

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Марков Дмитрий Дмитриевич

**ЭФФЕКТЫ N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ АКТГ В ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ
МОДЕЛИ ДЕПРЕССИИ**

1.5.5 - Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2023

Работа выполнена в лаборатории молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Научный руководитель *Долотов Олег Валентинович – кандидат биологических наук*

Официальные оппоненты *Гаврилова Светлана Анатольевна – доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский Государственный университет имени М. В. Ломоносова», Факультет фундаментальной медицины, кафедра физиологии и патологии, доцент*

Изнак Андрей Федорович - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья», лаборатория нейрофизиологии, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией

Поварнина Полина Юрьевна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», отдел химии лекарственных средств, лаборатория пептидных биорегуляторов, старший научный сотрудник

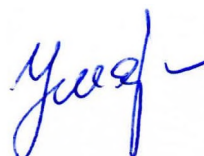
Защита диссертации состоится «30» октября 2023 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория «М-1»

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М. В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27),
на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/594086942/>
на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.7/2627>

Автореферат разослан «29» сентября 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. Депрессия является одним из наиболее распространенных психических расстройств. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в мире депрессией страдает порядка 280 млн. человек (World Health Organization. Depression. 2023). Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении депрессии, механизмы возникновения и развития заболевания, а также механизмы терапевтических эффектов применяемых для лечения депрессии фармакологических средств по-прежнему остаются недостаточно понятными.

Депрессия - это сложное гетерогенное заболевание, которое определяется сочетанием генетических факторов и факторов окружающей среды. Разнообразие симптомов депрессии указывает на вовлеченность в манифестацию этого заболевания различных систем организма и отделов мозга. Среди основных гипотез развития депрессии выделяют моноаминовую (снижение уровней моноаминов как причина депрессии), нейротрофиновую (снижение уровней ряда нейротрофических факторов, преимущественно нейротрофического фактора мозга BDNF), нарушение нейрогенеза в гиппокампе, нейроэндокринную (гиперактивация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС)), иммунную/воспалительную (увеличение уровней воспалительных цитокинов) (Krishnan, Nestler, 2008; Li et al., 2021; Kamran et al., 2022). Вероятно, эти гипотезы отражают различные взаимосвязанные аспекты патогенеза и манифестации депрессии и/или соответствуют различным процессам, ведущим в конечном итоге к появлению симптомов депрессии.

Специфических лекарственных препаратов, направленных на терапию депрессии, разработка которых была бы основана на нейротрофиновой, воспалительной и нейроэндокринной гипотезах развития депрессии, в настоящее время не существует. Почти все современные медикаментозные способы лечения депрессии базируются на моноаминовой гипотезе. Большинство антидепрессантов обладает негативными побочными эффектами, включая повышение риска суицида у детей и молодых людей (Li et al., 2022). Наличие у антидепрессантов серьезных побочных эффектов накладывает ограничения на их использование. Кроме того, почти 40% пациентов не испытывают долговременных улучшений при приеме антидепрессантов (Fava, Davidson, 1996; Schroder et al., 2022). Помимо побочных эффектов и резистентности к антидепрессантам, еще одним существенным недостатком существующих антидепрессантов является необходимость их продолжительного приема для достижения терапевтического эффекта.

В связи с очевидными недостатками антидепрессантов, применяемых в клинической практике, возникает необходимость поиска альтернативных подходов к лечению депрессии. Пациенты остро нуждаются в создании эффективных и безопасных препаратов с быстрым терапевтическим эффектом. Возможными мишенями для разработки лекарственных препаратов для лечения депрессии могут быть пептидергические системы. Предполагается, что стресс-ассоциированные нейропептиды могут играть важную роль в развитии тревожности и депрессии (Alldredge, 2010), при этом как сами нейропептиды, так и их рецепторы, рассматриваются в качестве потенциальных мишеней для лечения психических расстройств (Holmes et al., 2003; Kormos, Gaszner, 2013; Kupcova et al., 2022).

Одной из таких систем является меланокортиновая система, представленная рецепторами, активируемыми адренокортикотропным гормоном (АКТГ) и их лигандами. Центральная меланокортиновая система является критическим регулятором нейроэндокринного стрессового ответа, и ее роль при стрессе и при стресс-индуцированных патологиях, таких как тревожность и депрессия, активно исследуется в настоящее время (Bonaventura et al., 2022). Известно, что пептиды, относящиеся к семейству меланокортинов, обладают широким спектром действия. В частности, они проявляют нейропротекторные и нейротрофические свойства, оказывают противовоспалительные эффекты и способны регулировать активность ГГНС. Подобные свойства указывают на потенциальную возможность и перспективность использования представителей семейства меланокортинов при лечении пациентов с депрессией, имеющих нарушения в функционировании нервной, иммунной и нейроэндокринной систем организма.

Целью настоящей работы являлось исследование эффектов и механизмов действия некортикотропных N-концевых фрагментов АКТГ при системном введении в экспериментальной воспалительной модели депрессии (депрессивноподобное поведение, вызванное однократным системным введением липополисахарида (ЛПС) в низкой субсептической дозе).

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

В экспериментальной воспалительной модели депрессии исследовать влияние системного введения α -меланоцитстимулирующего гормона (α -МСГ/АКТГ1-13) и фрагмента АКТГ/ α -МСГ4-10 на:

1. уровень экспрессии мРНК BDNF в гиппокампе крысы
2. уровень экспрессии мРНК глюкокортикоидного рецептора (GR) в гиппокампе крысы

3. уровни экспрессии в мозге крысы мРНК ключевых провоспалительных факторов
4. уровни активации ГГНС и системного воспалительного ответа
5. поведение животных (двигательная активность, пищевое поведение, гедонический статус)

Научная новизна исследования. В работе впервые продемонстрирована способность α -МСГ и АКТГ4-10 при периферическом введении ослаблять у лабораторных животных в экспериментальной воспалительной модели депрессии ангедонию (снижение способности испытывать удовольствие), являющуюся ключевым симптомом депрессии. Результаты работы свидетельствуют о том, что в этой модели N-концевые фрагменты АКТГ проявляют антидепрессантоподобные эффекты. В работе впервые показано, что периферическое введение α -МСГ и АКТГ4-10 приводит к увеличению экспрессии мРНК BDNF, GR и mPGES-1 (микросомальная простагландин E синтаза-1) в гиппокампе крысы. В работе впервые продемонстрирована способность фрагмента АКТГ4-10 при периферическом введении подавлять системный воспалительный ответ, что подтверждается снижением уровня в крови одного из ключевых провоспалительных цитокинов TNF- α (фактор некроза опухолей альфа). Полученные в ходе работы результаты также впервые свидетельствуют о способности фрагмента АКТГ4-10 ослаблять активацию ГГНС, что выражается в снижении уровня кортикостерона в крови экспериментальных животных. Изучение в данной работе эффектов агониста (АКТГ4-10) и антагониста/агониста (SHU 9119) меланокортиновых рецепторов дало возможность предполагать, что наблюдаемые эффекты на иммунную и нейроэндокринную системы опосредуются через третий подтип меланокортиновых рецепторов (MC3R).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Эффекты N-концевых фрагментов АКТГ на активность ГГНС и их механизмы остаются практически неизученными, несмотря на то, что связанная с АКТГ короткая петля отрицательной обратной связи является важным компонентом регуляции активности ГГНС. Теоретическая значимость настоящей работы заключается в углублении понимания механизмов осуществления регуляторного влияния меланокортинов на активность ГГНС и воспалительного ответа организма. В свою очередь, понимание этих механизмов имеет практическое значение, заключающееся в возможности нормализации функционирования ГГНС при различных патологических состояниях, в которых наблюдается дерегуляция этой нейроэндокринной системы, в том числе, при связанных с воспалением состояниях. Полученные в работе результаты могут являться основой для дальнейшего изучения применимости N-концевых фрагментов АКТГ и их аналогов в клинической практике для лечения различных патологий с воспалительным компонентом.

Результаты настоящей работы углубляют понимание механизмов действия меланокортинов на иммунную, нервную и нейроэндокринную систему и свидетельствуют о наличии у представителей этого пептидного семейства потенциала использования в качестве терапевтических препаратов, направленных на лечение патологий, связанных с нарушением функционирования этих систем, к которым, в том числе, относится и депрессия.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными. Депрессивноподобное поведение у взрослых самцов крыс индуцировали однократным введением ЛПС в низкой субсептической дозе. Использовали внутрибрюшинное введение препаратов. Гедонический статус животных оценивали с помощью теста предпочтения сахарозы. Определение уровней TNF- α и кортикостерона проводили методом иммуноферментного анализа. Определение уровней представленности транскриптов проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Положения, выносимые на защиту:

- N-концевые фрагменты АКТГ при системном введении стимулируют экспрессию мРНК BDNF в гиппокампе
- N-концевые фрагменты АКТГ влияют на уровень кортикостерона в крови и экспрессию мРНК глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе
- N-концевые фрагменты АКТГ оказывают нейроэндокринные и противовоспалительные эффекты путем активации MC3R
- N-концевые фрагменты АКТГ оказывают антидепрессантоподобные эффекты, ослабляя ангедонию, вызванную системным воспалением

Публикации. По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, из них 8 статей в журналах индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Апробация материалов диссертации. Результаты диссертационного исследования были представлены на конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург-Колтуши, 2008, 2014); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2009», «Ломоносов-2015» (Москва, 2009, 2015); IV, VI, VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009, 2013, Москва, 2017); Итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления

«Живые системы» (Москва, 2009); VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, 2011); 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Московская область-Клязьма, 2015), II Научной конференции «Физиологическая активность регуляторных пептидов» (Москва, 2015); Конференции «Геномика и биология живых систем» (Звенигород, 2016); V съезде Биохимиков России и V съезде физиологов стран СНГ (Дагомыс-Сочи, 2016); XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017); XXVI Ежегодной научной конференции «Перспективные направления молекулярной генетики» (Москва, 2018); V съезде фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств" (Ярославль, 2018);

Личный вклад автора. Экспериментальные результаты работы получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор лично участвовал в проведении исследований на всех этапах работы: в сборе и анализе данных литературы, в подготовке и проведении экспериментов, в обработке и интерпретации экспериментальных данных, а также в подготовке публикаций по итогам проведенных исследований.

Степень достоверности результатов исследований. Результаты исследования были получены с использованием современных методов физиологии, биохимии и молекулярной биологии. Достоверность представленных результатов обеспечивается использованием в экспериментах необходимых контролей и применением методов статистического анализа данных, соответствующих экспериментальному дизайну. Планирование экспериментов, анализ и интерпретация полученных результатов проводились с использованием данных мировой научной литературы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов работы и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 166 страницах, содержит 28 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 423 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В экспериментах использовали самцов крыс линии Sprague-Dawley. Вес крыс на момент начала эксперимента составлял 200-250 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму и 12-ти часовым циклом освещения. Экспериментальные манипуляции проводили в светлой фазе

цикла, определение потребления корма и жидкостей проводили в течение темной фазы. Общая схема экспериментов представлена на рис. 1.

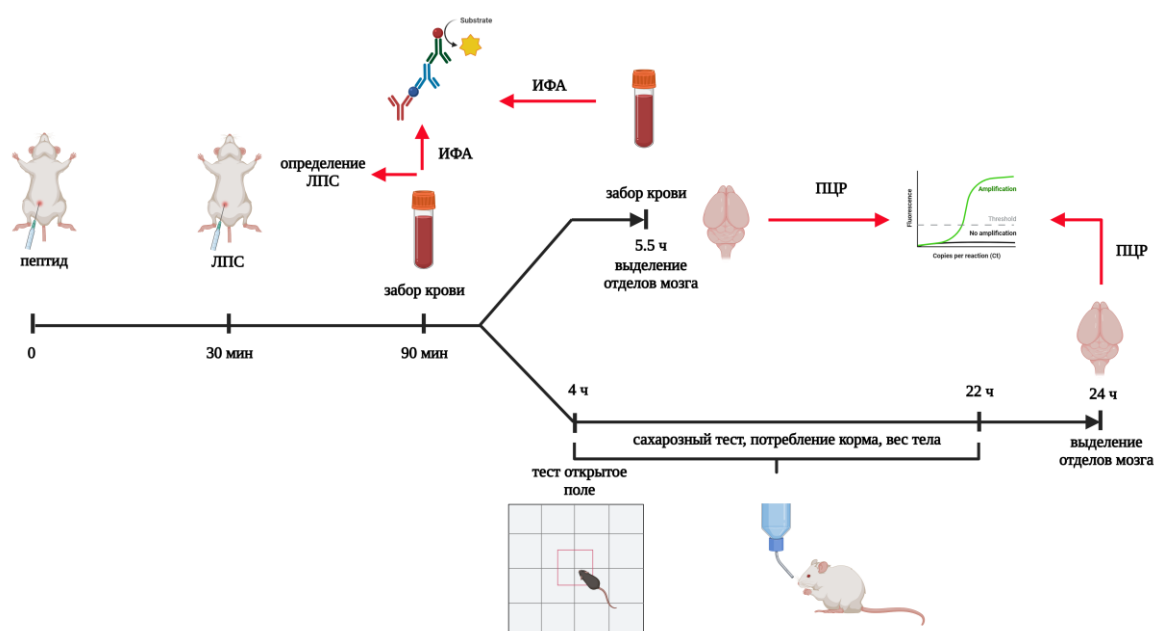


Рис. 1 Общая схема экспериментов

Введение препаратов и экспериментальные группы животных. Препараты ЛПС, α -МСГ, АКТГ4-10 и SHU 9119 вводили внутривенно в виде растворов в стерильном и апиrogenном 0.9% NaCl в объеме 1.5 мл/кг веса тела крысы. За 30 мин. до введения раствора ЛПС в дозе 25 мкг/кг животным вводили раствор α -МСГ (100 мкг/кг), АКТГ4-10 (60 мкг/кг), SHU 9119 (4,3 мкг/кг) или физраствора. В работе использовали следующие экспериментальные группы: «Контроль», «МСГ», «АКТГ4-10», «АКТГ4-10+SHU», «SHU», «ЛПС», «ЛПС+МСГ», «ЛПС+АКТГ4-10», «ЛПС+АКТГ4-10+SHU», «ЛПС+SHU».

Тест «открытое поле». Для оценки уровня тревожности, двигательной и исследовательской активности у животных использовали установку «открытое поле».

Оценка уровня потребления корма. Перед помещением в индивидуальную клетку животных взвешивали. Через 18 ч. крыс извлекали из индивидуальных клеток и помещали в «домашние» клетки. Оставшийся корм взвешивали и определяли потребление корма за 18 ч. Полученную величину нормировали на массу крысы, полученную в предыдущий день, и получали величину относительного потребления корма.

Оценка уровня ангедонии (тест предпочтения раствора сахарозы). Животным, содержащимся в индивидуальных клетках, предоставляли свободный доступ к двум предварительно взвешенным шариковым поилкам. Предварительная депривация по воде и пище не проводилась. Одна из поилок содержала обычную водопроводную воду, а вторая 1%

раствор сахарозы в воде. Через 18 ч. поилки взвешивали и определяли количество потребленных жидкостей. Предпочтение раствора сахарозы определяли как отношение массы потребленного 1% раствора сахарозы к суммарной массе потребленной жидкости (обычной воды + 1% раствора сахарозы).

Определение бактериального эндотоксина. Присутствие ЛПС в крови крысы через 90 мин. после внутрибрюшинного введения подтверждали анализом полученной сыворотки крови на присутствие бактериальных эндотоксинов с помощью LAL-теста. При анализе данных исключали из рассмотрения животных, получивших инъекцию ЛПС, но отрицательных по наличию эндотоксина в сыворотке крови.

Определение уровней TNF- α и кортикостерона. Через 90 мин. после инъекций отбирали около 200 мкл крови путем ампутации кончика хвоста. В случае забора крови через 5,5 ч. после введения ЛПС, образцы крови получали в результате декапитации животных. Количественное определение уровней TNF- α и кортикостерона в сыворотке крови крысы проводили с помощью коммерческих ИФА-наборов.

Определение уровней представленности транскриптов методом ПЦР в реальном времени. Через 5,5 или 24 ч. после введения ЛПС животных декапитировали и выделяли исследуемые отделы мозга. Тотальную РНК из образцов ткани выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции. Полученные образцы РНК обрабатывали ДНКазой I, после чего получали кДНК в ходе обратной транскрипции. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием детектирующего амплификатора. Нормализацию содержания мРНК исследуемых генов проводили по уровню мРНК бета-актина.

Статистическая обработка результатов. Обработку результатов проводили с помощью программного пакета для статистического анализа GraphPad Prism 9.5.0. Нормальность распределения оценивали с помощью тестов D'Agostino-Pearson и Shapiro-Wilk. Проверка однородности дисперсий производилась с помощью теста Brown-Forsythe. Использовали двухфакторный и многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением групповых средних с помощью теста Holm-Sidak. Уровень статистической значимости принимали равным 0.05. На графиках представлены средние значения групп с учетом стандартной ошибки среднего (Mean \pm SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с тем, что гипофиз и гипоталамус являются частью ГГНС, а гиппокамп регулирует активность ГГНС, мы проанализировали вызванные введением ЛПС изменения экспрессии мРНК ряда генов в этих структурах, играющих важную роль в функционировании

нервной, нейроэндокринной и иммунной систем. Далее мы проанализировали эффекты исследуемых пептидов на уровни циркулирующих кортикостерона и TNF- α как ключевых маркеров активации нейроэндокринной и иммунной систем, соответственно. После оценки эффектов АКГ4-10 и α -МСГ на молекулярно-биологические и биохимические показатели, мы изучили влияние пептидов на двигательную активность, пищевое и депрессивноподобное поведение.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКГ4-10 на экспрессию мРНК BDNF в гиппокампе

Снижение уровня BDNF наблюдается в крови и гиппокампе пациентов, страдающих депрессией. При этом терапия антидепрессантами приводит к нормализации уровня BDNF у таких пациентов.

Нами обнаружено, что периферическое введение АКГ4-10 и α -МСГ приводит к повышению экспрессии мРНК BDNF в гиппокампе (рис. 2). У животных групп «АКГ4-10» и «МСГ» экспрессия повышается в 1,5 раза по сравнению с животными в контрольной группе. В гипоталамусе значимых различий в уровнях экспрессии мРНК BDNF между группами экспериментальных животных не наблюдалось.

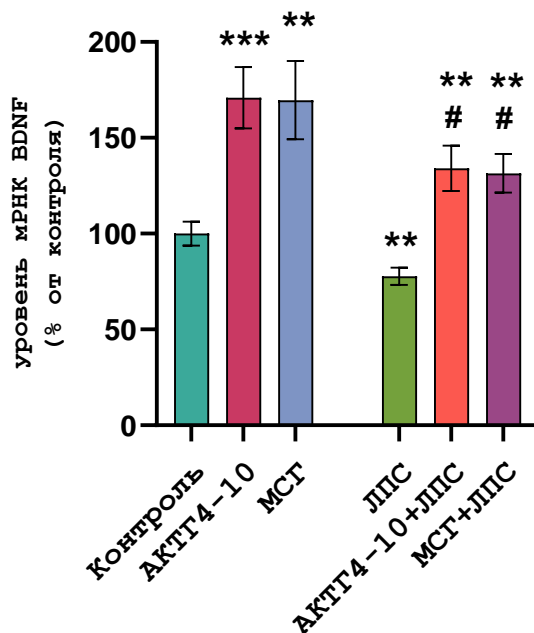


Рис. 2 Влияние ЛПС, АКГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК BDNF в гиппокампе крысы через 5.5 ч. после введения. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; Уровень значимости отличий от группы «ЛПС»: # - $p < 0,05$

У животных группы «ЛПС» наблюдается снижение экспрессии мРНК BDNF. Однако уровни мРНК BDNF в группах «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ» были значимо выше уровней в группах «ЛПС» и «Контроль».

Способность АКТГ4-10 и α -МСГ стимулировать экспрессию мРНК BDNF в гиппокампе может являться механизмом потенциального антидепрессантного действия меланокортинов.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК GR в гиппокампе

Считается, что снижение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (GR) может являться причиной гиперактивации ГГНС, наблюдаемой у части пациентов, страдающих депрессией.

Введение АКТГ4-10 и α -МСГ приводит к увеличению экспрессии мРНК GR в гиппокампе. Как видно из данных, представленных на рис. 3 экспрессия мРНК GR повышается в 1,5 раза. Введение ЛПС приводило к снижению экспрессии мРНК GR, однако введение АКТГ4-10 и α -МСГ значимо повышало уровни мРНК GR. В гипофизе и гипоталамусе статистически значимых различий в уровнях экспрессии мРНК GR между экспериментальными группами животных обнаружено не было.

АКТГ4-10 и α -МСГ повышают экспрессию мРНК GR в гиппокампе, а значит, потенциально могут усиливать ингибирование ГГНС по механизму отрицательной обратной связи.

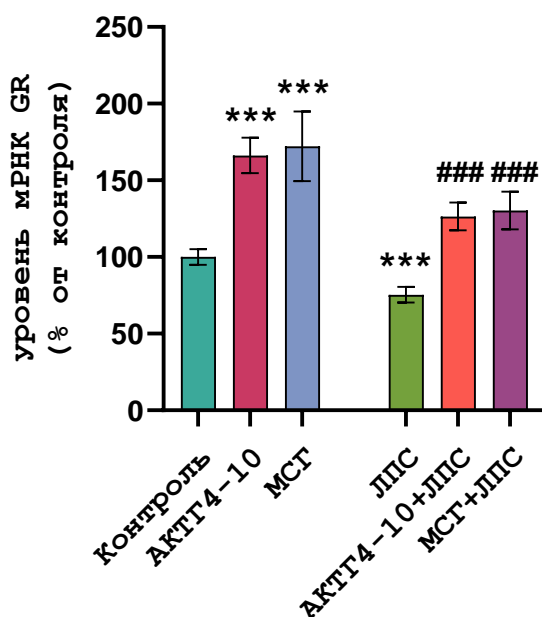


Рис. 3 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК GR в гиппокампе крысы через 5.5 ч. после введения. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: *** - $p < 0,001$; Уровень значимости отличий от группы «ЛПС»: ### - $p < 0,001$

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКГГ4-10 на экспрессию мРНК IL-1 β в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

Известно, что повышенный уровень IL-1 β приводит к развитию депрессивноподобного состояния.

На рис. 4 и 5 представлены результаты определения экспрессии мРНК IL-1 β в гипофизе и гипоталамусе соответственно.

Внутрибрюшинное введение ЛПС приводит к значительному увеличению уровня экспрессии мРНК IL-1 β . Уровень экспрессии в гипоталамусе увеличивается в 2 раза, а в гипофизе более чем в 7 раз. При этом в гиппокампе значимых изменений в экспрессии мРНК IL-1 β нами обнаружено не было. Исследуемые пептиды не оказывали влияния на экспрессию мРНК IL-1 β .

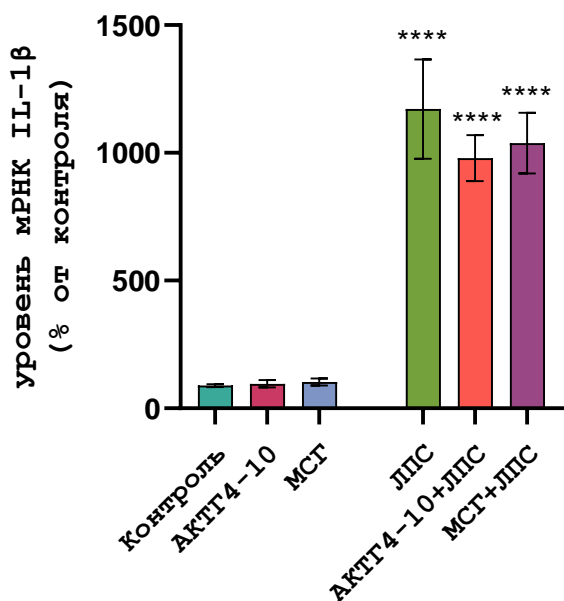


Рис. 4 Влияние ЛПС, АКГГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК IL-1 β в гипофизе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль», «АКГГ4-10», «МСГ»: **** - p < 0,0001

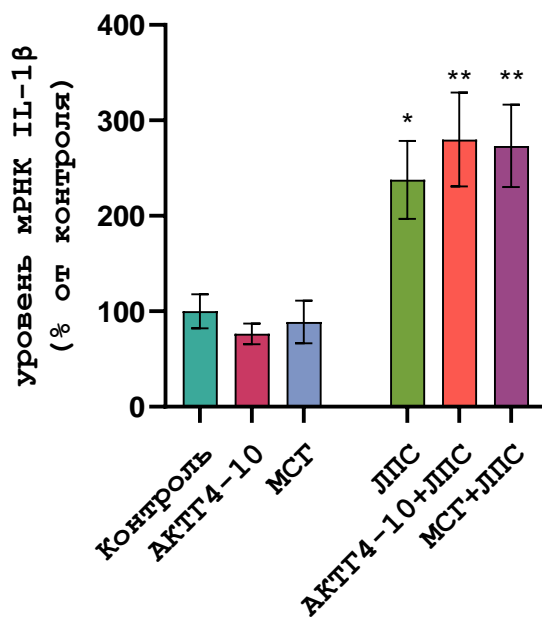


Рис. 5 Влияние ЛПС, АКГГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК IL-1 β в гипоталамусе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: * - p < 0,05; ** - p < 0,01

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК IL-6 в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

Введение ЛПС приводило к увеличению экспрессии мРНК IL-6 в гипофизе крысы. Из результатов, представленных на рис. 6 видно, что экспрессия у животных в группах «ЛПС», «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ» превышала значения в группе «Контроль» более чем в 6 раз.

В гиппокампе наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии мРНК IL-6 в группах «ЛПС», «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ», при этом в гипоталамусе статистически значимых изменений экспрессии обнаружено не было. Введение АКТГ4-10 и α -МСГ животным не оказывало влияния на экспрессию мРНК IL-6.

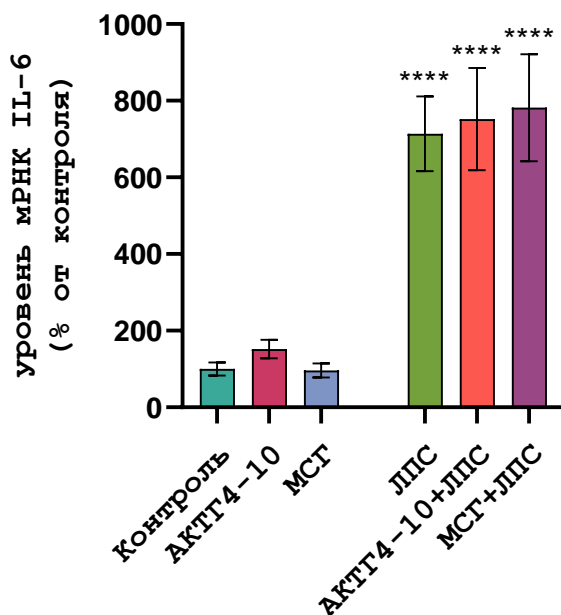


Рис. 6 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК IL-6 в гипофизе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль», «АКТГ4-10», «МСГ»: ****- $p < 0,0001$

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК TNF- α в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

TNF- α относится к провоспалительным цитокинам, уровень которого стремительно возрастает при введении ЛПС. Периферическое введение ЛПС индуцировало экспрессию мРНК TNF- α в гипофизе (рис. 7) и гипоталамусе (рис. 8) крысы.

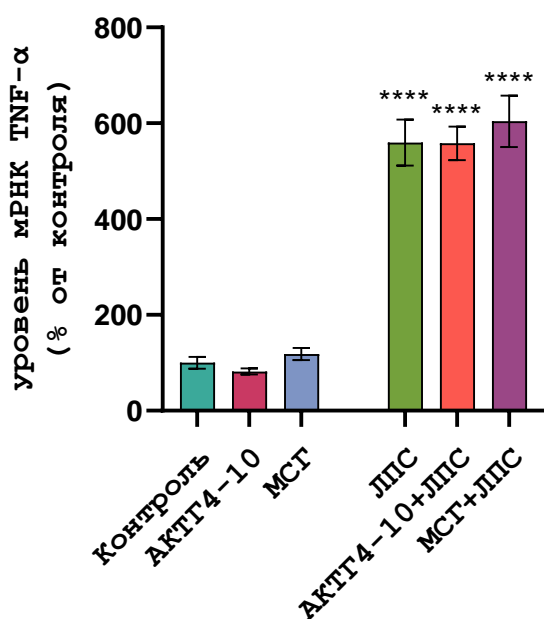


Рис. 7 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК TNF- α в гипофизе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль», «АКТГ4-10», «МСГ»: **** - $p < 0,0001$

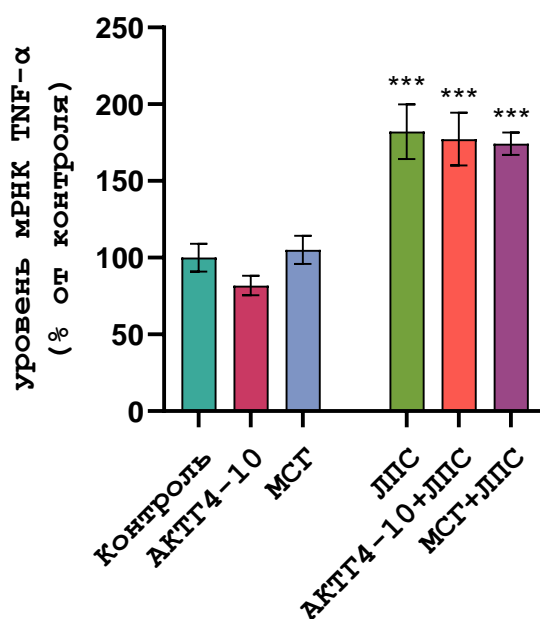


Рис. 8 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК TNF- α в гипоталамусе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: *** - $p < 0,001$

У животных, получивших инъекцию ЛПС, уровень экспрессии мРНК TNF- α в гипофизе был в 5 раз выше по сравнению с уровнем экспрессии у животных контрольной группы. В гипоталамусе уровень экспрессии мРНК TNF- α в группах «ЛПС», «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ» был в 2 раза выше по сравнению с группой «Контроль». В гиппокампе статистически значимое увеличение экспрессии мРНК TNF- α наблюдалось у животных групп «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ», но не у животных группы «ЛПС». Влияния АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК TNF- α нами обнаружено не было.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК mPGES-1 в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

mPGES-1 - это фермент, участвующий в синтезе простагландина E2. Внутривентрикулярное введение ЛПС приводит к повышению экспрессии мРНК mPGES-1 в гипофизе (рис. 9), гипоталамусе (рис. 10) и гиппокампе (рис. 11).

В гипофизе крысы уровень экспрессии мРНК mPGES-1 при введении ЛПС увеличивался в 2 раза, в гипоталамусе в 3 раза, а в гиппокампе почти в 10 раз. АКТГ4-10 и α -МСГ на фоне введения ЛПС приводили к увеличению экспрессии мРНК mPGES-1 в гиппокампе.

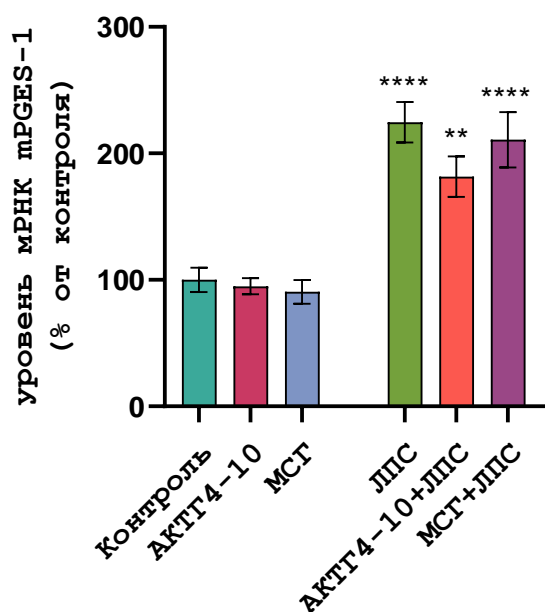


Рис. 9 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК mPGES-1 в гипофизе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$

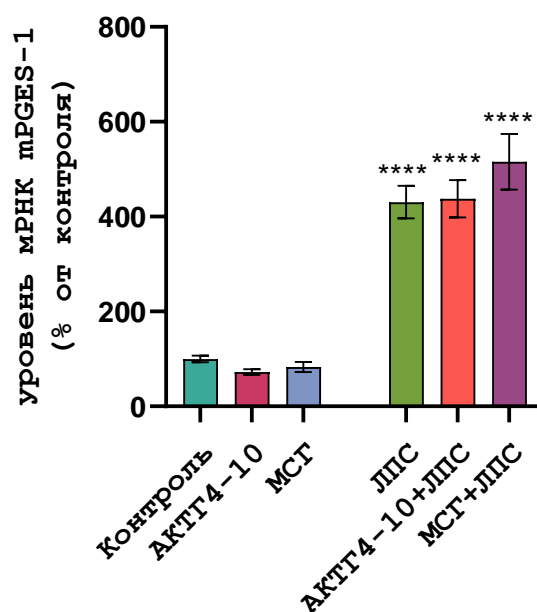


Рис. 10 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК mPGES-1 в гипоталамусе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль», «АКТГ4-10», «МСГ»: **** - $p < 0,0001$

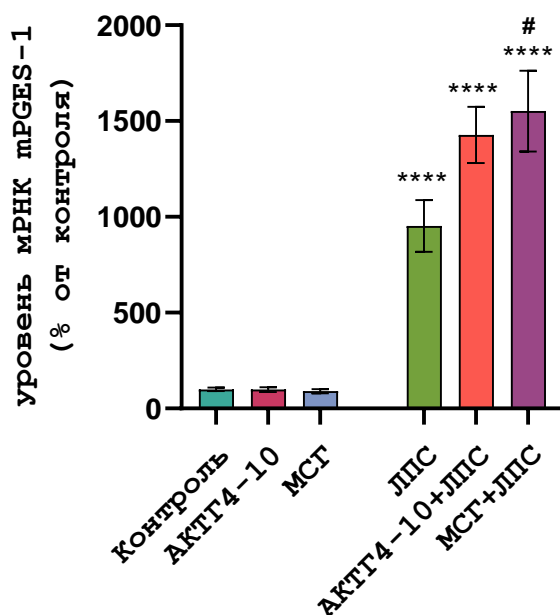


Рис. 11 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК mPGES-1 в гиппокампе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль», «АКТГ4-10», «МСГ»: **** - $p < 0,0001$; Уровень значимости отличий от группы «ЛПС»: # - $p < 0,05$

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК iNOS в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

NO синтазы – ферменты, катализирующие образование оксида азота из L-аргинина, являются важными медиаторами воспаления.

Как видно из графиков, представленных на рис. 12 и рис. 13 через 5,5 ч. после внутрибрюшинного введения ЛПС в гипофизе и гипоталамусе крысы наблюдается повышенный уровень экспрессии мРНК iNOS.

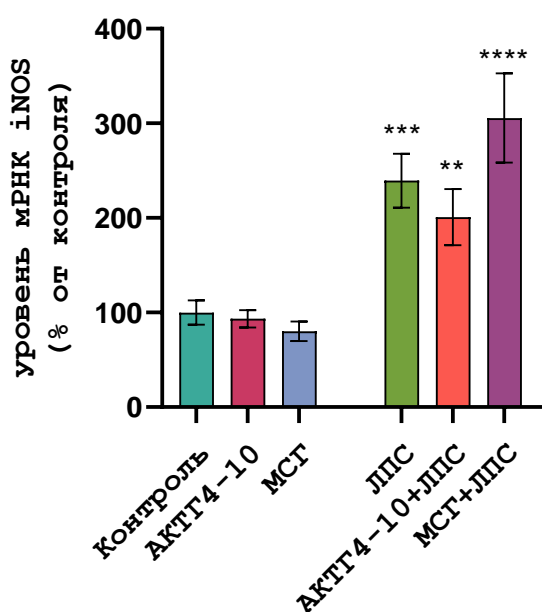


Рис. 12 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК iNOS в гипофизе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

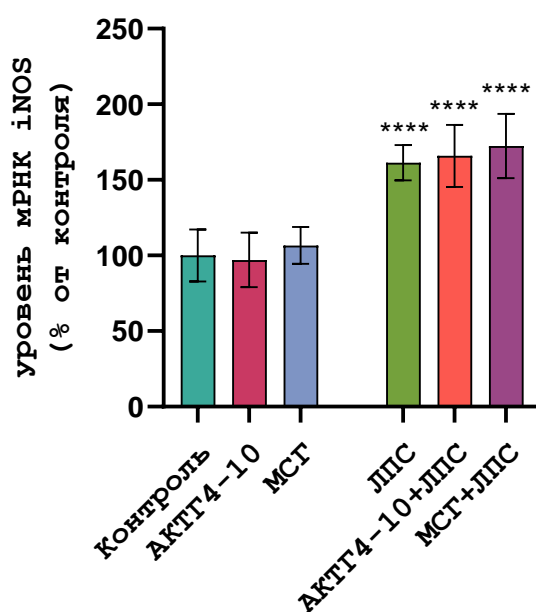


Рис. 13 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК iNOS в гипоталамусе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль», «АКТГ4-10», «МСГ»: **** - $p < 0,0001$

У животных, получивших инъекцию ЛПС, уровень экспрессии мРНК iNOS в гипофизе в 2 раза выше по сравнению с животными контрольной группы, а в гипоталамусе в 1,5 раза.

Предварительное внутрибрюшинное введение АКТГ4-10 и α -МСГ не оказывало влияния на экспрессию мРНК iNOS.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК MC4R в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

MC4R широко экспрессируется в различных отделах мозга и принимает участие в регуляции пищевого поведения, вовлечен в развитие тревожности и подавление нейровоспаления.

Периферическое введение ЛПС приводит к увеличению экспрессии мРНК MC4R. Статистически значимое увеличение экспрессии мРНК MC4R наблюдается в гипофизе и гиппокампе крысы. Как видно из данных, представленных на рис. 14 и рис. 15, у животных групп «ЛПС», «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ» уровень экспрессии в 2 раза выше по сравнению с уровнем экспрессии у животных в контрольной группе. Значимого влияния АКТГ4-10 и α -МСГ обнаружено не было.

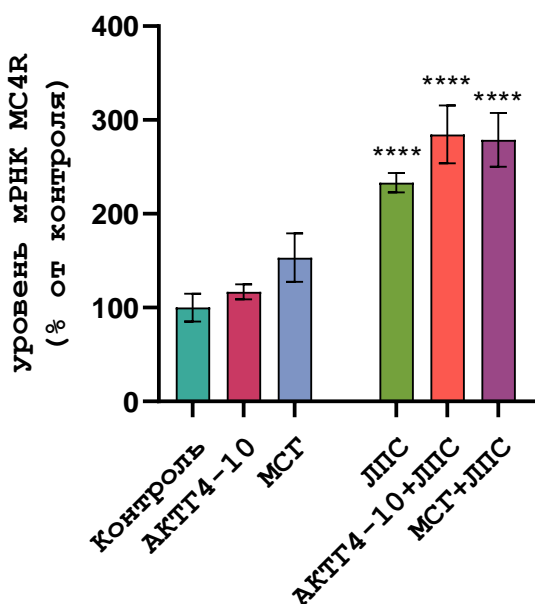


Рис. 14 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК MC4R в гипофизе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: **** - $p < 0,0001$

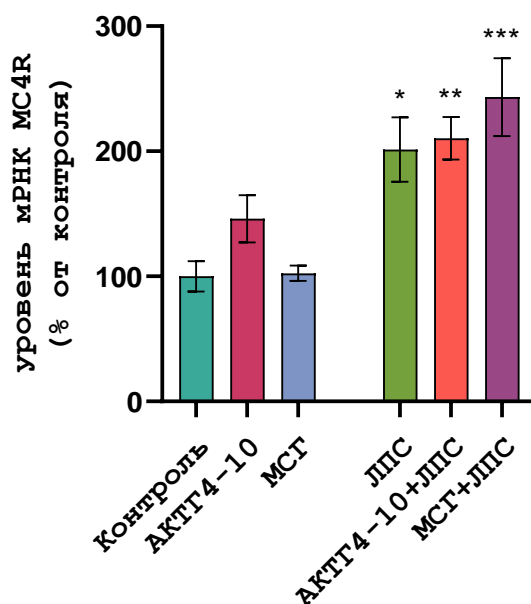


Рис. 15 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и α -МСГ на экспрессию мРНК MC4R в гиппокампе крысы. Число животных в группах: N=8-11. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p = 0,0001$

В гипоталамусе значимых различий в уровне экспрессии мРНК MC4R между экспериментальными группами животных обнаружено не было.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на экспрессию мРНК POMC, AVP, CRH, TrkB в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе

Нами также был проведен анализ экспрессии мРНК POMC в гипофизе, мРНК POMC, AVP, CRH, TrkB в гипоталамусе и мРНК TrkB в гиппокампе, однако статистически значимых различий между экспериментальными группами животных нами обнаружено не было.

Влияние АКТГ4-10 на уровень кортикостерона в сыворотке крови крысы

Определение уровня кортикостерона использовалось нами в качестве маркера активации ГГНС. Из результатов, представленных на рис. 16 следует, что уровень кортикостерона существенно повышен в сыворотке крови крыс через 1,5 ч. после введения ЛПС во всех группах, получивших инъекцию ЛПС.

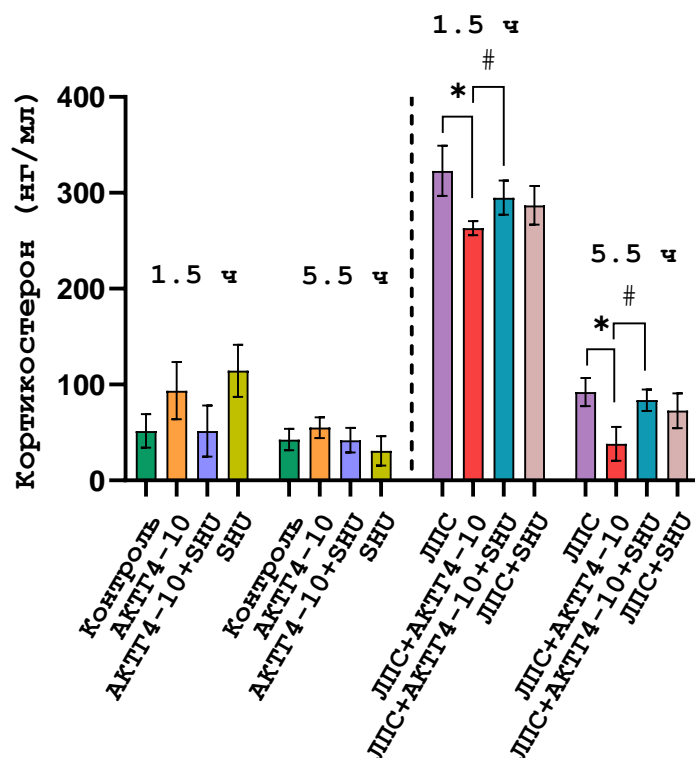


Рис. 16 Влияние ЛПС, АКТГ4-10 и SHU 9119 на уровень кортикостерона в сыворотке крови крысы. Число животных в группах: N=6-10. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «ЛПС»: * - $p < 0,05$; Уровень значимости отличий от группы «ЛПС+АКТГ4-10+SHU»: # - $p < 0,05$

Однако у животных группы «ЛПС+АКТГ4-10» уровень кортикостерона был значимо ниже по сравнению с животными других групп. Введение SHU 9119, являющегося антагонистом меланокортиновых рецепторов подтипов MC3R и MC4R и агонистом MC1R и

MC5R, блокировало эффект АКГГ4-10. Через 5,5 ч. после введения ЛПС уровень кортикостерона у животных всех исследуемых групп значительно снижался, возвращаясь к контрольным значениям. При этом у животных группы «ЛПС+АКГГ4-10» уровень кортикостерона был значимо ниже по сравнению с уровнем у животных остальных групп. Введение SHU 9119 блокировало эффект АКГГ4-10.

АКГГ4-10 не способен активировать MC1R, но при этом активирует MC3R и MC5R. SHU 9119 в свою очередь является антагонистом MC3R и MC4R и агонистом MC1R и MC5R. Учитывая, что эффекты АКГГ4-10 и SHU 9119 противоположны и при этом АКГГ4-10 является преимущественным агонистом MC3R, можно предположить, что именно этот тип рецептора ответственен за снижение уровня кортикостерона под действием АКГГ4-10.

Влияние АКГГ4-10 на уровень TNF- α в сыворотке крови крысы

Определение уровня TNF- α в сыворотке крови крыс нами было использовано в качестве маркера активации иммунной системы при периферическом введении ЛПС.

Как видно из представленных на рис. 17 данных, через 1,5 ч. после введения ЛПС у всех животных, получивших инъекцию ЛПС, наблюдается существенное увеличение уровня циркулирующего TNF- α .

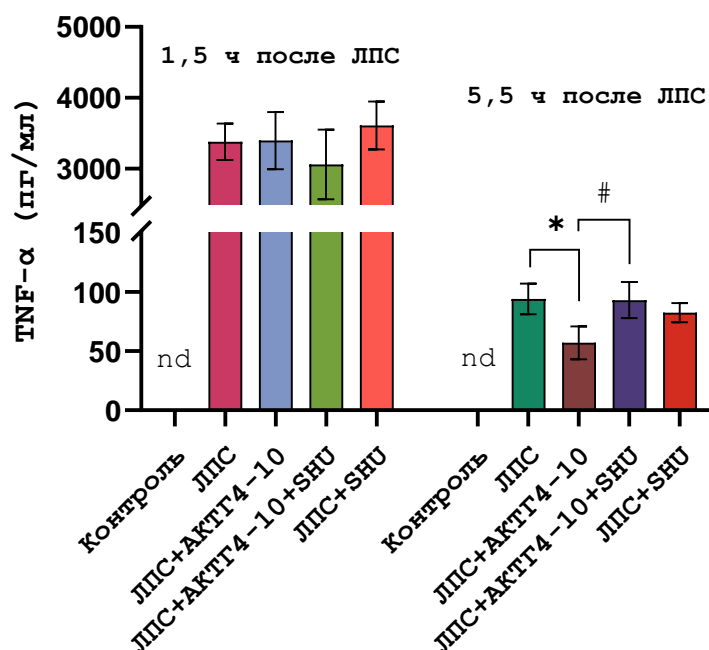


Рис. 17 Влияние ЛПС, АКГГ4-10 и SHU 9119 на уровень TNF- α в сыворотке крови крысы. Число животных в группах: N=7-10. Mean \pm SEM. Уровень значимости отличий от группы «ЛПС»: # - $p < 0,05$; Уровень значимости отличий от группы «ЛПС+АКГГ4-10+SHU»: * - $p < 0,05$

Уровень TNF- α в группах «ЛПС», «ЛПС+АКТГ4-10», «ЛПС+АКТГ4-10+SHU» и «ЛПС+SHU» составлял более 3000 пг/мл, в то время как в группе контрольных животных он находился ниже предела детекции. Через 5,5 ч. после введения ЛПС во всех исследуемых группах наблюдалось существенное снижение уровня TNF- α . Однако уровень TNF- α в группе «ЛПС+АКТГ4-10» был значимо ниже, чем во всех остальных группах. Введение SHU 9119 блокировало эффект АКТГ4-10.

Принимая во внимание различия в селективности АКТГ4-10 и SHU 9119 по отношению к различным типам меланокортиновых рецепторов, можно сделать вывод, что основная роль в снижении воспалительного ответа принадлежит MC3R.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на двигательную активность

Известно, что введение ЛПС приводит к развитию комплекса поведенческих реакций, свойственных больному животному. Подобное поведение выражается, в том числе, и в снижении двигательной активности животных.

Нами была проведена оценка влияния используемой субсептической дозы ЛПС на локомоторную активность крыс в тесте «открытое поле». Данные, представленные на рис. 18 и рис. 19 показывают, что введение ЛПС приводит к значимому снижению двигательной активности, что выражается в снижении количества пересеченных секторов животными группы «ЛПС».

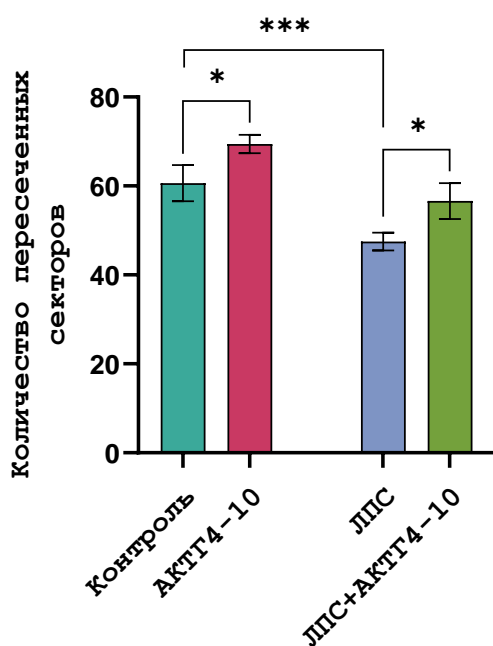


Рис. 18 Влияние ЛПС и АКТГ4-10 на двигательную активность крыс в тесте Открытое поле. Число

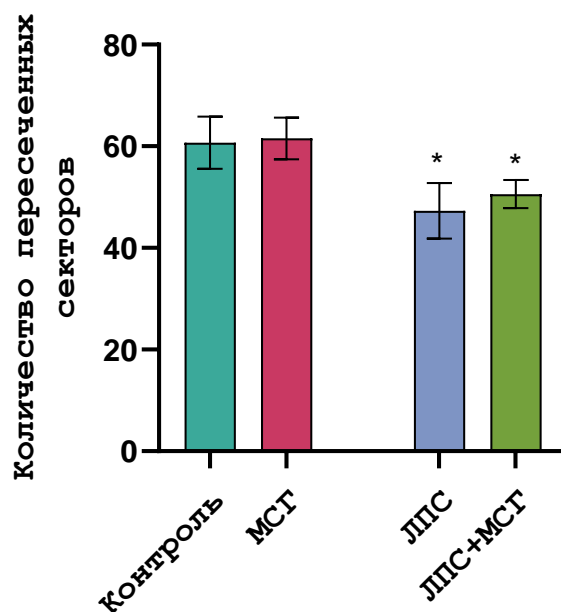


Рис. 19 Влияние ЛПС и α -МСГ на двигательную активность крыс в тесте Открытое поле. Число

животных в группах: N=7-10. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль» и «ЛПС»: * - $p < 0,05$; Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: *** - $p < 0,001$

животных в группах: N=11-14. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от групп «Контроль» и «МСГ»: * - $p < 0,05$

В группе «Контроль» общее количество пересеченных секторов животными составляло 60, а в группе «ЛПС» оно снижалось до 47. При этом используемая доза ЛПС не приводила к значительному подавлению двигательной активности, а значит, не оказывала сильного негативного влияния на состояние экспериментальных животных.

Введение АКТГ4-10 приводило к повышению двигательной активности, в то время как при введении α -МСГ такого эффекта не наблюдалось, что может быть связано с различным спектром активируемых ими подтипов меланокортиновых рецепторов.

Нами были проанализированы и другие поведенческие параметры в тесте «открытое поле» (количество стоек, число актов урикации, дефекации, груминга, обследование отверстий), которые отражают исследовательское поведение и уровень тревожности животных. Однако значимых различий по этим параметрам между экспериментальными группами животных обнаружено не было.

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на потребление корма

Острое системное воспаление, вызванное введением ЛПС или цитокинов, приводит к торможению пищевого поведения, что выражается в снижении потребления корма.

Из приведенных на рис. 20 и рис. 21 данных видно, что эндотоксемия приводит к значимому снижению потребления корма.

В группе «ЛПС» потребление корма в течение 18 ч. составляло 5,8 г/100 г массы тела и было значимо ниже уровня потребления корма животными группы «Контроль» 8,8 г/100 г. Меланокортины, при их центральном введении, обладают анорексигенным эффектом, т.е. способствуют снижению потребления пищи. Однако, в нашем случае, при периферическом введении исследуемых пептидов, какого-либо эффекта на потребление корма не наблюдается. Уровень потребления корма животными групп «АКТГ4-10» и «МСГ» значимо не отличается от уровня потребления корма животными группы «Контроль». При этом уровни потребления корма крысами групп «ЛПС+АКТГ4-10» и «ЛПС+МСГ» значимо ниже уровней потребления контрольными животными.

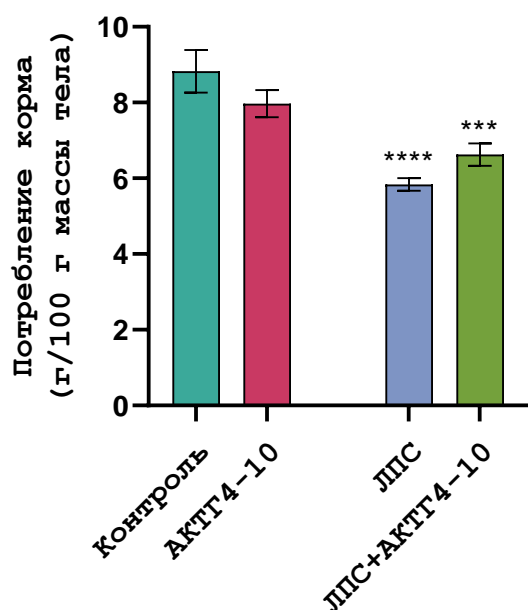


Рис. 20 Влияние ЛПС и АКТГ4-10 на потребление корма крысами. Число животных в группах: N=7-10. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль» *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

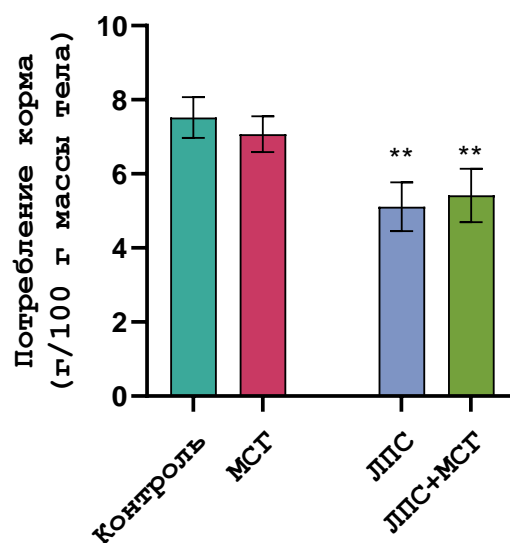


Рис. 21 Влияние ЛПС и α -МСТ на потребление корма крысами. Число животных в группах: N=10-14. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - $p < 0,01$

Влияние ЛПС, α -МСТ и АКТГ4-10 на массу тела

Следствием снижения потребления корма при остром введении ЛПС является замедление набора массы тела животными. Как видно из приведенных ниже результатов, представленных на рис. 22 и рис. 23, у животных, получивших внутрибрюшинную инъекцию ЛПС, наблюдается статистически значимое снижение массы тела по сравнению с контрольными животными.

Если у животных в группе «Контроль» прирост массы тела за сутки составлял 1,8-4,8 г., то у животных из групп «ЛПС», «ЛПС+АКТГ4-10», «ЛПС+МСТ», напротив, наблюдалось значительное снижение массы тела. При этом ни α -МСТ, ни фрагмент АКТГ4-10 не оказывали значимого влияния на массу тела экспериментальных животных.

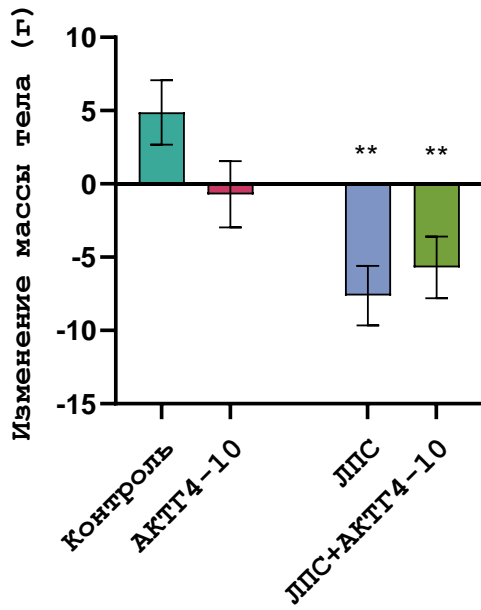


Рис. 22 Влияние ЛПС и АКТГ4-10 на массу тела крысы. Число животных в группах: N=7-10. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - p < 0,01

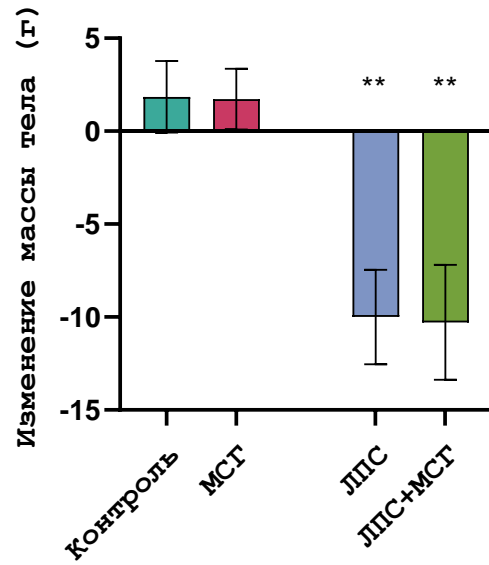


Рис. 23 Влияние ЛПС и α-МСГ на массу тела крысы. Число животных в группах: N=11-14. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - p < 0,01

Влияние ЛПС, α-МСГ и АКТГ4-10 на потребление жидкости

Данные, представленные на рис. 24 и рис. 25 свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное введение ЛПС приводит к снижению потребления животными жидкости (воды или раствора сахарозы). Введение α-МСГ не влияло на потребление жидкости животными, в то время как введение АКТГ4-10 приводило к снижению потребления жидкости.

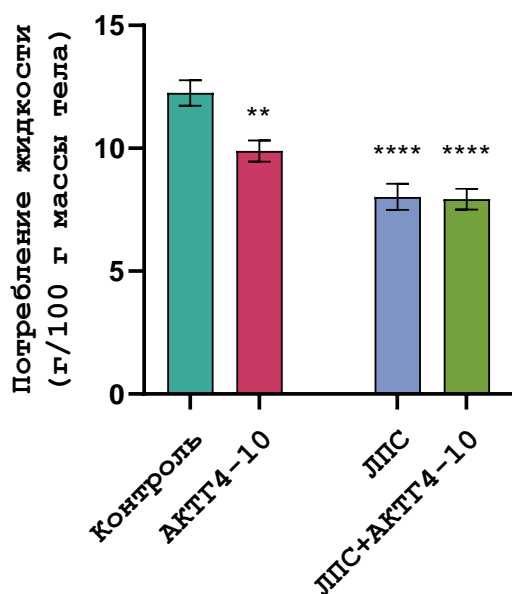


Рис. 24 Влияние ЛПС и АКТГ4-10 на потребление жидкости крысами. Число животных в группах: N=7-10. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$

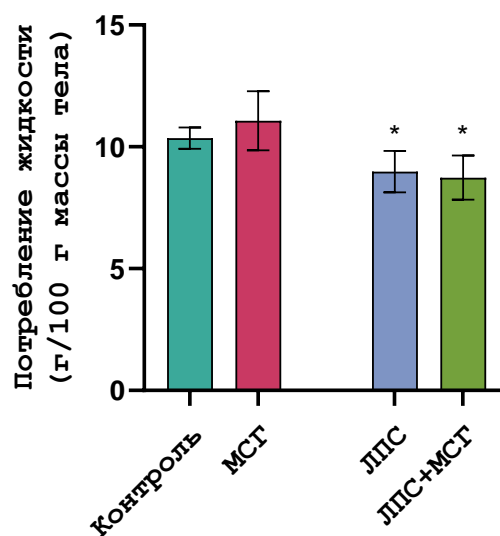


Рис. 25 Влияние ЛПС и α -МСГ на потребление жидкости крысами. Число животных в группах: N=11-14. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: * - $p < 0,05$

Влияние ЛПС, α -МСГ и АКТГ4-10 на предпочтение раствора сахарозы

Ангедония, наряду с подавленным настроением, является одним из двух основных симптомов депрессии у человека.

Согласно данным, представленным на рис. 26 и рис. 27, введение ЛПС приводит к значимому снижению предпочтения животными группы «ЛПС» раствора сахарозы по сравнению с животными группы «Контроль».

Если в группе контрольных животных среднее значение предпочтения сладкого раствора в течение 18 ч. составляло 88%, то в группе животных, получивших инъекцию ЛПС, оно снижалось до 59%. Введение α -МСГ и АКТГ4-10, на фоне ЛПС, приводило к значимому увеличению предпочтения раствора сахарозы животными. В группе «ЛПС+АКТГ4-10» также как и в группе «ЛПС+МСГ» среднее предпочтение составляло 79%.

Таким образом, нами впервые показано, что периферическое введение α -МСГ и АКТГ4-10 приводит к нормализации предпочтения животными раствора сахарозы в экспериментальной воспалительной модели депрессии. Предотвращение развития ангедонии в условиях острого системного воспаления свидетельствует об антидепрессантоподобной активности α -МСГ и АКТГ4-10.

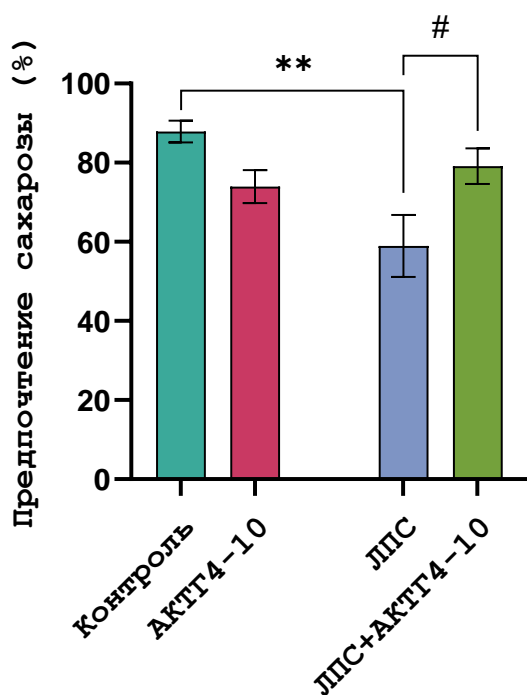


Рис. 26 Влияние ЛПС и АКТГ4-10 на предпочтение раствора сахарозы крысами. Число животных в группах: N=7-10. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «ЛПС+АКТГ4-10»: # - $p < 0,05$; Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: ** - $p < 0,01$

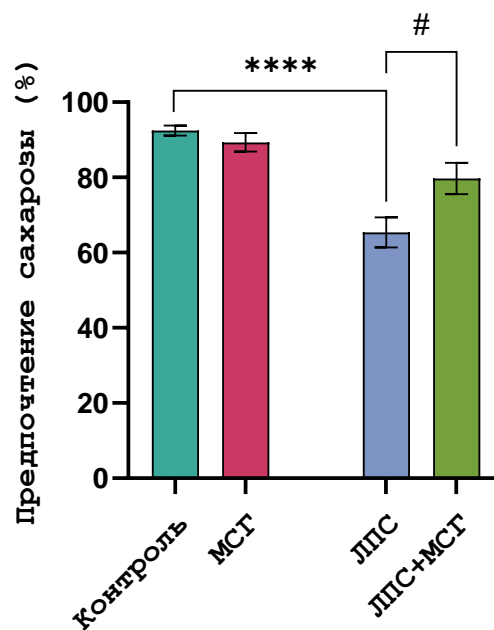


Рис. 27 Влияние ЛПС и α -МСТ на предпочтение раствора сахарозы крысами. Число животных в группах: N=11-14. Mean±SEM. Уровень значимости отличий от группы «ЛПС+МСТ»: # - $p < 0,05$; Уровень значимости отличий от группы «Контроль»: **** - $p < 0,0001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые продемонстрирована способность α -МСТ и АКТГ4-10 при периферическом введении ослаблять ангедонию у лабораторных животных в экспериментальной воспалительной модели депрессии. Подобный эффект свойственен клинически применяемым антидепрессантам. Результаты представленной работы свидетельствуют о том, что N-концевые фрагменты АКТГ проявляют антидепрессантоподобные эффекты. Нами впервые показано, что периферическое введение α -МСТ и АКТГ4-10 приводит к увеличению экспрессии мРНК BDNF, GR и mPGES-1 в гиппокампе крысы. Учитывая, что увеличение экспрессии мРНК GR и mPGES-1 приводит к последующему увеличению экспрессии мРНК BDNF, можно предположить, что исследуемые меланокортины оказывают антидепрессантные эффекты BDNF-зависимым способом. Подобные эффекты на экспрессию мРНК BDNF и GR также характерны для антидепрессантов. Нами показана способность фрагмента АКТГ4-10 ослаблять воспалительный ответ при

низкодозовой эндотоксемии, что подтверждается снижением уровня одного из ключевых провоспалительных цитокинов TNF- α . Полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о способности фрагмента АКТГ4-10 ослаблять также активацию ГГНС, что выражается в снижении уровня циркулирующего кортикостерона. На основании полученных данных можно предполагать, что исследуемые пептиды подавляют активность ГГНС на уровне гипоталамуса и гиппокампа. Полученные в данной работе результаты об эффектах агониста (АКТГ4-10) и антагониста/агониста (SHU 9119) различных подтипов меланокортиновых рецепторов, дают возможность предполагать, что наблюдаемые эффекты фрагментов АКТГ на иммунную и нейроэндокринную систему опосредуются через третий тип меланокортиновых рецепторов MC3R.

Полученные результаты указывают на то, что N-концевые фрагменты АКТГ или их аналоги могут найти применение в клинической практике при лечении различных патологий с воспалительным компонентом. В связи с тем, что многие психические и нейродегенеративные заболевания характеризуются подавлением нейрогенеза и нарушением процессов синаптической пластичности, важное значение приобретает способность изучаемых пептидов при периферическом введении стимулировать экспрессию в мозге нейротрофических факторов.

Клинические и экспериментальные данные показывают, что в основе патофизиологии депрессии лежат нарушения в функционировании нервной, иммунной и нейроэндокринной систем. Способность меланокортинов оказывать противовоспалительные эффекты, регулировать активность ГГНС и влиять на уровень BDNF (Рис. 28) свидетельствует об их потенциальной способности оказывать антидепрессантные эффекты.

Одновременная нормализация уровней провоспалительных цитокинов, кортизола и BDNF при введении меланокортинов депрессивным пациентам, может приводить к более эффективной нормализации состояния.

Результаты настоящей работы углубляют наше понимание в области механизмов действия меланокортинов на иммунную, нервную и нейроэндокринную системы и свидетельствуют о наличии у агонистов/антагонистов меланокортиновых рецепторов потенциала в качестве терапевтических препаратов, направленных на лечение патологий, характеризующихся нарушением функционирования нервной, иммунной и нейроэндокринной систем, к которым, в том числе, относится и депрессия.

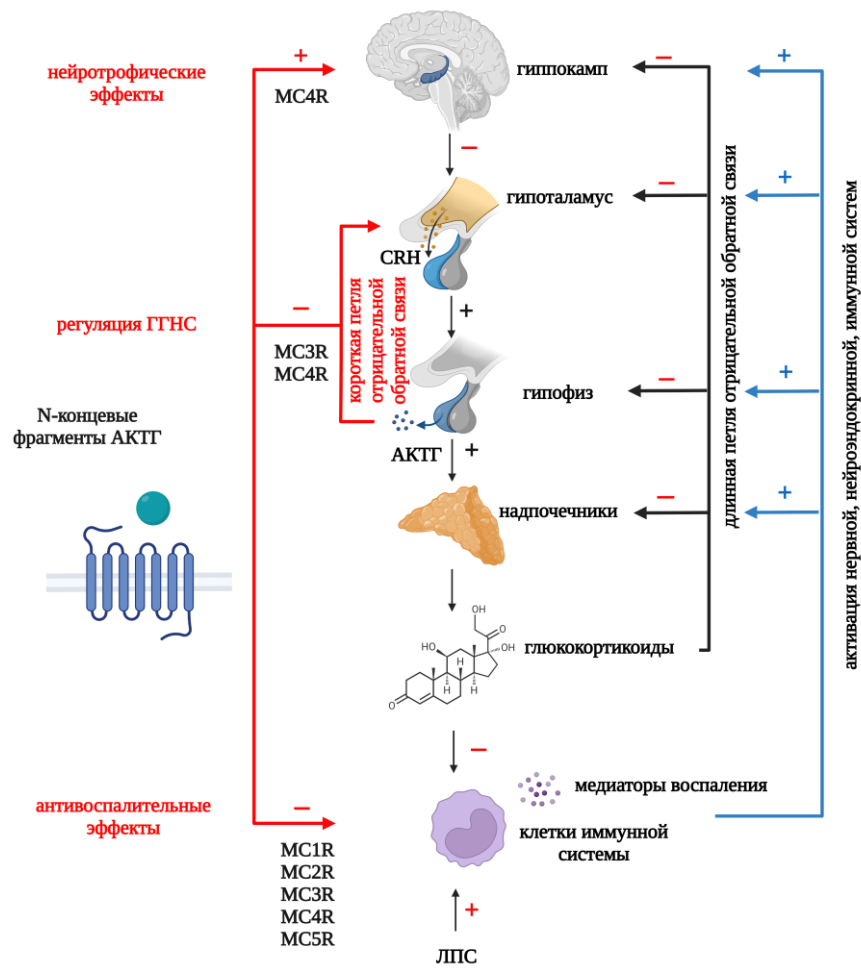


Рис. 28 Нейротрофические, нейроэндокринные и противовоспалительные эффекты меланокортинов

ВЫВОДЫ

- 1) α -МСГ и АКТГ4-10 при системном введении стимулируют экспрессию мРНК BDNF в гиппокампе крыс
- 2) α -МСГ и АКТГ4-10 при системном введении стимулируют экспрессию мРНК GR в гиппокампе крыс
- 3) АКТГ4-10 при системном введении ослабляет воспалительный ответ в условиях острого системного воспаления
- 4) АКТГ4-10 при системном введении ослабляет активацию ГГНС в условиях острого системного воспаления
- 5) Регуляторные эффекты АКТГ4-10 на иммунную и нейроэндокринную системы опосредованы активацией MC3R
- 6) Системно вводимые α -МСГ и АКТГ4-10 ослабляют ангедонию в воспалительной модели депрессии

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 - Физиология человека и животных:

- 1) Дубынина Е.В., Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Яценко К.А., Долотов О.В., Гривенников И.А. Альфа-меланоцитстимулирующий гормон увеличивает экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия в астроцитах гиппокампа крысы *in vitro* // Нейрохимия. - 2009. – Т. 26 (4). - С. 297-301. (IF - 0,596; RSCI) (0,61/0,25*)
- 2) Долотов О.В., Дубынина Е.В., Марков Д.Д., Иноземцева Л.С., Яценко К.А., Гривенников И.А. Влияние меланокортинов на экспрессию ряда нейротрофических факторов в клетках гиппокампа крысы *in vitro* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2011. – Т. 4. - С. 10-16. (IF - 0,23; RSCI) (0,86/0,25*)
- 3) Глазова Н.Ю., Атанов М.С., Пызгарева А.В., Андреева Л.А., Манченко Д.М., Марков Д.Д., Иноземцева Л.С., Долотов О.В., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование нейротропной активности аналога фрагмента АКТГ-АКТГ7-10PGP // Доклады Академии Наук. - 2011. – Т. 440 (4). - С. 544-549. (IF - 0,965; WoS/Scopus) (0,74/0,12*)
- 4) Markov D.D., Yatsenko K.A., Inozemtseva L.S., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Dolotov O.V.. Systemic N-terminal fragments of adrenocorticotropin reduce inflammation- and stress-induced anhedonia in rats // Psychoneuroendocrinology. - 2017. – V. 82. - P. 173–186. (IF - 3.7; WoS/Scopus) (1,72/1,23*)
- 5) Курко О.Д., Иноземцева Л.С., Глазова Н.Ю., Е.А. Себенцова Е.А., Марков Д.Д., Хухарева Д.Д., Левицкая Н.Г., Гривенников И.А., Долотов О.В. Эффекты хронического непредсказуемого стресса и острой низкодозовой эндотоксемии у крыс WISTAR HAN и SPRAGUE DAWLEY // Журнал высшей нервной деятельности им И. П. Павлова. - 2020. – Т. 70 (1). - С. 86-103. (IF - 0,569; WoS/Scopus) (2,21/0,37*)
- 6) Markov D.D. Sucrose Preference Test as a Measure of Anhedonic Behavior in a Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression: Outstanding Issues // Brain Sciences. - 2022. - V. 12(10). - P. 1287. (IF - 3.3; WoS/Scopus) (2,45/2,45*)

* Объем в условных печатных листах / вклад автора в условных печатных листах

- 7) 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. (IF - 4.2; WoS/Scopus) (3,68/3,43*)
- 8) Markov D.D., Dolotov O.V., Grivennikov I.A. The Melanocortin System: A Promising Target for the Development of New Antidepressant Drugs // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2023. – V. 24(7). - P. 6664. (IF - 5.6; WoS/Scopus) (5,51/4,66*)

Тезисы докладов в сборниках материалов международных и всероссийских конференций

1. Дубынина Е.В., Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Долотов О.В., Гривенников И.А. Активация меланокортинами Семакс и альфа-МСГ экспрессии нейротрофических факторов в культуре астроцитов гиппокампа крысы // Сборник тезисов конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга».- 2008.
2. Дубынина Е.В., Марков Д.Д., Яценко К.А. Снижение уровня нейротрофического фактора мозга (BDNF) в плазме крови крысы под действием стресса, вызванного принудительным плаванием // Сборник тезисов конференции «Ломоносов-2009».-2009.
3. Гривенников И.А., Долотов О.В., Дубынина Е.В., Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Яценко К.А., Мясоедов Н.Ф. Меланокортины в ЦНС: функции и возможные механизмы действия // Сборник тезисов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды».- 2009. - С. 49.
4. Иноземцева Л.С., Дубынина Е.В., Яценко К.А., Марков Д.Д., Долотов О.В., Гривенников И.А. Изменение уровней альфа-меланокортина и нейротрофического фактора мозга (BDNF) в плазме крови крысы в условиях острого стресса // Сборник тезисов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды».- 2009. - С. 198.
5. Гривенников И.А., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Лебедев А.Н., Марков Д.Д., Новосадова Е.В., Пызгарева А.В., Яценко К.А. Создание тест-системы для скрининга лекарственных препаратов с нейропротекторной активностью на клеточном и организменном уровне // Сборник тезисов итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы».- 2009. - С. 162.

6. Марков Д.Д., Иноземцева Л.С., Яценко К.А., Долотов О.В., Гривенников И.А. Влияние меланокортинов на экспрессию генов про- и противовоспалительных цитокинов в моделях воспаления *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток».-2011.- С. 40.
7. Долотов О.В., Яценко К.А., Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Гривенников И.А. Эффекты меланокортинов в моделях депрессии // Сборник тезисов VI российского симпозиума «Белки и пептиды».- 2013. - С. 115.
8. Яценко К.А., Иноземцева Л.С., Марков Д.Д., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Гривенников И.А., Долотов О.В. Аналог фрагмента АКТГ 4-10 Семакс ослабляет эффекты хронического стресса у крыс // Сборник тезисов VI российского симпозиума «Белки и пептиды».- 2013. - С. 289.
9. Долотов О.В., Марков Д.Д., Яценко К.А., Иноземцева Л.А., Андреева Л.А., Гривенников И.А. Роль меланокортиновой системы в регуляции депрессивноподобного поведения // Сборник тезисов конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга».- 2014. - С. 51.
10. Марков Д.Д., Яценко К.А., Иноземцева Л.С., Гривенников И.А., Долотов О.В. Альфа-меланоцитстимулирующий гормон ослабляет поведенческие эффекты острого системного воспаления у крыс и снижает уровень экспрессии индуцибельной NO-синтазы // Сборник тезисов конференции «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга».- 2014. - С. 93.
11. Марков Д.Д. Альфа-меланоцитстимулирующий гормон и его фрагмент 4-10 ослабляют поведенческие эффекты острого системного воспаления у крыс // Сборник тезисов конференции «Ломоносов-2015».- 2015. - С. 378.
12. Долотов О.В., Марков Д.Д., Иноземцева Л.С., Яценко К.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Меланокортиновые рецепторы как мишень для разработки новых антидепрессантов // Сборник тезисов конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам».- 2015.
13. Долотов О.В., Марков Д.Д., Иноземцева Л.С., Яценко К.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Эффекты N-концевых фрагментов адренокортикотропного гормона в моделях депрессивноподобного поведения // Сборник тезисов II Научной конференции «Физиологическая активность регуляторных пептидов». – 2015.
14. Марков Д.Д., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Курко О.Д., Гривенников И.А. Антидепрессантные эффекты меланокортинов в условиях острого системного

- воспаления у крыс // Сборник тезисов конференции «Геномика и биология живых систем».- 2016.
15. Марков Д.Д., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Гривенников И.А. Влияние меланокортинов на гедонистическое поведение крыс в условиях острого системного воспаления // АСТА NATURAE.- 2016. - Т. 2. - С. 159.
16. Шадрина М.И., Бондаренко Е.А., Долотов О.В., Марков Д.Д., Дружкова Т.А., Гуляева Н.В., Гехт А.Б., Сломинский П.А. Поиск молекулярных мишеней и механизмов, связанных с развитием депрессии // Сборник тезисов XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова. – 2017.
17. Марков Д.Д., Яценко К.А., Иноземцева Л.С., Гривенников И.А., Долотов О.В. Антидепрессантные эффекты эндогенных меланокортинов в модели непредсказуемого хронического стресса // Сборник тезисов VIII российского симпозиума «Белки и пептиды».- 2017.
18. Шадрина М.И., Бондаренко Е.А., Власов И.Н., Долотов О.В., Марков Д.Д., Курко О.Д., Гривенников И.А., Гехт А.Б., Сломинский П.А. Поиск молекулярных мишеней и механизмов, связанных с развитием депрессии: между моделью и пациентом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.- 2018.
19. Долотов О.В., Марков Д.Д., Курко О.Д., Иноземцева Л.С., Гривенников И.А. Изучение роли меланокортиновой системы в стрессовом ответе и развитии депрессивных состояний // Сборник тезисов XXVI ежегодной научной конференции «Перспективные направления молекулярной генетики». – 2018.
20. Марков Д.Д., Курко О.Д., Иноземцева Л.С., Долотов О.В., Гривенников И.А. Антидепрессантные эффекты N-концевых фрагментов АКТГ в условиях острого системного воспаления // Сборник тезисов V съезда фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств". – 2018.