

*На правах рукописи*

**КРАВЧЕНКО Сергей Владимирович**

**ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ТРЕВОГОПОДОБНЫЕ СОСТОЯНИЯ  
У КРЫС И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ КОРРЕКЦИИ  
НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫМИ МЕТОДАМИ**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России).

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор  
**Каде Азамат Халидович.**

**Официальные оппоненты:**

**Бяловский Юрий Юльевич**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий кафедрой;

**Спицин Анатолий Павлович**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 20 мая 2020 года в 13.00 час. на заседании диссертационного совета Д 208.038.02 на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861) 2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

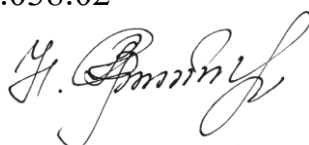
Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 208.038.02

доктор медицинских наук,

доцент



Лапина Наталья Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Тревожные расстройства (включая панические расстройства, социально-тревожные расстройства, генерализованное тревожное расстройство и другие формы) являются широко распространенной группой нарушений психики, способной наносить экономический ущерб. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, до 50 % людей во всем мире в определенный момент своей жизни могут страдать от нервно-психических расстройств. Среди них, исходя из результатов эпидемиологических исследований, тревожные расстройства составляют от 6,0 % до 13,6 % всех психических нарушений – вторая по распространенности группа, после расстройств настроения (Ю.А. Игнатова и др., 2018). По данным других исследований эпидемиологии психических заболеваний за последние десятилетия тревожные расстройства, при усредненной оценке их распространенности, имеют более высокий уровень, чем другие расстройства и занимают первое место в структуре всех психических расстройств в мире (Z. Steel et al., 2014; Н.Г. Незнанов и др., 2017). Симптоматика тревожных расстройств может иметь разнообразный характер и заключаться в наличии стойкого чувства беспокойства, относительно определенных событий и ситуаций, раздражительности, затруднений концентрации внимания, повышенной утомляемости и многих других симптомов (М.С. Троицкий и др., 2018). Современный ритм жизни, связанный с необходимостью принятия огромного количества важных решений, зачастую в условиях либо недостатка, либо наоборот – избытка информации способствует нарушениям функционирования центральной нервной системы (Т.А. Караваева и др., 2016), что делает создание новых способов терапии тревожных расстройств особенно актуальным. Нередко тревожно-депрессивные расстройства являются одним из проявлений не моторной симптоматики при паркинсонизме (A. Bonito-Oliva et al., 2014; M.P.G. Broen et al., 2016; R.F. Pfeiffer, 2016; A. Sauerbier et al., 2016; F. Faivre et al., 2018), значительно ухудшая течение болезни. Тревога и депрессия, возникающие при паркинсонизме, являются не просто симптомами, но и имеют тесную патогенетическую взаимосвязь с ним. Они могут возникать под действием одних и тех же факторов внешней среды. В том числе, некоторых сельскохозяйственных пестицидов, к которым относится и ротенон. Он, способствуя повреждению и гибели дофаминергических нейронов черной субстанции, за счет развития оксидативного стресса (E.L. Streck et al., 2014; K. Radad et al., 2019) и активации апоптоза (S. Heinz et al., 2017; E. Chernivec et al., 2018), ведет к развитию тревожности.

Высокая распространенность тревожных расстройств, их способность снижать уровень жизни пациентов, коморбидность тревожных расстройств с органическими поражениями центральной нервной системы (в том числе паркинсонизмом), организационные препятствия, связанные фармакотерапией, предметно-количественным учетом препаратов, относящихся к списку III Перечня наркотических и психотропных веществ (Н.Г. Незнанов и др., 2017), подчеркивает высокий уровень актуальности разработки методов немедикаментозной терапии тревожных расстройств, которым может стать метод транскраниальной электростимуляции.

Транскраниальная электростимуляция (ТЭС-терапия) – перспективный лечебный метод, обладающий множеством эффектов, среди которых особо стоит выделить антиоксидантный, обусловленный способностью ТЭС-терапии увеличивать синтез  $\beta$ -эндорфина (В.Д. Левичкин и др., 2014). Благодаря данному эффекту ТЭС-терапия является возможным перспективным методом немедикаментозной коррекции тревожных состояний.

**Степень разработанности темы.** К настоящему времени, большое количество экспериментальных данных демонстрирует эффективность ТЭС-терапии в коррекции самых различных нарушений. Можно выделить воздействие на нейроиммуноэндокринную регуляцию (А.Х. Каде и др., 2017), имеющее гомеостатический характер (А.И. Трофименко и др., 2014; А.С. Липатова и др., 2018). Показана возможность ТЭС-терапии оказывать антиоксидантное действие за счет восстановления уровня  $\beta$ -эндорфина, обладающего антиоксидантными свойствами благодаря своей пептидной природе (В.Д. Левичкин и др., 2014). Потенциал применения метода в неврологии обеспечен данными о результатах исследований, в ходе которых был выявлен нейропротекторный эффект ТЭС-терапии у больных с ишемическим инсультом (А.И. Трофименко и др., 2015). При этом эффективность данного метода при коррекции аффективных расстройств, например тревожности, особенно на фоне нейродегенеративных заболеваний остается малоизученным.

В большинстве работ по изучению различных терапевтических эффектов ТЭС-терапии, внимание исследователей, было обращено в первую очередь на усиление секреции  $\beta$ -эндорфина, синтез гипофизарных, надпочечниковых гормонов и цитокинов (С.О. Апсалямова, 2013; А.И. Трофименко и др., 2014; В.О. Небогатиков, 2015). Проведены исследования, посвященные оценке характера экспрессии гена *c-fos* в паравентрикулярном ядре гипоталамуса у крыс в условиях комбинированного стресса (А.Х. Каде и др., 2017). При этом характер поведения крыс под действием ТЭС-терапии изучен в сравнительно малой степени. В частности – не изучалось влияние ТЭС-терапии на изменение выраженности паттернов тревогоподобного поведения у крыс в поведенческих тестах, таких, как, например, тест «темно-светлая камера» и «открытое поле».

**Цель исследования:** изучить возможности коррекции тревогоподобного состояния у крыс с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма посредством ТЭС-терапии.

**Задачи исследования:**

1. Оценить влияние ТЭС-терапии на выраженность патологического тревогоподобного поведения крыс, возникающего на фоне хронической интоксикации ротеноном в поведенческом тесте «открытое поле».
2. Оценить влияние ТЭС-терапии на выраженность патологического тревогоподобного поведения крыс, возникающего на фоне хронической интоксикации ротеноном в поведенческом тесте «темно-светлая камера».
3. Изучить возможность влияния ТЭС-терапии на степень дегенеративных дистрофических изменений черной субстанции головного мозга крыс с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма, посредством оценки содержания фермента тирозингидроксилазы.

4. Оценить влияние ТЭС-терапии на выраженность индивидуальных суммированных баллов моторного дефицита.

5. Оценить влияние ТЭС-терапии на уровни плазменного  $\beta$ -эндорфина, серотонина, дофамина и кортикостерона.

6. На основании полученных результатов оценить возможность применения ТЭС-терапии в качестве немедикаментозного метода коррекции патологического тревогоподобного состояния у крыс, возникающего на фоне нейродегенеративных заболеваний, в частности – паркинсонизма.

**Научная новизна.** Впервые:

– показана возможность коррекции психоэмоциональных и моторных нарушений у крыс с тревогоподобным состоянием, развившимся при ротенон-индуцированном паркинсонизме, с помощью ТЭС-терапии.

– показано, что использование ТЭС-терапии уменьшает выраженность некоторых паттернов тревогоподобного поведения, развившегося у крыс при ротенон-индуцированном паркинсонизме.

– установлено уменьшение выраженности дегенеративно-дистрофических изменений в нейронах черной субстанции у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом под влиянием ТЭС-терапии.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Результаты проведенного исследования дополняют и расширяют имеющиеся представления о механизмах формирования тревожных состояний, как психоэмоциональных нарушений, сопутствующих нейродегенеративным заболеваниям центральной нервной системы. Показана существенная значимость изучения поведенческих паттернов крыс с патологическим тревогоподобным состоянием как одного из доступных и высокоинформативных инструментов для проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований анксиолитического эффекта ТЭС-терапии. Все это имеет теоретическую значимость для проведения исследований в сфере патологической физиологии и психофизиологии патологических тревогоподобных состояний у животных.

Проведенное исследование показало положительное влияние ТЭС-терапии на ряд психоэмоциональных и моторных нарушений у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом. Эти свидетельствует об эффективности используемого метода для коррекции, возникающих при нейродегенеративных заболеваниях, сопутствующих патологических тревожных расстройств. Результаты работы вносят существенный вклад в обоснование дальнейшего изучения и практического применения ТЭС-терапии в качестве метода профилактики и коррекции патологических тревогоподобных состояний развивающихся на фоне нейродегенеративных заболеваний и воздействия нейротоксинов.

Результатом работы стало патогенетическое обоснование применения ТЭС-терапии в качестве метода профилактики и коррекции патологических тревогоподобных состояний, развивающихся на фоне ротеноновой интоксикации.

**Методология и методы исследования.** Сбор и обработка экспериментальных данных осуществлялись в соответствии с разработанной диссертантом схемой исследования и использованием современных и адекватных поставленным задачам описательного, экспериментального, гистологического, биохимического и статистического методов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Применение ТЭС-терапии приводит к меньшей выраженности паттернов тревогоподобного поведения в тесте «открытое поле» у крыс с патологическим тревогоподобным состоянием на фоне хронической интоксикации ротеноном, относительно крыс, не получавших ТЭС-терапию.

2. Применение ТЭС-терапии приводит к меньшей выраженности паттернов тревогоподобного поведения крыс в тесте «темно-светлая камера» у крыс с патологическим тревогоподобным состоянием на фоне хронической интоксикации ротеноном, относительно крыс, не получавших ТЭС-терапию.

3. Применение ТЭС-терапии способно улучшить сохранность морфологической структуры черной субстанции у крыс с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма, в сравнении с крысами, не подвергнутыми её воздействию.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством наблюдений, объемом материала, использованием современных и информативных методов исследования и статистического анализа при обработке полученных данных. Основные положения работы представлялись и обсуждались на конференциях: II Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний»; региональной межвузовской учебно-методической конференции с международным участием «Естественно-научное образование: стратегия, проблемы, достижения»; VIII Съезд Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов России; VI съезд биофизиков России (представлено 2 работы).

**Внедрение результатов исследования.** Основные результаты исследования используются в научно-исследовательской и педагогической работе на кафедрах общей и клинической патологической физиологии, нервных болезней и нейрохирургии с курсом нервных болезней и нейрохирургии ФПК и ППС, психиатрии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г. Краснодар), в ГБУЗ «Специализированная клиническая психиатрическая больница № 1» (г. Краснодар).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из которых 6 в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных положений диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе 3 статьи индексируемых международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

**Личный вклад автора в исследование.** Диссертантом были сформулированы цели и задачи исследования, выполнена разработка дизайна исследования (85 %), проведен поиск и обзор зарубежных и отечественных литературных источников (95 %). Автор проводил эксперименты на лабораторных животных (крысы), сбор материала для лабораторного исследования (95 %), статистическую обработку и анализ результатов исследования (98 %). Автор принимал

непосредственное участие в формулировании выводов и научных положений, а также предложений для внедрения, кроме того в разработке практических рекомендаций (90 %), в работе над написанием статей и тезисов (85 %), подготовил текст и иллюстративный материал для диссертации (95 %).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, который включает 20 таблиц и 23 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, отражающей результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы, содержащего 61 отечественных и 114 иностранных источников, и приложений.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование выполнялось на белых половозрелых нелинейных самцах крыс с исходной массой тела –  $170 \pm 25$  г. Общий объем выборки – 145 животных. Крысам был обеспечен свободный доступ к воде и пище. Животные находились в условиях естественного освещения при температуре 22–24 °С. Для компенсации изменений уровня естественной освещенности дополнительно могло применяться искусственное освещение. Содержание животных и постановка экспериментов проводились в соответствии с требованиями приказа № 199н МЗ РФ от 01.04.2016 г., «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных» (1985) и требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals». Критериями исключения из эксперимента являлись видимые анатомические дефекты и признаки заболеваний.

В начале эксперимента животные, после недельного периода адаптации, подвергались поведенческим тестам без предварительного обусловливания «открытое поле» и «темно-светлая камера» для фиксации исходного уровня выраженности тревогоподобного поведения. Степень выраженности тревогоподобного поведения оценивали по количеству времени, проведенного в светлом отсеке «темно-светлой камеры», общей горизонтальной исследовательской активности (количеству пересеченных секторов всей площади арены установки) и горизонтальной исследовательской активности в центре «открытого поля», а также по уровню вертикальной активности – количеству стоек на задних лапах с опорой и без опоры на боковые стенки. Из части крыс была образована контрольная группа животных ( $n = 40$ ), остальные животные подвергались системному введению нейротоксина ротенона в течение месяца. После этого выжившие животные, в соответствии с поставленными задачами, случайным образом были разделены на две группы: группа сравнения ( $n = 40$ ) – животные, с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма и основная группа ( $n = 40$ ) – животные, с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма, получившие 7 сеансов ТЭС-терапии с 4-й по 5-ю недели эксперимента. На 4-й и на 5-й неделях эксперимента у всех животных так же выполнялся анализ выраженности паттернов тревогоподобного поведения в поведенческих тестах «от-

крытое поле» и «темно-светлая камера». Для определения степени выраженности дегенеративных дистрофических изменений черной субстанции использовался иммуногистохимический метод, детектируемый белок интереса – фермент тирозингидроксилаза. Для определения содержания гормонов и медиаторов в крови использовался иммуноферментный анализ. Оценивались уровни  $\beta$ -эндорфина, кортикостерона, серотонина, дофамина с помощью наборов Cloud-Clone Corp. (Китай).

Статистическая обработка полученных в ходе экспериментального исследования результатов, проводилась с помощью программного обеспечения «MS Excel 2013» (Microsoft Inc., США) и программных пакетов для выполнения статистического анализа и визуализации данных «Statistica 12» (StatSoft Inc., США) и «GraphPad Prism 6.01» (GraphPad Software Inc., США). Гипотеза о типе распределения количественных признаков проверялась посредством критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение полученных значений в исследуемых группах отличалось от нормального, для их дальнейшей обработки использовались методы непараметрической статистики. Данные представлялись в виде медианы, нижнего (25 %) и верхнего (75 %) квартилей ( $Me(Q1-Q3)$ ). Для парного сравнения показателей двух независимых групп использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (MW-test). Для оценки статистически значимых различий при парных сравнениях зависимых групп был использован непараметрический критерий Вилкоксона (W-test). Изменения считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  (Н.В. Трухачева, 2013).

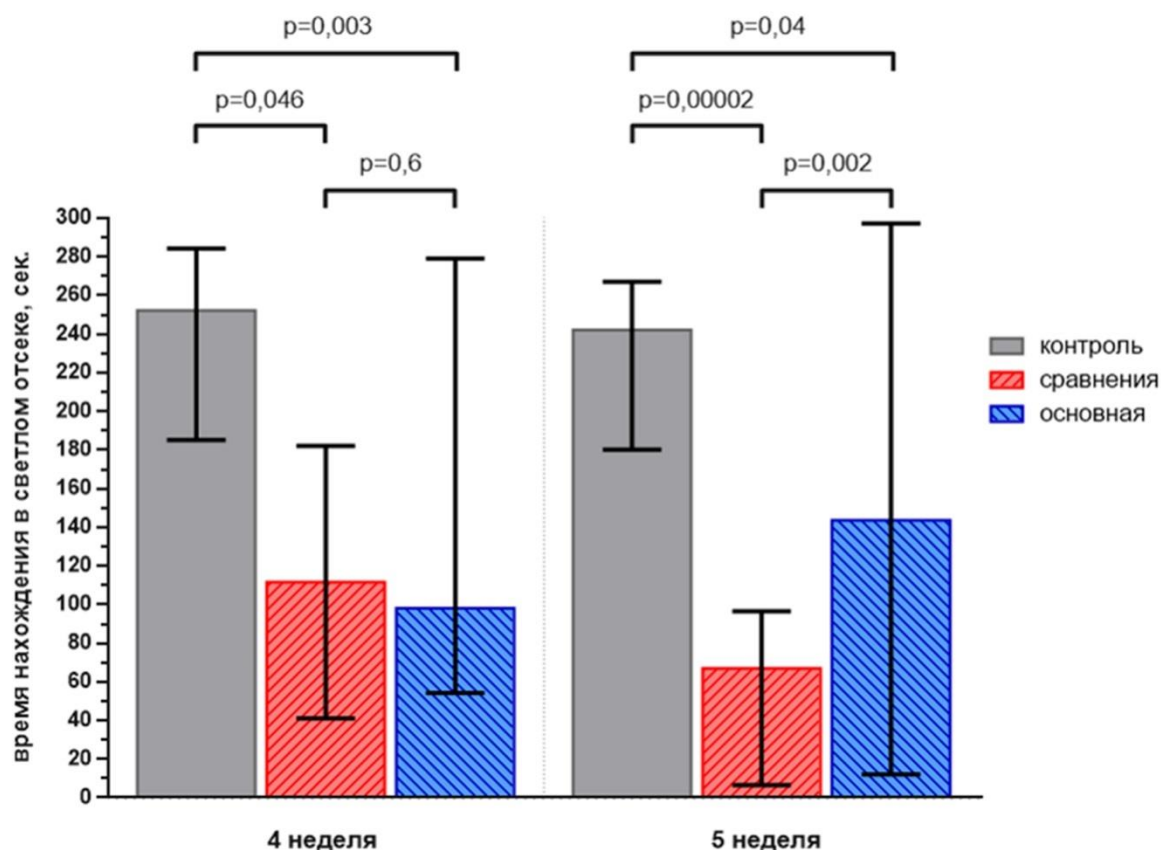
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Патологическая тревожность, наравне с другими расстройствами психоэмоциональной сферы, такими, как депрессия, является одним из не моторных проявлений паркинсонизма (А. Bonito-Oliva et al., 2014; А.А. Таппахов, Т.Я. Николаева, 2016; F. Faivre et al., 2018). Данное аффективное расстройство может быть воспроизведено у животных, в частности у крыс, при моделировании данного нейродегенеративного заболевания с помощью нейротоксинов (F. Faivre et al., 2018; J.C.F. Vieira et al., 2019). В данном диссертационном исследовании у крыс, после хронической интоксикации нейротоксином ротеноном, развилось патологическое тревогоподобное состояние, проявляющееся в увеличении выраженности паттернов тревогоподобного поведения в тестах «открытое поле» и «темно-светлая камера». На 4-й неделе эксперимента в тесте «темно-светлая камера» крысы, подвергнутые воздействию ротенона, демонстрировали на 55,75 % (MW-test,  $p = 0,046$ ) у группы сравнения и на 61,11 % (MW-test,  $p = 0,003$ ) у основной группы меньшее время нахождения в светлом отсеке, в сравнении с крысами контрольной группы (рисунок 1).

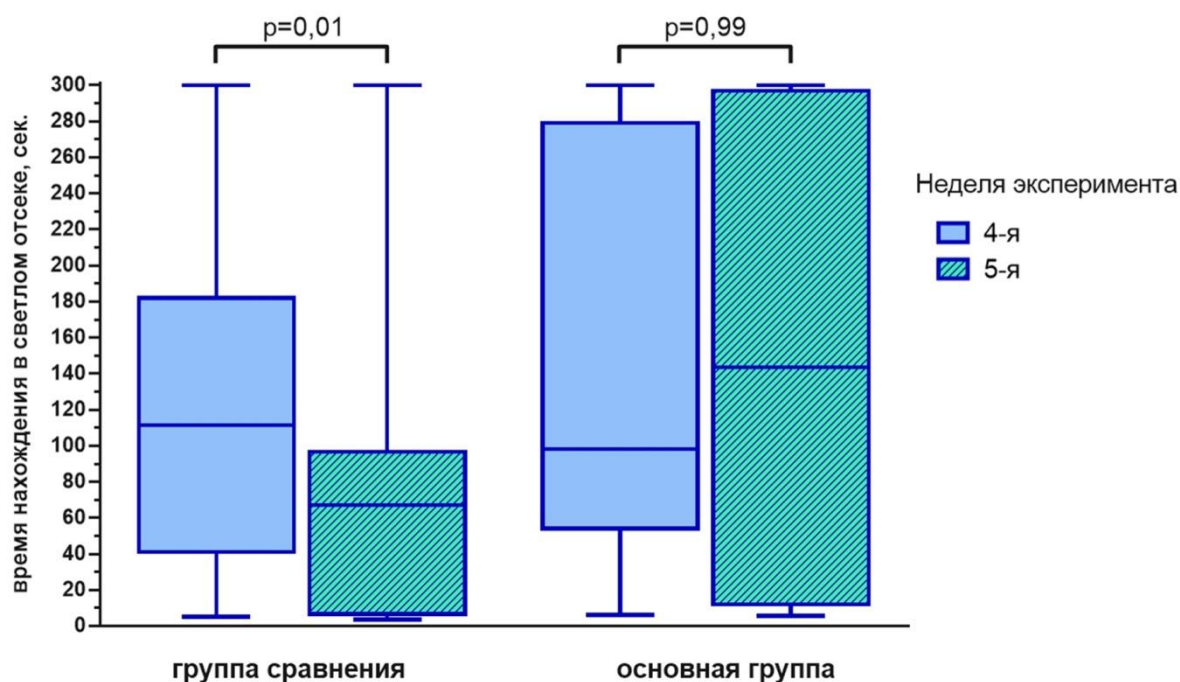
К 5-й неделе эксперимента у крыс группы сравнения происходило статистически значимое (W-test,  $p = 0,01$ ) падение времени, проведенного в светлом отсеке установки на 39,66 %, в то время как крысы основной группы после недельного курса ТЭС-терапии смогли сохранить, на 5-й неделе эксперимента, этот показатель на исходном уровне (рисунок 2). Время, проведенное в светлом



отеке установки «темно-светлая камера» крысами основной группы, после воздействия ТЭС-терапии было статистически значимо (MW-test,  $p = 0,002$ ) выше, чем у крыс из группы сравнения в 2,2 раза (рисунок 1).



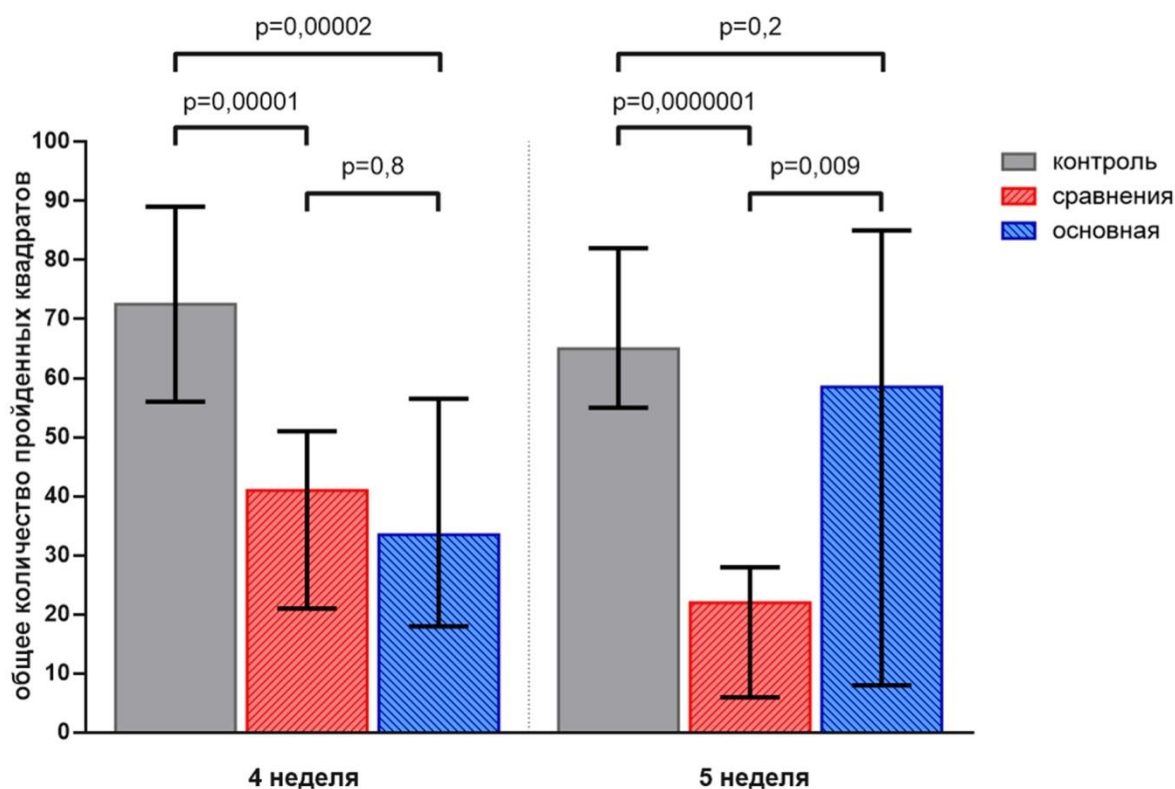
**Рисунок 1** – Время, проведенное в светлом отсеке установки «темно-светлая камера» на 4-й и 5-й неделях эксперимента крысами разных групп, Me(Q1–Q3), сек



**Рисунок 2** – Влияние ТЭС-терапии на динамику времени нахождения крыс группы сравнения и основной группы в светлом отсеке теста «темно-светлая камера» в сек

Такой характер изменения поведения в тесте «темно-светлая камера» является признаком увеличения степени тревожности (Y. Bouter et al., 2019; N. Pitsikas et al., 2019).

В тесте «открытое поле» крысы, подвергавшиеся воздействию ротенона на протяжении 28 дней, демонстрировали меньший уровень общей горизонтальной активности, что проявлялось меньшим на 43,45 % (MW-test,  $p = 0,00001$ ) у группы сравнения и на 53,79 % (MW-test,  $p = 0,00002$ ) у основной группы количеством пройденных квадратов в арене установки (рисунок 3).

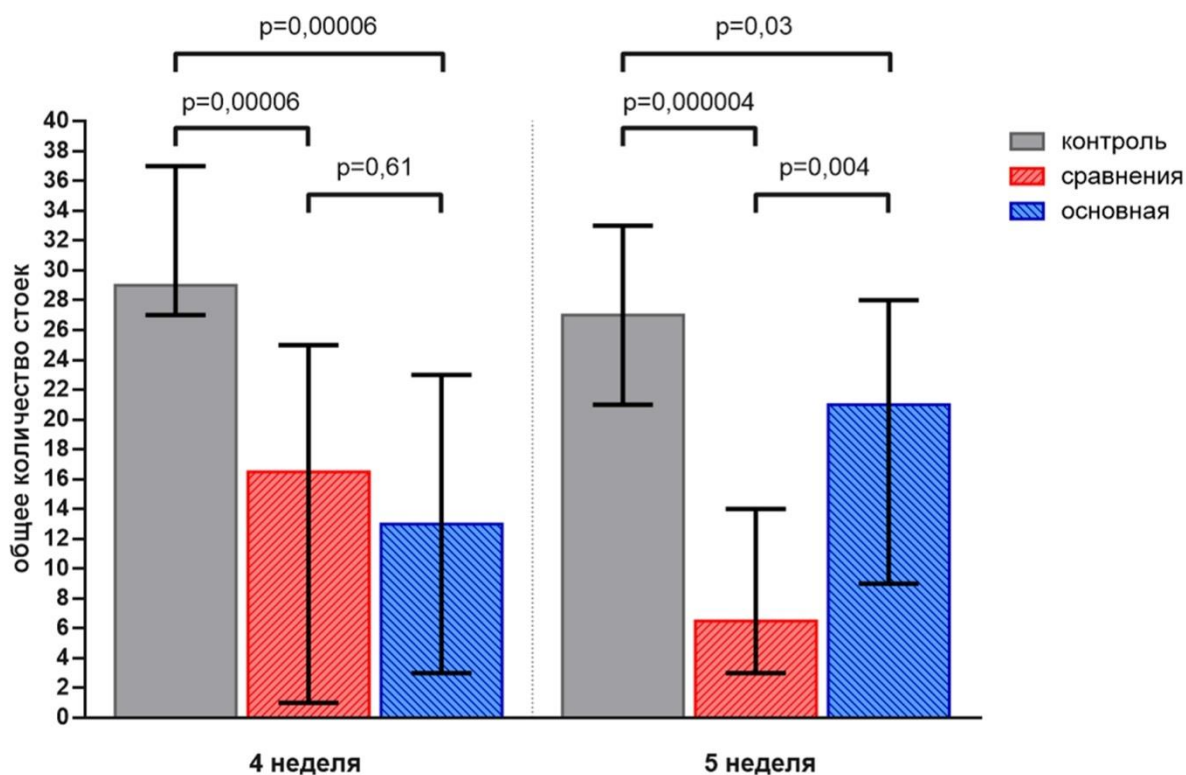
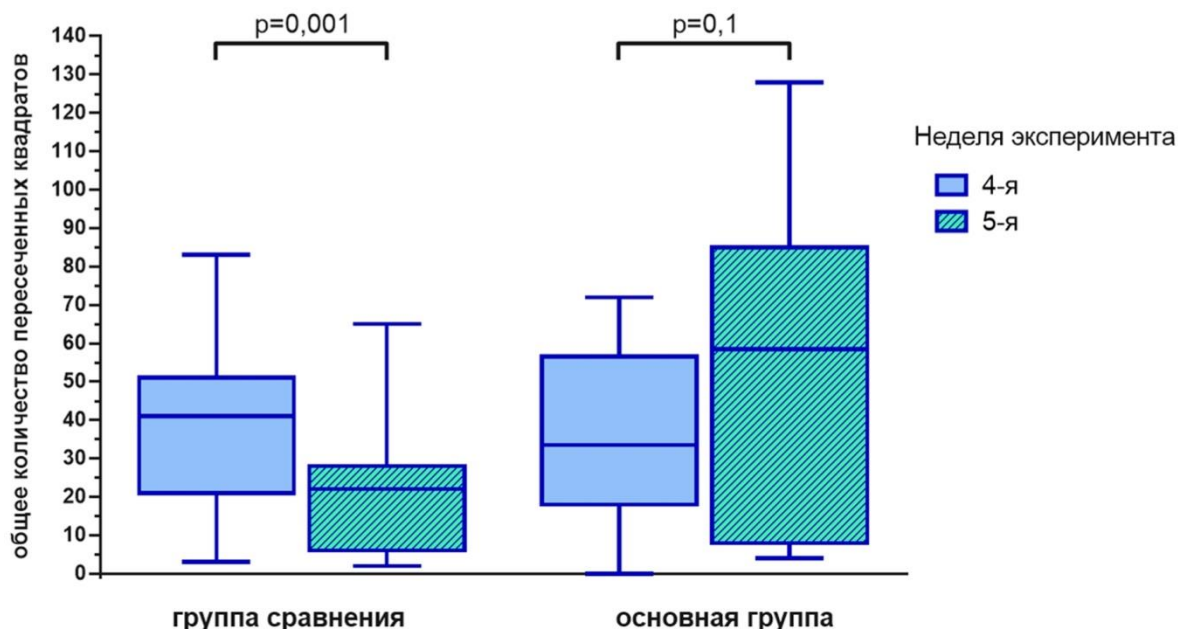


**Рисунок 3** – Уровни общей горизонтальной активности в тесте «открытое поле» на 4-й и 5-й неделях эксперимента у крыс разных групп, количество пройденных квадратов, Me(Q1–Q3)

В то время как у крыс группы сравнения к 5-й неделе эксперимента, через неделю после окончания инъекций ротенона, произошло падение (W-test,  $p = 0,001$ ) горизонтальной активности на 46,34 % относительно 4-й недели (рисунок 4), крысы основной группы, после прохождения ТЭС-терапии, не имели статистически значимого (W-test,  $p = 0,1$ ) снижения общей горизонтальной активности, а наоборот, показали тенденцию к увеличению значения данного параметра.

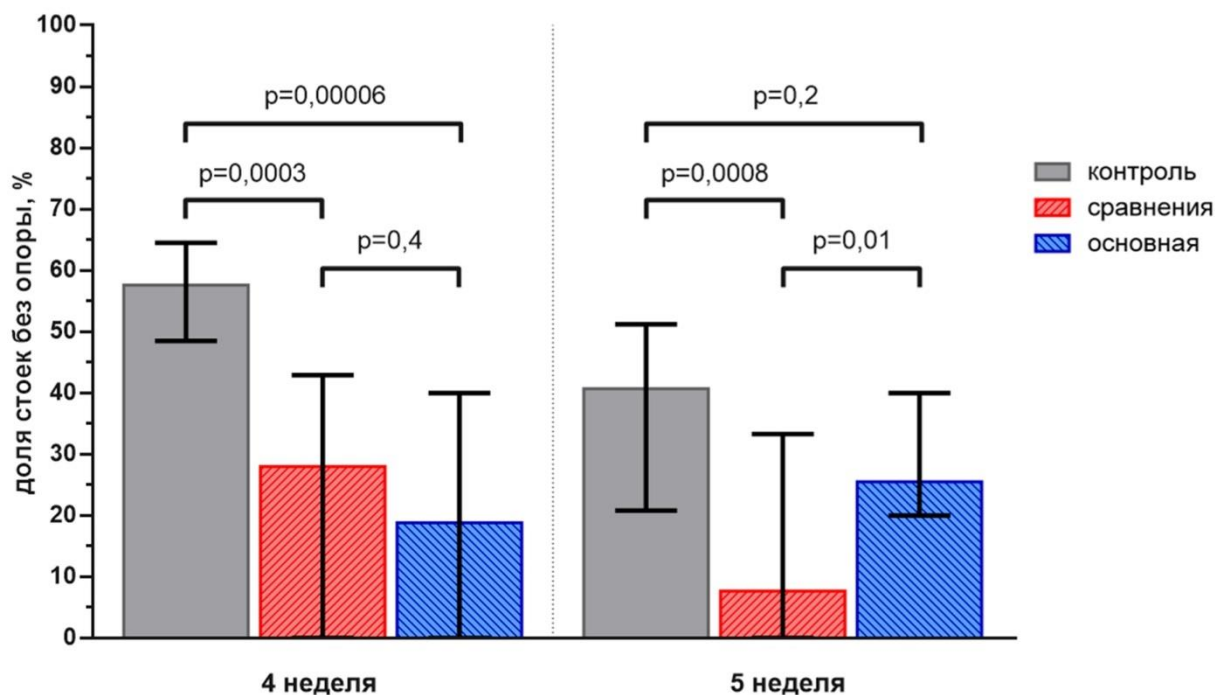
По показателям общего уровня вертикальной активности на всей площади установки «открытое поле» крысы основной группы и группы сравнения, после хронического системного введения ротенона, демонстрировали меньший её уровень, чем крысы группы контроля (рисунок 5). Так, у крыс группы сравнения значение медианы количества стоек на 4-й неделе было статистически значимо (MW-test,  $p = 0,00006$ ) ниже на 43,1 %, чем у крыс контрольной группы. У крыс основной группы значение данного показателя было статистически значимо (MW-test,  $p = 0,00006$ ) ниже, чем у группы контроля на 55,17 %. После

недельного курса ТЭС-терапии, крысы основной группы имели статистически значимое (MW-test,  $p = 0,001$ ) увеличение данного показателя на 450 %, по сравнению с крысами группы сравнения, не получавшими ТЭС-терапию, что указывает на более низкую выраженность тревогоподобного поведения у данной группы животных (рисунок 5).



**Рисунок 5** – Уровни общей вертикальной активности у крыс разных групп в тесте «открытое поле», количество стоек с опорой и без, Me(Q1–Q3)

ТЭС-терапия оказывала влияние не только на общее количество стоек с опорой и без опоры в «открытом поле», но и на структуру вертикальной активности (рисунок 6). Данный эффект проявился в статистически значимо (MW-test,  $p = 0,01$ ) большем количестве, на 231,17 %, доли стоек в центре (без опоры) от общего уровня вертикальной активности у крыс, прошедших недельный курс ТЭС-терапии, чем у крыс, не подвергавшихся данной процедуре.

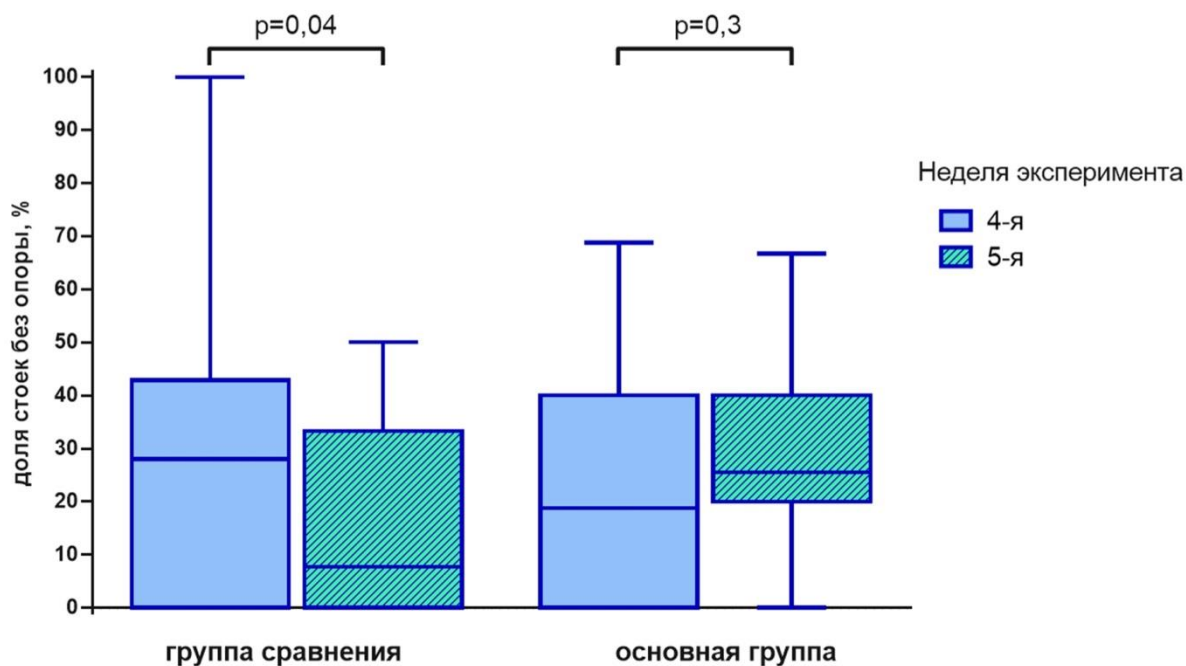


**Рисунок 6** – Доля вертикальной активности в центре у крыс разных групп, от общего уровня вертикальной активности в тесте «открытое поле», Me(Q1–Q3)

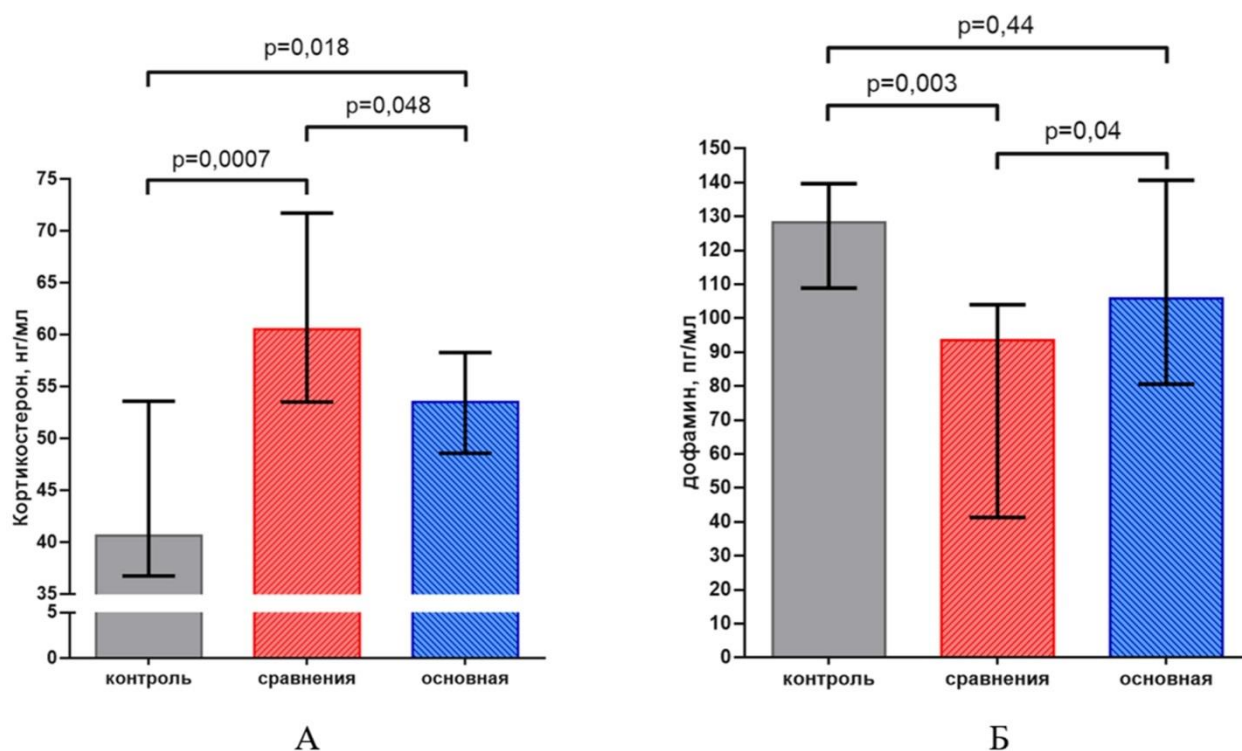
В динамике данного показателя также имелись различия – в группе сравнения, на 5-й неделе эксперимента, произошло статистически значимое (W-test,  $p = 0,04$ ) падение процентной доли вертикальной активности на 72,5 %. В то же время, у крыс основной группы, после прохождения ТЭС-терапии, не произошло уменьшения доли вертикальной активности по сравнению с показателями этой же группы на 4-й неделе (рисунок 7). Это так же говорит о влиянии транскраниальной электростимуляции на эмоциональное состояние крыс в виде снижения уровня тревожности.

На 4-й неделе эксперимента у крыс группы сравнения и основной группы медиана уровня кортикостерона в плазме крови была статистически значимо (MW-test,  $p = 0,0007$  и  $p = 0,0018$  соответственно) выше (на 48,95 % и 31,71 % соответственно), чем в контрольной группе (рисунок 8, А). На 5-й неделе крысы основной группы, получившие 7 сеансов ТЭС-терапии после хронического системного введения ротенона, демонстрировали статистически значимо (MW-test,  $p = 0,048$ ) более низкий уровень (на 11,58 %) плазменного кортикостерона в сравнении с крысами группы сравнения. Это, по имеющимся литературным данным, может быть одним из факторов, снижающих выраженность тревогоподобного поведения у животных (Zhang L. et al., 2017).





**Рисунок 7** – Влияние ТЭС-терапии на динамику доли вертикальной активности в центре от общего уровня вертикальной активности у крыс группы сравнения и основной группы в тесте «открытое поле», Me(Q1–Q3)



**Рисунок 8** – А – уровень кортикостерона в плазме крови у крыс разных групп, на 5-й неделе эксперимента, Me(Q1–Q3), нг/мл; Б – уровень дофамина в плазме крови у крыс разных групп на 5-й неделе эксперимента, Me(Q1–Q3), пг/мл

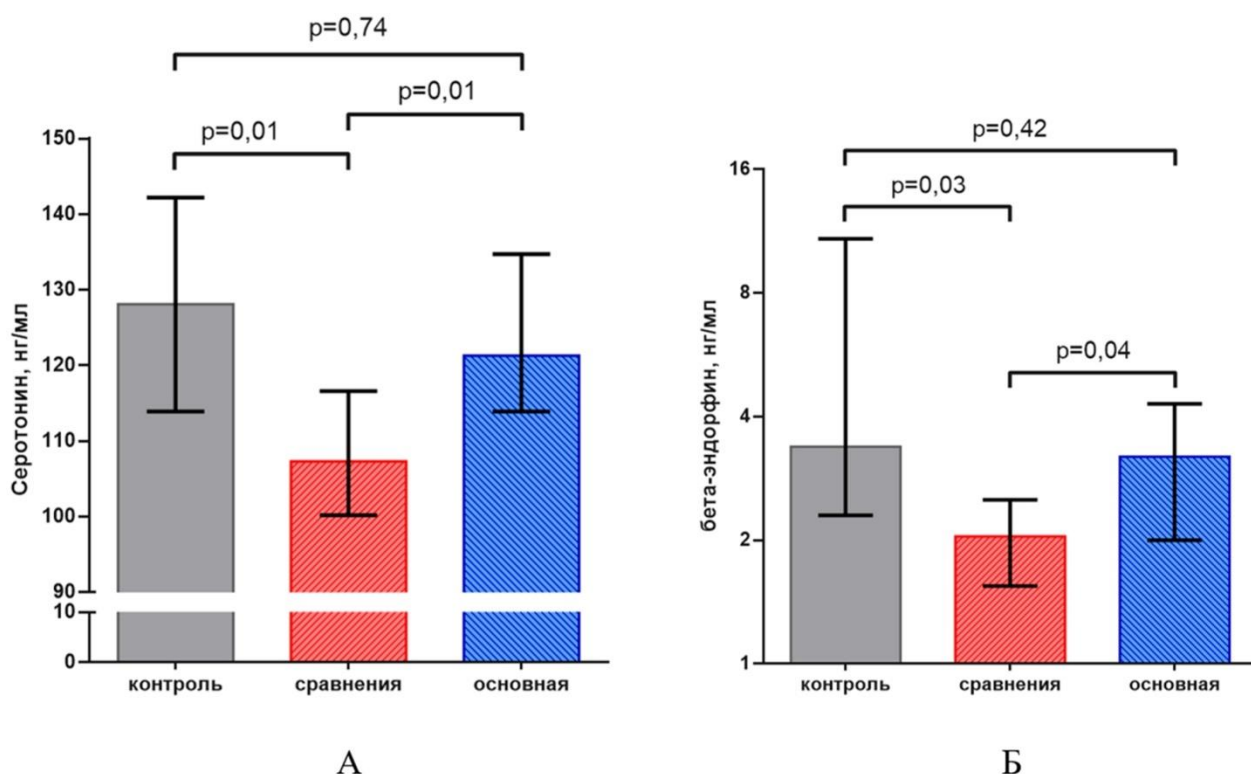
Поскольку повышение уровня кортикостерона является элементом активации стресс-реализующей системы, то его более низкий уровень у крыс основной группы, по сравнению с крысами группы сравнения, обусловлен стресс-лимитирующим эффектом ТЭС-терапии (А.С. Липатова, 2019). Таким образом, более низкий уровень кортикостерона в плазме крови, после недельного курса

транскраниальной электростимуляции, у животных основной группы, по сравнению с животными из группы сравнения, может являться биохимическим маркером более низкой выраженности тревожности и психоэмоционального стресса.

Медиана уровня дофамина у крыс группы сравнения и основной группы имела статистически значимую (MW-test,  $p = 0,04$ ) разницу между собой (рисунок 8, Б). У крыс основной группы, прошедших ТЭС-терапию, данный показатель был на 13,23 % выше, чем у крыс группы сравнения, не подвергавшихся её воздействию. При этом у крыс группы сравнения, данный показатель был статистически значимо (MW-test,  $p = 0,003$ ) ниже на 27,1 %, чем у крыс контрольной группы. В то время как у крыс основной группы, не было статистически значимого отличия данного показателя от животных контрольной группы (MW-test,  $p = 0,44$ ). Таким образом, уровень плазменного дофамина не имел статистически значимых отличий у крыс, получавших ТЭС-терапию, от крыс контрольной группы. У крыс группы сравнения величина плазменного дофамина статистически значимо ниже как показателей у животных контрольной группы, так и крыс основной группы. Наблюдаемые результаты оценки содержания дофамина в плазме крови у крыс различных групп позволяют сделать заключение о гомеостатическом эффекте ТЭС-терапии в отношении данного показателя. Данный факт обусловлен способностью ТЭС-терапии модулировать работу дофаминергического аппарата в мозге (А.С. Липатова, 2019).

Уровень серотонина в крови у крыс основной группы, получавших ТЭС-терапию, была на 13,05 % (MW-test,  $p = 0,01$ ) выше, чем у крыс группы сравнения, не подвергавшихся этому воздействию (рисунок 9, А). У крыс группы сравнения, данный показатель был статистически значимо (MW-test,  $p = 0,01$ ) ниже на 16,24 %, чем у крыс контрольной группы. В то время как у крыс основной группы не наблюдалось статистически значимых отличий (MW-test,  $p = 0,74$ ) от крыс группы контроля. Таким образом, можно сделать заключение о гомеостатическом влиянии ТЭС-терапии на уровень плазменного серотонина, что проявляется в отсутствие статистически значимой разницы уровня серотонина в плазме крови у крыс, получавших ТЭС-терапию, от животных из контрольной группы. В то время как у крыс группы сравнения величина данного показателя статистически значимо ниже как у животных контрольной группы, так и основной. Данный факт обусловлен способностью ТЭС-терапии модулировать работу серотонинергического аппарата (А.С. Липатова, 2019).

У крыс группы сравнения и основной группы медианы уровня  $\beta$ -эндорфина имели статистически значимую (MW-test,  $p = 0,04$ ) разницу – медиана уровня  $\beta$ -эндорфина в крови у крыс основной группы, получавших ТЭС-терапию, была на 56,86 % выше, чем у крыс группы сравнения, не подвергавшихся воздействию (рисунок 9, Б). При этом, у крыс группы сравнения, данный показатель был статистически значимо (MW-test,  $p = 0,03$ ) ниже, чем у крыс контрольной группы, в то время, как у крыс основной группы уровень  $\beta$ -эндорфина не имел статистически значимых отличий (MW-test,  $p = 0,42$ ) по сравнению с крысами контрольной группы.



**Рисунок 9** – А – уровень серотонина в плазме крови у крыс разных групп на 5-й неделе эксперимента, Me(Q1–Q3), нг/мл; Б – уровень  $\beta$ -эндорфина в плазме крови у крыс разных групп на 5-й неделе эксперимента, Me(Q1–Q3), нг/мл

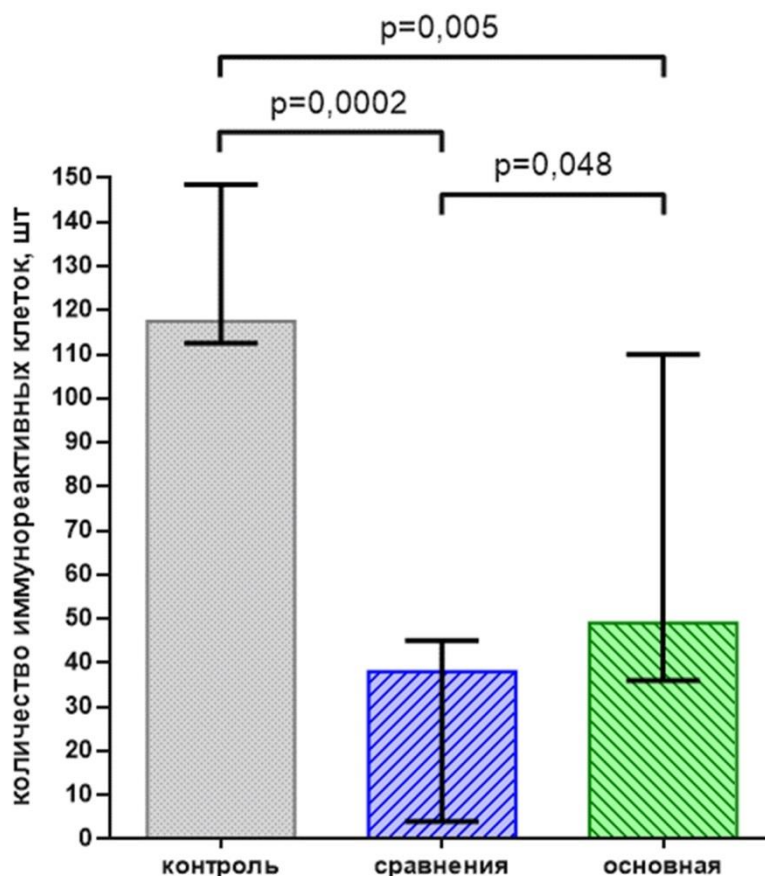
Таким образом, недельный курс ТЭС-терапии способствует нормализации уровня  $\beta$ -эндорфина у крыс, что проявляется его более высоким содержанием в плазме, чем у крыс группы сравнения, у которых данный показатель статистически значимо снижен относительно контроля и основной группы.

Это свидетельствует, что воздействие ТЭС-терапии на опиоидергическую систему, приводит к усилению выработки и высвобождения  $\beta$ -эндорфина и проявляется наблюдаемым повышением его уровня в крови. Стимуляция процессов выработки и секреции  $\beta$ -эндорфина является одним из основных эффектов ТЭС-терапии, описанным в экспериментальных исследованиях (V.P. Lebedev, 1997). Именно с воздействием данного нейропептида на различные опиоидные рецепторы связывают наблюдаемые терапевтические эффекты транскраниальной электростимуляции (С.О. Апсаямова, 2013; А.И. Трофименко и др., 2014; В.Д. Левичкин и др., 2014; Е.А. Шигина, О.Н. Кудря, 2019).

Влиянием  $\beta$ -эндорфина на работу гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, заключающимся в способности опиоидных пептидов снижать секрецию гормонов, повышающуюся при стрессе (Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов, 2012), можно объяснить то, что крысы основной группы, получавшие ТЭС-терапию и имевшие более высокий, чем у крыс группы сравнения, уровень  $\beta$ -эндорфина, имели более низкий, чем у животных группы сравнения, уровень кортикостерона в плазме крови. Кроме того,  $\beta$ -эндорфин сам обладает анксиолитическим действием, что снижает уровень тревоги и депрессии, модулируя стресс-ассоциированное поведение (А. Bali et al., 2015). ТЭС-терапия обладает антиоксидантным эффектом, обусловленный антиоксидантными свой-

ствами самих эндогенных опиоидных пептидов, в том числе,  $\beta$ -эндорфина (В.Д. Левичкин и др., 2014; А.В. Солин, Ю.Д. Ляшев, 2016). Данный эффект так же может быть одним из возможных элементов вероятного механизма выявленной способности ТЭС-терапии влиять на тревогоподобное поведение крыс, приводя к уменьшению его выраженности.

Иммуногистохимический анализ состояния клеток черной субстанции у крыс выявил статистически значимое (MW-test,  $p = 0,0002$  и  $p = 0,005$ ) снижение количества нейронов на срезах черной субстанции у крыс группы сравнения (на 67,5 %) и основной группы (на 58,1 %), подвергавшихся ротеноновой интоксикации, относительно крыс группы контроля (рисунок 10). При этом у крыс основной группы, получивших недельный курс ТЭС-терапии с 4-й по 5-ю неделю эксперимента, количество нейронов было статистически значимо (MW-test,  $p = 0,048$ ) больше на 30,0 %, чем у группы сравнения. Это свидетельствует о меньшей выраженности нейродегенеративных процессов в данной структуре у крыс, подвергнутых воздействию ротенона, получавших ТЭС-терапию, в сравнении с группой крыс, не подвергнутых ТЭС-терапии.



**Рисунок 10** – Результаты морфометрического анализа сохранности нейронов черной субстанции, количество нейронов на срезе черной субстанции, в штуках, Me(Q1–Q3)

В таблице 1 представлена оценка, по 3-бальной шкале выраженности признаков моторного дефицита, у крыс группы сравнений и основной группы с токсической моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма на 4-й и на 5-й неделях эксперимента.

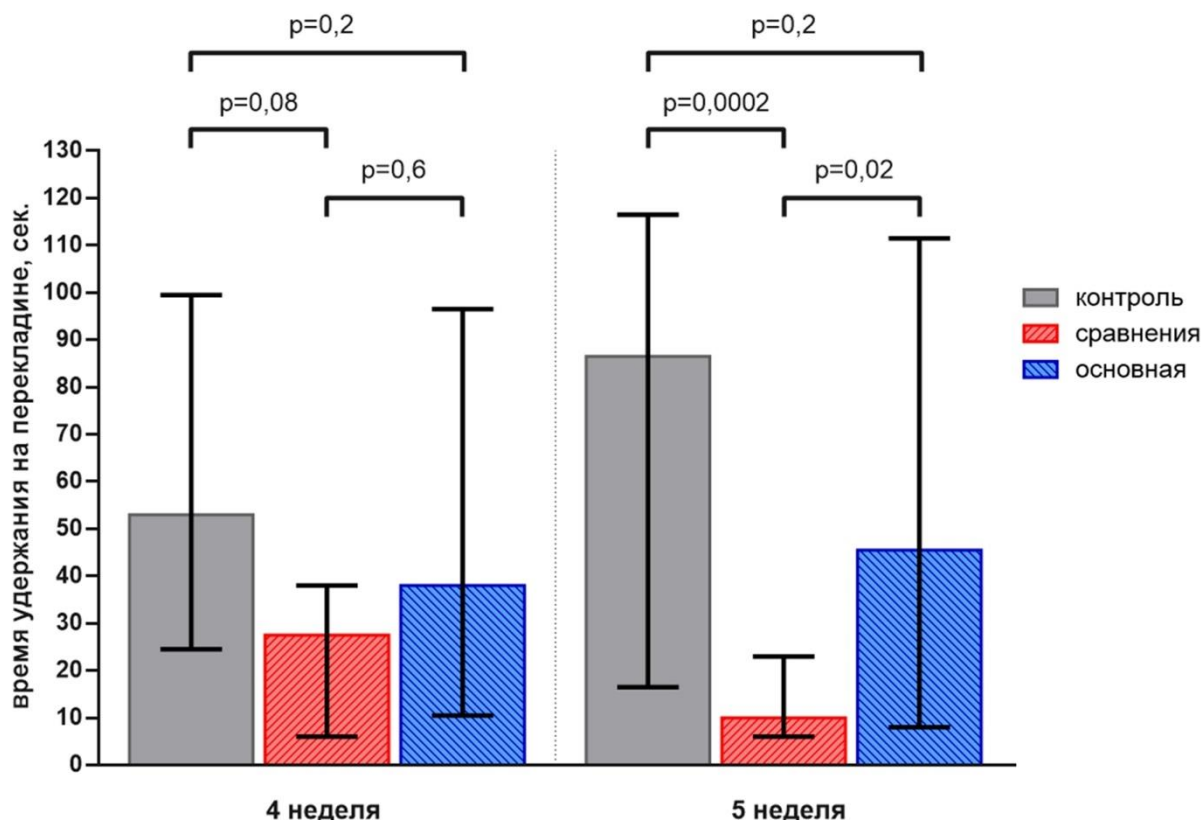


**Таблица 1** – Выраженность суммарных показателей моторного дефицита у крыс разных групп с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма, Me(Q1–Q3), в баллах

Неделя эксперимента \ Группа	Сравнения (не получали ТЭС)	Основная (получали ТЭС)	MW-test, p
4 неделя	7,5 (6–9)	7 (7–9)	0,89
5 неделя	5 (3–5)	3 (2–3)	0,04

Из таблицы видно, что на 4-й неделе между группами отсутствовали статистически значимые различия в степени выраженности моторного дефицита, вызванного хроническим системным подкожным введением ротенона. На 5-й неделе, после прохождения крысами из основной группы недельного курса ТЭС-терапии, у них появилась статистически значимо (MW-test,  $p = 0,04$ ) меньшая, в 1,66 раза, выраженность суммарных показателей моторного дефицита. Наблюдаемые результаты позволяют сделать заключение о том, что ТЭС-терапия снижает выраженность моторного дефицита у животных основной группы.

Результаты выполнения теста «вис на горизонтальной перекладине» представлены на рисунке 11. На 4-й неделе эксперимента между показателями крыс группы сравнения и основной группы не наблюдалось статистически значимых различий (MW-test,  $p = 0,6$ ). Показатели каждой из этих групп имели тенденцию к снижению относительно группы контроля, однако эти различия в обоих случаях и не имели статистической значимости (MW-test,  $p = 0,08$  и  $p = 0,2$ ).



**Рисунок 11** – Время удержания на горизонтальной перекладине у крыс разных групп в тесте «вис на горизонтальной перекладине», Me(Q1–Q3), в сек

На 5-й неделе эксперимента наблюдалась иная картина – между показателями крыс группы сравнения и основной группы появилась статистически значимая разница (MW-test,  $p = 0,02$ ). У крыс в основной группы медианное значение времени виса на горизонтальной перекладине на 355,0 % превысило данный показатель крыс группы сравнения. При этом медиана виса у крыс основной группы, получавших ТЭС-терапию. Время виса на горизонтальной перекладине у крыс группы сравнения, не подвергавшихся воздействию ТЭС-терапии, было статистически значимо (MW-test,  $p = 0,0002$ ) на 88,44 % ниже, чем у интактных животных.

При оценке как показателей моторной активности крыс (вис на горизонтальной перекладине), так и их поведения в тестах «открытое поле» и «темно-светлая камера», обращает на себя внимание тот факт, что состояние крыс группы сравнения, подвергнутых ротеноновой интоксикации и не получавших ТЭС, ухудшается через неделю после прекращения введения ротенона, что говорит о возможном продолжении нейродегенеративных процессов. Это, вероятно, обусловлено постепенным истощением компенсаторных возможностей и продолжающейся гибелью оставшихся дофаминовых нейронов и запуском порочных кругов, связанных с развитием нейродегенеративных процессов, оксидативного стресса и развитием патологического тревогоподобного состояния. Лучшая сохранность морфологической структуры черной субстанции у крыс основной группы, после курса ТЭС-терапии, вероятно, может быть связана с замедлением их разрушения, вследствие того, что антиоксидантные эффекты ТЭС-терапии предохраняют их от развивающегося оксидативного стресса и возможно потенцируют работу оставшихся клеток и сохранившихся компенсаторных механизмов. Благодаря антиоксидантному эффекту ТЭС, может происходить снижение продолжающегося токсического действия ротенона на митохондрии нервных клеток, а также уменьшение повреждающего действия свободных радикалов и снижения интенсивности их образования при ингибирования митохондриального комплекса I, и из-за неферментативного окисления дофамина в везикулах, вызванного деполимеризацией микротрубочек, приводящей к нарушению везикулярного транспорта. Возможным подтверждением предположения о вкладе антиоксидантного эффекта ТЭС в снижение выраженности тревогоподобного состояния у крыс может быть тот факт, что применение веществ, обладающих антиоксидантной активностью способно снижать уровень патологической тревожности в эксперименте (M. Nussbaumer et al., 2016; T. Afsar et al., 2017; H. Becerril-Chávez et al., 2017; M. Chen et al., 2019).

Еще одним потенциальным фактором, обеспечивающим наблюдаемую способность ТЭС-терапии корректировать патологические тревогоподобные состояния у крыс, может быть модуляция работы дофаминергического и серотонинергического механизмов нейроиммунноэндокринной системы (А.Х. Каде и др., 2017), имеющая гомеостатический характер (А.И. Трофименко, А.Х. Каде и др., 2018). Такой характер воздействия может оптимизировать работу имеющихся компенсаторных механизмов организма при паркинсонизме (Г.Р. Хакимова и др., 2011).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Результаты настоящего исследования позволяют расширить и дополнить представления о механизмах формирования тревожных состояний, как психоэмоциональных нарушений, сопутствующих нейродегенеративным заболеваниям центральной нервной системы. У подвергнутых хронической ротеноновой интоксикации животных развиваются не только моторные симптомы паркинсонизма, но также в поведенческих тестах появляются выраженные паттерны тревогоподобного поведения. У животных при патологическом тревогоподобном состоянии снижается уровень исследовательской активности и начинает преобладать поведение, направленное на избегание потенциальных источников опасности. Описанные поведенческие изменения прогрессируют даже в течение недели после завершения введения нейротоксина, сочетаясь со сниженным уровнем плазменного дофамина, серотонина и  $\beta$ -эндорфина, а также с повышенным уровнем плазменного кортикостерона, относительно крыс, не подвергнутых воздействию ротенона и не демонстрировавших тревогоподобного поведения.

Применение ТЭС-терапии оказывает анксиолитическое и антиоксидантное действие, снижая выраженность тревогоподобного поведения у крыс, подвергнутых ротеноновой интоксикации. Кроме того, применение ТЭС-терапии предотвращает нарастание выраженности паттернов тревогоподобного поведения. Обладая гомеостатическим эффектом, ТЭС-терапия нормализует уровни плазменного дофамина и серотонина, а также, снижает уровень плазменного кортикостерона, воздействуя на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему. Повышение уровня плазменного  $\beta$ -эндорфина у крыс после ТЭС-терапии демонстрирует воздействие данной процедуры на опиоидергическую систему, участвующую в работе стресс-лимитирующей системы, модулирующей работу гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, путем снижения секреции повышающихся при стрессе гормонов (Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов, 2012). Таким образом, можно сделать заключение, что ТЭС-терапия представляет интерес в качестве не медикаментозного способа коррекции патологических тревогоподобных состояний, обладая выраженным анксиолитическим и гомеостатическим эффектом.

## **ВЫВОДЫ**

1. После проведения семидневного курса ТЭС-терапии у крыс с патологическим тревогоподобным состоянием, сформированным хронической интоксикацией ротеноном, наблюдается снижение выраженности тревогоподобного поведения, отмеченного в тесте «открытое поле» и в тесте «темно-светлая камера».

2. Семидневный курс ТЭС-терапии у крыс с хроническим ротенон-индуцированным паркинсонизмом обеспечивает (MW-test,  $p = 0,048$ ) лучшую на 30 % сохранность нейронов черной субстанции, что свидетельствует о меньшей выраженности дегенеративно-дистрофических изменений.

3. Под влиянием семидневного курса ТЭС-терапии у крыс с хроническим ротенон-индуцированным паркинсонизмом наблюдается уменьшение моторного дефицита, проявляющееся в снижении на 40,0 % его индивидуальных суммированных баллов и увеличение на 355,0 % времени виса на горизонтальной перекладине относительно группы сравнения.

4. Применение ТЭС-терапии нормализует уровень плазменного кортикостерона (снижение на 11,58 % относительно группы сравнения), серотонина (увеличение на 13,05 %, относительно крыс группы сравнения), дофамина (на 13,23 % выше, чем у крыс группы сравнения).

5. Проведение курса ТЭС-терапии приводит к статистически значимому (MW-test,  $p = 0,04$ ) увеличению уровня плазменного  $\beta$ -эндорфина на 56,86 % относительно группы сравнения.

6. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения ТЭС-терапии в качестве немедикаментозного метода коррекции патологических тревогоподобных состояний у крыс, сформированных хронической интоксикацией ротеноном.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для определения уровня выраженности тревогоподобного поведения у крыс с моделью ротенон-индуцированного паркинсонизма можно использовать поведенческие тесты без предварительного обусловливания – «тест открытого поля» (open-field test) и тест «темно-светлая камера» (light-dark box test). Токсическую модель ротенон-индуцированного паркинсонизма можно использовать для изучения возможных механизмов патологических тревогоподобных состояний как одного из элементов сопутствующих расстройств не моторного характера при нейродегенеративных заболеваниях, в частности – паркинсонизме.

2. Для дальнейшего изучения анксиолитического эффекта ТЭС-терапии рекомендуется изучить её влияние на других моделях тревожных расстройств у разных животных.

3. Для использования ТЭС-терапии в качестве не медикаментозного метода коррекции тревожных состояний на фоне нейродегенеративных заболеваний, в частности – паркинсонизма рекомендуется проведение доклинических испытаний.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

1. Дальнейшее изучение влияния ТЭС-терапии на поведенческие паттерны крыс в условиях поведенческих тестов в условиях различных анксиогенных факторов.

2. Разработка эффективных режимов применения ТЭС-терапии в качестве самостоятельного метода и как компонента противотревожной терапии человека и животных с патологической тревожностью на фоне различных нейродегенеративных заболеваний и в условиях воздействия различных анксиогенных факторов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**\*1. Современные методы оценки уровня тревожности грызунов в поведенческих тестах, основанных на моделях без предварительного обусловливания / А.Х. Каде, С.В. Кравченко, А.И. Трофименко [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2018. – № 6 (25). – С. 171–176.**

**\*2. Влияние ТЭС-терапии на моторную функцию передних конечностей у крыс с ротеноновой моделью паркинсонизма / А.Х. Каде, С.В. Кравченко, К.Ю. Чаплыгина [и др.] // Теория и практика физической культуры. – 2019. – № 2. – С. 98.**

**\*3. Взаимосвязь тревожности и моторных нарушений / С.В. Кравченко, А.Х. Каде, С.А. Занин [и др.] // Теория и практика физической культуры. – 2019. – № 3. – С. 22.**

**\*4. Влияние ТЭС-терапии на выраженность дегенеративных дистрофических изменений нейронов черной субстанции у крыс с ротеновой моделью паркинсонизма / А.Х. Каде, С.В. Кравченко, К.Ю. Чаплыгина [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155. – № 2. – С. 138.**

**5. Экспериментальное изучение нейродегенеративных заболеваний / А.Х. Каде, С.А. Занин, С.В. Кравченко [и др.] // Материалы региональной межвузовской учебно-методической конференции с международным участием «Естественно-научное образование: стратегия, проблемы, достижения». – Краснодар, 2019. – С. 146–149.**

**\*6. Влияние ТЭС-терапии на динамику тревожного состояния крыс с моделью ротенонового паркинсонизма / С.В. Кравченко, А.Х. Каде, С.П. Вчерашнюк [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 3. – URL : <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28903> (дата обращения: 12.02.2020).**

**\*7. Эффективность ТЭС-терапии для купирования тревогоподобного поведения и моторных нарушений у крыс / А.Х. Каде, С.В. Кравченко, А.И. Трофименко [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119. – № 9. – С. 91–96.**

**8. Влияние транскраниальной электростимуляции на выраженность тревогоподобного поведения крыс с токсической моделью болезни Паркинсона в тесте «темно-светлая камера» / С.В. Кравченко, Е.И. Ананьева, К.Ю. Чаплыгина [и др.] // Материалы II Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний». Часть 2 (Рязань, 29–30 апреля 2019 г.) / ред. кол.: Т.Г. Авачева, О.В. Баковецкая, А.А. Кривушин; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань : ОТС и ОП, 2019. – С. 306–309.**

**9. Модификация метода «темно-светлая камера» при проведении нейробиологических исследований тревоги / С.В. Кравченко, А.Х. Каде, О.Г. Рыбакова [и др.] // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. – 2019. – С. 299–300.**

10. Применение транскраниальной электростимуляции для коррекции психоэмоциональных нарушений у крыс / **С.В. Кравченко**, А.Х. Каде, А.А. Луппа [и др.] // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России. – 2019. – С. 301

**\* – работа опубликована в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним.**