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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус» – 2026

Работа выполнена в Научном центре Генетики и Наук о жизни, направлении Нейробиология, автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Научный руководитель:
Мусиенко Павел Евгеньевич, доктор медицинских наук, руководитель направления «Нейробиология» АНОО ВО «Университет «Сириус».

Защита состоится «19» декабря 2026 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.24.25 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу: 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh

Автореферат разослан «18» ноября 2026 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук  Калинина Д.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Аффективные расстройства, включая депрессию и тревожные расстройства, относятся к числу наиболее распространенных заболеваний нервной системы. По данным Всемирной организации здравоохранения, они диагностируются примерно у 4 – 6 % мирового населения. 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.

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. В связи с этим все большее внимание уделяют противовоспалительным препаратам, способным модулировать активность глии и подавлять нейровоспаление. 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. В то же время в реальных условиях хронический стресс часто носит непрерывный характер, а развивающийся патологический процесс сопровождается последовательным изменением вовлеченных патогенетических механизмов. 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.

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. 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. 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. 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*, 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 телэнцефалона 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).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Животные. В работе использовали взрослых половозрелых (12–14 месяцев) короткоплавниковых особей *Danio rerio* дикого типа обоих полов (соотношение примерно 50:50), полученных от местного дистрибьютора (Tropic Aquarium Ltd., Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях (27 ± 0,5 °C, pH 7,4, световой день 12 ч) не менее 3 недель до начала экспериментов. Всего в трёх экспериментальных сериях использовано 995 рыб; общая смертность составила 6,7 %. Размер выборок определяли на основании анализа статистической мощности ($\alpha = 0,05$, мощность 0,8).

Схема исследования. Работа состояла из трёх экспериментальных серий. Первая серия (150 особей) была посвящена изучению временной динамики нейровоспаления при 5- и 12-недельном хроническом непредсказуемом стрессе (ХНС5 и ХНС12) с дополнительной точкой оценки после 1 недели стресса (ХНС1). Вторая серия (465 особей) была посвящена подбору оптимальных концентраций и режимов введения препаратов, оказывающих противовоспалительное воздействие (миноциклин, нимесулид) в модели 2-недельного стресса (ХНС2). Третья серия (380 особей) была посвящена оценке эффективности выбранных препаратов в моделях ХНС5 и ХНС12 в сравнении с антидепрессантом флуоксетином.

Хронический непредсказуемый стресс. Рыб содержали в 20-литровых аквариумах и ежедневно подвергали воздействию чередующихся стрессоров: скученность, стресс новизной, кратковременная экспозиция на воздухе, преследование сачком, температурный стресс, визуальное предъявление хищника (*Oreochromis niloticus*), воздействие химическими сигналами хищника, контакт с незнакомыми рыбами другой линии *Danio rerio* (GloFish), помещение в среду с новыми объектами, снижение уровня воды, воздействие мигающим светом, воздействие постоянным ярким светом, воздействие электрического тока, механическое встряхивание, воздействие феромона тревоги, социальная изоляция, а также лишение пищи и содержание в темноте. Контрольные животные содержались в аналогичных условиях без стрессорных воздействий.

Введение препаратов. Во второй экспериментальной серии рыб подвергали воздействию миноциклина (ингибитора активации микроглии) в концентрациях 25, 50 и 100 мг/л и селективного ингибитора циклоксигеназы-2 (ЦОГ-2) нимесулида в концентрациях 1, 2,5 и 5 мг/л. Продолжительность воздействия составляла 1 или 2 недели. В третьей экспериментальной серии применяли миноциклин в концентрации 25 мг/л, нимесулид в концентрации 2,5 мг/л и флуоксетин в концентрации 0,1 мг/л в качестве препарата сравнения. Продолжительность воздействия для всех препаратов составляла 1 неделю.

Поведенческие тесты. Тест нового аквариума (ТНА) проводили в прямоугольном резервуаре (20 × 20 × 5 см), условно разделённом на верхнюю и нижнюю зоны. В течение 5 минут регистрировали общую пройденную

дистанцию (см), количество входов, время пребывания (с) и латентный период выхода в верхнюю зону (с), количество и длительность замираний (с), длительность периодов высокой подвижности (с). В тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) каудальную половину тела рыбы фиксировали во влажной вискозной губке с прорезями, закреплённой в прозрачном стакане, а ростральную часть оставляли свободно подвешенной в воде. В течение 5 мин оценивали активность (средний процент изменившихся пикселей между последовательными кадрами) и латентный период первого движения (с). Видеозаписи анализировали с использованием программного обеспечения Noldus EthoVision XT 17.5.

Молекулярно-генетический анализ. Тотальную РНК выделяли из целых образцов головного мозга, экспрессию генов оценивали методом ПЦР-РВ (qPCRmix-HS SYBR, QuantStudio 5) с расчётом по методу 2^(−ΔΔCt) и нормированием на 2 референсных гена. Всего исследована экспрессия 18 генов: маркеры провоспалительного М1-фенотипа микроглии (*nos2a*, *cox2*, *il1β*), противовоспалительного М2-фенотипа микроглии (*arg1*, *cd206*), провоспалительного А1-фенотипа астроглии (*c3*, *gbp2*), противовоспалительного А2-фенотипа астроглии (*s100a10*, *ptx3*), дополнительные маркеры нейровоспаления (*p75ntr, il6*), глюкокортикоидного рецептора (*gr*), эпигенетических регуляторов (*dnmt3a/b*, *hat1*, *hdac4*) и кросс-таксонных маркеров депрессии (*cdh1*, *gria1*).

Нейрохимический анализ. Уровни норадреналина, серотонина, дофамина и их метаболитов (5-ГИУК, ДОФУК) определяли методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией (НТЕС-500, Eicom) с внутренним стандартом ДГБА. Дополнительно рассчитывали соотношения 5-ГИУК/серотонин и ДОФУК/дофамин, отражающие интенсивность метаболизма.

Уровень кортизола определяли в тканях тела методом ИФА после трёхкратной экстракции диэтиловым эфиром.

Проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) оценивали по площади флуоресценции Эванса синего на криосрезах телэнцефалона толщиной 10 мкм с использованием пороговой сегментации методом IsoData в программе Fiji ImageJ.

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 10. Нормальность распределения данных оценивали тестом Шапиро – Уилка,

выбросы удаляли методом ROUT. Для сравнения двух групп применяли критерий Манна–Уитни, а для сравнения трёх и более групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Для оценки взаимодействия факторов применяли двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Глава 1. Анализ эффектов длительности хронического непредсказуемого стресса

В первой экспериментальной серии оценивали временную динамику изменений, вызванных 1-, 5- и 12-недельным ХНС. Поведенческий анализ показал, что в 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 стресса в ХНС1. У животных из группы стресс в точке ХНС12 отмечалось снижение количества переходов по сравнению с группой стресс в точке 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 после ХНС5 и ХНС12, а также увеличение латентного периода после ХНС12. В ТИХ снижение активности по сравнению с контролем наблюдалось только в группе ХНС12, тогда как в группе ХНС5 достоверных различий не выявлено (Рисунок 1).

Совокупность полученных данных свидетельствует о росте тревожности по мере увеличения продолжительности стресса, которая к 12-й неделе трансформируется в депрессивно-подобный фенотип. Данная временная динамика согласуется с клиническими и доклиническими данными, полученными на грызунах, подтверждающими переход от тревожного состояния к развитию депрессивного расстройства при пролонгированном стрессовом воздействии.

Уровень кортизола оставался неизменным после ХНС5, но сопровождался повышенной экспрессией гена глюкокортикоидного рецептора в мозге, тогда как после ХНС12 наблюдалось снижение уровня кортизола без изменения экспрессии рецептора. Данный результат может

отражать истощение гипоталамо-гипофизарно-интерреналовой оси при длительном стрессе.

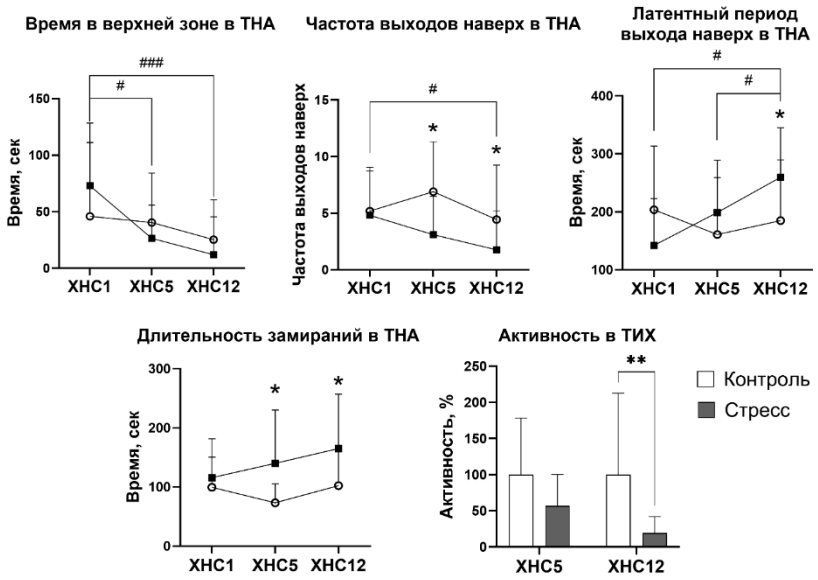


Рисунок 1 – Эффекты ХНС1, ХНС5, ХНС12 на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума (ТНА) и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ). Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Стресс и Время) с апостериорным тестом Сидака. # - p <0.05, ### - p <0.001 (внутри группы «Стресс»), * - p <0.05, **а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

Анализ экспрессии генов выявил изменение характера нейровоспалительного ответа по мере увеличения длительности стресса (Рисунок 2). После ХНС5 повышалась экспрессия провоспалительных маркеров (*nos2a*, *cox2*) и нейропротективного маркера (*s100a10*) по сравнению с контролем. Напротив, после ХНС12 наблюдалось повышение экспрессии противовоспалительных и нейропротективных маркеров (*cd206*, *s100a10*, *ptx3*), а также гена *cdh1*, ассоциированного с депрессией, и эпигенетического маркера *hdac4* по сравнению с контрольной группой. Таким образом, провоспалительная активность характерна для ранней стадии

аффективного патогенеза (5 недель), ассоциированной с тревожно-подобным фенотипом, тогда как при формировании депрессивно-подобного фенотипа после пролонгированного действия стресса доминирует противовоспалительная активность.

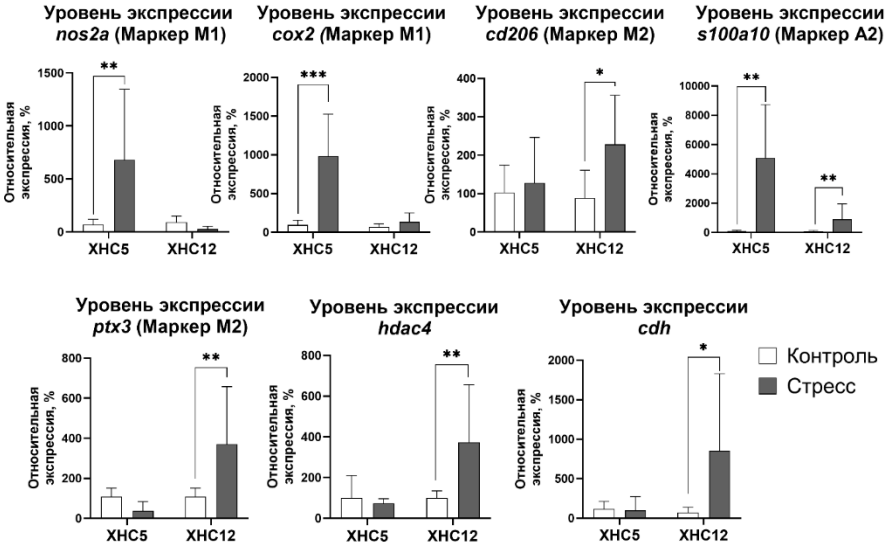


Рисунок 2 – Эффекты ХНС5 и ХНС12 на уровень экспрессии генов – биомаркеров нейровоспаления (*nos2a*, *cox2*, *cd206*, *s100a10*, *ptx3*), гена, ассоциированного с депрессивным состоянием (*cdh1*), и гена эпигенетического фермента (*hdac4*) в мозге *Danio rerio*. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака, U-критерий (для *s100a10*); * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, **** – $p < 0,0001$. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5–7 на группу)

Нейрохимический анализ показал, что ХНС5 увеличивал уровень норадреналина, а ХНС12 снижал соотношение 5-ГИУК/серотонин, что указывает на снижение интенсивности метаболизма серотонина. Уровень дофамина и интенсивность его метаболизма оставались неизменными в обеих временных точках (Рисунок 3). Снижение серотонинового оборота на 12-й неделе стресса согласуется с моноаминовой гипотезой депрессии и, наряду с ростом маркера депрессивного фенотипа *cdh1*, подкрепляет интерпретацию наблюдаемого поведенческого фенотипа как депрессивно-подобного.

Площадь флуоресценции красителя Эванса синего в телэнцефалоне была статистически значимо увеличена по сравнению с контролем в группе

ХНС5, тогда как в группе ХНС12 различий не выявлено (Рисунок 4). Данный результат указывает на увеличение проницаемости ГЭБ после 5 недель стресса и служит косвенным индикатором развития нейровоспаления, что согласуется с данными анализа экспрессии генов.

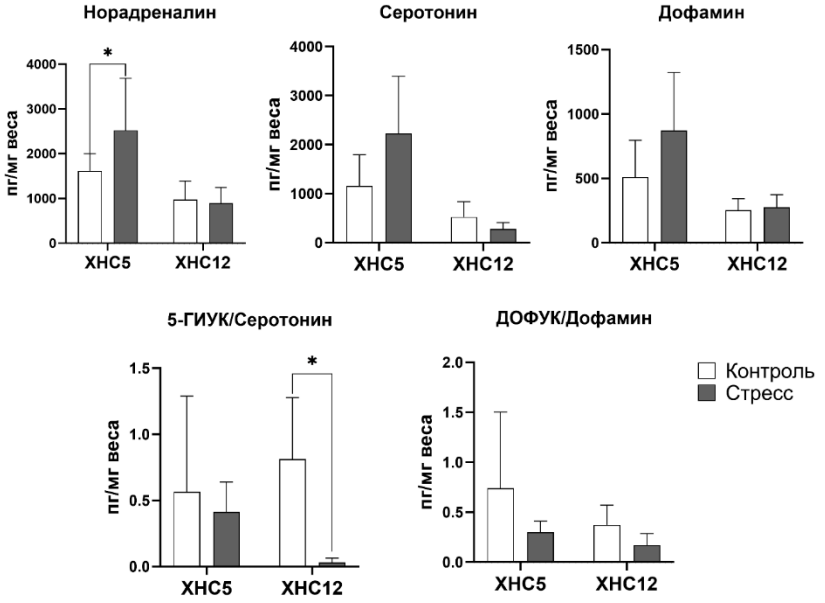


Рисунок 3 – Эффекты ХНС на уровень моноаминов и интенсивность их метаболизма в мозге *Danio rerio*. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака; * – $p < 0,05$. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5–7 на группу)

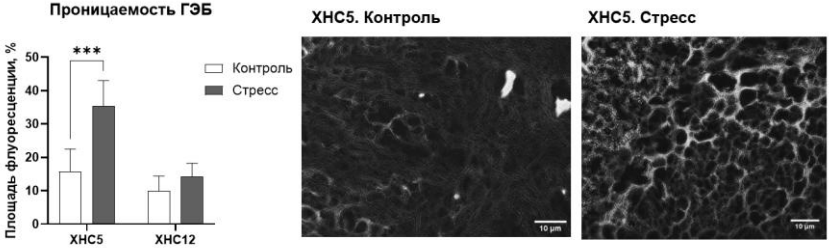


Рисунок 4 – Эффекты ХНС на проницаемость гематоэнцефалического барьера телэнцефалона *Danio rerio*. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака;*** – $p < 0,001$. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 5 на группу)

Основным результатом главы является демонстрация временной динамики перехода от тревожно-подобного к депрессивно-подобному

фенотипу у *Danio rerio* при пролонгированном хроническом стрессе и выявление соответствующих изменений нейровоспалительной реакции. Формирование депрессивно-подобного фенотипа на 12-й неделе подтверждается комплексно. Он проявляется снижением активности в ТИХ, снижением интенсивности метаболизма серотонина и повышением экспрессии гена *cdh1*. При этом активация противовоспалительных путей на поздней стадии не обеспечивает эффективной нейропротекции, способной снизить выраженность депрессивно-подобного фенотипа.

Глава 2. Анализ эффектов противовоспалительной терапии в модели ХНС2

Вторая экспериментальная серия была посвящена подбору оптимальных концентраций и режимов введения миноциклина и нимесулида в модели ХНС2. Вначале проводилась оценка влияния ХНС2 на тревожное и депрессивно-подобное поведение животных, а также на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением.

Поведенческий анализ показал, что ХНС2 вызывает увеличение общей пройденной дистанции и времени, проведённого в верхней зоне аквариума, снижение латентного периода первого выхода наверх, уменьшение длительности замираний и увеличение продолжительности эпизодов высокой подвижности в ТНА при одновременном снижении средней активности в ТИХ. Такой противоречивый фенотип позволяет предположить, что 2-недельный стресс соответствует переходной фазе между активной резистентностью и началом формирования аффективного патогенеза.

Анализ экспрессии генов согласуется с этой интерпретацией. Так, ХНС2 вызывал снижение экспрессии нескольких противовоспалительных маркеров (*arg1*, *cd206*, *ptx3*), одного провоспалительного маркера (*gbp2*) и гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*). Таким образом, в отличие от ХНС5, на 2-й неделе стресса ещё не наблюдается выраженной провоспалительной активности.

При подборе концентрации миноциклина было показано, что применение 50 и 100 мг/л препарата вызывает снижение общей дистанции в ТНА, что свидетельствует о седативном действии, тогда как 25 мг/л не влияли на поведенческие показатели.

Двухнедельное введение миноциклина (50 мг/л) на фоне ХНС2 снижало экспрессию *nos2a* и *arg1* и повышало экспрессию *s100a10*, однако сопровождалось снижением локомоторной активности и увеличением длительности замираний по сравнению с контрольными животными. Напротив, 1-недельное введение миноциклина в концентрации 25 мг/л на фоне ХНС2 (8-14 дни ХНС) увеличивало время пребывания животных в верхней зоне аквариума по сравнению с группой стресса, то есть оказывало анксиолитический эффект наряду с отсутствием седации (Рисунок 5).

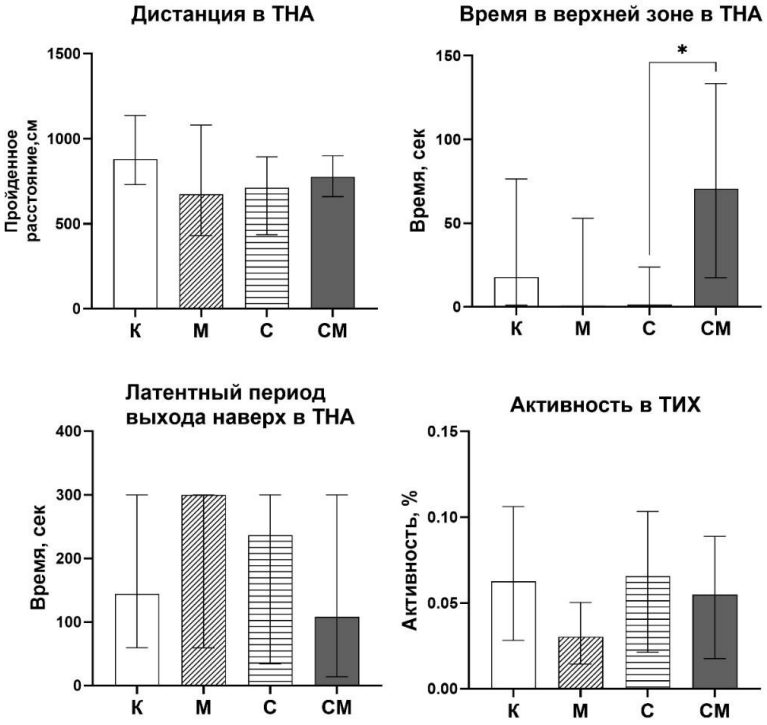


Рисунок 5 – Влияние миноциклина (25 мг/л, 1 неделя, 8-14 дни ХНС) на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и ТИХ в модели ХНС2. К – контроль, М – миноциклин, С – стресс, СМ – стресс + миноциклин. Критерий Краскела – Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 15 на группу)

При оценке эффектов нимесулида было выявлено, что 1-недельное введение препарата в концентрациях 1 и 5 мг/л не изменяло поведение животных в ТНА. Вместе с тем 2-недельное введение нимесулида (5 и 2,5

мг/л) на фоне стресса сопровождалось высокой летальностью животных уже после первой недели воздействия, что может быть связано с гепатотоксичностью препарата, потенцируемой хроническим стрессом. При сокращении сроков введения до 1 недели (2,5 мг/л; 8-14 дни ХНС) препарат не оказывал негативного влияния на поведенческие показатели, однако демонстрировал разнонаправленное модулирующее действие на маркеры нейровоспаления. В частности, на фоне стресса нимесулид повышал экспрессию провоспалительного маркера *nos2a* и нейропротективного маркера *s100a10*, а также нормализовал уровень экспрессии *cox2* и *il1β* до уровня контрольных значений (Рисунок 6).

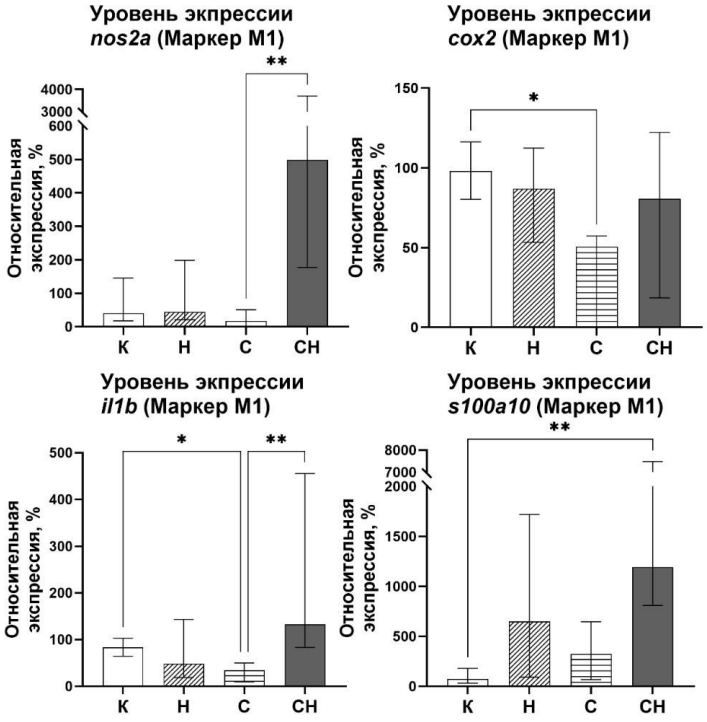


Рисунок 6 – Влияние нимесулида (2,5 мг/л; 1 неделя, 8 – 14 дни ХНС) на уровень экспрессии генов – маркеров нейровоспаления в мозге *Danio rerio*. *p<0.05, **p<0.01. Критерий Краскела – Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Данные представлены как медиана ± межквартильный размах (n = 5– 7 на группу)

Основным результатом главы является подбор сроков воздействия и концентраций противовоспалительной коррекции для последующей оценки её эффективности в моделях пролонгированного стресса. Для миноциклина была выбрана концентрация 25 мг/л при введении в течение 1 недели, для нимесулида – 2,5 мг/л при 1-недельном курсе введения.

Глава 3. Анализ эффектов противовоспалительной терапии в моделях ХНС5 и ХНС12

В третьей экспериментальной серии оценивали способность миноциклина (25 мг/л), нимесулида (2,5 мг/л), вводимых в течение 1 недели корректировать тревожно-подобный (ХНС5) и депрессивно-подобный (ХНС12) фенотипы в сравнении с антидепрессантом флуоксетином (0,1 мг/л в течение 1 недели). 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).

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 7, 8).

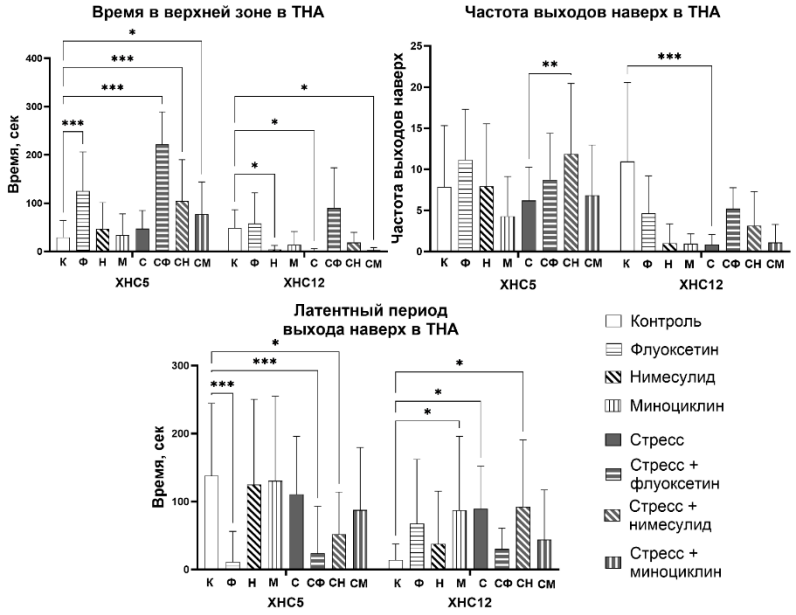


Рисунок 7 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на поведение взрослых *Danio rerio* в тесте нового аквариума в моделях ХНС5 и ХНС12 (время в верхней зоне, частота выходов наверх, латентный период выхода наверх). Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы «Группа» и «Время») с апостериорным тестом Сидака; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 20 на группу)

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 7,8).

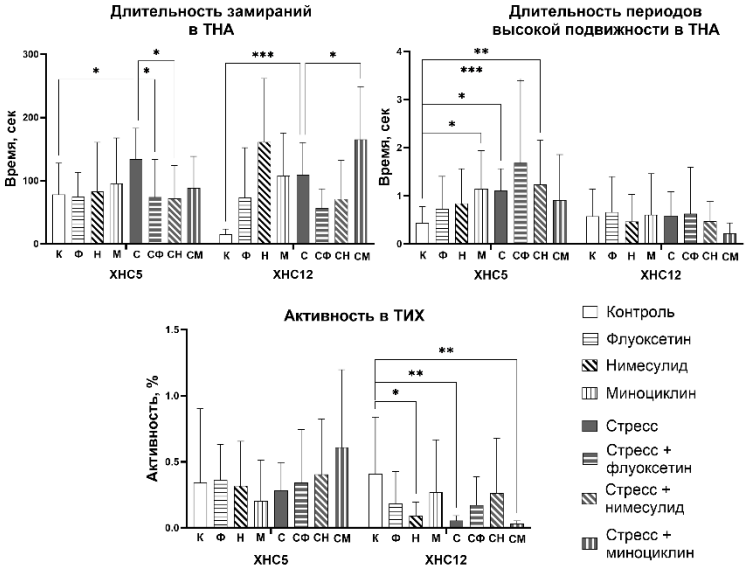


Рисунок 8 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на поведение взрослых *Danio rerio* в ТНА и тесте иммобилизации хвоста (ТИХ) в моделях ХНС5 и ХНС12 (длительность замираний, длительность периодов высокой подвижности, активность в ТИХ). Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным тестом Сидака.*- p<0,05,** - p<0,01,*** - p<0,001. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 20 на группу)

На молекулярно-генетическом уровне в модели ХНС5 стресс (С) вызывал выраженные изменения экспрессии маркеров нейровоспаления. В частности, повышалась экспрессия провоспалительных маркеров (*nos2a*, *cox2*) и нейропротективного маркера (*s100a10*), а также экспрессия гена *gr* и

эпигенетического фермента *hdac4*. Все три препарата подавляли стресс-индуцированную гиперэкспрессию *nos2a* и нормализовали экспрессию *hdac4*. Нимесулид дополнительно снижал стресс-индуцированную экспрессию *s100a10*. Нимесулид и миноциклин также нормализовали уровень экспрессии *gr*. Вместе с тем миноциклин на фоне стресса не нормализовал повышенную экспрессию *cox2* (Рисунок 9, 10).

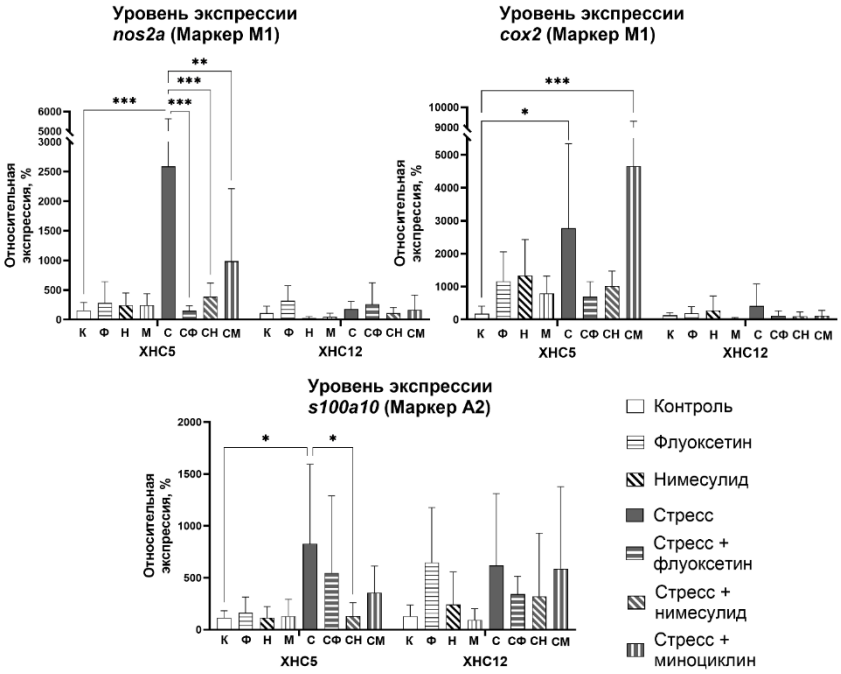


Рисунок 9 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на уровень экспрессии генов — маркеров нейровоспаления (*nos2a*, *cox2*, *s100a10*) в мозге взрослых *Danio rerio* в моделях ХНС5 и ХНС12. Двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Сидака; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. К – контроль, Ф – флуоксетин, Н – нимесулид, М – миноциклин, С – стресс, СФ – стресс + флуоксетин, СН – стресс + нимесулид, СМ – стресс + миноциклин. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (n = 7–10 на группу)

В модели ХНС12 выраженного нейровоспаления в головном мозге не наблюдалось. Так, уровни экспрессии *nos2a* и *cox2* в группе стресса не отличались от контрольных. Однако стресс статистически значимо повышал экспрессию гена *cdh*, ассоциированного с депрессивным состоянием, и все три препарата возвращали её к контрольному уровню. При этом эффект

нимесулида и миноциклина был выражен сильнее, чем эффект флуоксетина. Экспрессия *hdac4* и *gr* в модели ХНС12 не демонстрировала достоверных различий между группами (Рисунок 9, 10).

В модели ХНС5 нимесулид и миноциклин повышали соотношение 5-ГИУК/серотонин как при введении без стрессового воздействия, так и на фоне воздействия ХНС, что может отражать дополнительный, не связанный напрямую с подавлением нейровоспаления механизм их анксиолитического действия на ранней стадии развития аффективной патологии. В модели ХНС12 стресс вызывал значительное повышение уровня норадреналина, отражающее гиперактивацию симпатоадреналовой системы, а нимесулид и миноциклин на фоне стресса возвращали его к контрольным значениям. Интенсивность метаболизма дофамина не изменялась ни в одной из групп и временных точек.

Анализ проницаемости ГЭБ в данной серии показал, что в модели ХНС5 ни стресс, ни введение препаратов не влияли на проницаемость барьера, тогда как в модели ХНС12 стресс увеличивал проницаемость ГЭБ, а введение флуоксетина, нимесулида и миноциклина на фоне стресса возвращало её к уровню контроля.

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.

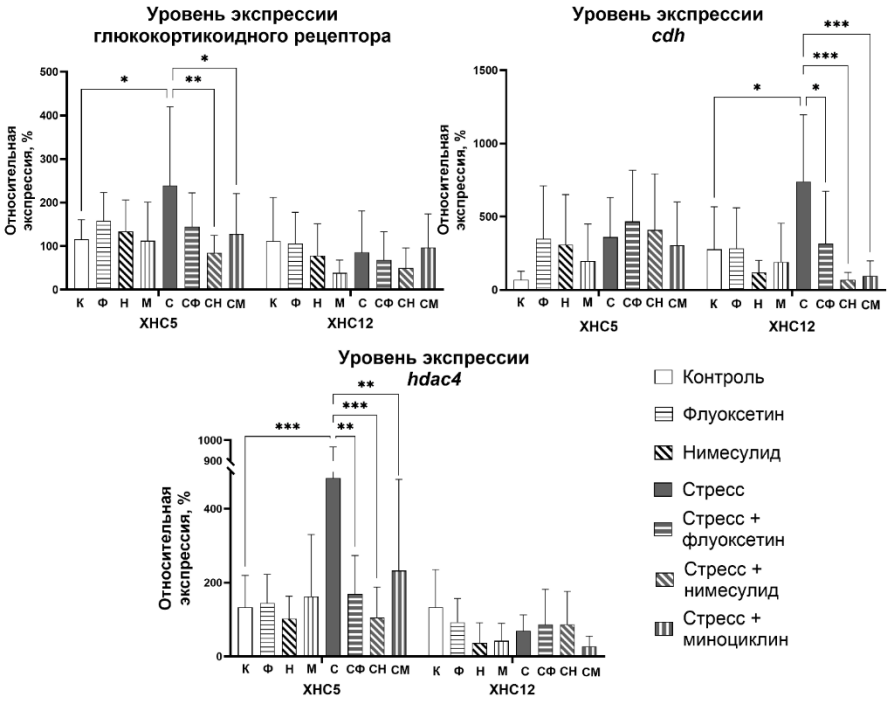


Рисунок 10 – Влияние флуоксетина, нимесулида и миноциклина на уровень экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора (*gr*), гена *cdh* и гена эпигенетического фермента *hdac4* в мозге взрослых *Danio rerio* в моделях ХНС5 и ХНС12. Двухфакторный дисперсионный анализ (факторы Группа и Время) с апостериорным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

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 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 формирования аффективной патологии (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 способность модулировать отдельные звенья патогенеза, 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 коррекции при аффективных расстройствах у *Danio rerio* 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 обусловленной разной исходной чувствительностью партий животных, что требует дальнейшей верификации с предварительным скринингом стрессоустойчивости. Во-вторых, предложенная концепция «переходной фазы стресса» для модели ХНС2 носит гипотетический характер и нуждается в подтверждении в исследованиях динамики развития аффективной патологии с анализом множества временных точек. В-третьих, использование классификации M1/M2 и A1/A2 для интерпретации экспрессии генов в гомогенате мозга *Danio rerio* не позволяет однозначно установить клеточно-специфическую поляризацию глии, что требует применения гистологических подходов в будущих работах. В-четвёртых, в исследовании не проводилась отдельная оценка половых различий, поскольку размер выборки не позволял провести статистически достоверное сравнение между самцами и самками. Кроме того, для нейрохимического анализа использовался гомогенат всей мозговой ткани, что обусловлено малыми размерами мозга *Danio rerio* и не позволяет оценить региональные различия в уровне моноаминов. Наконец, видовые различия между рыбами и млекопитающими ограничивают прямую

экстраполяцию полученных результатов на человека, хотя *Danio rerio* остаётся хорошо валидированной моделью для изучения аффективных расстройств.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По теме научного 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