

Содержание дейтерия в воде усиливает подверженность депрессии: потенциальная роль механизма, связанного с серотонином

Татьяна Стрекалова ^{a,b,c,*}, Мэттью Эванс ^a, Антон Чернопятко ^{d,e}, Ивонн Кауч ^a, Джоао Коста-Нунес ^b, Рэймонд Чеспульо ^f, Лесли Чессон ^g, Джули Вигниссе ^h, Гарри В. Штайнбуш ^c, Дэниел К. Энтони ^a, Игорь Помыткин ^{d,e}, Клаус-Петер Леш ^{c,i,**}

^a Department of Pharmacology, Oxford University, Oxford, UK;

^b Institute for Hygiene and Tropical Medicine, New University of Lisbon, Portugal;

^c School for Mental Health and Neuroscience, Department of Neuroscience, Maastricht University, Maastricht, Netherlands;

^d Claude Bernard Laboratory of Cognitive Dysfunctions, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia;

^e Timantti AB, Stockholm, Sweden;

^f Claude Bernard University, Faculty of Medicine, EA 4170, Lyon, France;

^g IsoForensics Inc., Salt Lake City, UT, USA;

^h GIGA Neuroscience, University of Liege, Liege, Belgium;

ⁱ Division of Molecular Psychiatry, Laboratory of Translational Neuroscience, Department of Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

Получено 21 апреля 2014, проверено 22 июля 2014, принято 23 июля 2014, доступно онлайн с 1 августа 2014.

Ключевые моменты

- Географическая вариативность дейтерия коррелирует с распространенностью депрессии.

- Вода, обедненная по дейтерию, снижает проявления депрессии у мышей.
- Гиппокампальная пролиферация поддерживается водой, обедненной по дейтерию.
- Вода, обедненная по дейтерию, оказывает на ЭЭГ-характеристики сна схожее с СИОЗС (селективными ингибиторами обратного захвата серотонина) влияние.
- Эффекты, обозначенные выше, могут быть результатом нормализации гиппокампального уровня 5-НТТ.

*Для корреспонденции:

Dr. Tatyana Strekalova¹
Department of Pharmacology
University of Oxford
Mansfield Road, OX1 3QT
Tel: (44) 01865 281136
Fax: (44) 01865 271853
email: bioc0541@pharm.ox.ac.uk

Аннотация

Факторы окружающей среды могут значительно влиять на распространение болезней, включая нейрофизиологические расстройства, такие как депрессия. Соотношение дейтерия и протия в воде проявляет сильную географическую вариативность, что может влиять на восприимчивость к болезни.

Была изучена взаимосвязь между содержанием дейтерия в воде и депрессией, как у людей на эпидемиологическом уровне, так у животных (мышей) с помощью модели хронического стресса.

Был выполнен корреляционный анализ уровня депрессии в регионах США и содержания дейтерия в водопроводной воде. Далее была использована парадигма 10-дневного хронического стресса с целью проверки влияния двухнедельного потребления воды,

обедненной по дейтерию (91 ppm), на депрессивноподобное поведение и гиппокампальный SERT (транспортёр серотонина). Исследовалось также влияние обеднения воды по дейтерию на электрофизиологию сна интактных мышей.

Установлена географическая корреляция между содержанием дейтерия и распространенностью депрессии в США. В модели хронического стресса у мышей, получавших воду, обедненную по дейтерию, были значительно снижены проявления депрессивного состояния, что так же сопровождалось нормализацией гиппокампальной экспрессии 5-HT транспортера (SERT), по сравнению с группой, получавшей обычную воду. Пятидневный стресс экспозиции хищнику также подавлял пролиферацию клеток в зубчатой извилине мозга; этот эффект был ослаблен у мышей, получавших воду, обедненную по дейтерию. Наконец, вода, обедненная по дейтерию, увеличивала у интактных мышей ЭЭГ-характеристики бодрствования и снижала показатели сна с быстрым движением глаз – явление, которое наблюдается при приеме селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС).

Наши данные дают основание предположить, что изотопные характеристики воды (содержание в ней дейтерия) могут влиять на распространенность патофизиологий, связанных с аффективными расстройствами, и большого депрессивного расстройства, что может быть связано с серотонинергическими механизмами.

Ключевые слова: депрессия, хронический стресс, транспортёр серотонина (SERT), гиппокампальная пролиферация клеток, дейтерий, сон.

1. Введение

По прогнозам распространенное и рецидивирующее большое депрессивное расстройство к 2020 году станет второй по значимости причиной нетрудоспособности во всем мире. Это связано с увеличением заболеваемости, ростом числа самоубийств и устойчивости

расстройства к лечению. Было установлено, что такие факторы окружающей среды как инсоляция и количество дневного света [1,2], ежегодные колебания температуры воздуха [3], содержание некоторых минералов в почве и воде [4,5] во взаимодействии влияют на нейрофизиологические расстройства, включая депрессию. Содержание изотопов в природной воде – это один из факторов, который сильно варьируется в зависимости от региона [6,7] и может в корне менять ход основных физиологических процессов [8]. Однако, неясно, влияет ли содержание изотопов в воде на распространение аффективных расстройств и может ли менять модели поведения в проявлении депрессии у животных.

Природная вода – это смесь девяти изотопологов воды, состоящих из стабильных изотопов водорода [^1H , протий (H) и ^2H , дейтерий (D)] и кислорода (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O). Термин ‘изотополог’ относится к молекуле, которая отличается от других только по изотопному составу [9]. Распространенность девяти изотопологов в природной воде, выраженная как отклонение (δ) по отношению к международному стандарту ‘Vienna Standard Mean Ocean Water 2’ (VSMOW2), систематически варьируется в зависимости от местоположения и климатических условий из-за изотопного фракционирования, сопровождающего процесс испарения-конденсации, когда воздушные массы двигаются вглубь материка, удаляясь от моря. Содержание тяжелых изотопологов уменьшается пропорционально удалению от океана и увеличению высоты над уровнем моря. Оно также зависит от других факторов, таких как широта, влажность и сезонная температура [7, 10-12]. Территориальное распределение изотопов в водопродной воде отражает региональные различия содержания изотопов в окружающей среде [13], что указывает на значительную вариативность по всем Соединённым Штатам. Тем не менее, самые низкие уровни содержания тяжёлых изотопологов обнаружены на плато Антарктиды, вода которой используется в качестве ещё одного международного стандарта, Standard Light Antarctic Precipitation 2 (SLAP2) (International Atomic Energy Agency, 2009). Эта вода характеризуется пониженным на 43% содержанием дейтерия (соотношение D/H - 89.1

против 155.8 ppm) и снижением на 5% концентрации кислорода-18 (соотношение $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 1894.9 против 2005.2 ppm) по сравнению с VSMOW2.

2. Цели

Мы выполнили эпидемиологический анализ взаимосвязи содержания дейтерия, наиболее распространенного изотопа после протия и изотопов кислорода, в питьевой воде в США и распространенностью депрессии. Затем мы оценили антидепрессантные свойства воды, обедненной по дейтерию ($D91 = 91.7$ ppm), в сравнении с фармакологическим средством (циталопрамом), используя три хорошо известные парадигмы депрессивноподобного поведения и стресса у мышей: модель хронического стресса, приводящего к депрессии [14], подавление пролиферации нервных клеток в гиппокампе, вызванное стрессом [15], и ЭЭГ-анализ сна [16].

3. Методы

3.1. Эпидемиологический анализ

Показатели депрессии у взрослых для каждого штата США были получены из еженедельных отчетов по заболеваемости депрессией и смертности [17] за период 2006-2008 гг [17]. Множество образцов водопроводной воды были собраны за период 2004-2013 гг, на основании усреднения этих данных были получены величины содержания дейтерия в воде для каждого континентального штата США. Далее был проведен анализ корреляции (корреляция Пирсона) между содержанием дейтерия в водопроводной воде и распространенностью депрессии в США.

3.2. Животные

В данном исследовании использовались 3.5-месячные самцы мышей линии C57BL/6J. 3.5-месячные самцы линии CD1 были использованы в качестве интродеров в тесте

социальной конфронтации, а 2,5-месячные крысы Вистар использовались в тесте демонстрации хищнику. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях, как было описано ранее [14]. Подробности о содержании животных можно посмотреть в «Дополнительных методах». Эксперименты были проведены в соответствии с Директивой Европейского Комитета по уходу и использованию лабораторных животных и были утверждены соответствующими местными государственными органами.

3.3. Изотопологи воды и медикаментозное лечение

Обычную питьевую воду заменяли на экспериментальные растворы. Контрольная вода (D140 = 140.3 ppm дейтерия) и вода, обедненная по дейтерию (D91 = 91.7 ppm дейтерия), были получены от компании «Алмаз», Котовск, Тамбовская обл./Timantti AB, Стокгольм, Швеция (подробности см. *дополнительные таблицы*). Циталопрам был растворен в водопроводной воде; растворы менялись каждые 3 дня. Доза циталопрама (15 мг/кг/день) в питьевой воде D140 рассчитывалась согласно валидированной ранее методике [18]. Мы измерили потребление воды в группах D91 и D140; существенных различий между группами выявлено не было ($p > 0.05$) (дополнительный рис.1).

3.4. Исследование хронического стресса

Мыши были разделены на контрольную (n=30) и стрессированную (n=63) группы в соответствии с характеристиками их социального поведения, веса тела и предпочтения к сахарозе [19]. Из стрессированной группы 25 мышей получали воду D140, 19 – воду D91 и 19 получали антидепрессант - циталопрам (15 мг/кг/день, с питьевой водой). Контрольные мыши получали воду D91, D140 или циталопрам (N=10 в каждой группе). В стрессированной группе мыши начинали получать воду D91, D140 и циталопрам за 7 дней до стресса; препараты давались до окончания всех стресс-процедур (*см.ниже*).

Использовался 10-дневный протокол стресса [14], включающий в себя тест демонстрации крысе во время темного цикла и наполовину случайное воздействие двух из трех факторов стресса в светлый цикл: стресс социальной конфронтации, тест ограничения подвижности и подвешивание за хвост. И так, между 09:00 и 18:00 часами применялись стресс-факторы в следующей последовательности: социальная конфронтация на 30 минут, стресс ограничения подвижности на 2 часа и подвешивание за хвост на 40 минут. Интервал между стрессами составлял минимум 4 часа. Всех мышей взвешивали на седьмой и десятый дни стрессирования и оценивали состояние их шерсти через 15 часов после окончания последнего стресса. Через 12 часов после окончания последнего стресс-воздействия, после взвешивания и оценки состояния шерсти все мыши подверглись 8-часовому тесту предпочтения к сахарозе для оценки гедонических черт. Сразу после этого их подвергли тесту принудительного плавания для оценки изменений в аффективном поведении. Мыши, подвергавшиеся хроническому стрессу, были умерщвлены через ~30 часов после последнего стресс-воздействия, их гиппокамп был извлечен, и был проведен анализ экспрессии транспортера серотонина с использованием количественного ПЦР метода, как описано ранее [14]. Подробности о поведенческих и молекулярных методах см. *дополнительные методы*.

3.5. Пролиферация нервных клеток в гиппокампе после пятидневного стресса экспозиции хищнику

Мыши были случайно поделены на 2 группы; одна группа получала воду D91 в течение 2 недель, вторая - D140. Обе группы подвергались стрессу демонстрации хищнику 5 ночей подряд; мыши получали D91 или D140 в течение всего периода стрессирования (см. *Дополнительные методы*). Перед первым сеансом стресса мыши получали четыре внутривентрикулярные инъекции бромдезоксипридина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; 200 мг/кг/кг), растворенного в 0.9% NaCl и 0.007M NaOH. Промежуток между

инъекциями составлял 2 часа. Мыши были умерщвлены через 24 часа после последнего стресса, перфузированы 4%-ным раствором параформальдегида. Мозги были извлечены и обработаны, как описано ранее [20]; подробности см. в *дополнительных методах*. Для количественного определения BrdU и Ki67 использовались иммунофлюоресценция и конфокальная микроскопия, как описано в *дополнительных методах*.

3.6. Исследование ЭЭГ-характеристик сна

Двенадцати интактным мышам C57BL6J имплантировали электроды для полиграфических записей, как описано ранее [16]. Группа, получавшая циталопрам, не была включена в ЭЭГ-эксперимент по исследованию сна, т.к. влияние СИОЗС на сон уже хорошо изучено и изложено в литературе последних десятилетий (для обзора см. Ursin [21]). Спустя две недели после хирургического вмешательства и восстановления животные были подсоединены к записывающим кабелям и оставлены в кабинетах записи на неделю. График освещения в кабинетах оставался реверсируемым (12ч:12ч, свет выключался в 9.00), еда и вода доступны вволю. После этого была начата подача воды D91 и D140 одновременно с полиграфическими записями, которые длились 14 дней. Данные были записаны и проанализированы по уже ранее описанному протоколу [22].

3.7. Статистика

Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 5.00 для Windows, Сан-Диего, Калифорния. Использовались методы одно- и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, дополненные апостериорным анализом Тьюки с поправками на множественные сравнения или, если более строго, Тьюки-Крамера, вследствие неравных размеров группы. Для двух групп был использован непарный двухвыборочный t-тест и двухсторонние критерии. Значение доверительного

интервала составляло $p < 0.05$. Данные рассчитывались как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

4. Результаты

4.1. Распространенность депрессии и содержание дейтерия в водопроводной воде

Для выявления взаимосвязи между содержанием дейтерия в водопроводной воде и распространенностью депрессии выполнен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Пирсона (Рис. 1). Была обнаружена значительная корреляция ($r=0.468$; $p=0.0016$, $F=11.49$) между содержанием дейтерия в водопроводной воде и распространенностью депрессии. На основании линейной зависимости получена оценка, которая показывает, что распространенность депрессии возрастает на 1.8% (95% точности с интервалами 0.7-2.9%; $R^2=0.219$; $p=0.0016$; $F=11.49$) на каждые 10 ppm увеличения содержания дейтерия в воде (См. *Дополнительную таблицу 3* с данными о содержании дейтерия в водопроводной воде каждого штата.) Для подтверждения полученных экспериментальных данных далее были проведены модельные исследования на животных.

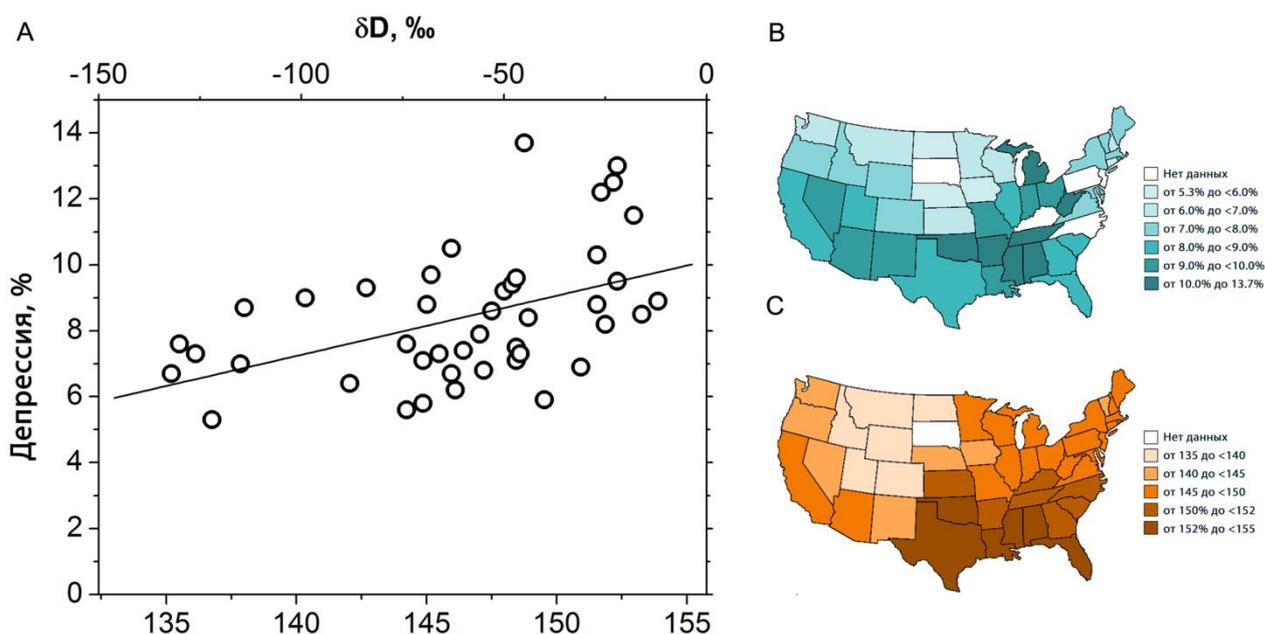


Рис.1 Распространенность депрессии и содержание дейтерия в водопроводной воде. (А) Корреляция между распространенностью большого депрессивного расстройства в США и содержанием дейтерия в водопроводной воде США. (В) Распространенность депрессии у взрослых старше ≥ 18 лет для каждого штата США [Центры по контролю и предотвращению болезней, Обзор психических болезней среди взрослых в США. MMWR 2011;60 (Suppl):1–30]. (С) Географическая вариативность среднего содержания дейтерия в водопроводной воде континентальных США, изученная по образцам воды, собранным в каждом штате США за 2004–2013 гг.

4.2. Оценка появления ангедонии

По результатам двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA выявлено существенное влияние стресса на предпочтение к сахарозе ($F_{1,120}=37.83$, $p<0.001$), а также взаимосвязь между стрессом и лечением ($F_{2,120}=4.84$, $p=0.009$). Апостериорный анализ с коррекцией Тьюки t-тестов выявил значительное снижение предпочтения к сахарозе по сравнению с исходным состоянием в стрессированной группе, не получавшей препаратов ($p<0.05$); однако показатели предпочтения к сахарозе у стрессированных групп, получавших циталопрам и воду D91, не отличалось от исходного. Это говорит о том, что вода D91, как и циталопрам, предотвращает снижение предпочтения к сахарозе у стрессированной группы (Рис.2А).

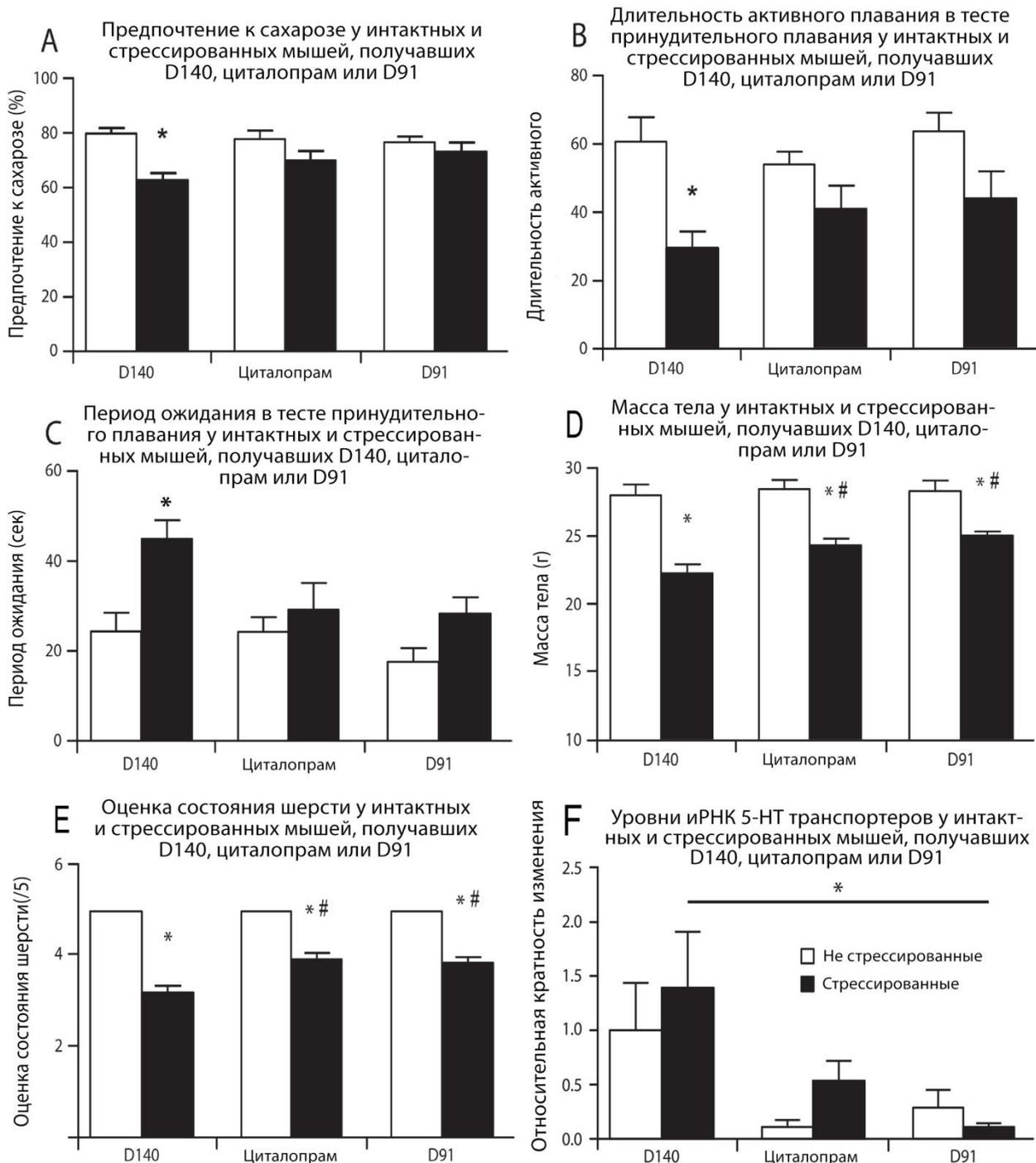


Рис.2 Циталопрам или вода D91 нейтрализуют депрессивноподобные изменения в поведении мышей, вызванные стрессом. (А) На 10 день тестирования потребление сахарозы существенно снизилось в группе, получавшей воду D140 ($p < 0.01$, апостериорный тест Тьюки). Тем не менее, предпочтение сахарозы не изменилось у

стрессированных мышей, получавших циталопрам или воду D91 ($p > 0.05$, апостериорный тест Тьюки). (B) Согласно результатам теста принудительного плавания, длительность активного плавания значительно снижалась после стрессирования у мышей, получавших воду D140 ($p < 0.01$), но этого не происходило в группах, получавших циталопрам или воду D91 ($p > 0.05$; апостериорный тест Тьюки). (C) Длительность пассивного плавания значительно увеличилась у стрессированных мышей, получавших воду D140 ($p < 0.001$), но оставалась без изменений у животных, пивших воду D91 или получавших циталопрам ($p > 0.05$; Апостериорный тест Тьюки). (D) Все стрессированные мыши значительно теряли в весе по сравнению с контрольными ($p < 0.001$ для мышей, получавших воду D140 и циталопрам, $p < 0.01$ для мышей, получавших воду D91). Апостериорные тесты выявили, что масса тела была значительно выше у стрессированных мышей, получавших циталопрам или воду D91 по сравнению с группой, получавшей воду D140 ($p < 0.01$ и $p < 0.0001$, соответственно). (E) У всех стрессированных мышей состояние шерсти было хуже, чем у контрольных, в то время как у стрессированных животных, получавших воду D91 или циталопрам, состояние шерсти было значительно лучше, чем у группы, получавшей воду D140 ($p < 0.001$, тест Тьюки). (F) Относительная кратность уровня экспрессии иРНК серотонинового транспортера (SERT) был значительно ниже у стрессированных мышей, получавших воду D91. Данные представлены как относительная кратность в сравнении с контрольными животными, со всей экспрессией по отношению к гену домашнего хозяйства GAPDH. Данные рассчитывались как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($* < 0.05$, апостериорный тест Тьюки).

4.3. Эффекты приема препаратов на тесты принудительного плавания

‘Поведенческое отчаяние’, измеренное в модифицированном тесте Порсолта – тесте принудительного плавания – по наличию периода пассивного плавания, является важным проявлением депрессивноподобного состояния у грызунов [23]. Период активного

плавания значительно изменился после стрессирования, что было обнаружено с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA ($F_{1,87}=14.19$, $p<0.001$), однако получаемое лечение не оказало существенного влияния ($F_{2,87}=0.82$, $p=0.44$), также не было выявлено существенной взаимосвязи ($F_{2,87}=0.92$, $p=0.40$). Апостериорные тесты выявили существенное уменьшение длительности активного плавания у стрессированных мышей по сравнению с контрольными, получавшими воду D140 ($p<0.01$), однако существенная разница не обнаружена между стрессированными и контрольными мышами, получавшими циталопрам или воду D91 ($p>0.05$; рис.2B), поэтому можно предположить, что вода D91 и циталопрам предотвращают появление поведенческого отчаяния, вызванного хроническим стрессом. Наблюдалось значительное влияние стресса на время пассивного плавания ($F_{1,81}=9.11$, $p=0.0033$) – у стрессированных мышей оно было дольше, чем у контрольных, - и значительный эффект лечения ($F_{2,87}=3.14$, $p<0.05$), однако значительной взаимосвязи между лечением и стрессом не было ($F_{2,87}=1.28$, $p=0.284$) (рис.2C). Апостериорные тесты выявили значительную разницу между контрольной и стрессированной группой, получавшей воду D140 ($p<0.01$), но такой разницы не было между другими группами ($p>0.05$).

4.4. Изменения массы тела

Что касается массы тела, по завершении парадигмы хронического стресса было выявлено значительное влияние стресса ($F_{1,87}=64.09$, $p<0.0001$), менее значительное влияние лечения ($F_{2,87}=2.94$, $p=0.058$) и незначительная разница между стрессированной группой и группой, получавшей препараты ($F_{2,87}=1.71$, $p=0.0187$). Тем не менее, стрессированные мыши, получавшие циталопрам или D91, были тяжелее, чем получавшие D140 ($p<0.01$ и $p<0.0001$, соответственно, рис.2D).

4.5. Оценка состояния волосяного покрова

Изначально (до процедуры стрессирования) все экспериментальные животные имели превосходное состояние шерсти, без существенных различий между группами (*данные не представлены*). После завершения процедуры хронического стресса двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил существенное влияние на состояние волосяного покрова как стресса ($F_{1,87}=3.59$, $p<0.0001$), так и последующего приема препаратов ($p=0.0317$; Рис.2Е). Была обнаружена значительная разница между стрессированными группами и группами, получавшими препараты ($F_{2,87}=3.59$, $p<0.05$). Состояние волосяного покрова у всех стрессированных мышей было хуже, чем у мышей из контрольной группы ($p<0.001$). Тем не менее, состояние волосяного покрова у групп, получавших циталопрам и воду D91, было лучше, нежели у группы, получавшей воду D140 ($p<0.001$).

4.6. Гиппокампальная экспрессия генов серотонинового транспортера (SERT)

Учитывая отмеченные поведенческие различия между группами и предыдущие исследования, демонстрирующие повышение экспрессии транспортера серотонина (SERT) в период ангедонии [14], мы стремились выяснить, ведет ли употребление циталопрама или воды D91 к изменениям в экспрессии информационной РНК (иРНК) серотонинового транспортера. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил значительную разницу между группами в гиппокампальной экспрессии иРНК серотонинового транспортера ($F_{2,47}=4.11$, $p=0.022$ Рис.2F). Здесь не было обнаружено существенного эффекта, вызванного стрессом ($p=0.542$), или какой-либо значительной взаимосвязи ($p=0.705$). Наблюдалась тенденция к повышенной экспрессии SERT у стрессированных мышей по сравнению с не-стрессированными мышами в группах, получавших D140 и циталопрам, но это не являлось существенным для апостериорного анализа ($p>0.05$). Тем не менее, у стрессированных мышей, получавших воду D91, экспрессия иРНК SERT была существенно ниже по сравнению с мышами, пившими воду

D140 ($p=0.05$). Однако, хотя экспрессия была также ниже у мышей, получавших циталопрам, по сравнению с D140-группой, эта тенденция не сохранилась после поправки для множественного сравнения ($p=0.26$). Таким образом, вода D91 оказывает значительный эффект не только на поведение, она так же существенно влияет на экспрессию уровня мРНК транспортера серотонина в гиппокампе.

4.7. Пролиферация нервных клеток после пятидневного стресса

Количество BrdU-позитивных клеток на мм^3 в зубчатой извилине существенно снизилось у стрессированных групп, получавших воду D140 и D91 (среднее значение: 613.6 ± 42.59 и 838.8 ± 99.18), по сравнению с нестрессированной контрольной группой (среднее значение: 1578 ± 147.1 ; $p=0.0003$, $F=18.06$, $R^2=0.766$, $q=5.58$ и $q=4.30$, соответственно, односторонний тест ANOVA). Наблюдалось существенное различие в количестве BrdU-позитивных клеток, нормализованном до контрольного, между группами, получавшими воду D91 и D140 ($P=0.041$, $t=2.086$, рис.3А).

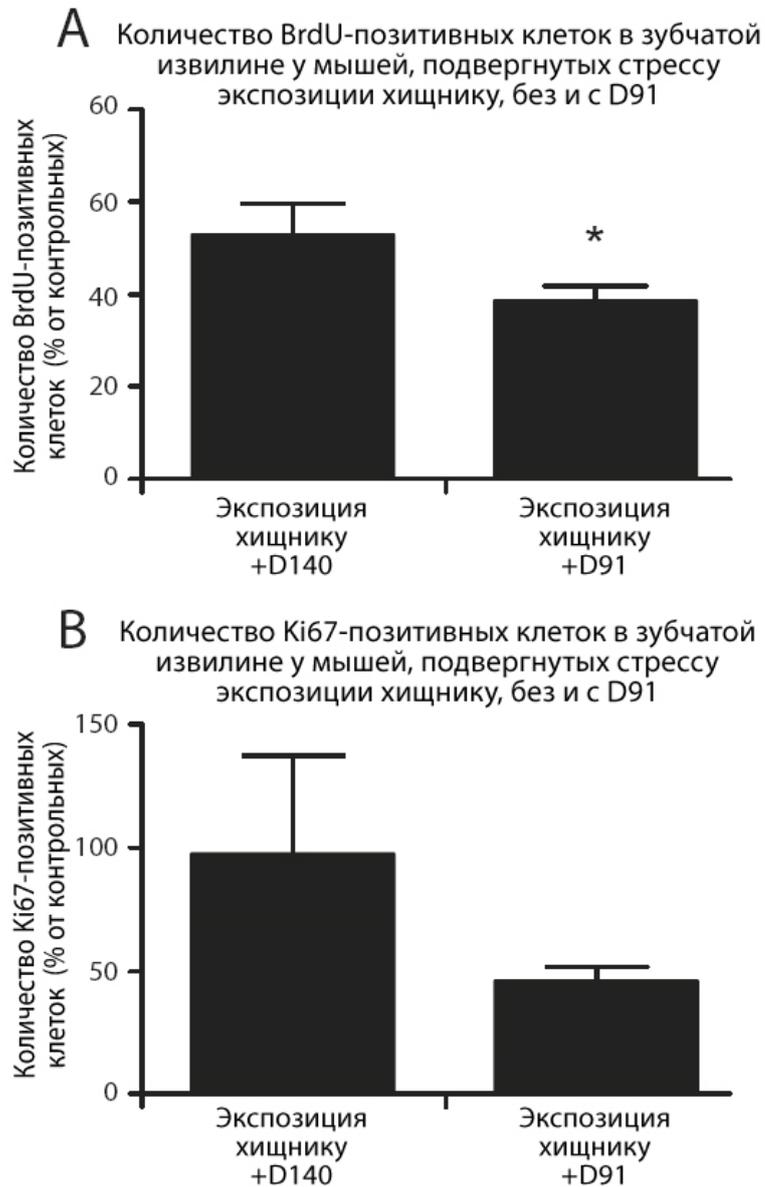


Рис.3 Влияние воды D91 на гиппокампальный SERT и нейрогенез. У стрессированных мышей по отношению к контрольным (А) количество BrdU-положительных клеток на мм^3 в зубчатой извилине было значительно выше в группе, получавшей воду D91, нежели у мышей, пивших воду D140 (* $p < 0.05$, непарный двусторонний t-тест). (В) Группа, получавшая воду D91, не отличалась от группы, получавшей воду D140, по количеству Ki67-положительных клеток на мм^3 в зубчатой извилине.

Количество Ki67- положительных клеток на мм^3 в зубчатой извилине было ниже в стрессированной группе после приема воды D140, по сравнению с нестрессированной контрольной (среднее значение: 1405 ± 104.05 , $p=0.0008$, $t=5.201$), но разница между стрессированной группой, получавшей D140 (среднее значение: 648.3 ± 80.1), и получавшей D91 (среднее значение: 1371.0 ± 558.5) не достигла статистической значимости в этом параметре по сравнению с контрольной ($p=0.102$, $t=1.28$, рис.3B).

4.8. ЭЭГ-параметры сна

ЭЭГ-анализ был осуществлен спустя две недели после оперативного вмешательства и восстановительного/адаптационного периода (рис.4A). На третий день приема мышами воды D91, у них отмечались существенные изменения в длительности бодрствования (W) (5-7%, $p=0.044$, $t=2.30$, непарный t-тест, рис.4B) и медленноволнового сна SWS (5-7%, $p=0.040$, $t=2.35$, непарный t-тест, рис.4C) по сравнению с животными, получавшими воду D140, и этот феномен сохранялся весь период, пока велись записи – по 14 день ($p=0.031$, $t=2.50$, непарный t-тест, Рис.4A и B). Употребление воды D91 существенно сократило фазу быстрого сна (БДГ-сон), начиная с 4-го дня ($p=0.046$, $t=2.27$, непарный t-тест, рис.4D); влияние воды на данный параметр было самым ярко выраженным, по сравнению со всеми остальными. Эффект достигал максимума на 11 день периода записи (40%, $p=0.0086$, $t=3.26$, непарный t-тест). Не было обнаружено никаких различий между группами в спектральной плотности мощности в любой период светового цикла или в любой день ($p>0.05$, непарный t-тест), включая день 11, когда были обнаружены максимальные изменения в параметрах сна (*дополнительный рис. 2*). Учитывались следующие полосы спектра ЭЭГ: дельта, 0.5-4 Гц; тета, 4-8 Гц, альфа, 8-11.5 Гц, сигма, 11.5-14.5 Гц; бета-1, 14.5-18.6 Гц и бета-2, 18.6-30 Гц.

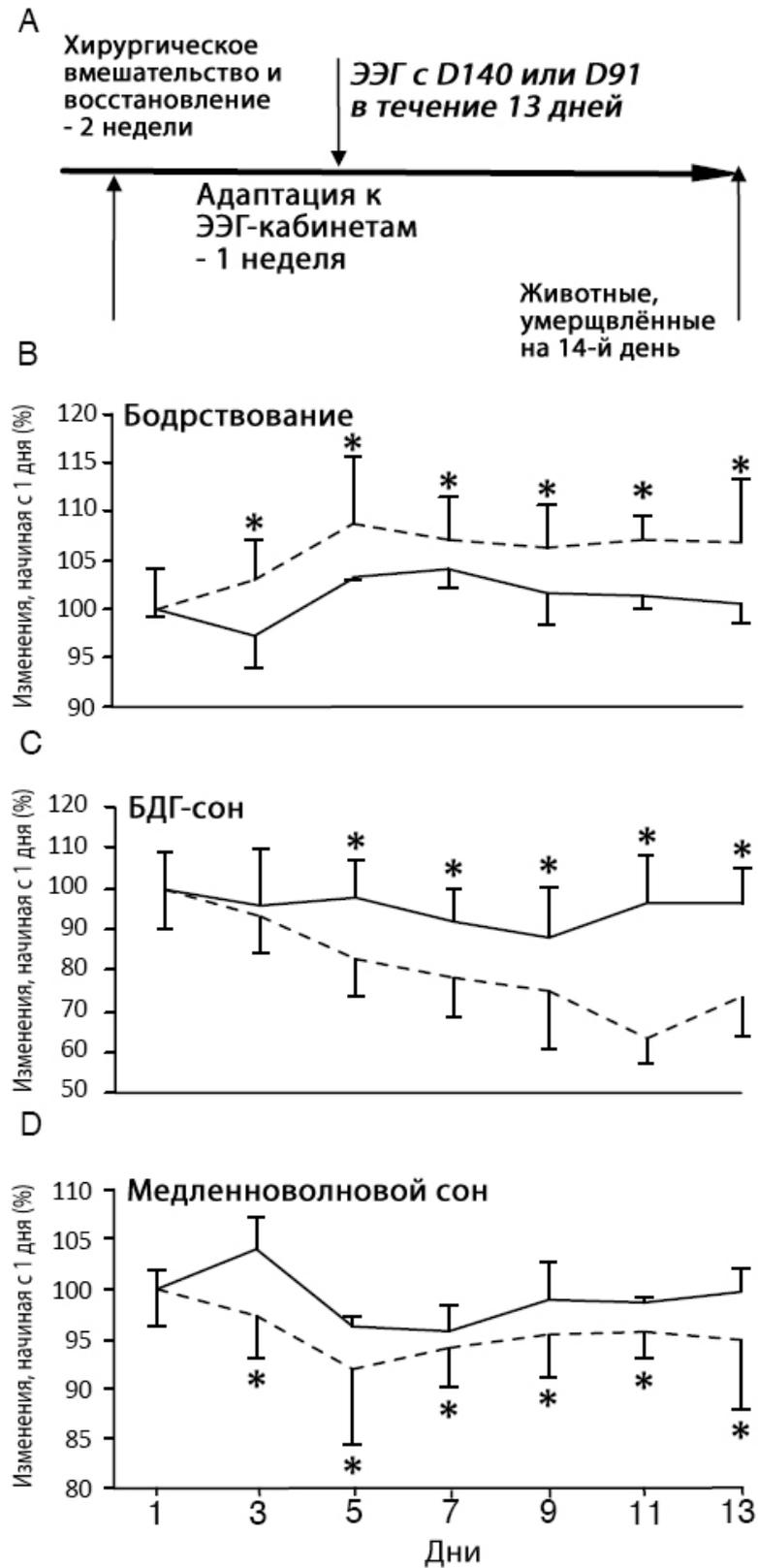


Рис. 4 Влияние воды D140 и D91 на ЭЭГ-характеристики сна у интактных мышей on EEG.

(A) Схематическая хронология ЭЭГ-эксперимента. После имплантации электродов,

привыкания мышам к кабинетам, где велась запись, и основной записи ЭЭГ в 1 день животные постоянно получали воду D140 или D91 в течение двух недель. (B) Влияние воды D140 и D91 на бодрствование. Продолжительность бодрствования значительно увеличилась за время лечения у мышей, получавших воду D91, по сравнению с группой, получавших воду D140. (C) Влияние воды D140 и D91 на медленноволновой сон. Длительность медленноволнового сна на 3-13 дни у мышей, получавших воду D91, была существенно меньше, чем у мышей, получавших воду D140. (D) Влияние воды D140 и D91 на БДГ-сон. Обнаружено значительное сокращение длительности БДГ-сна за период лечения у мышей, получавших воду D91, по сравнению с мышами, получавшими воду D140. * $p < 0.05$; непарный двусторонний t-тест. Данные рассчитывались как среднее \pm стандартная ошибка среднего, выраженные как процент от средней величины, полученной в день 1.

5. Обсуждение

Мы обнаружили существенную корреляцию между распространенностью аффективных расстройств и патофизиологий (определенных с помощью MMWR) [17] и содержанием дейтерия в воде каждого штата США. Учитывая, что средний объем воды, потребляемой взрослым человеком в день, колеблется между 2.7 и 3.7 л [24], суммарное потребление изотополога водород–кислород–дейтерий (HOD) в воде, содержащей дейтерий, составляет примерно 0.7–1.2 мл (для воды, близкой к стандарту VSMOW2). Таким образом, даже относительно небольшие изменения в содержании дейтерия в потребляемой воде приводят к существенным вариациям в суммарном его употреблении. Следует указать, что социальные, экономические или другие демографические факторы, указывающие на систематическую (от штата к штату) вариацию, могут влиять на статистику, а также что при корреляционных методах нельзя выделить причинно-следственные связи. Тем не

менее, очевидность данной взаимосвязи подтолкнула нас на проведение дальнейших исследований на мышах, которые показали, что снижение потребления дейтерия полностью изменить негативный аффект, изменять характеристики сна и экспрессию генов, связанных с серотонинергической нейротрансмиссией.

Мы использовали парадигму стресс-индуцированной ангедонии у мышей [14, 19], используя описанный выше тест предпочтения сахарозы [25, 26], являющийся надежным средством для выявления депрессии [27]. Циталопрам хорошо известен способностью противостоять стресс-индуцированному снижению предпочтения сахарозы в схожих поведенческих парадигмах [28, 29]. Хронический стресс снижал предпочтение сахарозы у мышей, пивших воду D140, согласно другим исследованиям [30, 31]; тем не менее, после проведенного лечения циталопрамом и водой D91 значительной разницы между стрессированными группами не наблюдалось. Важно, что ни D91, ни циталопрам не оказали эффекта на предпочтение сахарозы у контрольных животных, что исключает общее влияние на предпочтение сахарозы.

Наши данные, полученные при применении теста Порсолта (теста принудительного плавания), показали, что в то время как хронический стресс снижал длительность активного плавания и увеличивал длительность пассивного плавания у мышей, получавших D140, и циталопрам, и вода D91 предотвращали патологические изменения в данных параметрах, при этом существенной разницы между стрессированными и контрольными мышами, получавшими циталопрам или воду D91 не было ($p > 0.05$; Рис. 2B and C). Ранее мы наблюдали подобные изменения в тесте принудительного плавания при длительном приеме имипрамина и циталопрама [18, 32, 33].

Все стрессированные мыши теряли в весе (Рис. 2D), но этот эффект был скомпенсирован у мышей, получавших воду D91 и циталопрам. Их масса тела была существенно больше, нежели у контрольных и стрессированных мышей, получавших воду. Все мыши,

получавшие лечение, были значительно тяжелее контрольных мышей. Стрессированные животные, получавшие циталопрам или воду D91 весили больше, чем стрессированные мыши, пившие воду D140, в то время как значительной разницы между показателями стрессированных и не-стрессированных групп выявлено не было. Был найден довольно значительный эффект лечения. Это согласуется с предыдущими протоколами, где говорится, что антидепрессивная терапия способствует восстановлению веса [31, 34, 35]. У стрессированных мышей также наблюдалось значительное ухудшение состояния шерсти, что было скомпенсировано и водой D91, и циталопрамом (Рис. 2E). Ухудшение шерсти – существенный индикатор депрессивноподобного (ангедонического) состояния в доклинических моделях [36, 37], поэтому улучшения состояния волосяного покрова оцениваются как результат антидепрессивной терапии [37, 38].

Далее решалась задача по выяснению, отражаются ли антидепрессивные свойства воды D91 на экспрессии серотонинового транспортера (SERT) в гиппокампе. В соответствии с нашими предыдущими результатами в данной модели [14], в гиппокампе стрессированных мышей по сравнению с контрольными, получавшими воду D140, наблюдалось повышение экспрессии иРНК SERT, но в данном случае оно не достигло значимого различия (Рис.2F). Экспрессия SERT значительно уменьшилась у мышей, пивших воду D91, по сравнению с мышами, получавшими воду D140. Интересно, что это влияние было сильнее, чем эффект циталопрама, который не оказал существенного влияния на экспрессию SERT. И у стрессированных, и не-стрессированных животных наблюдалась тенденция к снижению экспрессии SERT при получении циталопрама/D91 по сравнению с группой, получавшей D140, поэтому неясно, имеет ли данный эффект ограничение по воздействию на стрессированных мышей. Изменение в экспрессии SERT в ЦНС и при хроническом стрессе, и при депрессии поддерживается в ряде исследований [39, 40, 41], и обычно связываются с изменениями в нейровоспалительных путях [14]. Таким образом, молекулярные изменения, связанные со снижением экспрессии SERT в

ЦНС, могут лежать в основе антидепрессивного эффекта циталопрама и воды D91 в данном исследовании.

Мы также обнаружили, что количество BrdU-позитивных клеток в зубчатой извилине снижалось под действием стресса, и этому снижению лучше противодействовало употребление воды D91 по сравнению с водой D140 (Рис. 3А), что указывает на её стимулирующий эффект на пролиферацию клеток в гиппокампе. Влияние стресса и антидепрессивной/противотревожной терапии на нейрогенез гиппокампа хорошо описано в литературе [42, 43]. Предполагается, что обеднение по дейтерию может играть аналогичную роль. Последние исследования выявили, что антидепрессанты, включая СИОЗС, защищают процесс текущего нейрогенеза в период стресса [44], а также предполагается, что существует связь между подавлением SERT и активизацией гиппокампального нейрогенеза [45] с ключевой ролью процессов, связанных с BDNF [46].

Быстрое увеличение продолжительности бодрствования, сопровождаемое быстрым сокращением медленноволнового сна, оставалось постоянным у мышей, получавших D91, в течение всего периода обработки (Рис. 4). Примечательно, что изменения в БДГ-сне происходили постепенно в течение всего периода лечения и достигали максимума на 11 день, когда данная фаза сна была сокращена примерно на 40% по сравнению с базовым значением. Аналогичные эффекты на медленноволновой и БДГ-сон оказывают антидепрессанты, ингибирующие захват серотонина и норадреналина [16, 47]. Интенсивное лечение [48, 49] длительностью 1-3 недели [49, 50] при помощи циталопрама или других СИОЗС сокращало продолжительность медленноволнового и БДГ-сна и увеличивало продолжительность бодрствования. В клинической практике сокращение длительности БДГ-сна, наблюдаемое на фоне лечения СИОЗС, является биомаркером их терапевтической эффективности [51].

При клинической депрессии укорачивается латентный период фазы быстрого сна, в то же время увеличивается длительность БДГ-сна в течение первой половины ночи. Этот эффект уравновешивается снижением длительности БДГ-сна в течение второй половины ночи – снижается общая продолжительности БДГ-сна за всю ночь. И напротив, продолжительность медленноволнового сна снижается в первой половине ночи и провоцирует число внезапных пробуждений. Возможно, изменения в экспрессии SERT влияют на изменения ЭЭГ-характеристик сна. В отличие от эффекта большинства стандартных антидепрессантов [52, 53] спектральная плотность мощности у мышей, получавших D91, не изменилась в течение всего периода обработки, вне зависимости от светового цикла. Это было удивительно, учитывая редукцию БДГ-сна, которая, возможно, изменила пропорцию альфа-волн.

Предыдущие исследования показали, что существует кинетический изотопный эффект воды как растворителя, D₂O со 100-процентной вероятностью замедляет скорость окисления производных убихинола в 400 раз [54]. Тем не менее, в то время как содержание дейтерия в пределах, существующих в естественной среде (89–155 ppm), не имеет большого значения для большинства химических реакций, однако дыхание в митохондриях может быть отдельным случаем, так как представляет собой последовательность переносов пары «протон-электрон». Очень низкие уровни дейтерия, как было показано, оказывают влияние на данный процесс [55] и могут проявляться в определенных биологических эффектах, которые мы наблюдали в наших парадигмах на мышах.

Необходимо установить механизм, который лежит в основе антидепрессантных свойств воды со сниженной концентрацией дейтерия. Основываясь на имеющейся в данной момент литературе и собственных предварительных результатах, могут быть предложены различные варианты описания такого механизма. Во-первых, замена обычной воды на

воду с меньшей вязкостью может приводить к физико-химическим эффектам, вызывающим повышенную текучесть клеточных мембран и менее жесткую структуру фосфолипидных бислоев [56, 57, 58], что может в свою очередь изменить дисперсию рецепторов нейромедиаторов и усилить сродство с рецепторами [59, 60], а также повлиять на пассивную проницаемость гематоэнцефалического барьера [61] и метаболизм арахидоновой кислоты и кальций-зависимые связи в рецепторах [62]. В еще не опубликованной работе нашей группы предполагается, что эпигенетические и посттрансляционные механизмы регулирования могут лежать в основе эффекта воды D91, на основе ограниченных изменений экспрессии генов, и там также может быть задействованы факторы синаптической пластичности и передача сигналов BDNF/TrkB.

6. Выводы

В целом, наше исследование демонстрирует, что уровень депрессии среди населения США в значительной степени коррелирует с географическим распределением дейтерия в природной воде.

Испытания на мышах показали, что замена обычной питьевой воды мышей на воду, обедненную по дейтерию, противодействует поведенческим, транскрипционным и пролиферативным изменениям, типичным для депрессивного состояния, что было сравнимо с результатами приема антидепрессанта СИОЗС-группы – циталопрама. У интактных мышей прием воды, обедненной по дейтерию, приводит к изменению ЭЭГ-параметров сна, что напоминает эффекты ингибиторов обратного захвата норадреналина и серотонина. Таким образом, питьевая вода, обедненная по дейтерию, может стать средством, лежащим в основе новой стратегии профилактики депрессии.

Благодарности

Мы хотели бы выразить признательность за важный вклад докторам Долорес Бонапартес, Диноре Лопес, Энрик Сильвейра, а также Хелен Дуга, Колетт Руссе и Ольге Карнауч за техническую помощь. Мы благодарим Португальский фонд по науке и технологии, Новый университет Лиссабона, Европейское сообщество (ЕС: AGGRESSOTYPE FP7/№602805), и Фонд исследования мозга и поведения за их финансовую поддержку, докторов Олега Долгова, Александра Лыско, Андрея Прошина, Елену Захарову, Владимира Ковальсона, Александра Ревина, господина Поля Куртеля, а также ОАО «Алмаз» (Котовск, Тамбовская обл.) за предоставление воды D91 и D140.

Ссылки

- [1] M. Bauer, T. Glenn, M. Alda, O.A. Andreassen, R. Arda, F. Bellivier, et al. Impact of sunlight on the age of onset of bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 14 (2012), pp. 654–663.
- [2] D. Ljubcic, T. Stipcevic, N. Pivac, M. Jakovljevic, D. Muck-Seler. The influence of daylight exposure on platelet 5-HT levels in patients with major depression and schizophrenia. *J Photochem Photobiol B*, 89 (2007), pp. 63–69.
- [3] M. Maes, F. De Meyer, P. Thompson, D. Peeters, P. Cosyns. Synchronized annual rhythms in violent suicide rate, ambient temperature and the light-dark span. *Acta Psychiatr Scand*, 90 (1994), pp. 391–396.
- [4] J.S. Brown Jr. Role of selenium and other trace elements in the geography of schizophrenia. *Schizophr Bull*, 20 (1994), pp. 387–398.
- [5] T.P. Flaten. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull*, 55 (2001), pp. 187–196.
- [6] A. Dutton, B.H. Wilkinson, J.M. Welker, G.J. Bowen, K.C. Lohmann. Spatial distribution and seasonal variation in $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ of modern precipitation and river water across the conterminous USA. *Hydrological Processes*, 19 (2005), pp. 4121–4146.
- [7] C. Kendall, T.B. Coplen. Distribution of oxygen-18 and deuterium in river waters across the United States. *Hydrological Processes*, 15 (2001), pp. 1363–1393.
- [8] V. Vasilescu, E. Katona. Deuteration as a tool in investigating the role of water in the structure and function of excitable membranes. *Methods Enzymol*, 127 (1986), pp. 662–678.

- [9] McNaught A, Wilkinson A. Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations, 2nd ed. Blackwell Science; 1997.
- [10] W. Daansgaard. Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16 (1964), pp. 436–438.
- [11] I. Friedman, A. Redfield, B. Schoen, J. Harris. The variation of the deuterium content of natural waters in the hydrologic cycle. *Rev Geophys*, 2 (1964), pp. 177–224.
- [12] J. Gat, M. Magaritz. Climactic variations in the Eastern Mediterranean Sea area. *Naturwissenschaften*, 67 (1980), pp. 80–87.
- [13] G.J. Bowen, J.R. Ehleringer, L.A. Chesson, E. Stange, T.E. Cerling. Stable isotope ratios of tap water in the contiguous United States. *Water Resour Res* (2007), p. 2007.
- [14] Y. Couch, D.C. Anthony, O. Dolgov, A. Revischin, B. Festoff, A.I. Santos, et al. Microglial activation, increased TNF and SERT expression in the prefrontal cortex define stress-altered behaviour in mice susceptible to anhedonia. *Brain Behav Immun*, 29 (2013), pp. 136–146.
- [15] B.L. Jacobs, H. van Praag, F.H. Gage. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry*, 5 (2000), pp. 262–269.
- [16] R. Cespuglio, C. Rousset, G. Debilly, C. Rochat, M.J. Millan. Acute administration of the novel serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, S33005, markedly modifies sleep-wake cycle architecture in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 181 (2005), pp. 639–652.
- [17] Gonzalez O, Berry JT, Promotion NCfCDPaH. Current depression among adults – United States, 2006 and 2008. Morbidity and mortality weekly report. Centers for Disease Control and Prevention; 2010. p. 1229–35.
- [18] T. Strekalova, N. Gorenkova, E. Schunk, O. Dolgov, D. Bartsch. Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. *Behav Pharmacol*, 17 (2006), pp. 271–287.
- [19] T. Strekalova, R. Spanagel, D. Bartsch, F.A. Henn, P. Gass. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*, 29 (2004), pp. 2007–2017.
- [20] T. Strekalova, C.T. Wotjak, M. Schachner. Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice. *Mol Cell Neurosci*, 17 (2001), pp. 1102–1113.
- [21] Ursin R. Serotonin and sleep. *Sleep Med Rev* 2002;6:55–69.
- [22] A. Descamps, C. Rousset, M.J. Millan, M. Spedding, P. Delagrangé, R. Cespuglio. Influence of the novel antidepressant and melatonin agonist/serotonin_{2C} receptor antagonist, agomelatine, on the rat sleep-wake cycle architecture. *Psychopharmacology (Berl)*, 205 (2009), pp. 93–106.

- [23] J.F. Cryan, R.J. Valentino, I. Lucki. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (2005), pp. 547–569.
- [24] J.H. Ledikwe, H.M. Blanck, L.K. Khan, M.K. Serdula, J.D. Seymour, B.C. Tohill, et al. Dietary energy density determined by eight calculation methods in a nationally representative United States population. *J Nutr*, 135 (2005), pp. 273–278.
- [25] R.J. Katz, K.A. Roth, B.J. Carroll. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 5 (1981), pp. 247–251.
- [26] P. Willner, A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, R. Muscat. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93 (1987), pp. 358–364.
- [27] M. Hamilton. Rating depressive patients. *J Clin Psychiatry*, 41 (1980), pp. 21–24.
- [28] M. Tonissaar, T. Mallo, M. Eller, R. Haidkind, K. Koiv, J. Harro. Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: effects of citalopram. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32 (2008), pp. 164–177.
- [29] S.H. Wang, Z.J. Zhang, Y.J. Guo, G.J. Teng, B.A. Chen. Hippocampal neurogenesis and behavioural studies on adult ischemic rat response to chronic mild stress. *Behav Brain Res*, 189 (2008), pp. 9–16.
- [30] Harro J, Kiive E, Laas K, Vaht M, Comasco E, Oreland L, et al. P. 4. a. 006 MAOA VNTR genotype, psychiatric vulnerability and life course in a population-representative longitudinal study. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012;22:S360.
- [31] P. Willner. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52 (2005), pp. 90–110.
- [32] B.H. Cline, H.W. Steinbusch, D. Malin, A.V. Revishchin, G.V. Pavlova, R. Cespuglio, et al. The neuronal insulin sensitizer dicholine succinate reduces stress-induced depressive traits and memory deficit: possible role of insulin-like growth factor 2. *BMC Neurosci*, 13 (2012), p. 110.
- [33] B.H. Cline, D.C. Anthony, A. Lysko, O. Dolgov, K. Anokhin, C. Schroeter, et al. Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. *Behav Brain Res* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.037> pii: S0166-4328(14)00255-1.
- [34] C.L. Bergner, A.N. Smolinsky, P.C. Hart, B.D. Dufour, R.J. Egan, J.L. Laporte, et al. Mouse models for studying depression-like states and antidepressant drugs. *Methods Mol Biol*, 602 (2010), pp. 267–282.

- [35] E.S. Buhl, T.K. Jensen, N. Jessen, B. Elfving, C.S. Buhl, S.B. Kristiansen, et al. Treatment with an SSRI antidepressant restores hippocampo-hypothalamic corticosteroid feedback and reverses insulin resistance in low-birth-weight rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (2010), pp. E920–E929.
- [36] Y. Ibarguen-Vargas, A. Surget, C. Touma, R. Palme, C. Belzung. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology*, 33 (2008), pp. 1357–1368.
- [37] E. Malatynska, H.W. Steinbusch, O. Redkozubova, A. Bolkunov, A. Kubatiev, N.B. Yeritsyan, et al. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Exp Gerontol*, 47 (2012), pp. 552–564.
- [38] A. Surget, M. Saxe, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, S. Chalon, G. Griebel, et al. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal *Biol Psychiatry*, 64 (2008), pp. 293–301.
- [39] M.L. Filipenko, A.G. Beilina, O.V. Alekseyenko, V.V. Dolgov, N.N. Kudryavtseva. Increase in expression of brain serotonin transporter and monoamine oxidase a genes induced by repeated experience of social defeats in male mice. *Biochem Biokhim*, 67 (2002), pp. 451–455.
- [40] S.J. Kohut, K.L. Decicco-Skinner, S. Johari, Z.E. Hurwitz, M.H. Baumann, A.L. Riley. Differential modulation of cocaine's discriminative cue by repeated and variable stress exposure: relation to monoamine transporter levels. *Neuropharmacology*, 63 (2012), pp. 330–337.
- [41] J.W. Murrough, D.S. Charney. The serotonin transporter and emotionality: risk, resilience, and new therapeutic opportunities. *Biol Psychiatry*, 69 (2011), pp. 510–512.
- [42] M.A. Kheirbek, K.C. Klemenhagen, A. Sahay, R. Hen. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci*, 15 (2012), pp. 1613–1620.
- [43] A. Tanti, W.P. Westphal, V. Girault, B. Brizard, S. Devers, A.M. Leguisquet, et al. Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 23 (2013), pp. 797–811.
- [44] A. Ferres-Coy, F. Pilar-Cuellar, R. Vidal, V. Paz, M. Masana, R. Cortes, et al. RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Translational Psychiatry*, 3 (2013), p. e211.
- [45] A.M. Gardier, B.P. Guiard, J.P. Guilloux, C. Repérant, F. Coudoré, D.J. David. Interest of using genetically manipulated mice as models of depression to evaluate antidepressant drugs activity: a review. *Fundam Clin Pharmacol*, 23 (2009), pp. 23–42.
- [46] K. Terada, N. Izumo, B. Suzuki, Y. Karube, T. Morikawa, Y. Ishibashi, et al. Fluvoxamine moderates reduced voluntary activity following chronic dexamethasone infusion in mice via recovery of BDNF signal cascades. *Neurochem Int*, 69 (2014), pp. 9–13.

- [47] R. Cespuaglio, S. Marinesco, V. Baubet, C. Bonnet, B. El Kafi. Evidence for a sleep-promoting influence of stress. *Adv Neuroimmunol*, 5 (1995), pp. 145–154.
- [48] A. Bridoux, C. Laloux, P. Derambure, R. Bordet, C. Monaca Charley. The acute inhibition of rapid eye movement sleep by citalopram may impair spatial learning and passive avoidance in mice. *J Neural Transm*, 120 (2013), pp. 383–389.
- [49] D. Neckelmann, B. Bjorvatn, A.A. Bjorkum, R. Ursin. Citalopram: differential sleep/wake and EEG power spectrum effects after single dose and chronic administration. *Behav Brain Res*, 79 (1996), pp. 183–192.
- [50] S. Vas, Z. Katai, D. Kostyalik, D. Pap, E. Molnar, P. Petschner, et al. Differential adaptation of REM sleep latency, intermediate stage and theta power effects of escitalopram after chronic treatment. *J Neural Transm*, 120 (2013), pp. 169–176.
- [51] P. Bonaventure, C. Dugovic, M. Kramer, P. De Boer, J. Singh, S. Wilson, et al. Translational evaluation of JNJ-18038683, a 5-hydroxytryptamine type 7 receptor antagonist, on rapid eye movement sleep and in major depressive disorder. *J Pharmacol Exp Ther*, 342 (2012), pp. 429–440.
- [52] W. Dimpfel, H.C. Hofmann, F. Schober, A. Todorova. Validation of an EEG-derived spectral frequency index (SFx) for continuous monitoring of sleep depth in humans. *Eur J Med Res*, 3 (1998), pp. 453–460.
- [53] L. Sommerfelt, R. Ursin. Behavioral, sleep-waking and EEG power spectral effects following the two specific 5-HT uptake inhibitors zimeldine and alaproclate in cats. *Behav Brain Res*, 45 (1991), pp. 105–115.
- [54] M.H. Huynh, T.J. Meyer. Colossal kinetic isotope effects in proton-coupled electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (2004), pp. 13138–13141.
- [55] I. Pomytkin, O. Kolesova. Relationship between natural concentration of heavy water isotopologs and rate of H₂O₂ generation by mitochondria. *Bull Exp Biol Med*, 142 (2006), pp. 570–572.
- [56] L. Beranova, J. Humpolickova, J. Sykora, A. Benda, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, et al. Effect of heavy water on phospholipid membranes: experimental confirmation of molecular dynamics simulations. *Phys Chem Chem Phys: PCCP*, 14 (2012), pp. 14516–14522.
- [57] F. Steckel, S. Szapiro. Physical properties of heavy oxygen water. Part 1—density and thermal expansion. *Trans Faraday Soc*, 59 (1963), pp. 331–343.
- [58] V. Goncharuk, V. Lapshin, T. Burdeinaya, T. Pleteneva, A. Chernopyatko, I. Atamanenko, et al.

Physicochemical properties and biological activity of the water depleted of heavy isotopes. *J Water Chem Technol*, 33 (2011), pp. 8–13.

[59] Y. Li, J.J. Wang, J.X. Cai. Aniracetam restores the effects of amyloid-beta protein or ageing on membrane fluidity and intracellular calcium concentration in mice synaptosomes. *J Neural Transm*, 114 (2007), pp. 1407–1411.

[60] A.H. Ahmed, C.P. Ptak, M.K. Fenwick, C.L. Hsieh, G.A. Weiland, R.E. Oswald. Dynamics of cleft closure of the GluA2 ligand-binding domain in the presence of full and partial agonists revealed by hydrogen-deuterium exchange. *J Biol Chem*, 288 (2013), pp. 27658–27666.

[61] K. Lanevskij, P. Japertas, R. Didziapetris, A. Petrauskas. Ionization-specific prediction of blood-brain permeability. *J Pharm Sci*, 98 (2009), pp. 122–134.

[62] Z. Korade, A.K. Kenworthy. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*, 55 (2008), pp. 1265–1273.

Дополнительные методы

Животные

Стрессирование осуществлялось на 3.5-месячных самцах мышей линии C57BL/6J. Самцы мышей возраста 3.5-месяца линии CD1 использовались в качестве интродеров в тесте социальной конфронтации, а 2.5-месячные крысы Вистар – в тесте демонстрации хищнику. Мыши были получены из питомника, исходно поддерживающего линию Charles River (Janvier, l'Arbresle Cedex, Франция), крысы – факультетом медицины Нового Университета Лиссабона, Лиссабон, Португалия. За 10-14 дней до начала экспериментов мыши линии C57BL/6J были рассажены по одному животному в клетке. Животных проверяли каждое утро и вечер в течение экспериментального периода. Животные содержались в условиях реверсированного режима освещения 12 ч : 12 ч (свет включался в 21:00 ч), в стандартных лабораторных условиях ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% влажности), вода и корм доступны ad libitum.

Экспозиция крысы в контейнерах

Мышей в прозрачных цилиндрических контейнерах (15 см х Ø 8 см) помещали в крысиную клетку (15-часовые экспозиции выполняли с 18.00 до 09.00).

Стресс социальной конфронтации

Данный вид стресса осуществлялся в темную фазу светового цикла; чтобы иметь возможность осуществлять визуальный контроль за конфронтацией «резидент-интродер»,

тест проводился при красном свете. Агрессивные мыши-самцы линии CD1 были заранее отобраны для эксперимента по критерию латентного периода атаки (без нанесения травм), который составлял менее 60 секунд. В течение сессий теста социальной конфронтации эти животные помещались в клетки мышей из стрессируемой группы. Социальное взаимодействие воспроизводилось в клетках стрессируемых мышей, что надёжно усиливало воздействие стрессовых процедур, т.к. при таком раскладе побеждённое животное оставалось в постоянном контакте с обонятельными сигналами агрессивного интродера. Таким образом, психологическое стрессирование продолжалось, несмотря на то, что физического присутствия агрессора не было. Средняя продолжительность сессии составляла 30 мин., согласно обычно используемому протоколу. Тестируемые мыши реагировали на конфронтацию бегством, позой покорства и вокализацией. За животными велось тщательное наблюдение во избежание любого физического вреда. В редких случаях физического повреждения тест немедленно прекращали.

Тест ограничения подвижности и подвешивание за хвост

Процедура подвешивания мышей за хвост выполнялась согласно ранее описанному протоколу (Markova et al. 2013). Данный вид стресса осуществлялся в темную фазу светового цикла.

Тест предпочтения сахарозы

Мыши получали свободный восьмичасовой доступ одновременно к двум бутылкам. В одной из них содержался 1-процентный раствор сахарозы, в другой – обычная водопроводная вода. Доступ открывался на 7 дней до замены обычной воды на воду D91 или D140 и в конце 10-го дня процедуры стресса. Предпочтение воды или 1-процентного раствора сахарозы, а также общая сумма употреблённых растворов оценивались путём взвешивания бутылок до и после открытия доступа к ним мышам. Тест начинался с наступлением темной (активной) фазы цикла животных. Расположение бутылок в клетке менялось каждые 4 часа в течение теста для предотвращения возможных эффектов предпочтения у животного определённой стороны. Перед началом теста животных в еду или питье не ограничивали. Остальные условия теста оставались такими же, как в более ранних экспериментах (Strekalova and Steinbusch 2010). 1-процентный раствор сахарозы использовался в тестах на этапе включения и во время хронического стрессирования.

Предпочтение сахарозы (%) рассчитывается по следующей формуле:

Предпочтение сахарозы = V (раствор сахарозы) / V (раствор сахарозы) + V (вода) x 100%.

Тест принудительного плавания

Тест Порсолта (тест принудительного плавания) был модифицирован, чтобы предотвратить поведенческие артефакты, вызванные стресс-индуцированной гиперподвижностью (Strekalova et al. 2005; Strekalova et al. 2011). Мышей помещали в прозрачный бассейн (20 x 35 x 15 см), подсвеченный красным светом и наполненный теплой водой (30°C, глубиной 9.5 см) на 2 минуты. Поведение «пассивного плавания» определялось как отсутствие направленного движения головы и тела мыши, и измерялось путем визуального наблюдения, которое было подтверждено ранее автоматизированной системой CleverSys (CleverSys, Вирджиния, США) (Malatynska et al. 2012a). Период активного плавания определялся как время между помещением мыши в резервуар с водой и полной неподвижностью всего тела животного продолжительностью >3 сек. Общее время плавания было посчитано за весь период испытаний при помощи видеоматериалов.

Оценка состояния шерстяного покрова

Состояние покрова тела было оценено слепым методом с целью определения стресс-индуцированной дезинтеграции волосяного покрова мышей. Баллы от 1 (очень плохое состояние) до 5 (превосходное состояние) присваивались каждому животному двумя независимыми экспериментаторами; далее высчитывался средний балл этих оценок. Ранее этот параметр был использован как показатель степени ангедонии, вызванной стрессом, т.к. активный уход мыши за собственным волосяным покровом является гедоническим признаком (Malatynska et al. 2012a).

Диссекция мозга и количественная ПЦР (кПЦР)

Мышей умерщвляли путём цервикальной дислокации. Извлечение РНК осуществлялось из быстрозамороженных микродиссектированных областей мозга; 1 µg всей РНК было конвертировано в кДНК, как описано ранее (Blond et al. 2002; Campbell et al. 2005).

Количественная ПЦР (кПЦР) запускалась с использованием технологии SYBR green (Primer Design Ltd., Саутгемптон, Великобритания). Стандартные кривые были получены с использованием ранее сформированных образцов, чтобы запустить нормализацию к вспомогательному гену глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (ГА-3-Ф-ДГ; прямой праймер ACCCCTTCATTTGACCTCAACTACATG; обратный праймер CCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC) методом Пфафля (Pfaffl 2001). Экспрессия SERT была оценена при помощи прямого праймера TGCSTTTTATATCGCCTCCTAC и

обратного праймера CAGTTGCCAGTGTCCAAGA. Результаты выражены в виде относительной кратности изменения по сравнению с контрольными животными.

Подготовка тканей

Мыши были подвергнуты глубокой анестезии нембуталом (Сева Санте Анималь, Брюссель, Бельгия, 0.01мл/г вес тела) и затем транскардиально перфузированы 0.9% NaCl (PFA; Fluka Chemika, Букс, Швейцария). Мозги были извлечены и затем стабилизированы в 4%-ном растворе параформальдегида на 12 ч при температуре 4°C с последующим погружением в 30% сахарозы на фосфатном буферном растворе (2% в растворе, pH - 7.4) на 24 часа при температуре 4°C. Перемещаемые сагиттальные срезы толщиной 40 μ m были получены с использованием виброножа Leica VT1000M (Leica Microsystems, Нуслох, Германия). Каждый 4-ый срез был взят из каждого полушария каждого мозга вдоль медиально-поперечной оси (между 0.120 мм и 6.00 мм от среднего шва; (Franklin and Paxinos 1997)) и хранился в замороженном состоянии при -20°C.

Иммунофлюоресценция

Чтобы осуществить измерение BrdU и Ki67, восстановление антигена проводилось в течение 30 минут при 90°C в модифицированном цитратном буфере (Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Дания)). Срезы были промыты 3 x 10 мин. в солевом трис-буфере (TBS), и ДНК была денатурирована с 2N HCl на 30 мин. при 37°C, а затем в 0.1M боратном буфере pH 8.5 на 10 мин. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом крысы анти-BrdU (1:500, AbDSerotec, Роли, Северная Каролина, США) и первичным антителом мыши анти-Ki67 (1:500, BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США), разведенных в TBS, содержащей детергент - 0.1% тритон, полисорбат - 0.1% твин-20 и 5% нормальной сыворотки осла (блокирующая субстанция). После промывания в TBS срезы инкубировали при комнатной температуре на 1 час в TBS, содержащем 0.1% тритона, 0.1% полисорбата и соответствующие вторичные антитела (1:500, Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd, графство Саффолк, Великобритания), в сочетании с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), либо с родамином красным (Rhodamine Red-X). Наконец, срезы были промыты в TBS и установлены между стеклом и покровным стеклом с применением субстрата VectaShield Hard Set, содержащего 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Vector Laboratories, Берлингем, Калифорния, США). Слайды хранились в темноте при 4°C.

Конфокальная микроскопия и количественный анализ

Изображения флуоресценции были получены с использованием конфокальной системы Olympus Fluoview FV1000, оснащенной инвертированным микроскопом Olympus IX81 (Olympus Europa GmbH, Гамбург, Германия). Поля были получены с помощью Z-сканирования с шагом 1.5 μm между каждой конфокальной плоскостью. Все срезы, подготовленные для сравнения, были проанализированы одновременно, с использованием одних и тех же параметров измерения; экспериментатор, который оставался в неведении об условиях эксперимента проводил подсчеты. Чтобы оценить пролиферацию и нейрогенез в зубчатой извилине, гранулярный слой клеток и субгранулярная зона BrdU-позитивных и количество Ki-67+ -позитивных клеток были рассмотрены под объективом 60 \times в выборке каждого четвертого сагиттального среза толщиной 40 μm (560 μm от начала зубчатой извилины до её конца; 0.36 мм до 2.52 мм от боковой брегмы; было проанализировано около 14 срезов 40 μm). Было посчитано количество клеток на mm^3 . Количество Ki-67+ клеток в гранулярном слое клеток было получено путем умножения результатов на четыре, как описано ранее (Beukelaers et al. 2011).

Оперативное вмешательство и имплантация электродов

Оперативное вмешательство и имплантация электродов осуществлялись согласно ранее описанному протоколу (Cesuglio et al. 2005; Descamps et al. 2009). Вкратце, животных анестезировали внутривенной инъекцией смеси ксилазина (10 мг/кг, Rompun, Bayer) и кетамина (100 мг/кг, Ketalar, Parke-Davis), разведенных в изотоническом растворе NaCl (0.01 мл/г массы тела). Впоследствии мыши были иммобилизованы в стереотаксической раме (World Precision Instruments, Сарасота, США), гомеотермическое одеяло использовалось для поддержки температуры тела. В черепе были просверлены отверстия, и четыре электроэнцефалографических электрода (ЭЭГ-электроды: провод из нержавеющей стали с тефлоновой изоляцией; длина - 2.0 мм; диаметр - 500 μm) были помещены в левую и правую лобную кору (2.0 мм боковые и 2.0 передние от темени) и в левую и правую теменную кору (2.0 мм боковые от средней линии в средней точке между теменем и лямбдой). Электромиографические электроды (ЭМГ, активная длина - 1 мм; диаметр - 500 μm) были вставлены между двумя мышечными слоями шеи. Все имплантированные электроды были припаяны к двум миниатюрным 5-штырьковым соединителям (Sei 3D, Лион, Франция), которые были закреплены на черепе с помощью клея Super-Bond (Sun Medical, Co., Сига, Япония) и стоматологической акриловой смолы (Ivoclar, Лион, Франция).

Регистрация и анализ ЭЭГ

Процедуры регистрации ЭЭГ (Embla, Medcare, Исландия) и анализа были проведены, как описано ранее (Clement et al. 2003). Визуальная оценка записей оцифрованной ЭЭГ (0.5-49.9 Гц) и ЭМГ (15-49.9 Гц) была осуществлена через 10-секундные периоды с целью определения количества и длительности эпизодов бодрствования (Б), медленноволнового сна (МВС) и сна с быстрым движением глаз (БДГС) в течение 12 часов светлого и темного периодов. Продолжительность каждой фазы ЭЭГ рассчитывалась в секундах и процентах от средних значений в контрольной группе. Влияние лечения на спектральную плотность мощности во время бодрствования, МВС и БДГС было вычислено для темных и светлых периодов светового цикла. Представление дельта-групп (0.5-4 Гц), тета-групп (4-8 Гц), альфа-групп (8-11.5 Гц), сигма-групп (11.5-14.5 Гц), бета-1 групп (14.5-18.6 Гц) и бета-2 групп (18.6-30 Гц) было выражено в процентах от общей мощности группы ЭЭГ (0-49.9 Гц).

Дополнительные таблицы

Дополнительная таблица 1. Содержание дейтерия в водопроводной воде штатов/областей континентальных США.

Штат/область	№	Среднее δD , ‰		Среднее кол-во дейтерия, ppm
		среднее значение	стандартное отклонение	среднее значение
Айдахо	34	-130	4,8	135,51
Айова	6	-70	13,4	144,86
Алабама	3	-23	5,2	152,18
Аризона	85	-68	12,4	145,17
Арканзас	14	-26	4,9	151,71
Вайоминг	26	-126	7,6	136,13
Вашингтон	24	-88	22,7	142,05
Вермонт	2	-70	1	148,6
Вирджиния	40	-46	5,9	144,86
Висконсин	6	-63	5,2	148,75
Джорджия	42	-25	3,4	151,87
Западная Вирджиния	3	-45	0,4	145,95
Иллинойс	37	-44	4,4	148,91
Индиана	35	-47	6,4	148,44
Калифорния	404	-69	18,4	145,01
Канзас	47	-31	6,7	150,93
Кентукки	3	-32	1,9	150,78
Колорадо	53	-115	8,4	137,85
Коннектикут	1	-40	N/A	149,53
Луизиана	18	-22	9,1	152,33
Массачусетс	1	-47	N/A	148,44

Миннесота	75	-62	10	146,1
Миссисипи	5	-22	5,6	152,33
Миссури	12	-48	15,6	148,28
Мичиган	9	-63	10,3	145,95
Монтана	24	-132	9,1	135,2
Мэн	2	-60	11,5	146,41
Мэриленд	38	-47	3,3	148,44
Небраска	18	-74	10,8	144,23
Невада	79	-99	10,2	140,34
Нью-Гэмпшир	25	-55	6,4	147,19
Нью-Джерси	5	-47	3,1	148,44
Нью-Йорк	34	-66	9,5	145,48
Нью-Мексико	61	-84	15,8	142,68
Огайо	32	-50	6	147,97
Оклахома	20	-18	14,9	152,96
Округ Колумбия	4	-56	5,6	147,04
Орегон	103	-74	10,1	144,23
Пенсильвания	35	-58	4,7	146,73
Род-Айленд	1	-53	N/A	147,5
Северная Дакота	8	-122	7,4	136,76
Северная Каролина	4	-31	5	150,93
Теннесси	2	-27	10,7	151,55
Техас	147	-16	15,6	153,27
Флорида	76	-12	5	153,89
Южная Каролина	1	-27	N/A	151,55
Юта	52	-114	10,8	138

Аббревиатуры: N/A – не определено

Дополнительная таблица 2. Содержание D (дейтерия) и ¹⁸O в образцах воды.

Образец воды	D, ppm		δD _{v-SMOW} , ‰		¹⁸ O, ppm		δ ¹⁸ O _{v-SMOW} , ‰	
	среднее	SD**	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
D-91	91.7	0.3	-411.3	1.9	1809.7	0.1	-95.84	0.04
D-119	119.5	0.3	-232.9	1.7	1905.3	0.2	-48.01	0.09
D-128	128.6	0.2	-174.5	0.9	1933.0	0.1	-34.14	0.01
D-140	140.3	0.1	-99.2	0.2	1974.0	0.1	-13.72	0.05

*среднее значение

** standart deviation - стандартное отклонение

Анализ дейтерия и кислорода-18 в образцах проводился трижды на проточных масс-спектрометрах с изотопными приставками: Europa Scientific ANCA-GSL и GEO 20-20 IRMS – для дейтерия и Europa Scientific ANCA-G и Hydra 20-20 IRMS – для кислорода-18 (IsoAnalytical Ltd, Великобритания).

Дополнительная таблица 2. Минеральный состав образцов воды D91 и D140.

Элемент/ингредиент	Содержание, мг/л
Калий	14.4
Натрий	15.3
Кальций	38.1
Магний	10.4
Хлорид	103.0
Фторид	0.5
Сульфат	<0.5
Гидрокарбонат	55.8
Йодид	<10.0
Бромид	<0.1
pH	7.2