van Honk J. Cortisol administration induces global down-regulation of the brain's reward circuitry // Psychoneuroendocrinology. — 2014. — 2014/09/01/. — V. 47. — P. 31-42.
186. Parul, Mishra A., Singh S., Singh S., Tiwari V., Chaturvedi S., Wahajuddin M., Palit G., Shukla S. Chronic unpredictable stress negatively regulates hippocampal neurogenesis and promote anxious depression-like behavior via upregulating apoptosis and inflammatory signals in adult rats // Brain Res Bull. — 2021. — Jul. — V. 172. — P. 164-179.
187. Musaelyan K., Yildizoglu S., Bozeman J., Du Preez A., Egeland M., Zunszain P. A., Pariante C. M., Fernandes C., Thuret S. Chronic stress induces significant gene expression changes in the prefrontal cortex alongside alterations in adult hippocampal neurogenesis // Brain Commun. — 2020. — V. 2, № 2. — P. fcaa153.
188. Tsimpolis A., Kalafatakis K., Charalampopoulos I. Recent advances in the crosstalk between the brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids // Frontiers in endocrinology. — 2024. — V. 15. — P. 1362573.
189. Numakawa T., Odaka H., Adachi N. Actions of brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid stress in neurogenesis // International journal of molecular sciences. — 2017. — V. 18, № 11. — P. 2312.
190. Misztak P., Pańczyszyn-Trzewik P., Sowa-Kućma M. Histone deacetylases (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders // Pharmacological Reports. — 2018. — V. 70, № 2. — P. 398-408.
191. Park H.-S., Kim J., Ahn S. H., Ryu H.-Y. Epigenetic targeting of histone deacetylases in diagnostics and treatment of depression // International journal of molecular sciences. — 2021. — V. 22, № 10. — P. 5398.
192. Nestler E. J. Epigenetic mechanisms of depression // JAMA psychiatry. — 2014. — V. 71, № 4. — P. 454-456.
193. Martins de Carvalho L., Chen W. Y., Lasek A. W. Epigenetic mechanisms underlying stress-induced depression // Int Rev Neurobiol. — 2021. — V. 156. — P. 87-126.
194. Ziv L., Muto A., Schoonheim P. J., Meijsing S. H., Strasser D., Ingraham H. A., Schaaf M. J., Yamamoto K. R., Baier H. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor // Molecular psychiatry. — 2013. — V. 18, № 6. — P. 681-691.
195. Maximino C., Puty B., Benzecry R., Araújo J., Lima M. G., Batista E. d. J. O., de Matos Oliveira K. R., Crespo-Lopez M. E., Herculano A. M. Role of serotonin in zebrafish (Danio rerio) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models // Neuropharmacology. — 2013. — V. 71. — P. 83-97.
196. Rajeswari J. J., Gilbert G. N., Khalid E., Vijayan M. M. Brain monoamine changes modulate the corticotropin-releasing hormone receptor 1-mediated behavioural response to acute thermal stress in zebrafish larvae // Molecular and Cellular Endocrinology. — 2025. — V. 600. — P. 112494.
197. Choudhary P., Meena P., Saini K. K., Prajapat G., Bunker S. K., Agrawal A., Kumar K., Verma R. Mechanistic insight into the antistress potential of eugenol: Modulation of the monoaminergic system in chronic unpredictable stress zebrafish model // Chemical Biology Letters. — 2025. — V. 12, № 1. — P. 1257-1257.
198. Fulcher N., Tran S., Shams S., Chatterjee D., Gerlai R. Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The

Zebrafish as a Model for Major Depression // Zebrafish. — 2017. — Feb. — V. 14, № 1. — P. 23-34.
199. Kölliker-Frers R., Udovin L., Otero-Losada M., Kobiec T., Herrera M. I., Palacios J., Razzitte G., Capani F. Neuroinflammation: An Integrating Overview of Reactive-Neuroimmune Cell Interactions in Health and Disease // Mediators Inflamm. — 2021. — V. 2021. — P. 9999146.
200. Yamanaka K. Neuroinflammation in aging and neurodegeneration // Clinical and Experimental Neuroimmunology. — 2016. — 05/01. — V. 7. — P. 107-107.
201. Yong H. Y., Rawji K. S., Ghorbani S., Xue M., Yong V. W. The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system // Cellular & molecular immunology. — 2019. — V. 16, № 6. — P. 540-546.
202. Jurga A. M., Paleczna M., Kuter K. Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes // Front Cell Neurosci. — 2020. — V. 14. — P. 198.
203. Vidal-Itriago A., Radford R. A. W., Aramideh J. A., Maurel C., Scherer N. M., Don E. K., Lee A., Chung R. S., Graeber M. B., Morsch M. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS // Front Immunol. — 2022. — V. 13. — P. 997786.
204. Xie D., He M., Hu X. Microglia/macrophage diversities in central nervous system physiology and pathology // CNS Neurosci Ther. — 2019. — Dec. — V. 25, № 12. — P. 1287-1289.
205. Colonna M., Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration // Annu Rev Immunol. — 2017. — Apr 26. — V. 35. — P. 441-468.
206. Liu X., Jiang N., Zhou W. Various Energetic Metabolism of Microglia in Response to Different Stimulations // Molecules. — 2023. — V. 28, № 11. — P. 4501.
207. Stence N., Waite M., Dailey M. E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices // Glia. — 2001. — Mar 1. — V. 33, № 3. — P. 256-66.
208. Kreutzberg G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS // Trends Neurosci. — 1996. — Aug. — V. 19, № 8. — P. 312-8.
209. Jiang X., He H., Mo L., Liu Q., Yang F., Zhou Y., Li L., Su D., Yi S., Zhang J. Mapping the Plasticity of Morphology, Molecular Properties and Function in Mouse Primary Microglia // Frontiers in Cellular Neuroscience. — 2022. — 811061. — V. 15.
210. Li Q., Wen S., Ye W., Zhao S., Liu X. The potential roles of m(6)A modification in regulating the inflammatory response in microglia // J Neuroinflammation. — 2021. — Jul 5. — V. 18, № 1. — P. 149.
211. Chhor V., Le Charpentier T., Lebon S., Oré M. V., Celador I. L., Josserand J., Degos V., Jacotot E., Hagberg H., Sävman K., Mallard C., Gressens P., Fleiss B. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro // Brain Behav Immun. — 2013. — Aug. — V. 32. — P. 70-85.
212. Paolicelli R. C., Sierra A., Stevens B., Tremblay M.-E., Aguzzi A., Ajami B., Amit I., Audinat E., Bechmann I., Bennett M. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads // Neuron. — 2022. — V. 110, № 21. — P. 3458-3483.
213. Zhao C., Yang Z., Li Y., Wen Z. Macrophages in tissue repair and regeneration: insights from zebrafish // Cell Regeneration. — 2024. — 2024/06/11. — V. 13, № 1. — P. 12.
214. Stratoulias V., Venero J. L., Tremblay M., Joseph B. Microglial subtypes: diversity within the microglial community // Embo j. — 2019. — Sep 2. — V. 38, № 17. — P. e101997.
215. Novakovic M. M., Korshunov K. S., Grant R. A., Martin M. E., Valencia H. A., Budinger G. R. S., Radulovic J., Prakriya M. Astrocyte reactivity and inflammation-induced depression-like behaviors are regulated by Orai1 calcium channels // Nat Commun. — 2023. — Sep 7. — V. 14, № 1. — P. 5500.
216. He L., Zhang R., Yang M., Lu M. The role of astrocyte in neuroinflammation in traumatic brain injury // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. — 2024. — Mar. — V. 1870, № 3. — P. 166992.

217. Liddelow S. A., Guttenplan K. A., Clarke L. E., Bennett F. C., Bohlen C. J., Schirmer L., Bennett M. L., Münch A. E., Chung W. S., Peterson T. C., Wilton D. K., Frouin A., Napier B. A., Panicker N., Kumar M., Buckwalter M. S., Rowitch D. H., Dawson V. L., Dawson T. M., Stevens B., Barres B. A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia // Nature. — 2017. — Jan 26. — V. 541, № 7638. — P. 481-487.
218. Santiago-Balmaseda A., Aguirre-Orozco A., Valenzuela-Arzeta I. E., Villegas-Rojas M. M., Pérez-Segura I., Jiménez-Barrios N., Hurtado-Robles E., Rodríguez-Hernández L. D., Rivera-German E. R., Guerra-Crespo M., Martinez-Fong D., Ledesma-Alonso C., Diaz-Cintra S., Soto-Rojas L. O. Neurodegenerative Diseases: Unraveling the Heterogeneity of Astrocytes // Cells. — 2024. — V. 13, № 11. — P. 921.
219. Verkhratsky A., Butt A., Li B., Illes P., Zorec R., Semyanov A., Tang Y., Sofroniew M. V. Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies // Signal Transduction and Targeted Therapy. — 2023. — 2023/10/13. — V. 8, № 1. — P. 396.
220. Nguyen-Chi M., Laplace-Builhe B., Travnickova J., Luz-Crawford P., Tejedor G., Phan Q. T., Duroux-Richard I., Levraud J.-P., Kissa K., Lutfalla G., Jorgensen C., Djouad F. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish // eLife. — 2015. — 2015/07/08. — V. 4. — P. e07288.
221. Lu X. J., Chen J. Specific function and modulation of teleost monocytes/macrophages: polarization and phagocytosis // Zool Res. — 2019. — May 18. — V. 40, № 3. — P. 146-150.
222. Bohaud C., Cruz J., Terraza C., Barthelaix A., Laplace-Builhé B., Jorgensen C., Arribat Y., Djouad F. Lactate metabolism coordinates macrophage response and regeneration in zebrafish // Theranostics. — 2022. — V. 12, № 8. — P. 3995-4009.
223. Cavone L., McCann T., Drake L. K., Aguzzi E. A., Oprişoreanu A.-M., Pedersen E., Sandi S., Selvarajah J., Tsarouchas T. M., Wehner D., Keatinge M., Mysiak K. S., Henderson B. E. P., Dobie R., Henderson N. C., Becker T., Becker C. G. A unique macrophage subpopulation signals directly to progenitor cells to promote regenerative neurogenesis in the zebrafish spinal cord // Developmental Cell. — 2021. — V. 56, № 11. — P. 1617-1630.e6.
224. Cao P., Zhang H., Meng H., Cheng Y., Xu H., Zang S., Li Z., Cui J., Li Y. Celecoxib Exerts a Therapeutic Effect Against Demyelination by Improving the Immune and Inflammatory Microenvironments // Journal of Inflammation Research. — 2020. — 2020/12/01. — V. 13. — P. 1043-1055.
225. Engur D., Ercan I., Kiser C., Tufekci K., Soy S., Micili S., Ozhan G., Guven S., Kumral A., Genc S. Hydrogen peroxide signaling modulates neuronal differentiation via microglial polarization and Wnt/β-catenin pathway // European Review for Medical & Pharmacological Sciences. — 2023. — V. 27, № 11. — P. 5083–5096.
226. Iribarne M., Hyde D. R. Different inflammation responses modulate Müller glia proliferation in the acute or chronically damaged zebrafish retina // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2022. — V. 10, № 892271.
227. Yang L., Wang J., Wang D., Hu G., Liu Z., Yan D., Serikuly N., Alpyshov E. T., Demin K. A., Strekalova T., de Abreu M. S., Song C., Kalueff A. V. Delayed behavioral and genomic responses to acute combined stress in zebrafish, potentially relevant to PTSD and other stress-related disorders: Focus on neuroglia, neuroinflammation, apoptosis and epigenetic modulation // Behavioural Brain Research. — 2020. — 2020/07/01/. — V. 389. — P. 112644.
228. Zhang Y., Wang D., Liu J., Bai Y., Fan B., Lu C., Wang F. Structural characterization and antidepressant-like effects of Polygonum Sibiricum Polysaccharides on regulating Microglial polarization in chronic unpredictable mild stress-Induced zebrafish // International journal of molecular sciences. — 2024. — V. 25, № 4. — P. 2005.
229. Won E., Kim Y. K. Neuroinflammation-Associated Alterations of the Brain as Potential Neural Biomarkers in Anxiety Disorders // Int J Mol Sci. — 2020. — Sep 7. — V. 21, № 18.
230. Xu J., Wang B., Ao H. Corticosterone effects induced by stress and immunity and inflammation: mechanisms of communication // Frontiers in Endocrinology. — 2025. — V. 16, № 1448750.

231. Chiu W., Su Y., Su K., Chen P. Recurrence of depressive disorders after interferon-induced depression // Translational psychiatry. — 2017. — V. 7, № 2. — P. e1026-e1026.
232. Mendiola A. S., Cardona A. E. The IL-1β phenomena in neuroinflammatory diseases // Journal of Neural Transmission. — 2018. — 2018/05/01. — V. 125, № 5. — P. 781-795.
233. Wang X., Michaelis E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain // Frontiers in aging neuroscience. — 2010. — V. 2. — P. 1224.
234. Kumar A., Chanana P. Role of nitric oxide in stress-induced anxiety: from pathophysiology to therapeutic target // Vitamins and hormones. — 2017. — V. 103. — P. 147-167.
235. Liu W., Li Q., Ye B., Cao H., Shen F., Xu Z., Du W., Guo F., Liu J., Li T., Zhang B., Liu Z. Repeated Nitrous Oxide Exposure Exerts Antidepressant-Like Effects Through Neuronal Nitric Oxide Synthase Activation in the Medial Prefrontal Cortex // Frontiers in Psychiatry. — 2020. — V. 11 №837.
236. Nagele P., Palanca B. J., Gott B., Brown F., Barnes L., Nguyen T., Xiong W., Salloum N. C., Espejo G. D., Lessov-Schlaggar C. N. A phase 2 trial of inhaled nitrous oxide for treatment-resistant major depression // Science translational medicine. — 2021. — V. 13, № 597. — P. eabe1376.
237. Troubat R., Barone P., Leman S., Desmidt T., Cressant A., Atanasova B., Brizard B., El Hage W., Surget A., Belzung C., Camus V. Neuroinflammation and depression: A review // European Journal of Neuroscience. — 2021. — V. 53, № 1. — P. 151-171.
238. Wang H., He Y., Sun Z., Ren S., Liu M., Wang G., Yang J. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression // Journal of neuroinflammation. — 2022. — V. 19, № 1. — P. 132.
239. Goshen I., Kreisel T., Ben-Menachem-Zidon O., Licht T., Weidenfeld J., Ben-Hur T., Yirmiya R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression // Molecular Psychiatry. — 2008. — 2008/07/01. — V. 13, № 7. — P. 717-728.
240. Wu A., Zhang J. Neuroinflammation, memory, and depression: new approaches to hippocampal neurogenesis // Journal of Neuroinflammation. — 2023. — V. 20, № 1. — P. 283.
241. Miller A. H. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: Psychoneuroimmunology at the translational interface // Brain, behavior, and immunity. — 2009. — V. 23, № 2. — P. 149-158.
242. Fanet H., Capuron L., Castanon N., Calon F., Vancassel S. Tetrahydrobioterin (BH4) pathway: from metabolism to neuropsychiatry // Current neuropharmacology. — 2021. — V. 19, № 5. — P. 591-609.
243. Haroon E., Raison C. L., Miller A. H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior // Neuropsychopharmacology. — 2012. — V. 37, № 1. — P. 137-162.
244. Ma M., Chang X., Wu H. Animal models of stress and stress-related neurocircuits: A comprehensive review // Stress and Brain. — 2021. — 06/01. — V. 1. — P. 1.
245. Tran I., Gellner A. K. Long-term effects of chronic stress models in adult mice // J Neural Transm (Vienna). — 2023. — Sep. — V. 130, № 9. — P. 1133-1151.
246. Antoniuk S., Bijata M., Ponimaskin E., Wlodarczyk J. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability // Neurosci Biobehav Rev. — 2019. — Apr. — V. 99. — P. 101-116.
247. Masis-Calvo M., Schmidtner A. K., de Moura Oliveira V. E., Grossmann C. P., de Jong T. R., Neumann I. D. Animal models of social stress: the dark side of social interactions // Stress. — 2018. — Sep. — V. 21, № 5. — P. 417-432.
248. Atrooz F., Alkadhi K. A., Salim S. Understanding stress: Insights from rodent models // Current Research in Neurobiology. — 2021. — 2021/01/01/. — V. 2. — P. 100013.
249. Petković A., Chaudhury D. Encore: Behavioural animal models of stress, depression and mood disorders // Frontiers in Behavioral Neuroscience. — 2022. — V. 16, № 931964.

250. Molet J., Maras P. M., Avishai-Eliner S., Baram T. Z. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress // Dev Psychobiol. — 2014. — Dec. — V. 56, № 8. — P. 1675-88.
251. Markov D. D., Novosadova E. V. Chronic unpredictable mild stress model of depression: possible sources of poor reproducibility and latent variables // Biology. — 2022. — V. 11, № 11. — P. 1621.
252. Mao Y., Xu Y., Yuan X. Validity of chronic restraint stress for modeling anhedonic-like behavior in rodents: a systematic review and meta-analysis // J Int Med Res. — 2022. — Feb. — V. 50, № 2. — P. 3000605221075816.
253. Italia M., Forastieri C., Longaretti A., Battaglioli E., Rusconi F. Rationale, Relevance, and Limits of Stress-Induced Psychopathology in Rodents as Models for Psychiatry Research: An Introductory Overview // Int J Mol Sci. — 2020. — Oct 9. — V. 21, № 20.
254. Ieraci A., Mallei A., Popoli M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice // Neural Plast. — 2016. — V. 2016. — P. 6212983.
255. Koike H., Ibi D., Mizoguchi H., Nagai T., Nitta A., Takuma K., Nabeshima T., Yoneda Y., Yamada K. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice // Behav Brain Res. — 2009. — Aug 24. — V. 202, № 1. — P. 114-21.
256. Golden S. A., Covington H. E., 3rd, Berton O., Russo S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice // Nat Protoc. — 2011. — Jul 21. — V. 6, № 8. — P. 1183-91.
257. Schmidt M. V., Wang X.-D., Meijer O. C. Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression? // Psychopharmacology. — 2011. — V. 214, № 1. — P. 131-140.
258. Shin H. S., Lee S. H., Moon H. J., So Y. H., Jang H. J., Lee K.-H., Ahn C., Jung E.-M. Prolonged stress response induced by chronic stress and corticosterone exposure causes adult neurogenesis inhibition and astrocyte loss in mouse hippocampus // Brain Research Bulletin. — 2024. — 2024/03/01/. — V. 208. — P. 110903.
259. Rahim N. A., Nordin N., Rasedi N. I. S. A., Kauli F. S. M., Ibrahim W. N. W., Zakaria F. Behavioral and cortisol analysis of the anti-stress effect of Polygonum minus (Huds) extracts in chronic unpredictable stress (CUS) zebrafish model // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. — 2022. — V. 256. — P. 109303.
260. Borba J. V., Biasuz E., Sabadin G. R., Savicki A. C., Canzian J., Luchiari A. C., Adedara I. A., Rosemberg D. B. Influence of acute and unpredictable chronic stress on spatio-temporal dynamics of exploratory activity in zebrafish with emphasis on homebase-related behaviors // Behavioural Brain Research. — 2022. — V. 435. — P. 114034.
261. Shams S., Seguin D., Facciol A., Chatterjee D., Gerlai R. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish // Behavioral neuroscience. — 2017. — V. 131, № 6. — P. 492.
262. Kitraki E., Karandrea D., Kittas C. Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain // Neuroendocrinology. — 1999. — V. 69, № 5. — P. 331-338.
263. Fontana B. D., Gibbon A. J., Cleal M., Norton W. H., Parker M. O. Chronic unpredictable early-life stress (CUELS) protocol: Early-life stress changes anxiety levels of adult zebrafish // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2021. — V. 108. — P. 110087.
264. Fontana B. D., Cleal M., Norton W. H., Parker M. O. The impact of chronic unpredictable early-life stress (CUELS) on boldness and stress-reactivity: Differential effects of stress duration and context of testing // Physiology & behavior. — 2021. — V. 240. — P. 113526.
265. Gądek-Michalska A., Spyrka J., Rachwalska P., Tadeusz J., Bugajski J. Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity // Pharmacological Reports. — 2013. — 2013/09/01. — V. 65, № 5. — P. 1163-1175.

266. Bondar N., Bryzgalov L., Ershov N., Gusev F., Reshetnikov V., Avgustinovich D., Tenditnik M., Rogaev E., Merkulova T. Molecular adaptations to social defeat stress and induced depression in mice // Molecular neurobiology. — 2018. — V. 55, № 4. — P. 3394-3407.
267. Shoji H., Miyakawa T. Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice // Neuropsychopharmacology Reports. — 2020. — V. 40, № 1. — P. 73-84.
268. Luine V., Gomez J., Beck K., Bowman R. Sex differences in chronic stress effects on cognition in rodents // Pharmacology Biochemistry and Behavior. — 2017. — V. 152. — P. 13-19.
269. Pałucha-Poniewiera A., Podkowa K., Rafało-Ulińska A., Brański P., Burnat G. The influence of the duration of chronic unpredictable mild stress on the behavioural responses of C57BL/6J mice // Behavioural pharmacology. — 2020. — V. 31, № 6. — P. 574-582.
270. Bowman R. E., Beck K. D., Luine V. N. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity // Hormones and behavior. — 2003. — V. 43, № 1. — P. 48-59.
271. Reshetnikov V. V., Kisaretova P. E., Bondar N. P. Transcriptome alterations caused by social defeat stress of various durations in mice and its relevance to depression and posttraumatic stress disorder in humans: A meta-analysis // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — V. 23, № 22. — P. 13792.
272. Sterlemann V., Ganea K., Liebl C., Harbich D., Alam S., Holsboer F., Müller M. B., Schmidt M. V. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders // Hormones and behavior. — 2008. — V. 53, № 2. — P. 386-394.
273. Culig L., Surget A., Bourdey M., Khemissi W., Le Guisquet A.-M., Vogel E., Sahay A., Hen R., Belzung C. Increasing adult hippocampal neurogenesis in mice after exposure to unpredictable chronic mild stress may counteract some of the effects of stress // Neuropharmacology. — 2017. — V. 126. — P. 179-189.
274. Hu C., Luo Y., Wang H., Kuang S., Liang G., Yang Y., Mai S., Yang J. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress // PloS one. — 2017. — V. 12, № 9. — P. e0185129.
275. Erkizia-Santamaría I., Fernández L., Horrillo I., Meana J. J., Ortega J. E. Comparative analysis of multiple chronic unpredictable mild stress paradigms in mice: Behavioural and physiological validity // Neurobiology of Stress. — 2026. — P. 100815.
276. Nollet M. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice // Current protocols. — 2021. — V. 1, № 8. — P. e208.
277. Law J., Ibarguen-Vargas Y., Belzung C., Surget A. Decline of hippocampal stress reactivity and neuronal ensemble coherence in a mouse model of depression // Psychoneuroendocrinology. — 2016. — V. 67. — P. 113-123.
278. Shi W., Zhang S., Lu Y., Wang Y., Zhao J., Li L. T cell responses in depressed mice induced by chronic unpredictable mild stress // Journal of Affective Disorders. — 2022. — V. 296. — P. 150-156.
279. Cepeda Y., Tobar C., Jara N., Carril-Pardo C., Villarroel A., Lagos R., Recabal A., Nova-Lamperti E., Obregón-Rivas A. M., Vidal P. M. Prolonged social isolation promotes depressive-like behavior in male and female mice, with sex-related differences in the stress response // Biology of Sex Differences. — 2026. — V. 17, № 1. — P. 94.
280. Pavlov V., Palikov V., Fedotova A. Y., Shinelev M., Pakhomova I., Kazakova M., Baidarova S., Dyachenko I. Study of Behavioral Disorders in Laboratory Animals Using a Model of Unpredictable Chronic Mild Stress // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2025. — V. 178, № 6. — P. 794-797.
281. Monteiro S., Roque S., de Sá-Calçada D., Sousa N., Correia-Neves M., Cerqueira J. J. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice // Frontiers in psychiatry. — 2015. — V. 6. — P. 6.

282. Nadei O. V., Prokopenko E. S., Agalakova N. I. The Influence of the Duration of Chronic Unpredictable Mild Stress on the Effectiveness of Modeling Depressive-Like State in Rats of Different Ages // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2024. — 2024/11/01. — V. 60, № 6. — P. 2504-2516.
283. Marcon M., Herrmann A. P., Mocelin R., Rambo C. L., Koakoski G., Abreu M. S., Conterato G. M., Kist L. W., Bogo M. R., Zanatta L. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline // Psychopharmacology. — 2016. — V. 233, № 21. — P. 3815-3824.
284. Bassett B., Subramaniyam S., Fan Y., Varney S., Pan H., Carneiro A. M. D., Chung C. Y. Minocycline alleviates depression-like symptoms by rescuing decrease in neurogenesis in dorsal hippocampus via blocking microglia activation/phagocytosis // Brain Behav Immun. — 2021. — Jan. — V. 91. — P. 519-530.
285. Niranjan R., Rajasekar N., Nath C., Shukla R. The effect of guggulipid and nimesulide on MPTP-induced mediators of neuroinflammation in rat astrocytoma cells, C6 // Chem Biol Interact. — 2012. — Dec 5. — V. 200, № 2-3. — P. 73-83.
286. Shiow L. R., Favrais G., Schirmer L., Schang A. L., Cipriani S., Andres C., Wright J. N., Nobuta H., Fleiss B., Gressens P., Rowitch D. H. Reactive astrocyte COX2-PGE2 production inhibits oligodendrocyte maturation in neonatal white matter injury // Glia. — 2017. — Dec. — V. 65, № 12. — P. 2024-2037.
287. Christou M., Kavaliauskis A., Ropstad E., Fraser T. W. K. DMSO effects larval zebrafish (Danio rerio) behavior, with additive and interaction effects when combined with positive controls // Sci Total Environ. — 2020. — Mar 20. — V. 709. — P. 134490.
288. Gajbhiye S., Bhangre A., Tripathi R. K., Jalgaonkar S., Shankar A., Koli P. G. Evaluation of Antidepressant Effect of Minocycline in Alcohol Abstinence-Induced Depression Model in Mice // Cureus. — 2022. — Sep. — V. 14, № 9. — P. e28711.
289. Ahmed A., Wang L. L., Abdelmaksoud S., Aboelgheit A., Saeed S., Zhang C. L. Minocycline modulates microglia polarization in ischemia-reperfusion model of retinal degeneration and induces neuroprotection // Sci Rep. — 2017. — Oct 25. — V. 7, № 1. — P. 14065.
290. Fraga-Junior E. B., Fernandes I. L., Rohden C. A. H., Doneda D. L., Ynoue H. N., Rios-Santos F., Lima E., Buss Z. S., Vandresen-Filho S. Attenuation of the levels of pro-inflammatory cytokines prevents depressive-like behavior during ethanol withdrawal in mice // Brain Res Bull. — 2022. — Dec. — V. 191. — P. 9-19.
291. Kumar A., Singh B., Mishra J., Sah S. P., Pottabathini R. Neuroprotective mechanism of losartan and its interaction with nimesulide against chronic fatigue stress // Inflammopharmacology. — 2015. — Dec. — V. 23, № 6. — P. 291-305.
292. Song C., Liu B.-P., Zhang Y.-P., Peng Z., Wang J., Collier A. D., Echevarria D. J., Savelieva K. V., Lawrence R. F., Rex C. S., Meshalkina D. A., Kalueff A. V. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2018. — 2018/02/02/. — V. 81. — P. 384-394.
293. Canavello P., Cachat J., Beeson E., Laffoon A., Grimes C., Haymore W., Elegante M., Bartels B., Hart P., Elkhayat S., Truong D., Mohnot S., Amri H., Kalueff A. Measuring Endocrine (Cortisol) Responses of Zebrafish to Stress, 2010. — P. 135-142.
294. Egan R. J., Bergner C. L., Hart P. C., Cachat J. M., Canavello P. R., Elegante M. F., Elkhayat S. I., Bartels B. K., Tien A. K., Tien D. H., Mohnot S., Beeson E., Glasgow E., Amri H., Zukowska Z., Kalueff A. V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish // Behavioural Brain Research. — 2009. — 2009/12/14/. — V. 205, № 1. — P. 38-44.
295. Rassier G. T., Silveira T. L. R., Remião M. H., Daneluz L. O., Martins A. W. S., Dellagostin E. N., Ortiz H. G., Domingues W. B., Komninou E. R., Kütter M. T., Marins L. F.

F., Campos V. F. Evaluation of qPCR reference genes in GH-overexpressing transgenic zebrafish (Danio rerio) // Scientific Reports. — 2020. — 2020/07/29. — V. 10, № 1. — P. 12692.
296. Langnaese K., John R., Schweizer H., Ebmeyer U., Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model // BMC Mol Biol. — 2008. — May 28. — V. 9. — P. 53.
297. Theodoridi A., Tsalafouta A., Pavlidis M. Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in Serotonergic System Regulation // Frontiers in Neuroscience. — 2017. — V. 11, № 223.
298. Lepiller S., Franche N., Solary E., Chluba J., Laurens V. Comparative analysis of zebrafish nos2a and nos2b genes // Gene. — 2009. — Sep 15. — V. 445, № 1-2. — P. 58-65.
299. Demin K. A., Krotova N. A., Ilyin N. P., Galstyan D. S., Kolesnikova T. O., Strekalova T., de Abreu M. S., Petersen E. V., Zabegalov K. N., Kalueff A. V. Evolutionarily conserved gene expression patterns for affective disorders revealed using cross-species brain transcriptomic analyses in humans, rats and zebrafish // Sci Rep. — 2022. — Dec 2. — V. 12, № 1. — P. 20836.
300. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat Methods. — 2012. — Jul. — V. 9, № 7. — P. 671-5.
301. Fleming A., Diekmann H., Goldsmith P. Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish // PLOS ONE. — 2013. — V. 8, № 10. — P. e77548.
302. Liu W.-Y., Wang Z.-B., Wang Y., Tong L.-C., Li Y., Wei X., Luan P., Li L. Increasing the Permeability of the Blood–brain Barrier in Three Different Models in vivo // CNS Neuroscience & Therapeutics. — 2015. — V. 21, № 7. — P. 568-574.
303. Golushko N. I., Matrynov D., Galstyan D. S., Apukhtin K. V., de Abreu M. S., Yang L., Stewart A. M., Kalueff A. V. Understanding (and appreciating) behavioral complexity of zebrafish novel tank assays // Behav Processes. — 2025. — Aug. — V. 230. — P. 105230.
304. Demin K. A., Lakstygal A. M., Chernysh M. V., Krotova N. A., Taranov A. S., Ilyin N. P., Seredinskaya M. V., Tagawa N., Savva A. K., Mor M. S., Vasyutina M. L., Efimova E. V., Kolesnikova T. O., Gainetdinov R. R., Strekalova T., Amstislavskaya T. G., de Abreu M. S., Kalueff A. V. The zebrafish tail immobilization (ZTI) test as a new tool to assess stress-related behavior and a potential screen for drugs affecting despair-like states // J Neurosci Methods. — 2020. — May 1. — V. 337. — P. 108637.
305. Armario A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits // Neurosci Biobehav Rev. — 2021. — Sep. — V. 128. — P. 74-86.
306. Pizzagalli D. A., Roberts A. C. Prefrontal cortex and depression // Neuropsychopharmacology. — 2022. — V. 47, № 1. — P. 225-246.
307. Valencia-Flores K. B., Vidal-de-la O. Y., Paz-Trejo D., Sánchez-Castillo H. An approach to screen susceptible rats and efficacy of an antidepressive treatment after chronic stress // IBRO Neurosci Rep. — 2025. — Jun. — V. 18. — P. 803-813.
308. Wang Y. L., Han Q. Q., Gong W. Q., Pan D. H., Wang L. Z., Hu W., Yang M., Li B., Yu J., Liu Q. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats // J Neuroinflammation. — 2018. — Jan 17. — V. 15, № 1. — P. 21.
309. Zhou H., Wang K., Xu Z., Liu D., Wang Y., Guo M. Chronic unpredictable stress induces depression/anxiety-related behaviors and alterations of hippocampal monoamine receptor mRNA expression in female mice at different ages // Heliyon. — 2023. — Jul. — V. 9, № 7. — P. e18369.
310. Tay A. K., Jayasuriya R., Jayasuriya D., Silove D. Twelve-month trajectories of depressive and anxiety symptoms and associations with traumatic exposure and ongoing adversities: a latent trajectory analysis of a community cohort exposed to severe conflict in Sri Lanka // Translational Psychiatry. — 2017. — V. 7, № 8. — P. e1200-e1200.

311. Starr L. R., Stroud C. B., Li Y. I. Predicting the transition from anxiety to depressive symptoms in early adolescence: Negative anxiety response style as a moderator of sequential comorbidity // J Affect Disord. — 2016. — Jan 15. — V. 190. — P. 757-763.
312. Boyer P. Do anxiety and depression have a common pathophysiological mechanism? // Acta Psychiatrica Scandinavica. — 2000. — V. 102. — P. 24-29.
313. Yehuda R., Seckl J. Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis // Endocrinology. — 2011. — Dec. — V. 152, № 12. — P. 4496-503.
314. Bremmer M. A., Deeg D. J., Beekman A. T., Penninx B. W., Lips P., Hoogendijk W. J. Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia // Biol Psychiatry. — 2007. — Sep 1. — V. 62, № 5. — P. 479-86.
315. Vythilingam M., Gill J. M., Luckenbaugh D. A., Gold P. W., Collin C., Bonne O., Plumb K., Polignano E., West K., Charney D. Low early morning plasma cortisol in posttraumatic stress disorder is associated with co-morbid depression but not with enhanced glucocorticoid feedback inhibition // Psychoneuroendocrinology. — 2010. — Apr. — V. 35, № 3. — P. 442-50.
316. Seki K., Yoshida S., Jaiswal M. K. Molecular mechanism of noradrenaline during the stress-induced major depressive disorder // Neural Regen Res. — 2018. — Jul. — V. 13, № 7. — P. 1159-1169.
317. Llorca-Torralba M., Suárez-Pereira I., Bravo L., Camarena-Delgado C., Garcia-Partida J. A., Mico J. A., Berrocoso E. Chemogenetic Silencing of the Locus Coeruleus-Basolateral Amygdala Pathway Abolishes Pain-Induced Anxiety and Enhanced Aversive Learning in Rats // Biol Psychiatry. — 2019. — Jun 15. — V. 85, № 12. — P. 1021-1035.
318. Picard K., St-Pierre M. K., Vecchiarelli H. A., Bordeleau M., Tremblay M. Neuroendocrine, neuroinflammatory and pathological outcomes of chronic stress: A story of microglial remodeling // Neurochem Int. — 2021. — May. — V. 145. — P. 104987.
319. Mitani H., Shirayama Y., Yamada T., Kawahara R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. — 2006. — May. — V. 30, № 3. — P. 531-4.
320. Owens M. J., Nemeroff C. B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter // Clinical Chemistry. — 1994. — V. 40, № 2. — P. 288-295.
321. Bach H., Huang Y. Y., Underwood M. D., Dwork A. J., Mann J. J., Arango V. Elevated serotonin and 5-HIAA in the brainstem and lower serotonin turnover in the prefrontal cortex of suicides // Synapse. — 2014. — Mar. — V. 68, № 3. — P. 127-30.
322. Gan D., Wu S., Chen B., Zhang J. Application of the Zebrafish Traumatic Brain Injury Model in Assessing Cerebral Inflammation // Zebrafish. — 2020. — Apr. — V. 17, № 2. — P. 73-82.
323. Veetil A. T., Zou J., Henderson K. W., Jani M. S., Shaik S. M., Sisodia S. S., Hale M. E., Krishnan Y. DNA-based fluorescent probes of NOS2 activity in live brains // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2020. — Jun 30. — V. 117, № 26. — P. 14694-14702.
324. Wiegertjes G. F., Wentzel A. S., Spaink H. P., Elks P. M., Fink I. R. Polarization of immune responses in fish: The ‘macrophages first’ point of view // Molecular Immunology. — 2016. — 2016/01/01/. — V. 69. — P. 146-156.
325. Leiba J., Özbilgiç R., Hernández L., Demou M., Lutfalla G., Yatime L., Nguyen-Chi M. Molecular Actors of Inflammation and Their Signaling Pathways: Mechanistic Insights from Zebrafish // Biology. — 2023. — V. 12, № 2. — P. 153.
326. Wheeler M. A., Jaronen M., Covacu R., Zandee S. E. J., Scalisi G., Rothhammer V., Tjon E. C., Chao C. C., Kenison J. E., Blain M., Rao V. T. S., Hewson P., Barroso A., Gutiérrez-Vázquez C., Prat A., Antel J. P., Hauser R., Quintana F. J. Environmental Control of Astrocyte Pathogenic Activities in CNS Inflammation // Cell. — 2019. — Jan 24. — V. 176, № 3. — P. 581-596.e18.

327. Peng L., Ji Y., Li Y., You Y., Zhou Y. PRDX6-iPLA2 aggravates neuroinflammation after ischemic stroke via regulating astrocytes-induced M1 microglia // Cell Commun Signal. — 2024. — Jan 29. — V. 22, № 1. — P. 76.
328. Coelho A. A., Vila-Verde C., Sartim A. G., Uliana D. L., Braga L. A., Guimarães F. S., Lisboa S. F. Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition in the Medial Prefrontal Cortex Attenuates the Anxiogenic-Like Effect of Acute Restraint Stress via CB(1) Receptors // Front Psychiatry. — 2022. — V. 13. — P. 923177.
329. Abu-Ghanem Y., Cohen H., Buskila Y., Grauer E., Amitai Y. Enhanced stress reactivity in nitric oxide synthase type 2 mutant mice: findings in support of astrocytic nitrosative modulation of behavior // Neuroscience. — 2008. — Oct 2. — V. 156, № 2. — P. 257-65.
330. Gamble-George J. C., Baldi R., Halladay L., Kocharian A., Hartley N., Silva C. G., Roberts H., Haymer A., Marnett L. J., Holmes A., Patel S. Cyclooxygenase-2 inhibition reduces stress-induced affective pathology // Elife. — 2016. — May 10. — V. 5.
331. Morgan A., Kondev V., Bedse G., Baldi R., Marcus D., Patel S. Cyclooxygenase-2 inhibition reduces anxiety-like behavior and normalizes enhanced amygdala glutamatergic transmission following chronic oral corticosterone treatment // Neurobiol Stress. — 2019. — Nov. — V. 11. — P. 100190.
332. Song Q., Feng Y. B., Wang L., Shen J., Li Y., Fan C., Wang P., Yu S. Y. COX-2 inhibition rescues depression-like behaviors via suppressing glial activation, oxidative stress and neuronal apoptosis in rats // Neuropharmacology. — 2019. — Dec 1. — V. 160. — P. 107779.
333. Klatt Shaw D., Saraswathy V. M., Zhou L., McAdow A. R., Burris B., Butka E., Morris S. A., Dietmann S., Mokalled M. H. Localized EMT reprograms glial progenitors to promote spinal cord repair // Dev Cell. — 2021. — Mar 8. — V. 56, № 5. — P. 613-626.e7.
334. Maheras A. L., Dix B., Carmo O. M. S., Young A. E., Gill V. N., Sun J. L., Booker A. R., Thomason H. A., Ibrahim A. E., Stanislaw L., Dallego J. C., Ngo C. N., Chen A., Fortini B. K., Spence R. D. Genetic Pathways of Neuroregeneration in a Novel Mild Traumatic Brain Injury Model in Adult Zebrafish // eneuro. — 2018. — V. 5, № 1. — P. ENEURO.0208-17.2017.
335. Ha S. M., Barnhill L. M., Li S., Bronstein J. M. Neurotoxicity of diesel exhaust extracts in zebrafish and its implications for neurodegenerative disease // Scientific Reports. — 2022. — 2022/11/12. — V. 12, № 1. — P. 19371.
336. Spencer C. G., Hamilton M., Bedsole E., Wei Y. N., Rojas A. M., Burciu A., Zhu J., Sabin K. Z., Shiau C. E. Chronic macrophage activation derails muscle repair by disrupting mannose-receptor-linked plasticity revealed by endogenous irg1/acod1 tracking // Nature Communications. — 2026. — 2026/01/07. — V. 17, № 1. — P. 1466.
337. Zhang L., An L., Zhao Y., Lu Z., Huang J., Tang L., Lv M., Mo D., Shu L. Tanshinone IIA accelerates zebrafish venous vascular repair via macrophage recruitment through the CXCR4A–CXCL12B signaling axis // Frontiers in Immunology. — 2026. — V. 17, № 1792022.
338. Wentzel A. S., Petit J., van Veen W. G., Fink I. R., Scheer M. H., Piazzon M. C., Forlenza M., Spaink H. P., Wiegertjes G. F. Transcriptome sequencing supports a conservation of macrophage polarization in fish // Scientific Reports. — 2020. — 2020/08/10. — V. 10, № 1. — P. 13470.
339. Oosterhof N., Holtman I. R., Kuil L. E., van der Linde H. C., Boddeke E. W., Eggen B. J., van Ham T. J. Identification of a conserved and acute neurodegeneration-specific microglial transcriptome in the zebrafish // Glia. — 2017. — Jan. — V. 65, № 1. — P. 138-149.
340. Sun J., Peterson E. A., Chen X., Wang J. ptx3a(+) fibroblast/epicardial cells provide a transient macrophage niche to promote heart regeneration // Cell Rep. — 2024. — Apr 23. — V. 43, № 4. — P. 114092.
341. Xia Y., Duca S., Perder B., Dündar F., Zumbo P., Qiu M., Yao J., Cao Y., Harrison M. R. M., Zangi L., Betel D., Cao J. Activation of a transient progenitor state in the epicardium is required for zebrafish heart regeneration // Nature Communications. — 2022. — 2022/12/13. — V. 13, № 1. — P. 7704.

342. Qiu L., Li J., Bai H., Wang L., Zeng Q., Wu S., Li P., Mu L., Yin X., Ye J. Long-chain pentraxin 3 possesses agglutination activity and plays a role in host defense against bacterial infection in Oreochromis niloticus // Developmental & Comparative Immunology. — 2023. — 2023/12/01/. — V. 149. — P. 105053.
343. Li Y., Xia P., Wu J., Huang A., Bu G., Meng F., Kong F., Cao X., Han X., Yu G., Pan X., Yang S., Zeng X., Du X. The potential sensing molecules and signal cascades for protecting teleost fishes against lipopolysaccharide // Fish Shellfish Immunol. — 2020. — Feb. — V. 97. — P. 235-247.
344. Svenningsson P., Kim Y., Warner-Schmidt J., Oh Y. S., Greengard P. p11 and its role in depression and therapeutic responses to antidepressants // Nat Rev Neurosci. — 2013. — Oct. — V. 14, № 10. — P. 673-80.
345. Kokkosis A. G., Madeira M. M., Hage Z., Valais K., Koliatsis D., Resutov E., Tsirka S. E. Chronic psychosocial stress triggers microglial-/macrophage-induced inflammatory responses leading to neuronal dysfunction and depressive-related behavior // Glia. — 2024. — Jan. — V. 72, № 1. — P. 111-132.
346. Xu Y., Wang M., Wei H., Yu M., Li Y. Pentraxin 3 promotes microglial M2 polarization and excitatory synapse formation in the hippocampus in depression // Int Immunopharmacol. — 2025. — Jan 27. — V. 146. — P. 113946.
347. Rossi S., Studer V., Motta C., Polidoro S., Perugini J., Macchiarulo G., Giovannetti A. M., Pareja-Gutierrez L., Calò A., Colonna I., Furlan R., Martino G., Centonze D. Neuroinflammation drives anxiety and depression in relapsing-remitting multiple sclerosis // Neurology. — 2017. — Sep 26. — V. 89, № 13. — P. 1338-1347.
348. Welcome M. O., Mastorakis N. E. Stress-induced blood brain barrier disruption: Molecular mechanisms and signaling pathways // Pharmacol Res. — 2020. — Jul. — V. 157. — P. 104769.
349. Menard C., Pfau M. L., Hodes G. E., Kana V., Wang V. X., Bouchard S., Takahashi A., Flanigan M. E., Aleyasin H., LeClair K. B., Janssen W. G., Labonté B., Parise E. M., Lorsch Z. S., Golden S. A., Heshmati M., Tamminga C., Turecki G., Campbell M., Fayad Z. A., Tang C. Y., Merad M., Russo S. J. Social stress induces neurovascular pathology promoting depression // Nat Neurosci. — 2017. — Dec. — V. 20, № 12. — P. 1752-1760.
350. Pearson-Leary J., Eacret D., Chen R., Takano H., Nicholas B., Bhatnagar S. Inflammation and vascular remodeling in the ventral hippocampus contributes to vulnerability to stress // Transl Psychiatry. — 2017. — Jun 27. — V. 7, № 6. — P. e1160.
351. Yuan M., Yang B., Rothschild G., Mann J. J., Sanford L. D., Tang X., Huang C., Wang C., Zhang W. Epigenetic regulation in major depression and other stress-related disorders: molecular mechanisms, clinical relevance and therapeutic potential // Signal Transduct Target Ther. — 2023. — Aug 30. — V. 8, № 1. — P. 309.
352. Arzate-Mejia R. G., Carullo N. V. N., Mansuy I. M. The epigenome under pressure: On regulatory adaptation to chronic stress in the brain // Curr Opin Neurobiol. — 2024. — Feb. — V. 84. — P. 102832.
353. Sailaja B. S., Cohen-Carmon D., Zimmerman G., Soreq H., Meshorer E. Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4 // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2012. — Dec 26. — V. 109, № 52. — P. E3687-95.
354. Sarkar A., Chachra P., Kennedy P., Pena C. J., Desouza L. A., Nestler E. J., Vaidya V. A. Hippocampal HDAC4 contributes to postnatal fluoxetine-evoked depression-like behavior // Neuropsychopharmacology. — 2014. — Aug. — V. 39, № 9. — P. 2221-32.
355. Guidotti G., Calabrese F., Anacker C., Racagni G., Pariante C. M., Riva M. A. Glucocorticoid receptor and FKBP5 expression is altered following exposure to chronic stress: modulation by antidepressant treatment // Neuropsychopharmacology. — 2013. — V. 38, № 4. — P. 616-627.
356. Zhang L., Zhang J., Sun H., Liu H., Yang Y., Yao Z. Exposure to enriched environment restores the mRNA expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the

hippocampus and ameliorates depressive-like symptoms in chronically stressed rats // Current neurovascular research. — 2011. — V. 8, № 4. — P. 286-293.
357. Adzic M., Djordjevic J., Djordjevic A., Niciforovic A., Demonacos C., Radojcic M., Krstic-Demonacos M. Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain // Journal of Endocrinology. — 2009. — V. 202, № 1. — P. 87-97.
358. Wang D., Wang J., Yan D., Wang M., Yang L., Demin K. A., de Abreu M. S., Kalueff A. V. Minocycline reduces neurobehavioral deficits evoked by chronic unpredictable stress in adult zebrafish // Brain Res. — 2024. — Dec 15. — V. 1845. — P. 149209.
359. Feng C.-W., Wen Z.-H., Huang S.-Y., Hung H.-C., Chen C.-H., Yang S.-N., Chen N.-F., Wang H.-M. D., Hsiao C.-D., Chen W.-F. Effects of 6-Hydroxydopamine Exposure on Motor Activity and Biochemical Expression in Zebrafish (Danio Rerio) Larvae // Zebrafish. — 2014. — V. 11, № 3. — P. 227 - 239.
360. Skvarc D. R., Lin S. C., Croce S., Bastawy E. M., Smith C. M., Drum B., Panizzutti B., Dean O. M. Preclinical rodent studies support minocycline as an adjunctive anxiolytic // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2026. — 2026/03/20/. — V. 145. — P. 111650.
361. Nadanaciva S., Aleo M. D., Strock C. J., Stedman D. B., Wang H., Will Y. Toxicity assessments of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in isolated mitochondria, rat hepatocytes, and zebrafish show good concordance across chemical classes // Toxicol Appl Pharmacol. — 2013. — Oct 15. — V. 272, № 2. — P. 272-80.
362. Suhail N., Bilal N., Hasan S., Banu N. Chronic unpredictable stress exacerbates 7,12-dimethylbenz (a) anthracene induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in Swiss albino mice // Mol Cell Biochem. — 2011. — Sep. — V. 355, № 1-2. — P. 117-26.
363. Bilal N., Suhail N., Hasan S., Ashraf G. M., Fatima S., Khan H. Y., Alharbi M. S., Alexiou A., Banu N. Exacerbation of N-nitrosodiethylamine Induced Hepatotoxicity and DNA Damage in Mice Exposed to Chronic Unpredictable Stress // Front Pharmacol. — 2017. — V. 8. — P. 360.
364. Godino-Gimeno A., Rocha A., Chivite M., Saera-Vila A., Rotllant J., Míguez J. M., Cerdá-Reverter J. M. Agouti-induced anxiety-like behavior is mediated by central serotonergic pathways in zebrafish // Journal of Neuroscience. — 2024. — V. 44, № 32. — Art. e1970232024.
365. Strekalova T., Spanagel R., Bartsch D., Henn F. A., Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration // Neuropsychopharmacology. — 2004. — Nov. — V. 29, № 11. — P. 2007-17.
366. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage // Neurobiol Stress. — 2017. — Feb. — V. 6. — P. 78-93.
367. Roszkowski M., Bohacek J. Stress does not increase blood-brain barrier permeability in mice // J Cereb Blood Flow Metab. — 2016. — Jul. — V. 36, № 7. — P. 1304-15.
368. Perez-Caballero L., Torres-Sanchez S., Bravo L., Mico J. A., Berrocoso E. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development // Expert opinion on drug discovery. — 2014. — V. 9, № 5. — P. 567-578.
369. Canzian J., Silva R. M., Mohammed K. A., Resmim C. M., Gonçalves F. L., Fontoura K., Pretzel C. W., Muller M. L., Moraes H. S., Fontana B. D. Fluoxetine ameliorates affective-and pain-related responses in adult zebrafish // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. — 2025. — V. 142. — P. 111505.
370. Zavvari F., Nahavandi A., Goudarzi M. Fluoxetine attenuates stress-induced depressive-like behavior through modulation of hippocampal GAP43 and neurogenesis in male rats // Journal of Chemical Neuroanatomy. — 2020. — V. 103. — P. 101711.
371. Qian X., Zhong Z.-d., Zhang Y., Qiu L.-q., Tan H.-j. Fluoxetine mitigates depressive-like behaviors in mice via anti-inflammation and enhancing neuroplasticity // Brain Research. — 2024. — V. 1825. — P. 148723.

372. Zhang C., Zhang Y.-P., Li Y.-Y., Liu B.-P., Wang H.-Y., Li K.-W., Zhao S., Song C. Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat // Behavioural brain research. — 2019. — V. 356. — P. 348-357.
373. Cheng D., Qin Z.-S., Zheng Y., Xie J.-Y., Liang S.-S., Zhang J.-L., Feng Y.-B., Zhang Z.-J. Minocycline, a classic antibiotic, exerts psychotropic effects by normalizing microglial neuroinflammation-evoked tryptophan-kynurenine pathway dysregulation in chronically stressed male mice // Brain, Behavior, and Immunity. — 2023. — V. 107. — P. 305-318.
374. Sarapultsev A., Komelkova M., Utepova I., Gusev E., Hu D., Trofimov A., Tokay T., Kondaurova E., Naumenko V. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors in preclinical rodent models of depression and post-traumatic stress disorder: a systematic review of behavioral, neuroinflammatory, and molecular mechanisms // ACS Chemical Neuroscience. — 2025. — V. 16, № 16. — P. 3096-3114.
375. Wu L.-H., Huang B.-R., Lai S.-W., Lin C., Lin H.-Y., Yang L.-Y., Lu D.-Y. SIRT1 activation by minocycline on regulation of microglial polarization homeostasis // Aging (albany NY). — 2020. — V. 12, № 18. — P. 17990.
376. Scholz R., Sobotka M., Caramoy A., Stempfl T., Moehle C., Langmann T. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration // Journal of neuroinflammation. — 2015. — V. 12, № 1. — P. 209.
377. Luo W., Luo Y., Yang J. Proteomics-based screening of the target proteins associated with antidepressant-like effect and mechanism of nimesulide // Sci Rep. — 2020. — Jul 6. — V. 10, № 1. — P. 11052.
378. Tsybko A. S., Kondaurova E. M., Zalivina E. A., Blaginya V. O., Naumenko V. S. Effects of Chronic Combined Treatment with Ketanserin and Fluoxetine in B6.CBA-D13Mit76C Recombinant Mice with Abnormal 5-HT1A Receptor Functional Activity // Biochemistry (Moscow). — 2023. — 2023/06/01. — V. 88, № 6. — P. 758-769.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Данные статистического анализа для экспериментальной серии 1, описанной в главе 3

Таблица А.1 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Стресс) эффектов хронического непредсказуемого стресса (ХНС) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума и тесте иммобилизации хвоста в экспериментальной серии 1 (см. Рисунок 3.1 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Тест	Параметры	Факторы	Статистика ANOVA	p-значение
ТНА	Время в верхней части аквариума, сек	Время	F (2, 140) = 10.40	0.0001
		Стресс	F (1, 140) = 0.01	0.9876, НЗ
		Время х Стресс	F (2, 140) = 2.89	0.0591, НЗ
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	Время	F (2, 140) = 4.20	0.0169
		Стресс	F (1, 140) = 1.05	0.3084, НЗ
		Время х Стресс	F (2, 140) = 5.66	0.0043
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	Время	F (2, 140) = 7.68	0.0007
		Стресс	F (1, 140) = 4.71	0.0316
		Время х Стресс	F (2, 140) = 0.74	0.4787, НЗ
	Длительность замираний, сек	Время	F (2, 140) = 8.08	0.0005
		Стресс	F (1, 140) = 1.05	0.3085, НЗ
		Время х Стресс	F (2, 140) = 2.74	0.0678, НЗ
	Частота замираний	Время	F (2, 140) = 17.71	0.0001
		Стресс	F (1, 140) = 2.21	0.1395, НЗ
		Время х Стресс	F (2, 140) = 0.07	0.9327, НЗ
	Пройденная дистанция, см	Время	F (2, 140) = 1.87	0.1587, НЗ
		Стресс	F (1, 140) = 0.12	0.7352, НЗ
		Время х Стресс	F (2, 140) = 4.20	0.0169
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	Время	F (2, 140) = 2.40	0.0945, НЗ
		Стресс	F (1, 140) = 14.43	0.0002
		Время х Стресс	F (2, 140) = 1.36	0.2598, НЗ
ТИХ	Активность,%	Время	F (1, 66) = 1.228	0.2719, НЗ
		Стресс	F (1, 66) = 13.42	0.0005
		Время х Стресс	F (1, 66) = 1.228	0.2719, НЗ

Таблица А.2 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Стресс) для уровня кортизола в теле *Danio rerio* (см. Рисунок 3.2 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Параметры	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
Уровень кортизола, нг/г веса тела	Стресс	F (1, 51) = 1.16	0.2862, НЗ
	Время	F (2, 51) = 1.85	0.1672, НЗ
	Стресс х Время	F (2, 51) = 4.04	0.0236

Таблица А.3 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Стресс) для уровня экспрессии генов в головном мозге *Danio rerio* (см. Рисунок 3.3 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Гены	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
nos2a	Стресс	F (1, 23) = 5.01	0.0352
	Время	F (1, 23) = 6.75	0.0161
	Стресс х Время	F (1, 23) = 5.01	0.0352
cox2	Стресс	F (1, 21) = 15.02	0.0009
	Время	F (1, 21) = 11.62	0.0026
	Стресс х Время	F (1, 21) = 10.47	0.0040
il-1β	Стресс	F (1, 23) = 4.62	0.0424
	Время	F (1, 23) = 0.13	0.7217, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 23) = 0.47	0.4999, НЗ
il-6	Стресс	F (1, 22) = 0.01	0.9502, НЗ
	Время	F (1, 22) = 0.95	0.3417, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 22) = 1.36	0.2554, НЗ
p75NTR	Стресс	F (1, 23) = 3.94	0.0591, НЗ
	Время	F (1, 23) = 0.01	0.9320, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 23) = 0.01	0.9043, НЗ
arg-1	Стресс	F (1, 23) = 1.53	0.2289, НЗ
	Время	F (1, 23) = 0.30	0.5887, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 23) = 0.14	0.7073, НЗ
cd206	Стресс	F (1, 22) = 5.77	0.0252
	Время	F (1, 22) = 0.73	0.4035, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 22) = 2.95	0.1001, НЗ
c3	Стресс	F (1, 26) = 5.76	0.0238
	Время	F (1, 26) = 0.84	0.3669, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 26) = 0.02	0.9073, НЗ
gbp2	Стресс	F (1, 23) = 0.01	0.9824, НЗ
	Время	F (1, 23) = 1.23	0.2781, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 23) = 2.54	0.1246, НЗ

Продолжение таблицы А.3

Гены	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
ptx3	Стресс	F (1, 25) = 2.39	0.1348, НЗ
	Время	F (1, 25) = 8.14	0.0086
	Стресс х Время	F (1, 25) = 7.95	0.0093
gr	Стресс	F (1, 26) = 5.95	0.0219
	Время	F (1, 26) = 6.14	0.0200
	Стресс х Время	F (1, 26) = 6.70	0.0156
chh	Стресс	F (1, 22) = 5.62	0.0270
	Время	F (1, 22) = 4.91	0.0374
	Стресс х Время	F (1, 22) = 5.97	0.0230
gria	Стресс	F (1, 23) = 0.55	0.4655
	Время	F (1, 23) = 0.03	0.8581
	Стресс х Время	F (1, 23) = 4.16	0.0530
dnmt3a	Стресс	F (1, 22) = 2.14	0.1574
	Время	F (1, 22) = 1.52	0.2302
	Стресс х Время	F (1, 22) = 2.72	0.1133
dnmt3b	Стресс	F (1, 23) = 1.65	0.2116
	Время	F (1, 23) = 0.42	0.5231
	Стресс х Время	F (1, 23) = 0.42	0.5231
hat1	Стресс	F (1, 21) = 4.38	0.0486
	Время	F (1, 21) = 0.02	0.8850, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 21) = 0.01	0.9813, НЗ
hdac4	Стресс	F (1, 18) = 3.91	0.0636, НЗ
	Время	F (1, 18) = 5.48	0.0310
	Стресс х Время	F (1, 18) = 5.41	0.0320

Таблица А.4 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Стресс) для анализа уровня моноаминов (см. Рисунок 3.4 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Параметры	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
5-ГИУК/серотонин	Стресс	F (1, 22) = 6.95	0.0151
	Время	F (1, 22) = 0.16	0.7065, НЗ
	Стресс х Время	F (1. 22) = 3.14	0.0904, НЗ
ДОФУК/дофамин	Стресс	F (1, 22) = 3.39	0.0789, НЗ
	Время	F (1, 22) = 1.62	0.2161, НЗ
	Стресс х Время	F (1, 22) = 0.08	0.7802, НЗ
Серотонин	Стресс	F (1, 22) = 1.9	0.1825, НЗ
	Время	F (1, 22) = 18.43	0.0003
	Стресс х Время	F (1, 22) = 4.82	0.0390
Дофамин	Стресс	F (1, 24) = 3.08	0.0920, НЗ
	Время	F (1, 24) = 15.13	0.0007
	Стресс х Время	F (1, 24) = 2.4	0.1345, НЗ
Норадреналин	Стресс	F (1, 23) = 2.5	0.1276, НЗ
	Время	F (1, 23) = 18.68	0.0003
	Стресс х Время	F (1, 23) = 3.53	0.0730, НЗ

Таблица А.5 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Стресс) для анализа проницаемости ГЭБ (см. Рисунок 3.5 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Параметры	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
Уровень флуоресценции Эванса синего	Стресс	F (1, 16) = 20.20	0.0004
	Время	F (1, 16) = 25.47	0.0001
	Стресс x Время	F (1, 16) = 8.402	0.0105

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Данные статистического анализа для экспериментальной серии 2, описанной в главе 4

Таблица Б.1 – Результаты статистического анализа (тест Манна-Уитни) эффектов хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА), тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) и уровень экспрессии генов в эксперименте (ПЦР-РВ) 1 (см. Рисунок 4.1, 4.2). Me – медиана, НЗ – нет значимых различий

Тест	**Параметры**	**Me(контроль)**	**Me(стресс)**	**U, p-значение**
ТНА	Пройденная дистанция, см	978	1152	190, p=0.0022
	Время в верхней части аквариума, сек	14	139	74, p<0.0001
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	2	11	120, p<0.0001
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	215	31	110, p<0.0001
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	0.4	1.03	192, p=0.0023
	Длительность замираний, сек	81	63	193, p=0.0026
	Частота замираний	616	604	358, p=0.91
ТИХ	Активность,%	0.17	0.03	40, p=0.0021
	Латентный период первого периода активности, сек	41	29	186, p=0.12, НЗ
ПЦР-РВ	*nos2a*	75	116	17, p = 0.94, НЗ
	cox2	93	72	16, p = 0.88, НЗ
	il1β	111	93	15, p = 0.75, НЗ
	il6	77	92	23, p = 0.90, НЗ
	arg1	101	64	2, p = 0.02
	cd206	99	52	5, p = 0.02
	c3	86	173	16, p = 0.32, НЗ
	gbp2	98	22	2, p = 0.02
	s100a10	46	200	12, p = 0.13, НЗ
	ptx	119	41	2, p = 0.03
	gr	106	42	4, p = 0.03

Таблица Б.2 – Результаты статистического анализа (Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна) эффектов миноциклина (25 мг/л, 50 мг/л, 100 мг/л; 1 неделя) и нимесулида (1 мг/л, 5 мг/л; 1 неделя) на поведение *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) в экспериментах 2 и 5 (см. Рисунок 4.3, 4.7). Me – медиана, НЗ – нет значимых различий

Препарат	**Параметры в ТНА**	**Me(c)**	**Me(25)**	**Me(50)**	**Me(100)**	**$H_{(3, 43)}$, p-значение**
Миноциклин	Пройденная дистанция, см	1070	937	764	760	13.03, p=0.0046
	Время в верхней части аквариума, сек	126	93	106	76	1.54, p=0.67, НЗ
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	11	7	5	9	3.23, p=0.36, НЗ
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	102	84	142	73	0.59, p=0.89, НЗ
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	1	0.75	0.6	0.25	8.54, p=0.036, НЗ
	Длительность замираний, сек	94	97	144	134	9.33, p=0.025, НЗ
	Частота замираний	560	521	559	824	2.12, p=0.55, НЗ
Нимесулид	**Параметры в ТНА**		**Me(c)**	**Me(1)**	**Me(5)**	**$H_{(2, 31)}$, p-значение**
	Пройденная дистанция, см		1537	1492	1275	1.41, p=0.49 НЗ
	Время в верхней части аквариума, сек		122	147	104	3.17, p=0.21 НЗ
	Частота захода в верхнюю часть аквариума		16	19	12	5.59, p=0.06 НЗ
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек		24	35	37	2.83, p=0.24 НЗ
	Длительность периодов высокой подвижности, сек		2	1.3	1.2	2.72, p=0.26 НЗ
	Длительность замираний, сек		24	23	40	1.65, p=0.44 НЗ
	Частота замираний		388	402	479	0.36, p=0.84 НЗ

Таблица Б.3 – Результаты статистического анализа (Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна) эффектов миноциклина (50 мг/л; 2 недели) в модели хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА), тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) и уровень экспрессии генов (ПЦР-РВ) в эксперименте 3 (см. Рисунок 4.4, 4.5). Me – медиана, к –контроль, м – миноциклин, с- стресс, см – стресс + миноциклин, НЗ – нет значимых различий

Тест	**Параметры**	**Me(к)**	**Me(н)**	**Me(с)**	**Me(сн)**	**KW H, p-значение**
ТНА	Пройденная дистанция, см	1271	790	977	1020	12.49, p=0.006
	Время в верхней части аквариума, сек	74	30	35	48	1.07, p=0.78, НЗ
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	7	4	3	7	5.31, p=0.15, НЗ
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	87	155	85	119	3.03, p=0.39, НЗ
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	1.2	0.9	0.7	2.1	8.72, p=0.03
	Длительность замираний, сек	32	115	78	120	18.28, p=0.0004
	Частота замираний	383	696	621	452	13.18, p=0.004
ТИХ	Активность,%	0.06	0.08	0.02	0.02	6.61, p=0.086, НЗ
	Латентный период первого периода активности, сек	42	61	161	62	7.92, p=0.0479
ПЦР-РВ	*nos2a*	99	5	1	2	13.40, p=0.004
	cox2	75	8	11	3	9.07, p=0.0284
	il1β	93	57	83	39	0.59, p=0.898 НЗ
	il6	70	26	2	4	10.09, p=0.018
	arg1	92	10	3	1	12.39, p=0.0062
	cd206	72	765	1985	278	10.29, p=0.016
	c3	79	21	25	9	2.65, p=0.45
	gbp2	92	32	55	193	4.21, p=0.25 НЗ
	s100a10	88	279	121	25	12.68 p=0.0054
	ptx	82	13	0	0	12.11, p=0.007

Таблица Б.4 – Результаты статистического анализа (Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна) эффектов миноциклина (25 мг/л; 1 неделя) в модели хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) в эксперименте 4 (см. Рисунок 4.6). Me – медиана, к –контроль, м – миноциклин, с-стресс, см – стресс + миноциклин, НЗ – нет значимых различий

Тест	**Parameters**	**Me(к)**	**Me(м)**	**Me(с)**	**Me(см)**	**KW H, p-значение**
ТНА	Пройденная дистанция, см	881	674	712	775	4.51, p=0.212, НЗ
	Время в верхней части аквариума, сек	18	1	1	70	10.02, p=0.012
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	5	1	1	5	4.14, p=0.274, НЗ
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	144	300	237	108	7.86, p=0.049
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	0.7	1.3	0.4	1	2.85, p=0.416, НЗ
	Длительность замираний, сек	97	144	123	125	3.19, p=0.363, НЗ
	Частота замираний	569	482	622	762	19.62, p=0.0002
ТИХ	Активность,%	0.06	0.03	0.06	0.05	5.28, p=0.153, НЗ
	Латентный период первого периода активности, сек	92	140	43	68	5.40, p=0.145, НЗ

Таблица Б.5 – Результаты статистического анализа (Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна) эффектов нимесулида (5 мг/л; 2 недели) в модели хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) в эксперименте 6 (см. Рисунок 4.8). Me – медиана, к –контроль, н – нимесулид, с-стресс, сн – стресс + нимесулид, НЗ – нет значимых различий

Тест	**Параметры**	**Me(к)**	**Me(н)**	**Me(с)**	**Me(сн)**	**KW H $_{(3, 47)}$, p-значение**
ТНА	Пройденная дистанция, см	1017	774	1060	832	12.78, p=0.0055
	Время в верхней части аквариума, сек	4	8	140	42	25.32, p<0.0001
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	1	2	11	5	20.64, p=0.0001
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	240	196	15	65	25.69, p<0.0001
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	0.5	0.4	0.42	0.27	0.21, p=0.975, НЗ
	Длительность замираний, сек	86	118	58	105	15.45, p=0.0015
	Частота замираний	684	984	659	920	14.34, p=0.0025
ТИХ	Активность,%	0.03	0.05	0.03	0.03	4.26, p=0.235, НЗ
	Латентный период первого периода активности, сек	73	86	216	220	3.71, p=0.30, НЗ

Таблица Б.6 – Результаты статистического анализа (Критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна) эффектов нимесулида (2.5 мг/л; 2 недели) в модели хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) в эксперименте 7 (см. Рисунок 4.9). Me – медиана, к –контроль, н – нимесулид, с-стресс, сн – стресс + нимесулид, НЗ – нет значимых различий

Тест	**Параметры**	**Me(к)**	**Me(н)**	**Me(с)**	**Me(сн)**	**KW H $_{(3, 37)}$, p-значение**
ТНА	Пройденная дистанция, см	946	853	1262	1356	9.76, p=0.0207
	Время в верхней части аквариума, сек	17	4	125	197	23.49, p<0.0001
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	4	3	11	5	9.58, p=0.0225
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	114	216	40	111	10.54, p=0.0145
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	0.2	0.2	1.8	2.1	22.42, p<0.0001
	Длительность замираний, сек	80	101	63	56	5.65, p=0.13,НЗ
	Частота замираний	575	606	592	458	5.09, p=0.16, НЗ
ТИХ	Активность,%	0.5	0.3	0.02	0.03	16.56, p=0.0009
	Латентный период первого периода активности, сек	28	48	67	63	1.77, p=0.62, НЗ

Таблица Б.7 – Результаты статистического анализа (тест Краскела – Уоллиса с поправкой) эффектов нимесулида (2.5 мг/л в течение 1 недели) в модели хронического непредсказуемого стресса (ХНС2) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума, тесте иммобилизации хвоста и уровень экспрессии генов в эксперименте 8 (см. Рисунок 4.10, 4.11). Me – медиана, к –контроль, н – нимесулид, с- стресс, сн – стресс + нимесулид, НЗ – нет значимых различий

	Параметры	**Me(к)**	**Me(н)**	**Me(с)**	**Me(сн)**	**KW H, p-значение**
ТНА	Пройденная дистанция, см	796	911	823	586	6.76, p=0.079, НЗ
	Время в верхней части аквариума, сек	8	12	12	48	8.09, p=0.044
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	1	3	2	5	6.72, p=0.081, НЗ
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	222	156	272	126	5.23, p=0.16, НЗ
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	0.2	0.15	0.22	0.13	1.37, p=0.71, НЗ
	Длительность замираний, сек	113	90	122	175	5.35, p=0.15, НЗ
	Частота замираний	686	616	704	815	8.78, p=0.032
ТИХ	Активность,%	0.1	0.07	0.1	0.09	3.58, p=0.31, НЗ
	Латентный период первого периода активности, сек	41	232	100	39	5.09, p=0.17, НЗ
ПЦР-РВ	*nos2a*	40	43	17	498	11.94, p=0.0076
	cox2	98	87	50	80	8.02, p=0.045
	il1β	84	49	35	133	12.99, p=0.005
	il6	77	160	70	136	1.31, p=0.72, НЗ
	arg1	104	113	119	95	0.66, p=0.88, НЗ
	cd206	104	33	85	39	5.28, p=0.15, НЗ
	c3	97	441	106	124	6.51, p=0.09, НЗ
	gbp2	89	31	36	61	2.53, p=0.46, НЗ
	s100a10	75	650	324	1193	10.60, p=0.014
	ptx	94	45	119	120	2.29, p=0.51, НЗ

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Данные статистического анализа для экспериментальной серии 3, описанной в главе 5

Таблица В.1 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Группа) эффектов хронического непредсказуемого стресса (ХНС) на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума и тесте иммобилизации хвоста в экспериментальной серии 3 (см. Рисунок 5.1, 5.2 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Тест	Параметры	Факторы	Статистика ANOVA	p-значение
ТНА	Время в верхней части аквариума, сек	Время	F (1, 300) = 89.37	<0.001
		Группа	F (7, 300) = 30.24	<0.001
		Время х Группа	F (7, 300) = 7.33	<0.001
	Латентное время захода в верхнюю часть аквариума, сек	Время	F (1, 304) = 8.10	0.005
		Группа	F (7, 304) = 4.23	<0.001
		Время х Группа	F (7, 304) = 5.18	<0.001
	Частота захода в верхнюю часть аквариума	Время	F (1, 299) = 55.60	<0.001
		Группа	F (7, 299) = 7.74	<0.001
		Время х Группа	F (7, 299) = 4.23	<0.001
	Длительность замираний, сек	Время	F (1, 301) = 1.19	0.28, НЗ
		Группа	F (7, 301) = 9.66	<0.001
		Время х Группа	F (7, 301) = 6.10	<0.001
	Частота замираний	Время	F (1, 295) = 0.14	0.7097, НЗ
		Группа	F (7, 295) = 22.34	<0.0001
		Время х Группа	F (7, 295) = 7.12	<0.0001
	Пройденная дистанция, см	Время	F (1, 303) = 99.42	<0.0001
		Группа	F (7, 303) = 10.42	<0.0001
		Время х Группа	F (7, 303) = 3.946	0.0004
	Длительность периодов высокой подвижности, сек	Время	F (1, 303) = 30.43	<0.001
		Группа	F (7, 303) = 2.80	0.008
		Время х Группа	F (7, 303) = 2.36	0.02
ТИХ	Активность,%	Время	F (1, 247) = 16.62	<0.0001
		Группа	F (7, 247) = 1.40	0.2090, НЗ
		Время х Группа	F (7, 247) = 2.97	0.0053
	Латентный период первого периода активности, сек	Время	F (1, 242) = 54.69	<0.0001
		Группа	F (7, 242) = 3.75	0.0007
		Время х Группа	F (7, 242) = 3.6	0.0011

Таблица В.2 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Группа) для уровня экспрессии генов в головном мозге *Danio rerio* (см. Рисунок 5.3, 5.4 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Гены	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
nos2a	Время	F (1, 114) = 9.12	0.003
	Группа	F (7, 114) = 3.85	<0.001
	Время х Группа	F (7, 114) = 3.60	0.002
cox2	Время	F (1, 114) = 27.44	<0.001
	Группа	F (7, 114) = 4.06	<0.001
	Время х Группа	F (7, 114) = 3.74	0.001
arg-1	Время	F (1, 115) = 8.29	0.0047
	Группа	F (7, 115) = 2.27	0.0334
	Время х Группа	F (7, 115) = 2.77	0.0107
cd206	Время	F (1, 119) = 1.98	0.1623, НЗ
	Группа	F (7, 119) = 0.32	0.9431, НЗ
	Время х Группа	F (7, 119) = 0.68	0.6905, НЗ
c3	Время	F (1, 113) = 23.56	<0.001
	Группа	F (7, 113) = 1.92	0.0729, НЗ
	Время х Группа	F (7, 113) = 2.06	0.0542, НЗ
gbp2	Время	F (1, 115) = 5.27	0.0236
	Группа	F (7, 115) = 1.90	0.0751, НЗ
	Время х Группа	F (7, 115) = 0.79	0.5960, НЗ
s100a10	Время	F (1, 110) = 0.89	0.3481, НЗ
	Группа	F (7, 110) = 3.66	0.0014
	Время х Группа	F (7, 110) = 1.07	0.3898, НЗ
ptx3	Время	F (1, 114) = 4.37	0.0388
	Группа	F (7, 114) = 1.67	0.1242, НЗ
	Время х Группа	F (7, 114) = 0.69	0.6813, НЗ
gr	Время	F (1, 119) = 16.96	<0.0001
	Группа	F (7, 119) = 2.15	0.0433
	Время х Группа	F (7, 119) = 1.16	0.3307, НЗ
cdh	Время	F (1, 106) = 0.79	0.3771, НЗ
	Группа	F (7, 106) = 2.99	0.0066
	Время х Группа	F (7, 106) = 2.48	0.0212
hdac4	Время	F (1, 118) = 20.20	<0.001
	Группа	F (7, 118) = 2.59	0.02
	Время х Группа	F (7, 118) = 3.00	0.006

Таблица В.3 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Группа) для анализа уровня моноаминов (см. Рисунок 5.5 для данных и результатов апостериорного анализа). НЗ – нет значимых различий

Параметры	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
5-ГИУК/серотонин	Время	F (1, 100) = 53.64	<0.001
	Группа	F (7, 100) = 6.40	<0.001
	Время х Группа	F (7, 100) = 5.82	<0.001
ДОФУК/дофамин	Время	F (1, 98) = 5.09	0.0263
	Группа	F (7, 98) = 1.59	0.1482, НЗ
	Время х Группа	F (7, 98) = 1.64	0.1333, НЗ
Серотонин	Время	F (1, 100) = 2.38	0.1263, НЗ
	Группа	F (7, 100) = 2.62	0.0160
	Время х Группа	F (7, 100) = 4.11	0.0005
Дофамин	Время	F (1, 100) = 14.42	0.0003
	Группа	F (7, 100) = 1.83	0.0905, НЗ
	Время х Группа	F (7, 100) = 5.39	<0.001
Норадреналин	Время	F (1, 97) = 10.19	0.0019
	Группа	F (7, 97) = 3.88	0.0009
	Время х Группа	F (7, 97) = 4.93	<0.0001

Таблица В.4 – Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (факторы Время и Группа) для анализа проницаемости ГЭБ (см. Рисунок 5.6 для данных и результатов апостериорного анализа)

Параметры	**Факторы**	**Статистика ANOVA**	**p-значение**
Уровень флуоресценции Эванса синего	Время	F (1, 60) = 8.42	0.005
	Группа	F (7, 60) = 2.25	0.04
	Время х Группа	F (7, 60) = 2.58	0.02