

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ  
PSIHIATRIE

*Implicațiile stresului oxidativ, inflamației și factorilor  
neurotrofici cerebrali în tulburările afective*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. HABIL. CS I DR. RIGA SORIN**

**Student-doctorand:**

**DIONISIE VLAD**

## Lista cu lucrările științifice publicate ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Dionisie V**, Filip GA, Manea MC, Manea M, Riga S. The anti-inflammatory role of SSRI and SNRI in the treatment of depression: a review of human and rodent research studies. *Inflammopharmacology* 2021; 29(1): 75-90.  
doi: 10.1007/s10787-020-00777-5  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10787-020-00777-5>  
Revistă indexată în bazele de date PubMed și Web of Science (Clarivate Analytics),  
factor de impact ISI = 4,473
2. **Dionisie V**, Filip GA, Manea MC, Movileanu RC, Moisa E, Manea M, Riga S, Ciobanu AM. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, a novel inflammatory marker, as a predictor of bipolar type in depressed patients: a quest for biological markers. *Journal of Clinical Medicine* 2021; 10(9): 1924.  
doi: 10.3390/jcm10091924  
<https://www.mdpi.com/2077-0383/10/9/1924>  
Revistă indexată în bazele de date PubMed și Web of Science (Clarivate Analytics),  
factor de impact ISI = 4,241
3. **Dionisie V**, Ciobanu AM, Toma VA, Manea MC, Baldea I, Olteanu D, Sevastre-Berghian A, Clichici S, Manea M, Riga S, Filip GA. Escitalopram targets oxidative stress, caspase-3, BDNF and MeCP2 in the hippocampus and frontal cortex of a rat model of depression induced by chronic unpredictable mild stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(14): 7483.  
doi: 10.3390/ijms22147483  
<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/14/7483>  
Revistă indexată în bazele de date PubMed și Web of Science (Clarivate Analytics),  
factor de impact ISI = 5,923

## Cuprins

<i>Mulțumiri</i> .....	1
<i>Lista cu lucrările științifice publicate ca rezultat al cercetării doctorale</i> .....	6
<i>Lista cu abrevieri și simboluri</i> .....	7
<i>Introducere</i> .....	10
<b>I. PARTEA GENERALĂ (stadiul actual al cunoașterii)</b> .....	13
<b>1. Tulburările afective (tulburarea depresivă unipolară și tulburarea afectivă bipolară) – generalități</b> .....	13
1.1. Definiție, aspecte clinice și diagnostice .....	13
1.2. Analiza comparativă a simptomatologiei clinice a depresiei unipolare și bipolare.....	14
1.3. Epidemiologia tulburărilor afective și factorii de risc implicați.....	17
1.4. Abordări farmacologice în tulburările afective .....	19
<b>2. Neurobiologia tulburărilor afective</b> .....	23
2.1. Teoriile actuale privind mecanismele fiziopatologice din tulburările afective.....	23
2.1.1. Neurotransmițătorii monoaminergici .....	23
2.1.2. Stresul psihologic și axa hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenaliană.....	25
2.1.3. Neuroplasticitatea și factorul neurotrofic cerebral .....	27
2.1.4. Mecanismele imun-inflamatorii .....	31
2.1.5. Stresul oxidativ și nitrozativ .....	37
2.2. Markerii biologici cu rol potențial în diagnosticul diferențial dintre depresia bipolară și unipolară.....	42
2.3. Relația dintre antidepresivele de tip inhibitori selectivi ai recaptării serotoninei și mecanismele fiziopatologice ale depresiei .....	44
2.3.1. Inflamația .....	44
2.3.2. Stresul oxidativ și nitrozativ .....	48
2.3.3. Factorul neurotrofic cerebral.....	51

<b>3. Modele animale experimentale bazate pe stres psihologic utilizate pentru studiul neurobiologiei depresiei și a mecanismelor de acțiune a antidepressivelor.....</b>	<b>53</b>
3.1. Modelul stresului cronic, mediu și imprevizibil.....	54
3.2. Modelul de depresie experimentală indus prin stres cronic, mediu și imprevizibil și patogeneza stresului oxidativ și a inflamației .....	55
<b>II. CONTRIBUȚII PERSONALE (originale) .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Utilitatea clinică a unor noi indici hematologici de inflamație ca markeri biologici în tulburările afective .....</b>	<b>57</b>
4.1. Introducere (scop, ipoteză de lucru și obiective specifice) .....	57
4.1.1. Scop studiului.....	57
4.1.2. Ipoteza de lucru .....	57
4.1.3. Obiective specifice .....	57
4.2. Material și metodă .....	58
4.2.1. Tipul studiului .....	58
4.2.2. Populația studiată .....	58
4.2.3. Parametrii incluși în cercetare.....	59
4.2.4. Metodele statistice utilizate în cadrul studiului.....	60
4.3. Rezultate.....	61
4.3.1. Descrierea lotului .....	61
4.3.2. Caracteristicile socio-demografice și clinice ale populației studiate și analiza acestora în funcție de subploturi .....	61
4.3.3. Caracteristicile biologice ale populației studiate și analiza acestora în funcție de subploturi.....	67
4.3.4. Analiza de predicție a tipului de depresie pentru indicii hematologici de inflamație.. .....	72
4.4. Discuții .....	81
<b>5. Rolul stresului oxidativ, caspazei-3, BDNF și MeCP2 în patogeneza depresiei experimentale și în efectul terapeutic al escitalopramului.....</b>	<b>85</b>
5.1. Introducere (scop, ipoteză de lucru și obiective specifice) .....	85
5.1.1. Scopul studiului.....	85
5.1.2. Ipotezele de lucru .....	85
5.1.3. Obiective specifice .....	86

5.2. Material și metodă .....	87
5.2.1. Tipul studiului .....	87
5.2.2. Protocolul studiului .....	87
5.2.2.1. Cazarea și îngrijirea animalelor.....	87
5.2.2.2. Repartizarea animalelor în grupurile experimentale și etapele experimentului.. .....	88
5.2.2.3. Inducerea modelului de depresie prin aplicarea unui protocolul de stres cronic, mediu și imprevizibil.....	89
5.2.2.4. Testele comportamentale utilizate pentru analiza sindromului depresiv și anxios și a activității locomotorii.....	90
5.2.3. Evaluarea parametrilor de stres oxidativ .....	92
5.2.4. Evaluarea expresiei BDNF și MeCP2 .....	93
5.2.5. Determinarea cantitativă a caspazei-3 .....	93
5.2.6. Investigarea histologică și imunohistochimică a țesuturilor cerebrale.....	94
5.2.7. Metodele statistice utilizate în cadrul studiului.....	95
5.3. Rezultate.....	96
5.3.1. Preferința pentru sucroză .....	96
5.3.2. Anxietatea și activitatea locomotorie în testul labirintului în cruce suspendat.....	97
5.3.3. Parametrii de stres oxidativ .....	100
5.3.4. Caspaza-3 .....	103
5.3.5. BDNF.....	104
5.3.6. MeCP2 .....	105
5.3.7. Aspectul histologic Golgi-Cox al cortexului frontal .....	106
5.3.8. Expresia unor markeri imunohistochimici și numărul de oligodendrocite din cortexul frontal și hipocamp .....	107
5.4. Discuții .....	111

<b>6. Implicațiile sistemice ale depresiei experimentale și ale tratamentului cu escitalopram .....</b>	<b>121</b>
6.1. Introducere (scop, ipoteză de lucru și obiective specifice) .....	121
6.1.1. Scopul studiului.....	121
6.1.2. Ipotezele de lucru .....	121

6.1.3. Obiective specifice .....	121
6.2. Material și metodă .....	122
6.3. Rezultate.....	122
6.3.1. Parametrii de stres oxidativ din ficat, rinichi și inimă.....	122
6.3.1.1. Inimă .....	122
6.3.1.2. Rinichi.....	123
6.3.1.3. Ficat.....	124
6.3.2. Caspaza-3 din ficat, rinichi și inimă .....	126
6.4. Discuții .....	128
<b>7. Concluzii și contribuții originale și inovative ale tezei .....</b>	<b>134</b>
7.1. Concluzii .....	134
7.2. Contribuții originale și inovative ale tezei .....	136
<b><i>Bibliografie</i>.....</b>	<b>138</b>
<b><i>Anexe</i>.....</b>	<b>188</b>
<b>Anexa 1 (Articol 1).....</b>	<b>188</b>
<b>Anexa 2 (Articol 2).....</b>	<b>204</b>
<b>Anexa 3 (Articol 3).....</b>	<b>217</b>

## Introducere

Tulburările afective, și în special depresia, reprezintă unele dintre cele mai frecvente afecțiuni psihice întâlnite în populația generală, având un impact major asupra individului și societății. Cercetările ultimilor ani au identificat două caracteristici îngrijorătoare ale evoluției epidemiologice a depresiei, și anume: trendul rapid crescător al incidenței și prevalenței și scăderea vârstei de debut.

În lumina acestor date, psihiatria și neuroștiințele au făcut eforturi considerabile pentru a aduce răspunsuri obiective la întrebările *De ce?* și *Cum?*. Pornind de la explicații psihanalitice și apoi cognitiv-comportamentale bazate pe observații clinice directe, actualmente cele mai importante răspunsuri sunt oferite de cercetările în sfera biologică. Primele teorii etiologice, care au oferit și primele opțiuni terapeutice farmacologice, s-au bazat pe modificările neurotransmițătorilor monoaminergici, în special serotonina. Incapacitatea acestor mecanisme de a oferi răspunsuri complete la problematica tulburărilor afective a condus la continuarea cercetărilor. Acestea au evidențiat implicarea modificărilor neuroendocrinologice în relație cu stresul psihologic, a inflamației și factorilor neurotrofici cerebrali sau a unor mecanisme genetice și epigenetice complexe. Studiile ultimilor ani au arătat că toate aceste mecanisme fiziopatologice interacționează la diferite niveluri și, împreună, formează un model etiopatogenic complex, denumit teoria unificată a depresiei. Totuși, în ciuda a peste 40 de ani de cercetări neuroștiințifice, farmacologice și psihosociale, înțelegerea comprehensivă a fiziopatologiei depresiei nu este pe deplin încă posibilă. În plus, recăderea afectează aproape jumătate din pacienții aflați la primul episod de depresie și rezistența la tratament începe să devină o problemă serioasă în practica de zi cu zi.

Dezvoltarea unor modele de boală experimentale pe animale de laborator a deschis calea spre explorarea unor mecanisme inaccesibile până atunci. Diferitele tipuri de modele de depresie au permis cercetări care nu pot fi efectuate pe subiecți umani și care au condus la o înțelegere mult mai profundă a unor rezultate din studiile clinice.

Pe lângă studiile legate de modul de apariție a depresiei, una dintre direcțiile de cercetare cu real potențial aplicativ este cea a biomarkerilor. Până în momentul de față, nu există un marker biologic standardizat cu rol în completarea și obiectivarea diagnosticului sau în prezicerea răspunsului la tratament sau a prognosticului. De asemenea, problema diagnosticului diferențial între depresia bipolară și cea unipolară, precum și implicațiile terapeutice importante ale unui diagnostic eronat au stimulat interesul pentru studierea mai aprofundată a diferențelor de ordin biologic între cele două entități nosologice. Dinamica cortizolului, modificările

parametrilor de stres oxidativ și inflamației, a factorului neurotrofic cerebral sau cele structurale (imagistice) sunt câteva dintre direcțiile de identificare a unor biomarkeri de încredere și cu rol real în practica clinică.

Așadar, în contextul preocupărilor științifice intense pentru aceste domenii de cercetare, Teza de Doctorat prezentă este orientată spre identificarea și evaluarea unor mecanisme fiziopatologice (stres oxidativ, apoptoză, factori neurotrofici, modulare epigenetică) și a interrelațiilor dintre acestea din perspectiva unui model experimental etiopatogenic complex și, totodată, spre studierea clinică a unor markeri biologici de inflamație specifici tulburărilor afective, în special conceptului nosologic de depresie.

Pe de o parte, în această Teză de Doctorat sunt prezentate rezultatele unei cercetări, pe subiecți umani, care a urmărit diferențele de activare inflamatorie între diferite episoade afective (episod maniacal, episod depresiv bipolar, episod depresiv unipolar), prin evaluarea unor markeri de inflamație derivați din hemogramă. Un obiectiv major, pe care l-am îndeplinit și care contribuie la caracterul original și inovativ al cercetării derulate în cadrul stagiului doctoral, a fost identificarea unui marker care să își poată dovedi utilitatea clinică în diferențierea tipurilor de depresie unipolar și bipolar. Mai precis, am arătat că diferențele de status inflamator dintre cele două tipuri de depresie pot fi cuantificate prin intermediul markerilor de inflamație subclinică reprezentați de raportul neutrofile/limfocite și indexul imun-inflamator sistemic. În plus, rezultatele prezentate arată că raportul neutrofile/limfocite reprezintă un predictor independent pentru depresia bipolară.

O altă direcție de cercetare a acestei Teze de Doctorat a fost orientată spre evaluarea directă, la nivel cerebral, a efectului depresiei și a tratamentului cu escitalopram la nivelul unor căi moleculare patogenice specifice. Spre deosebire de alte specialități medicale în care organele țintă pot fi analizate direct, cu o ușurință mai mare și fără riscuri vitale sau interdicții etice, în cazul psihiatriei evaluarea directă a creierului nu este posibilă la oameni. Așadar, pentru studierea moleculară a unor căi patogenice, am utilizat un model animal de depresie indus prin stres cronic, care a permis analizarea mecanismelor fiziopatologice din diferite zone cerebrale cu rol în reglarea emoțională (hipocamp și cortex frontal). Rezultatele acestei cercetări contribuie, într-un mod original și inovativ, la caracterizarea și validarea unor căi fiziopatologice presupuse a fi implicate în depresie (stresul oxidativ, factorul neurotrofic – BDNF, apoptoza, factorul epigenetic MeCP2, proteina sinaptică PSD95). În plus, am demonstrat că interacțiunea modulatorie a escitalopramului cu aceste căi moleculare contribuie la efectul său antidepresiv. Pe de altă parte, acest studiu arată existența unor diferențe, în funcție



de regiunea cerebrală, în modul de activare a mecanismelor patogenice studiate. Rezultatele prezentate dezvăluie și mai mult complexitatea acestei tulburări psihice.

Având în vedere că depresia se asociază cu numeroase comorbidități somatice și, de asemenea, impactează evoluția lor, a treia direcție de cercetare a fost analiza influenței depresiei experimentale și a administrării de escitalopram la nivelul ficatului, rinichiului și cordului. Această analiză a fost efectuată prin prisma stresului oxidativ și a apoptozei, mecanisme comune între depresie și diferite patologii somatice. Datele rezultate din acest studiu aduc dovezi pentru asocierea dintre depresie și creșterea peroxidării lipidice de la nivelul inimii, precum și pentru efectul escitalopramului de creștere a apărării antioxidante non-enzimatice la nivelul cordului.

Rezultatele curprinse în această Teză de Doctorat deschid calea unor noi direcții de studiu pentru biomarkerii de inflamație reprezentați de indicii hematologici în ceea ce privește utilitatea lor clinică în diagnosticul diferențial al tipului unui episod depresiv. Acești noi markeri de inflamație ar putea avea un rol real în practica clinică psihiatrică de zi cu zi. De asemenea, cercetarea contribuie și la aprofundarea sau chiar deschiderea cunoașterii unor mecanisme moleculare implicate în fiziopatologia depresiei și în efectul terapeutic al escitalopramului. Aceste rezultate ar putea conduce la descoperirea de noi ținte terapeutice pentru antidepresive.

## I. PARTEA GENERALĂ (stadiul actual al cunoașterii)

Tulburarea afectivă bipolară (TAB) și tulburarea depresivă majoră (TDM) sunt tulburări psihice comune și au o prevalență în populația generală de 1-1,1%, respectiv 16,2% [1–3]. TAB și TDM prezintă de obicei o evoluție recurentă și determină o povară economică și socială mare asupra societății [1–3].

Depresia bipolară și cea unipolară sunt asemănătoare din punct de vedere clinic. În afară de câțiva indicatori clinici de bipolaritate care pot fi căutați la un pacient cu episod depresiv fără istoric clar de manie sau hipomanie (spre ex. istoric familial de tulburare bipolară, debut precoce, reactivitate dispozițională marcată, apariția unor stări mixte), nu există alți markeri clinici sau biologici specifici care să ajute diagnosticul diferențial [1]. Așadar, diagnosticul diferențial dintre depresia unipolară și cea bipolară reprezintă o provocare pentru clinician. Totodată, pacienții bipolari au o rată mai mare de prezentare la psihiatru, în special în regim de ambulatoriu, în episod depresiv și doar 20% dintre aceștia sunt diagnosticați corect în primul an de la accesarea serviciilor de specialitate [1, 4]. Un alt aspect care subliniază importanța diagnosticului diferențial corect între tulburarea bipolară și tulburarea depresivă majoră este amploarea diagnosticului incorect a tulburării bipolare ca tulburare depresivă unipolară. Hirschfeld și colab. (2005) au arătat că 21% dintre pacienții tratați pentru depresie în servicii de asistență medicală primară au fost identificați ca având tulburare bipolară [5].

Una dintre consecințele negative ale diagnosticării eronate a depresiei bipolare ca fiind unipolară este tratamentul cu antidepressive care poate induce un viraj dispozițional spre manie sau poate determina trecerea bolii spre forma cu ciclare rapidă [6].

Datele din numeroase meta-analize arată că pacienții care suferă de TAB sau TDM au niveluri crescute ale citokinelor pro-inflamatorii în comparație cu indivizii sănătoși [7, 8]. De asemenea, trialurile clinice randomizate realizate pentru a testa efectul diferitelor medicamente cu rol anti-inflamator adaugă și mai multe dovezi pentru implicarea dezechilibrului imun și a inflamației în tulburările afective [9–12]. Transpunerea datelor clinice pe modele de animal a condus la obținerea de dovezi suplimentare pentru implicarea patogenetică a inflamației în TDM. În studiile *in vivo*, administrarea de lipopolizaharid sau IL-1 sau aplicarea unei paradigme de stres (acut sau cronic) au arătat că induc apariția unui sindrom comportamental specific depresiei, care se caracterizează prin letargie, anhedonie, anorexie, scăderea activității sexuale în asociere cu niveluri ridicate de citokine inflamatorii [13].

Teoria neurotrofică a depresiei susține că apariția TDM este secundară unei neurogeneze aberante în regiunile cerebrale responsabile de reglarea emoțiilor și memoriei. Acest proces este

rezultatul scăderii expresiei BDNF cauzată de stresul cronic [14]. Așadar, efectul antidepresiv ar avea la bază creșterea expresiei și concentrației cerebrale a BDNF. Numeroase rezultate din studii clinice au arătat că pacienții cu TDM netratați au un nivel al BDNF seric mai redus în comparație cu indivizii sănătoși [15–17]. Cercetările pe model animal au arătat că modificările BDNF din depresie sunt determinate de stres. O serie de studii care au aplicat imobilizarea fizică (acută sau cronică), izolarea socială, deprivarea maternală sau stresul cronic mediu impredictibil la șobolani, producându-le un sindrom comportamental asemănător depresiei, au demonstrat scăderea nivelurilor proteice totale sau de mRNA a BDNF din hipocamp sau cortexul frontal [18–22].

În ultimii ani, rapoartele neutrofile/limfocite, plachete/limfocite și monocite/limfocite au fost studiate ca markeri pentru diverse patologii cu etiologie inflamatorie subclinică precum diabet zaharat, obezitate, neoplazii, boli cardio-vasculare [23]. RNL, RPL și RML au fost studiați și în tulburările psihiatrice, inclusiv în TAB și TDM. Numeroase studii au arătat că RNL și RPL sunt crescuți în episodul manical din cadrul TAB, putând fi considerați biomarkeri [24–29]. Aceste rezultate au fost confirmate de Mazza și colab. (2018) printr-o meta-analiză [30]. În ceea ce privește RML, câteva cercetări clinice au raportat valori crescute în episodul maniacal [25, 27, 28]. RNL a fost observat a fi crescut și la pacienții cu TDM comparativ cu pacienții din lotul martor [30]. IIS este un marker integrat de inflamație care rezultă din combinarea RNL și RPL. Cercetările privind rolul IIS în tulburările psihice sunt destul de reduse. Wang și colab. (2021) au arătat că nivelurile mari de IIS sunt asociate cu diagnosticul de TDM la pacienții cu diabetici de gen masculin [31]. Rezultate similare au fost prezentate și de Zhou și colab. (2020) pe un lot de pacienți fără patologie somatică [32].

Legătura dintre stres, dereglarea axei hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenale (HHC) și inflamație este modulată de modificările de stres oxidativ (SO). Mai precis, mecanismul responsabil de apariția dereglării axei HHC este reducerea sensibilității receptorului pentru glucocorticoizi. În prezența peroxidului de hidrogen, translocarea nucleară a receptorului pentru glucocorticoizi, după administrarea de dexametazonă, a fost afectată. Aceste date sugerează implicarea SO în dereglarea buclei de feed-back negativ a axei HHC [33]. Totodată, apariția citokinelor pro-inflamatorii este modulată de speciile reactive de oxigen (SRO) într-o manieră dependentă de calea NF- $\kappa$ B [34]. Pe de altă parte, excesul de catecolamine indus de stresul psihosocial activează sinteza de citokine pro-inflamatorii prin intermediul creșterii activității căii NF- $\kappa$ B. Deși în mod fiziologic activarea axei HHC conduce la inhibarea răspunsului inflamator, apariția „rezistenței la glucocorticoizi” determină hiper-activarea axei HHC și perpetuarea neuroinflamației în cazul tulburărilor afective [35]

Escitalopram este printre cele mai puțin studiate antidepresive în ceea ce privește efectul său potențial anti-inflamator. Analiza proprietăților anti-inflamatorii ale escitalopramului la nivelul diverselor zone cerebrale implicate în patogeneza depresiei a oferit o perspectivă mai concretă. Pe un model animal indus prin administrare de lipopolizaharid (LPS), escitalopramul a redus nivelurile de TNF-alfa, IFN-gamma și IL-6 în cortexul prefrontal (PFC), hipotalamus, striatum și hipocamp în asociere cu un efect de prevenție a apariției semnelor de depresie [36]. Wang și colab. (2017) au demonstrat că escitalopramul a menținut scăzute valorile IL-1beta în hipotalamusul ventral și crescute pe cele ale IL-10 la șoarecii adulți separați de mame periodic imediat după naștere [37].

În studiile clinice, efectele anti-inflamatorii ale escitalopramului sunt mult mai neclare astfel că cercetări viitoare în această direcție sunt necesare. Eller și colab. (2008) au raportat o scădere serică a receptorului solubil pentru IL-12 la un lot cu pacienți cu depresie moderată și severă după 4 săptămâni de tratament cu escitalopram. Aceste rezultate au fost observate doar la pacienții cu răspuns clinic la acest ISRS [38].

Numeroase alte studii susțin efectul de echilibrare a balanței redox al escitalopramului, prin supresia peroxidării oxidative (MDA, substanțele reactive ale acidului tiobarbituric) sau prin creșterea moleculelor antioxidante (GSH, GPx, catalaza, SOD- superoxid dismutaza) în creier sau, specific, în PFC sau hipocamp [39–42].

O serie de studii a examinat necesitatea BDNF pentru efectul antidepresivelor. Șoarecii cu deleție a genei pentru BDNF heterozigoți nu au răspuns la tratamentul cu imipramină sau desimipramină [43, 44]. De asemenea, inhibarea semnalizării prin TrkB prin inducerea unui TrkB dominant cu efect negativ sau deleția TrkB în girusul dințat blochează efectul antidepresivelor (imipramină, citalopram sau fluoxetină) [43, 45, 46]. Șoarecii cu polimorfismul uninucleotidic Val66Met nu au răspuns la antidepresive [47, 48]. Având în vedere că polimorfismul Val66Met conduce la o scădere a capacității de eliberare în dependență de activitate a BDNF, rezultatele menționate susțin implicarea BDNF în efectul clinic al antidepresivelor [49].

## **II. CONTRIBUȚII PERSONALE (originale)**

### **1. Studiul 1 – Utilitatea clinică a unor noi indici hematologici de inflamație ca markeri biologici în tulburările afective**

#### **1.1. Introducere**

Scopul acestui studiu este de a evalua comparativ gradul de inflamație subclinică (măsurată cu ajutorul indicilor hematologici de inflamație) la pacienții cu tulburare afectivă bipolară și tulburare depresivă majoră unipolară.

Obiectivele acestui studiu sunt: Caracterizarea lotului studiat în funcție de variabile demografice și clinice; Evaluarea diferențelor între valorile rapoartelor unor markeri hematologici la pacienții cu tulburare afectivă bipolară – episod maniacal, tulburare afectivă bipolară – episod depresiv și tulburare depresivă majoră; Evaluarea puterii de predicție a rapoartelor markerilor hematologici de inflamație pentru tipul de episod depresiv (unipolar și bipolar)

#### **1.2. Material și Metodă**

Acesta este un studiu analitic – observațional, de cohortă – retrospectiv.

Pacienții internați în secțiile de psihiatrie adulți ale Spitalul Clinic de Psihiatrie „Prof. Dr. Alexandru Obregia”, în perioada martie 2020 – ianuarie 2021, pentru tulburare afectivă bipolară – episod maniacal, tulburare afectivă bipolară – episod depresiv și tulburare depresivă majoră au fost incluși în cohorta acestui studiu.

Criteriile de includere în studiu au fost următoarele: a) Vârsta pacienților la momentul internării între 18 și 65 de ani, b) Diagnosticul de Tulburare afectivă bipolară – episod actual maniacal sau depresiv (cu sau fără simptome psihotice) (F.31.1-31.5), Tulburare depresivă recurentă – episod actual sever (cu sau fără simptome psihotice) (F33.2, F33.3), episod depresiv sever (cu sau fără simptome psihotice) (F32.3, F32.2), c) Disponibilitatea datelor medicale incluse în studiu.

Criteriile de excludere din studiu au fost următoarele: a) Alte comorbidități psihiatrice, inclusiv dependența de alcool sau de alte substanțe psihoactive, b) Alte condiții medicale generale care pot influența parametrii de inflamație (infecție; febră; patologii endocrinologice,

inflamatorii, autoimune sau cerebro-vasculare; insuficiența renală, cardiacă sau hepatică; afecțiuni neoplazice; diabet zaharat), c) IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>, d) Fumatul de tutun > 20 țigarete/zile, e) Pacientele gravide la momentul internării.

Datele incluse în acest studiu au fost obținute prin colectare din foile de observație clinică generală sau din sistemul informatic al Spitalului Clinic de Psihiatrie „Prof. Dr. Alexandru Obregia” din București.

Pentru cohorta de pacienți incluși am colectat următoarele date: 1. date socio-demografice: vârstă, sex, nivelul de educație, statusul marital 2. date clinice: greutatea corporală, înălțimea, prezența consumului de tutun, prezența simptomelor psihotice, 3. date paraclinice: număr absolut - leucocite, neutrofile, limfocite, monocite, plachete sangvine, glicemia a jeune, colesterol tota, trigliceride.

Diagnosticile au fost documentate conform celor stabilite de către medicul curant pe baza criteriilor de diagnostic ale Clasificării statistice internaționale a bolilor și problemelor de sănătate înrudite, revizia a 10-a (ICD-10).

Indicii hematologici de inflamație au fost calculați utilizând numărările celulare absolute din hemoleucogramă. Pentru RNL, RPL, RML și IIS au fost utilizate următoarele formule de calcul: RNL = număr neutrofile / număr de limfocite, RPL = număr plachete sangvine / număr limfocite, RML = număr monocite / număr limfocite, IIS = (număr plachete sangvine × număr neutrofile) / număr limfocite.

Analiza statistică a datelor a fost realizată utilizând programul IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versiunea 20.0. Analiza statistică a fost realizată după ce fiecare variabilă a fost testată pentru normalitatea distribuției datelor utilizând testul Kolmogorov-Smirnov. Variabilele continue au fost exprimate ca medie ± deviație standard. Variabilele categorice au fost exprimate ca procent sau frecvență ± deviație standard. Compararea variabilelor cu distribuție normală a fost realizată cu ajutorul testelor parametrice: testul T pentru variabile independente, testul Hi-pătrat și corelația Pearson, testul ANOVA. Pentru variabilele cu distribuție anormală, compararea a fost realizată folosind următoarele teste neparametrice: testul Mann-Whitney U și testul Kruskal Wallis. Cohorta de pacienți inițială a fost divizată în 3 subloturi: TAB episod maniacal, TAB episod depresiv și TDM. Testele ANOVA și Kurskal-Wallis au fost utilizate pentru a evalua statistic diferențele dintre cele 3 subloturi pentru variabilele continue în funcție de distribuția datelor. Testele Mann-Whitney U și T independent au fost folosite pentru a compara datele cu distribuție continuă între 2 loturi. Analiza statistică pentru variabilele categorice a fost efectuată utilizând testul Hi-pătrat după realizarea tabelelor de contingență. Pentru indicii hematologici care s-au corelat

semnificativ statistic cu subtipurile de depresie (testul Mann-Whitney U) a fost realizată o regresie logistică binară. După ce a fost efectuată o analiză univariată, am efectuat o analiză multivariată pentru RNL și IIS care a fost ajustată pentru vârstă, gen, IMC, prezența fumatului, statusul marital, nivel de educație, colesterol, trigliceride și glicemie. Valoarea Exp(B) reprezintă valoarea odds ratio pentru un interval de confidență (CI) de 95%. Valoarea  $p$  mai mică de 0.05 a fost considerată semnificativ statistică.

### 1.3. Rezultate

Lotul total de studiu a inclus în final 182 de pacienți (N=182), după aplicarea criteriilor de includere și excludere. Lotul total de studiu a fost divizat, în funcție de diagnostic, în 3 subloturi (grupuri): Grupul I (TAB episod maniacal): 65 de pacienți (35,71%); Grupul II (TAB episod depresiv): 34 de pacienți (18,68%); Grupul III (TDM): 83 de pacienți (45,6%). La nivelul întregii populații studiate, media de vârstă a fost 44,41 ( $\pm 12,29$ ); 84 de subiecți au aparținut genului masculin, iar 98 genului feminin. Datele socio-demografice și clinice sunt prezentate complet în Tabelul I.1.

Pacienții cu episod maniacal au avut valori mai mari ale neutrofilelor ( $5,13 \pm 1,63$ ) în comparație cu pacienții cu TAB episod depresiv ( $4,40 \pm 1,68$ ) ( $p < 0,01$ , testul Mann-Whitney U) sau cu cei cu TDM ( $3,68 \pm 1,24$ ) ( $p < 0,001$ , testul Mann-Whitney U). De asemenea, neutrofilele au fost mai crescute la pacienții bipolari în episod depresiv în comparație cu cei cu depresie unipolară ( $4,40 \pm 1,68$  vs.  $3,68 \pm 1,24$ ,  $p < 0,05$ , testul Mann-Whitney U).

În grupul TDM, limfocitele au fost mai mari comparativ cu grupul TAB episod maniacal sau TAB episod depresiv ( $2,54 \pm 0,77$  vs.  $2,25 \pm 0,67$ ,  $p < 0,05$ , testul Mann-Whitney U), respectiv ( $2,54 \pm 0,77$  vs.  $2,24 \pm 0,63$ ,  $p < 0,05$ , testul Mann-Whitney U).

RNL a fost semnificativ mai mare în grupul TAB episod maniacal ( $2,43 \pm 0,95$ ) față de sublotul TAB episod depresiv ( $2,10 \pm 0,96$ ) ( $p < 0,05$ , testul Mann-Whitney U) sau față de grupul TDM ( $1,55 \pm 0,79$ ) ( $p < 0,001$ , testul Mann-Whitney U). De asemenea, pacienții cu depresie bipolară au avut valori ale RNL mult mai mari față de cei cu depresie unipolară ( $2,10 \pm 0,96$  vs.  $1,55 \pm 0,79$ ,  $p < 0,01$ , testul Mann-Whitney U). RPL și RML au fost semnificativ mai crescuți în sublotul cu pacienți cu manie față de pacienții cu depresie unipolară:  $129,21 \pm 50,19$  vs.  $113,5 \pm 39,47$ ,  $p < 0,05$  testul Mann-Whitney U, respectiv  $0,30 \pm 0,11$  vs.  $0,25 \pm 0,07$ ,  $p < 0,01$  testul Mann-Whitney U (Fig. 1.1.).

Tabel I.1. Caracteristicile socio-demografice și clinice ale cohorței studiate.

	<b>Lotul total (N=182)</b>	<b>TAB episod maniacoal (N=65)</b>	<b>TAB episod depresiv (N=34)</b>	<b>TDM (N=83)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Gen, N (%)</b>					
Bărbați	84 (46,2)	31 (47,7)	16 (47,1)	37 (44,6)	0,925 <sup>1</sup>
Femei	98 (53,8)	34 (52,3)	18 (52,9)	46 (56,4)	
<b>Vârsta, medie ± DS</b>					
	44,41 ± 12,29	41,25 ± 11,6	47,59 ± 12,02	45,58 ± 12,45	0,015 <sup>2</sup>
<b>Nivel de educație, N (%)</b>					
≤8 ani	38 (20,9)	7 (10,8)	7 (20,6)	24 (28,9)	0,024 <sup>2</sup>
9-12 ani	93 (51,1)	35 (53,8)	17 (50,0)	41 (49,4)	
>12 ani	51 (28)	23 (35,4)	10 (29,4)	18 (21,7)	
<b>Status marital, N (%)</b>					
Singur	68 (37,4)	35 (53,8)	10 (29,4)	23 (27,7)	0,062 <sup>2</sup>
Căsătorit	62 (34,1)	15 (23,1)	12 (35,3)	35 (42,2)	
Divorțat	26 (14,3)	6 (9,2)	8 (23,5)	12 (14,5)	
Văduv	6 (3,3)	0	0	6 (7,2)	
Concubinaj	20 (11,0)	9 (13,8)	4 (11,8)	7 (8,4)	
<b>Prezența fumatului, N (%)</b>					
Da	105 (57,7)	47 (72,3)	18 (52,9)	40 (48,2)	0,011 <sup>1</sup>
Nu	77 (42,3)	18 (27,7)	16 (47,1)	43 (51,8)	
<b>Simptome psihotice, N (%)</b>					
Da	64 (35,2)	43 (66,2)	28 (82,4)	15 (18,1)	<0,001 <sup>1</sup>
Nu	118 (64,8)	22 (33,8)	6 (17,6)	68 (81,9)	
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>), medie±DS</b>					
	24,92 ± 2,86	25,17 ± 2,56	25,47 ± 2,25	24,51 ± 3,25	0,449 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> testul Chi-square; <sup>2</sup> testul Kruskal-Wallis.

Pentru IIS, valorile în lotul TAB episod maniacoal au fost semnificativ mai mari comparativ cu lotul TAB episod depresiv (648,21 ± 295,79 vs. 549,40 ± 335,78,  $p < 0,05$ , testul Mann-Whitney U). Rezultate asemănătoare au fost obținute și pentru compararea cu lotul TDM (648,21 ± 295,79 vs. 415,13 ± 251,45,  $p < 0,001$ , testul Mann-Whitney U). Totodată, pacienții cu depresiv bipolară au avut valori mai mari ale IIS față de cei cu depresie unipolară (415,13 ± 251,45) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1.1.).



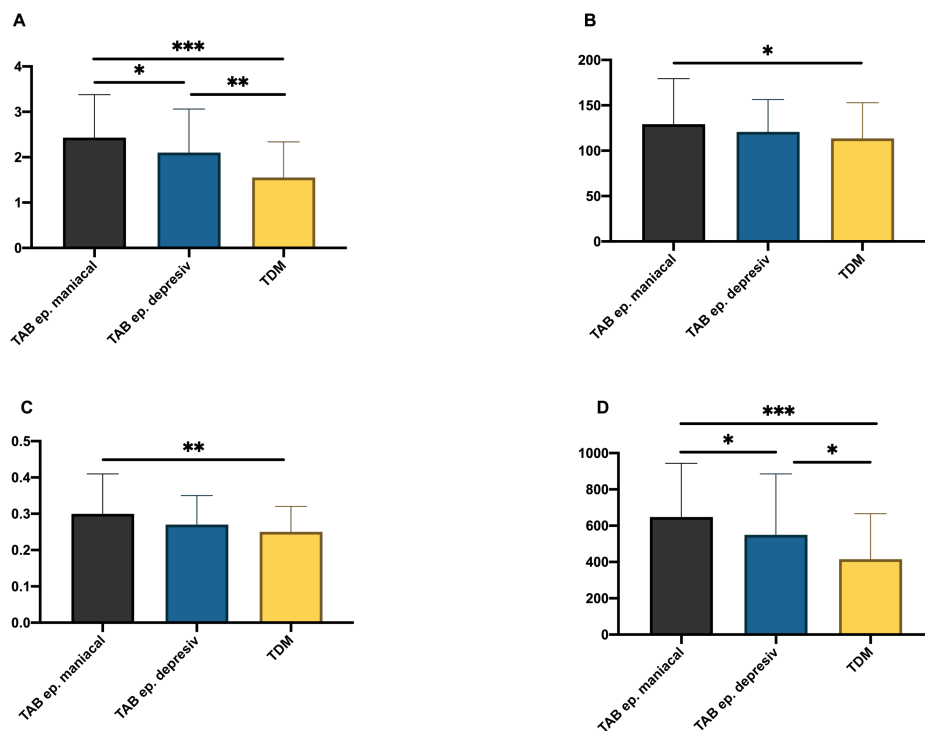


Fig. 1.1. Reprezentarea RNL (A), RPL (B), RML (C) și IIS (D) în funcție de subloturi.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Regresia logistică binară a fost realizată pentru indicii hematologici semnificativ asociați cu tipurile de depresie (unipolară, bipolară). Boala a fost considerată variabila dependentă (categorială, bipolară versus unipolară). RNL, IIS, vârsta, genul, IMC, prezența fumatului, statusul marital, nivelul de educație, colesterolul, glicemia și trigliceridele au fost considerate variabile independente.

Ca prim pas, am realizat o analiză univariată pentru RNL și IIS. Ambele au fost asociate semnificativ cu depresia de tip bipolar ( $R^2$  Nagelkerke = 0,108,  $p = 0,002$ , OR = 2,178; 95% CI;  $p = 0,01$  pentru RNL și  $R^2$  Nagelkerke = 0,059,  $p = 0,026$ , OR = 1,002; CI 95%,  $p = 0,047$  pentru IIS). Apoi, am efectuat modele de analiză multivariată în care am ajustat RNL și IIS pentru potențiale variabile cu efect de confundare: vârstă, gen, IMC, prezența fumatului, statusul marital, nivelul de educație, colesterol total, trigliceride și glicemie. Pentru Modelul 2 am ajustat RNL cu variabilele cu efect de confundare menționate mai sus ( $R^2$  Nagelkerke = 0,235,  $p = 0,021$ ). După ajustare, RNL a fost asociat semnificativ cu depresia bipolară (OR = 2,495; 95% CI;  $p = 0,005$ ).

O ajustare asemănătoare a fost realizată și pentru IIS, rezultând un model care nu a fost semnificativ din punct de vedere statistic ( $R^2$  Nagelkerke = 0,193,  $p = 0,075$ ).

Pentru Modelul 3, am introdus în același model RNL și IIS și am realizat o ajustare pentru variabile cu efect de confundare ( $R^2$  Nagelkerke = 0,248,  $p = 0,022$ ). IIS nu a fost semnificativ statistic asociat cu depresia bipolară (OR = 0,997; 95% CI;  $p = 0,269$ ). În schimb, RNL a fost asociat semnificativ statistic cu depresia bipolară (OR = 5,311; 95% CI;  $p = 0,03$ ), ceea ce semnifică că RNL este un predictor independent pentru depresia bipolară.

Pentru modelele de regresie logistică binară, datele au fost introduse în analiză utilizând metoda Enter.

Analiza Curbei Receiver Operating Characteristics (ROC) pentru discriminarea NLR între depresie bipolară și depresia unipolară a relevat un model puternic semnificativ statistic ( $p = 0,001$ ) cu o arie de sub curbă acceptabilă (AUC = 0,688, 95% CI 0,580 – 0,795). Utilizând indexul Youden, valoarea cut-off identificată a fost de 1,43. Pentru această valoare cut-off, sensibilitatea și specificitatea testului au fost de: 76,5%, respectiv 49,4%. De asemenea, valoarea pozitivă predictivă a fost de 38,2%, iar valoarea predictivă negativă de 83,7%.

Analiza Curbei Receiver Operating Characteristics (Curba ROC) pentru discriminarea SII între depresie bipolară și depresia unipolară a relevat un model semnificativ statistic ( $p = 0,015$ ) cu o arie de sub curbă acceptabilă (AUC = 0,644, 95%CI 0,530 – 0,759). Utilizând indexul Youden, valoarea cut-off identificată a fost pentru SII = 398. Pentru această valoare cut-off, sensibilitatea și specificitatea testului au fost de 67,6%, respectiv 57,8%. De asemenea, valoarea pozitivă predictivă a fost de 39,7%, iar valoarea predictivă negativă de 81,4%.

#### **1.4. Discuții**

Literatura științifică actuală arată că între diferitele episoade ale TAB și TDM există diferențe semnificative în ceea ce privește RNL, RML și RPL. Mazza și colab. (2018) sunt primii care au investigat rapoartele markerilor de inflamație derivate din hemogramă între manie și depresie în TAB [50]. Aceștia au raportat că valorile RNL și RML sunt semnificativ mai crescute la pacienții cu episod maniacoal față de cei cu depresie bipolară. Același studiu a arătat însă că între cele două grupuri nu există o diferență în ceea ce privește nivelurile RPL [50]. Pe de altă parte, Inanli și colab. (2019) au demonstrat că doar RML este crescut în episodul maniacoal versus episodul depresiv din TAB [24]. Un studiu recent a dovedit că toate cele trei rapoarte (RNL, RML, RPL) au fost semnificativ mai mari în faza expansivă față de cea depresivă din TAB [51]. Rezultatele obținute în studiul acesta sunt asemănătoare cu cele din literatură în ceea ce privește RNL, RML și RPL între episodul maniacoal și cel depresiv din TAB. Mai precis, cercetarea de față a demonstrat că RNL este semnificativ mai mare în manie

față de depresia bipolară. Mazza și colab. (2018) au comparat rapoartele de inflamație și între TAB episod de manie și TDM și au demonstrat că RNL și RML sunt mai crescute în episodul expansiv versus depresia unipolară (TDM) [50]. Studiul de față a confirmat aceste rezultate și, în plus, a demonstrat că și RPL este mai crescut în manie față de TDM.

Un singur studiu a investigat legătura dintre IIS și TDM și a arătat că acest index este mai crescut în grupul de pacienți față de lotul control [32]. Studiul de față a relevat că pacienții cu episod expansiv au un status inflamator ridicat, cuantificat prin IIS, prin comparație cu pacienții bipolari în episod depresiv sau cu cei cu TDM.

Această cercetare a arătat că pacienții bipolari în episod depresiv au un nivel mai crescut de inflamație subclinică, reflectat prin IIS și RNL, prin comparație cu pacienții cu TDM. De asemenea, această cercetare a demonstrat că RNL este un predictor bun pentru depresia bipolară la pacienții cu episod depresiv. Mai precis, pacienții cu depresie cu valori crescute ale RNL au de 5,31 mai multe șanse să aibă depresie de tip bipolar. Așadar, RNL ar putea fi folosit ca indicator de bipolaritate la un pacient cu depresie.

## **2. Studiul 2 - Rolul stresului oxidativ, caspazei-3, BDNF și MeCP2 în patogeneza depresiei experimentale și în efectul terapeutic al escitalopramului**

### **2.1. Introducere**

Studiul de față are două scopuri: Evaluarea stresului oxidativ, apoptozei, a nivelurilor BDNF și MeCP2 la un model animal (șobolan) de depresie indusă prin paradigma stresului cronic, imprevizibil și mediu; Evaluarea efectului administrării unui inhibitor selectiv al recaptării serotoninei (escitalopram) asupra mecanismelor patogenetice (stres oxidativ, apoptoză, expresie a BDNF și MeCP2) ale depresiei indusă pe un model experimental animal (șobolan).

Obiectivele acestui studiu sunt: Inducerea unui sindrom comportamental depresiv la șobolani de laborator prin aplicarea unui protocol experimental de stres cronic, imprevizibil și de intensitate medie; Cuantificarea nivelurilor de MDA, GSH și GSSG și a activității catalazei la nivelul cortexului frontal și hipocampului la șobolani mator, la cei cu depresie și la cei tratați cu escitalopram; Evaluarea activității caspazei-3, ca marker de apoptoză, la nivelul hipocampului și cortexului frontal la animalele martor, la cele depresive netratate și la cele tratate cu escitalopram; Cuantificarea nivelurilor de BDNF și MeCP2 la nivelul hipocampului și cortexului frontal la animalele martor, la cele depresive netratate și la cele tratate cu escitalopram; Analizarea din punct de vedere histologic a țesuturilor cerebrale din cortexul frontal la animalele martor, la cele cu sindrom depresiv netratate și la cele tratate cu escitalopram; Evaluarea expresiei markerilor imunohistochimici CNP și PSD95 la nivelul hipocampului și cortexului frontal; Evaluarea diferențelor între loturile studiate, pe regiuni cerebrale, în ceea ce privește MDA, GSH, GSSG, activitatea catalazei, caspazei-3, nivelul BDNF, MeCP2 și numărul de oligodendrocite.

### **2.2. Material și metodă**

Acesta este un studiu de tip experimental, pe model animal. Toate experimentele realizate în cadrul acestui studiu au fost realizate în laboratoarele de cercetare ale Disciplinei de Fiziologie, UMF „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca sau în Laboratorul de Histologie și

Imunohistochimie al Departamentului de Biologie Experimentală și Biochimie din cadrul Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca.

Experimentele au fost efectuate pe un număr de 32 de șobolani masculi adulți din rasa Wistar. Rozătoarele au fost acomodare pentru o perioadă de 7 zile la condițiile din laborator (program de 12h lumină și 12h întuneric, temperatura ambientală  $24 \pm 2^{\circ} \text{C}$ ) înainte de începerea experimentelor. Experimentul s-a desfășurat pe o perioadă de 72 de zile.

După perioada de acomodare, animalele au fost divizate în mod egal și randomizat în 4 loturi (N=8):

1. *Control*: animalele nu au fost supuse protocolului de stres cronic, mediu și imprevizibil și nu au primit tratament cu escitalopram sau vehicul (soluție carboxi-metil-celuloză 2%)
2. *Stres*: animalele au fost supuse protocolului de stres cronic, mediu și imprevizibil pentru inducerea modelului de depresie și au primit soluție vehicul din ziua 26 până în ziua 67 a experimentului
3. *Stres + ESC5*: animalele au fost supuse protocolului de stres cronic, mediu și imprevizibil pentru inducerea modelului de depresie și au primit escitalopram în doză de 5mg/kg corp din ziua 26 până în ziua 67 inclusiv a experimentului
4. *Stres + ESC5/10*: animalele au fost supuse protocolului de stres cronic, mediu și imprevizibil pentru inducerea modelului de depresie și au primit escitalopram în doză de 5 mg/kg corp din ziua 26 până în ziua 46 a experimentului și în doză de 10mg/kg corp din ziua 47 până în ziua 67 inclusiv a experimentului

Escitalopram a fost administrat după instalarea sindromului comportamental depresiv pentru a replica situația clinică reală. În ziua 25 și ziua 71 a fost efectuat testul de preferință pentru sucroză. Testul labirintului în cruce suspendat („elevated plus maze”) a fost efectuat în ziua 72. În ziua 72, animalele au fost eutanasiate sub anestezie generală. Imediat după eutanasiere au fost recoltate creierul, ficatul, rinichii și inima animalelor. Hipocampul și cortexul frontal au fost excizate și împărțite în jumătăți pentru testele biochimice sau analiza histologică și imunohistochimică.

Protocolul de stres cronic, mediu și imprevizibil din acest studiu a contat în aplicarea a diferiți stresori într-un mod randomizat pentru a fi imprevizibili pentru animale. Acesta a fost aplicat singur pentru 21 de zile și, apoi, simultan cu administrarea de escitalopram sau soluție vehicul pentru încă 42 de zile.

Testul de preferință la sucroză (TPS) a fost conceput pentru a observa și cuantifica anhedonia. O valoare a preferinței pentru sucroză  $< 65\%$  este considerată un semn al prezenței anhedoniei dacă animalele din lotul control au o preferință pentru sucroză  $\geq 65\%$  [52].

Testul labirintului în cruce suspendat este un test comportamental utilizat pe scară largă pentru a evalua comportamentul anxios și activitatea locomotorie și este considerat standardul de aur pentru evaluarea efectului anxiolitic al diferitelor substanțe în cercetarea experimentală preclinică [53].

Pentru evaluarea stresului oxidativ, am măsurat MDA (marker al peroxidării lipidice), GSH, raportul GSH/GSSG și activitatea catalazei (parametrii ai activității antioxidante). Stresul oxidativ a fost evaluat în țesutul din hipocamp și cortexul frontal. Estimarea cantitativă a BDNF și MeCP2 a fost efectuată utilizând tehnica Western Blot. Nivelurile de caspază-3 din hipocamp și cortexul frontal au fost determinate prin tehnica ELISA.

Investigarea imunohistologică a țesuturilor a fost realizată cu anticorpi monoclonali anti-2',3'-ciclic-nucleotid 3'-fosfodiesterază (CNP) (marker pentru oligodendrocite) și anti-proteină de densitate postsinaptică 95 (PSD95). Examenul histologic al țesuturilor din cortexul frontal a fost realizat utilizând colorația Golgi-Cox (impregnare metalică).

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programului informatic GraphPad versiunea 8.0. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  deviație standard. Compararea între grupuri a rezultatelor a fost realizată cu analiza de varianță unidirecțională ANOVA, urmată de analiza post hoc Tukey (pentru comparații multiple). Pentru rezultatele de la EPM, a fost aplicat testul Kruskal-Wallis și apoi analiza post hoc Bonferroni (Dunn) (pentru comparații multiple).

O valoare  $p$  sub 0,05 a fost considerată statistic semnificativă.

### **2.3. Rezultate**

#### **Preferința pentru sucroză**

După 3 săptămâni în care a fost aplicat protocolul de stres cronic, mediu și imprevizibil, animalele din loturile Stres, Stres + ESC5 și Stres + ESC5/10 au avut un procent al preferinței pentru sucroză sub 65%, mai mic față de lotul Control ( $86,19 \pm 4,88$  vs.  $37,19 \pm 4,31$ ,  $p < 0,001$ ;  $86,19 \pm 4,88$  vs.  $35,92 \pm 1,96$ ,  $p < 0,001$ ;  $86,19 \pm 4,88$  vs.  $37,14 \pm 4,10$ ,  $p < 0,001$ ).

Tratamentul cu escitalopram (doză fixă pentru lotul Stres + ESC5 și doză titrată pentru lotul Stres + ESC5/10) a determinat un efect antidepresiv, crescând semnificativ preferința pentru sucroză la loturile respective față de grupul Stres ( $78,44 \pm 9,04$  vs.  $49,84 \pm 4,09$ ,  $p < 0,001$ , respectiv  $84,39 \pm 6,34$  vs.  $49,84 \pm 4,09$ ,  $p < 0,001$ ).

#### **Anxietatea și activitatea locomotorie în testul labirintului în cruce suspendat**

Stresul cronic a determinat, pentru grupul Stres, reducerea numărului total de intrări în comparație cu lotul control ( $p < 0,05$ ). Escitalopram doză fixă 5mg/kgcorp/zi a îmbunătățit

activitatea locomotorie, crescând distanța totală parcursă, numărul total de intrări și numărul de intrări în brațele închise prin comparație cu grupul Stres ( $p < 0,05$ ).

Stresul cronic a crescut nivelul de anxietate. Mai precis, stresul cronic a determinat reducerea semnificativă a numărului de intrări în brațele deschise ale aparatului în comparație cu animalele din lotul control ( $p < 0,05$ ). Lotul Stres + ESC5/10 a avut distanța parcursă în brațele deschise și numărul de intrări în brațele deschise îmbunătățite față de animalele de control, ceea ce argumentează pentru un grad scăzut de anxietate ( $p < 0,05$ ).

### Parametrii de stres oxidativ

Nivelurile de MDA din hipocampul animalelor din loturile Stres + ESC5 și Stres + ESC5/10 au scăzut semnificativ față de nivelurile grupului Stres ( $0,91 \pm 0,11$  vs.  $2,24 \pm 0,28$ ,  $p < 0,001$  și, respectiv,  $1,32 \pm 0,39$  vs.  $2,24 \pm 0,28$ ,  $p < 0,01$ ). În lobul frontal, MDA a avut valori mai ridicate la lotul Stres + ESC5/10 comparativ cu lotul control ( $1,61 \pm 0,43$  vs.  $0,86 \pm 0,20$ ,  $p < 0,05$ ) (Fig. 2.1.).

Escitalopramul administrat în doză titrată a determinat creșterea GSH în hipocamp și lobul frontal în comparație cu animalele cu depresie și netratate ( $1,58 \pm$  vs.  $1,20 \pm 0,17$ ,  $p < 0,05$  și, respectiv,  $1,12 \pm 0,15$  vs.  $0,83 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). În plus, nivelurile de GSH din cortexul frontal au fost semnificativ mai scăzute în lotul Stres față de animalele martor ( $0,83 \pm 0,05$  vs.  $1,09 \pm 0,11$ ,  $p < 0,05$ ). Raportul GSH/GSSG a crescut semnificativ în hipocamp dar și în lobul frontal la animalele din lotul Stres + ESC5/10 față de valorile din lotul Stres ( $11,41 \pm 1,42$  vs.  $5,45 \pm 0,27$ ,  $p < 0,001$ , respectiv  $8,22 \pm 1,72$  vs.  $4,90 \pm 0,47$ ,  $p < 0,01$ ) (Fig. 2.2.).

Catalaza a avut o activitate mai crescută în hipocamp și cortexul frontal la animalele cu depresie față de martori, însă diferențele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic ( $0,31 \pm 0,10$  vs.  $0,17 \pm 0,08$ ,  $p > 0,05$ , respectiv  $0,36 \pm 0,05$  vs.  $0,15 \pm 0,06$ ,  $p > 0,05$ ).

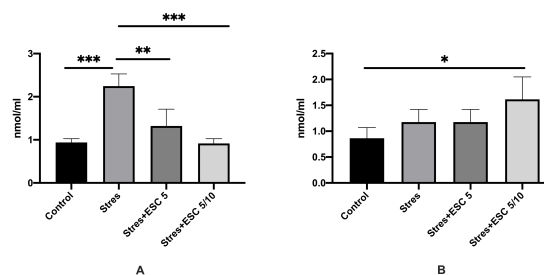


Fig. 2.1. Efectele depresiei experimentale și ale administrării de escitalopram asupra nivelului de MDA din hipocamp (A) și cortexul frontal (B). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

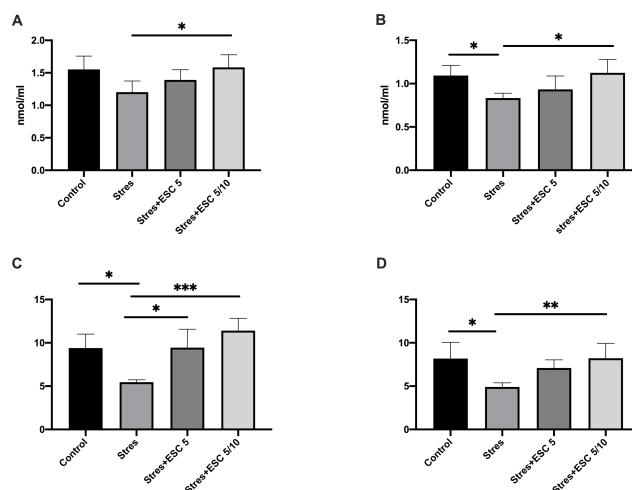


Fig. 2.2. Efectele depresiei experimentale și ale administrării de escitalopram asupra valorilor GSH din hipocamp (A), GSH din cortexul frontal (B), raportului GSH/GSSG din hipocamp (C) și raportului GSH/GSSG din cortexul frontal (D). \*  $p < 0,5$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### Caspaza-3

Animalele din grupul Stres + ESC5/10 au avut niveluri scăzute ale caspazei-3 în hipocamp prin comparație cu lotul Stres ( $119,1 \pm 23,54$  vs.  $586,3 \pm 232,5$ ,  $p < 0,05$ ).

### BDNF și MeCP2

Expresia BDNF în hipocampus animalelor din loturile Stres + ESC5/10 și Stres + ESC5 a crescut comparativ cu valorile obținute pentru lotul Stres ( $p < 0,01$ , respectiv  $p < 0,01$ ). La nivelul regiunii corticale frontale, expresia BDNF a scăzut la șobolanii din grupurile Stres + ESC5/10 comparativ cu valorile obținute pentru animalele din grupul Stres ( $p < 0,01$ ).

Animalele din grupurile Stres + ESC5/10 au avut valori mai mari ale MeCP2 la nivelul hipocampusului comparativ cu cele obținute pentru loturile Stres ( $p < 0,001$ ), Control ( $p < 0,001$ ) și Stres + ESC5 ( $p < 0,001$ ). La nivelul cortexului frontal, loturile Stres + ESC5 și Stres + ESC5/10 au avut niveluri de MeCP2 semnificativ mai mari față de lotul Stres ( $p < 0,05$ ).

### Aspectul histologic Golgi-Cox al cortexului frontal

În condiții de stres, neuronii piramidali se restrâng, arborele dendritic își restânge teritoriul, corpul celular (soma) devine ușor globular, dinamică traficului axonal este diminuată iar spinele dendritice se înglobează în membrana dendritică. Escitalopram în doză fixă de



5mg/kg corp/zi a îmbunătățit aspectul morfologic neuronal. Escitalopram în regim de titrare nu a determinat niciun efect la nivelul conexiunilor neuronale și morfologiei neuronilor din cortexul frontal.

### **Expresia unor markeri imunohistochimici și numărul de oligodendrocite din cortexul frontal și hipocamp**

În lotul Stres, numărul de oligodendrocite din cortexul frontal a crescut față de grupul Control ( $p < 0,001$ ). De asemenea, administrarea de escitalopram în ambele regimuri a determinat normalizarea numărului de oligodendrocite comparativ cu lotul Stres ( $p < 0,001$ ). În hipocamp, lotul Stres + ESC5 a avut un număr de oligodendrocite mai scăzut comparativ cu lotul Stres și lotul Control ( $p < 0,001$ ).

Aplicarea protocolului de stres cronic, mediu și imprevizibil a determinat o reducere a expresiei PSD-95 prin comparație cu lotul martor, dar tratamentul cu escitalopram, în ambele variante de dozare testate, a determinat intensificarea expresiei imunohistochimice a PSD-95 comparativ cu loturile Stres și Control.

## **2.4. Discuții**

Numeroase studii susțin aceste mecanisme și au arătat că stresul cronic a determinat creșterea nivelurilor markerilor de stres oxidativ (substanțele reactive ale acidului tiobarbituric, MDA, proteine carbonilate) sau reducerea apărării antioxidante (Trolox capacitatea antioxidantă echivalentă, GSH, GPx, catalaza, peroxiredoxine, SOD) în întreg creierul, hipocamp sau cortex frontal în comparație cu animalele de control [41, 42, 54–61]. Studiul de față aduce argumente pentru implicarea stresului oxidativ în comportamentul depresiv al șobolanilor supuși unui stres cronic. Pentru a verifica dacă stresul cronic are o implicare la nivel biologic în ceea ce privește stresul oxidativ, am cuantificat nivelurile de MDA și am demonstrat că stresul cronic a accentuat peroxidarea lipidică la animalele depressive. GSH și GSH/GSSG în hipocampus și cortexul frontal al animalelor cu depresie au fost mult mai scăzute comparativ cu șobolanii martor.

A fost demonstrat că escitalopram este implicat în reglarea stresului oxidativ determinat de depresia prin stres cronic prin reducerea peroxidării lipidice (spre ex. MDA sau substanțele reactive ale acidului tiobarbituric) sau prin creșterea nivelului unor molecule cu rol antioxidant (spre ex. GSH, GPx, SOD, catalază) în întreg creierul sau în cortexul prefrontal [39, 41, 42, 62, 63]. Pe de altă parte, Eren și colab. (2007) și Martin-Hernandez și colab. (2018) au raportat

creșterea peroxidării lipidice (cuantificată prin MDA sau substanțele reactive ale acidului tiobarbituric) în cortexul prefrontal al șobolanilor expuși la stres cronic după administrarea de escitalopram [41, 62]. Rezultatele studiului de față sunt în concordanță parțială cu aceste date. Mai precis, rezultatele acestui studiu arată că ambele doze de escitalopram au determinat scăderea MDA în hipocamp dar nu și în lobul frontal. De asemenea, apărarea antioxidantă non-enzimatică (GSH, GSH/GSSG) a fost intensificată de administrarea în doză titrată a escitalopram în hipocamp și cortexul frontal. Acest studiu a arătat că nivelul de catalază a avut o tendință spre normalizare sub tratament cu escitalopram.

Hipocampul și cortexul frontal joacă un rol cheie în neurobiologia depresiei datorită rolului lor în funcțiile executive și cognitive și în reglarea emoțiilor [64]. Cercetările efectuate până la momentul scrierii acestei teze indică faptul că stresul cronic determină creșterea caspazei-3, o enzimă pivot în procesul de apoptoză, în cortexul cerebral, hipocamp sau cortexul frontal [65–69]. Cercetările privind efectul escitalopram asupra caspazei-3 sunt limitate. Yang și colab. (2018) au demonstrat, pe un model pe șobolan de depresie prin stres cronic, mediu și imprevizibil, că tratamentul cu escitalopram a redus activitatea caspazei-12 [70]. În studiul de față, escitalopram administrat în regim de titrare a determinat o scădere a caspazei-3 în hipocamp, însă același efect nu a fost observat la nivelul cortexului frontal.

Atrofia dendritică și moarte celulară neuronală au fost asociate cu nivelurile reduse de BDNF observate ca răspuns la stresori cronici. Administrarea a diferite antidepresive a inversat aceste modificări în asociere cu ameliorarea comportamentului de tip depresiv [71, 72]. Rezultatele acestui studiu arată scăderea BDNF în hipocamp în cazul modelului de depresie prin stres cronic. Pe de altă parte, în cortexul frontal, paradigma stresului cronic a produs o creștere a BDNF. Totodată, creșterea valorilor BDNF din cortexul frontal ar putea fi explicată și ca un mecanism compensator.

Literatura oferă studii care au arătat că administrarea de escitalopram nu a avut niciun efect asupra nivelurilor de BDNF din hipocamp sau cortexul frontal [73, 74]. Pe de altă parte, o serie de studii realizate utilizând paradigma de stres cronic pe șobolani a demonstrat că escitalopram a recuperat reducerea nivelurilor proteice sau de mRNA a BDNF din hipocamp [75, 76]. Aceste rezultate nu sunt în contradicție cu constatările studiului de față care relevă că ambele regimuri de administrare a escitalopram au crescut nivelurile proteice de BDNF din hipocampul animalelor depresive în comparație cu lotul martor. Totuși, rezultatele raportate aici arată că escitalopram administrat în doză fixă nu a avut nicio influență asupra scăderii BDNF din cortexul frontal, iar administrarea în doză titrată a normalizat valorile BDNF la nivelul celor ale animalelor de control.

În ultimii ani, dovezile științifice aduc argumente pentru implicarea MeCP2 în fiziopatologia depresiei și a mecanismului de acțiune al antidepresivelor. MeCP2 este implicată în mecanismele de reglare epigenetică fiind unul dintre reglatorii cheie a sintezei de BDNF. Su și colab. (2015) au observat că neuronii din hipocamp cu knockdown al MeCP2 au un nivel redus de BDNF, iar nivelurile de BDNF și MeCP2 au fost scăzute la șobolanii cu depresie indusă prin paradigma stresului cronic, mediu și imprevizibil [77]. Aceste rezultate atestă implicarea MeCP2 în tulburările psihice stres-dependente. Totodată, literatura de specialitate oferă informații care susțin rolul MeCP2 în căile de acțiune ale antidepresivelor. Mai precis, a fost demonstrat că mai multe antidepresive, inclusiv escitalopram, fosforilează MeCP2 pentru a crește nivelul de BDNF [78–81]. Rezultatele studiului de față sunt în concordanță parțială cu datele prezentate mai sus. Mai precis, în studiul de față nu am raportat niciun efect al stresului cronic asupra nivelurilor proteice de MeCP2 din hipocamp sau cortexul frontal. Însă, acest studiu arată o creștere a nivelurilor proteice de MeCP2 din lobul frontal și hipocamp ca urmare a tratamentului cu escitalopram în doză titrată (inițial 5mg apoi 10mg/kg corp/zi). De asemenea, se pare că escitalopram modulează nivelurile de MeCP2 în funcție de doza administrată.

Depresia se asociază cu pierderea axonilor iar oligodendrocitele disfuncționale ar putea avea un rol în acest efect deoarece sunt implicate în sinteza de mielină și în menținerea integrității axonului [82, 83]. S-a demonstrat că depresia experimentală indusă prin stres cronic, mediu și imprevizibil a determinat reducerea celulelor CNP+ din unele regiuni ale hipocampului (spre ex. zonele CA1 sau CA3, girusul dințat) sau din cortexul prefrontal medial al șobolanilor [84–86]. Rezultatele raportate în studiul de față sunt parțial concordante cu cele din literatura curentă. Studiul pe care l-am condus a arătat că stresul cronic a crescut numărul de oligodendrocite în cortexul frontal, însă nu a avut niciun efect la nivelul hipocampului. De asemenea, administrarea de escitalopram în doză titrată a normalizat numărul de oligodendrocite în lobul frontal.

Postsynaptic density este un complex proteic compactat dens, localizat sub membranele postsinaptice din sinapsele excitatorii. Proteinele din PSD au rol crucial pentru neurotransmisia și plasticitatea sinaptică. BDNF și receptorul său TrkB joacă un rol important în dezvoltarea sinapselor și prin intermediul PSD-95 [87, 88]. Studii recente au demonstrat că inducere unui sindrom comportamental depresiv la șobolani sau șoareci prin aplicarea paradigmei stresului cronic a determinat scăderea nivelului proteic sau de mRNA a PSD95 în hipocamp sau amigdală [89–92]. Rezultatele studiului de față arată că stresul cronic a determinat scăderea expresiei imunohistochemice pentru PSD în neuronii hipocampici, confirmând implicarea proteinelor PSD95 în fiziopatologia depresiei. Escitalopramul administrat unui model de

șobolan cu depresie prin stres cronic a crescut grosimea PSD și nivelul de PSD95 în cortexul prelimbic și în zonele CA3, CA1 și girusul dințat din hipocamp [93]. Studiul nostru a demonstrat că administrarea de escitalopram în doză titrată a determinat o creștere a imunoreactivității pentru PSD95 în zona CA3 din hipocamp.

Rezultatele histologice prezentate în studiul de față susțin rolul benefic al escitalopram în ceea ce privește troficitatea și neuroplasticitatea. Mai exact, suportul trofic necorespunzător indus de stresul cronic asociat cu stresul oxidativ au condus la reducerea extensiilor axonale ale neuronilor, corpul neuronilor fiind restricționat la soma și având extensii scurte. Escitalopram a mărit extensiile neuronale corticale, lungimea neuronilor și prelungirile dendritelor. Administrarea escitalopramului a condus la extinerea arborelui dendritic al neuronilor piramidali din stratul cortical 3 și 6, alungirea corpului celular care astfel și-a recăpătat forma piramidală din cea globulară iar spinele dendritice au proliferat. Aceste schimbări au demonstrat pe de-o parte plasticitatea ridicată a cortexului frontal prin neuronii piramidali pe care îi deține și, pe de altă parte, efectul neurotrof, regenerativ al escitalopramului în condiții generale de stres, depresie.

### **3. Studiul 3 – Implicațiile sistemice ale depreisie experimentale și ale tratamentului cu escitalopram**

#### **3.1. Introducere**

Acest studiu a avut scopul de a evalua, din perspectiva stresului oxidativ și a apoptozei, impactul depresiei experimentale și a tratamentului cu escitalopram asupra ficatului, rinichiului și miocardului pe un model animal de depresie experimentală.

În acest studiu am urmărit următoarele obiective: Inducerea experimentală a depresiei prin aplicarea unui protocol de stres cronic, mediu și imprevizibil; Cuantificarea MDA, GSH, GSH/GSSG, activitatea catalazei și caspazei-3 în ficat, rinichi și inimă la animalele martor, cele doar cu sindrom depresiv și cele cu sindrom depresiv și tratate cu escitalopram.

#### **3.2. Material și Metodă**

Tipul studiului, protocolul experimental și metodele statistice utilizate sunt asemănătoare cu cele descrise în studiul anterior „Rolul stresului oxidativ, caspazei-3, BDNF și MeCP2 în patogeneza depresiei experimentale și în efectul terapeutic al escitalopram”.

#### **3.3. Rezultate**

##### **Parametrii de stres oxidativ din ficat, rinichi și inimă**

La nivelul inimii, stresul cronic a determinat o creștere a valorilor MDA comparativ cu lotul Control ( $0,57 \pm 0,05$  vs.  $0,38 \pm 0,03$ ,  $p < 0,001$ ). Lotul Stres+ESC5 și lotul Stres+ESC5/10 au avut niveluri de GSH mai mari față de lotul Stres ( $1,21 \pm 0,05$  vs.  $0,89 \pm 0,1$ ,  $p < 0,001$ , respectiv  $1,20 \pm 0,6$  vs.  $0,89 \pm 0,11$ ,  $p < 0,001$ ). Administrarea escitalopramului în doză fixă sau în doză titrată a determinat creșterea nivelurilor GSH/GSSG față de lotul Stres ( $8,61 \pm 1,23$  vs.  $6,07 \pm 0,80$ ,  $p < 0,05$ , respectiv  $8,54 \pm 1,20$  vs.  $6,07 \pm 0,80$ ,  $p < 0,05$ ) (Fig. 3.1.).

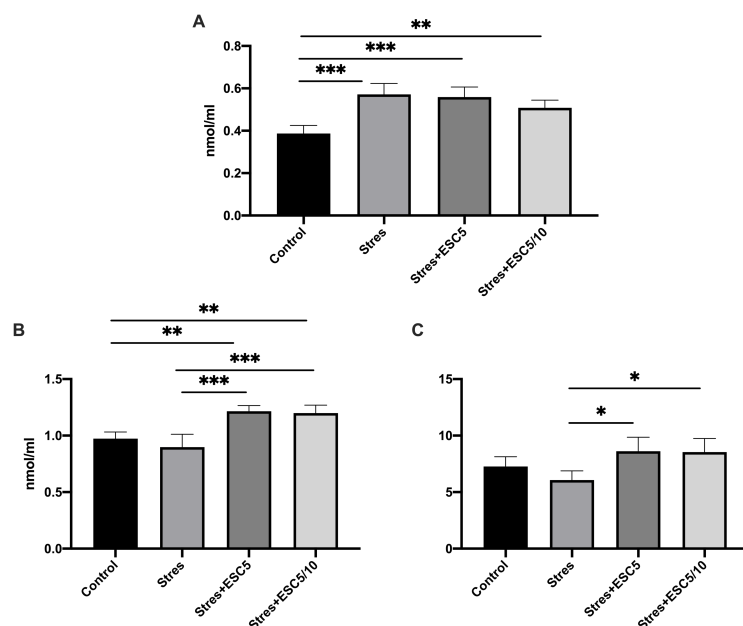


Fig. 3.1. Efectele depresiei experimentale și ale administrării de escitalopram asupra nivelului de MDA (A), GSH (B) și GSH/GSSG (C) din inimă. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

În rinichi, animalele din lotul Control au avut niveluri ușor mai scăzute de MDA comparativ cu loturile Stres, Stres+ESC5 și Stres+ESC5/10 însă, diferențele nu au fost semnificative din puncte de vedere statistic ( $0,38 \pm 0,02$  vs.  $0,41 \pm 0,07$ ,  $p > 0,05$ ;  $0,38 \pm 0,02$  vs.  $0,41 \pm 0,02$ ,  $p > 0,05$ ;  $0,38 \pm 0,02$  vs.  $0,46 \pm 0,05$ ,  $p > 0,05$ ). Valoarea GSH/GSSG din rinichi pentru lotul Control a fost mai mare comparativ cu loturile Stres, Stres+ESC5 și Stres+ESC5/10 însă diferențe nu au fost semnificative statistic ( $16,89 \pm 1,47$  vs.  $13,72 \pm 1,66$ ,  $p > 0,05$ ;  $16,89 \pm 1,47$  vs.  $13,03 \pm 3,15$ ,  $p > 0,05$ ; respectiv  $16,89 \pm 1,47$  vs.  $15,22 \pm 3,09$ ,  $p > 0,05$ ).

La nivelul ficatului, inducerea sindromului depresiv și tratamentul cu escitalopram în doză fixă și titrată nu a determinat diferențe semnificative în ceea ce privește valorile MDA în comparație cu lotul Control ( $0,19 \pm 0,03$  vs.  $0,23 \pm 0,04$ ,  $p > 0,05$ ;  $0,19 \pm 0,03$  vs.  $0,26 \pm 0,03$ ,  $p > 0,05$ ;  $0,19 \pm 0,03$  vs.  $0,23 \pm 0,03$ ,  $p > 0,05$ ). Între lotul Control și lotul Stres nu au fost diferențe semnificative statistic între valorile GSH, deși se observă un trend de scădere a GSH la lotul Stres față de lotul martor ( $1,56 \pm 0,28$  vs.  $1,40 \pm 0,11$ ,  $p > 0,05$ ). De asemenea, administrarea de escitalopram nu a determinat modificări semnificative statistic față de lotul Stres pentru GSH ( $1,40 \pm 0,11$  vs.  $1,46 \pm 0,32$ ,  $p > 0,05$ , respectiv  $1,40 \pm 0,11$  vs.  $1,37 \pm 0,13$ ,  $p > 0,05$ ). Raportul GSH/GSSG nu a diferit semnificativ statistic între loturile Control și Stres ( $6,41 \pm 0,85$  vs.  $7,16 \pm 1,65$ ,  $p > 0,05$ ) și nici între loturile Stres și Stres+ESC5 sau Stres+ESC5/10 ( $7,16 \pm 1,65$  vs.  $8,37 \pm 1,48$ ,  $p > 0,05$ , respectiv  $7,16 \pm 1,65$  vs.  $6,77 \pm 1,08$ ,  $p > 0,05$ ). Între loturile Control și Stres nu au fost diferențe semnificative statistic în ceea ce

privește catalaza ( $0,82 \pm 0,08$  vs.  $0,73 \pm 0,05$ ,  $p > 0,05$ ). Totodată, nici între lotul Stres și lotul Stres+ESC5 sau Stres+ESC5/10 nu au fost diferențe care să atingă pragul de semnificație statistică pentru catalază ( $0,73 \pm 0,05$  vs.  $0,70 \pm 0,01$ ,  $p > 0,05$ ; respectiv,  $0,73 \pm 0,05$  vs.  $0,69 \pm 0,10$ ,  $p > 0,05$ ).

### **Caspaza-3 din ficat, rinichi și inimă**

Animalele supuse stresului cronic au avut niveluri mai ridicate ale activității caspazei-3 în miocard față de lotul Control, însă diferențele nu au fost semnificative statistic ( $0,67 \pm 0,13$  vs.  $0,49 \pm 0,02$ ,  $p > 0,05$ ). Administrarea de escitalopram în ambele doze (5mg/kg corp/zi sau regimul de titrare la 10mg/kg corp/zi) a determinat o scădere a nivelului caspazei-3 în comparație cu lotul Stres dar fără diferențe semnificative statistic ( $0,67 \pm 0,13$  vs.  $0,49 \pm 0,25$ ,  $p > 0,05$ ; respectiv  $0,67 \pm 0,13$  vs.  $0,45 \pm 0,01$ ,  $p > 0,05$ ).

Stresul cronic nu a determinat modificări semnificative statistic pentru nivelurile caspazei-3 din rinichi față de lotul Control ( $1,15 \pm 0,39$  vs.  $1,39 \pm 0,25$ ,  $p > 0,05$ ). De asemenea, administrarea de escitalopram (5mg/kg corp/zi sau regimul de titrare la 10mg/kg corp/zi) nu a influențat activitatea caspazei-3 față de lotul supus stresului cronic și netratat ( $1,30 \pm 0,33$  vs.  $1,15 \pm 0,39$ ,  $p > 0,05$ ; respectiv  $1,35 \pm 0,67$  vs.  $1,15 \pm 0,39$ ,  $p > 0,05$ ).

La nivelul ficatului, stresul cronic nu a influențat semnificativ statistic activitatea caspazei-3 comparativ cu lotul martor ( $0,40 \pm 0,11$  vs.  $0,43 \pm 0,13$ ,  $p > 0,05$ ). Administrarea de escitalopram în doză de 5mg/kg corp/zi apoi 10mg/kg corp/zi a determinat o scădere a caspazei-3 față de lotul Stres, însă diferența nu a atins pragul de semnificație statistică ( $0,36 \pm 0,02$  vs.  $0,45 \pm 0,06$ ,  $p > 0,05$ ).

### **3.4. Discuții**

Bolile cardio- vasculare reprezintă cauza principală de mortalitate la nivel mondial [94]. Totodată, stresul este un factor important care influențează bolile cardio-vasculare prin diferite mecanisme: indirecte - crește predispoziția pentru apariția unor factori de risc (spre ex. fumatul), directe - accelerează progresia procesului aterosclerotic sau tip trigger – conduce la apariția evenimentelor cardiace acute [95]. O serie de cercetări a examinat relația dintre stresul psihologic cronic, depresie și stresul oxidativ de la nivelul inimii. Hasan și colab. (2011) au demonstrat că stresul cronic a determinat scăderea apărării antioxidante (SOD, catalază, glutathione S-transferază, glutathione reductaza și GSH) din inimă și creșterea peroxidării lipidice cuantificată prin MDA [96]. Rezultatele raportate de studiul de față arată că stresul

cronic, mediu și imprevizibil a determinat o creștere semnificativă a nivelului de MDA . Totodată, la nivelul inimii, stresul cronic a determinat un trend descrescător al nivelurilor de GSH și GSH/GSSG.

Cercetările din literatură au investigat efectul antidepresivelor asupra parametrilor de stres oxidativ și rezervei antioxidante. Escitalopramul administrat unui model animal de insuficiență cardiacă a determinat reducerea anxietății dar și a nivelurilor de lactat dehidrogenază și MDA de la nivelul țesutului cardiac [97]. Pe de altă parte, administrarea de fluoxetină la șobolani supuși stresului prin izolare socială nu a avut un efect semnificativ asupra disfuncției mitocondriale și sintezei crescute de SRO de la nivelul țesutului cardiac [98]. Matchkov și colab. (2015) au documentat creșterea GSH ca urmare a administrării de escitalopram pe un model de șobolan supus stresului cronic. Pe de altă parte, escitalopram nu a avut un efect la nivelul MDA [60]. Rezultate prezentate în teza de față confirmă unele cercetări din literatură. Deși escitalopramul nu a diminuat peroxidarea lipidică la animalele depresive prin stres cronic, a condus la creșterea apărării antioxidante, respectiv la creșterea GSH și GSH/GSSG.

Efectul stresului cronic și al depresiei experimentale asupra echilibrului redox din rinichi au fost studiate de Samarghandian și colab. (2016) și Samarghandian și colab. (2017). Rezultatele obținute de aceștia au arătat că modelul animal de stres cronic prin contenționare fizică pe șobolan a condus la creșterea MDA și la scăderea GSH și a activității SOD, GPx, glutathion reductazei, catalazei [99, 100]. În rinichi, pe modelul pe șobolan de depresie prin stres cronic, mediu și imprevizibil, peroxidarea lipidică (substanțele reactive ale acidului tiobarbituric) s-a intensificat, însă apărarea antioxidantă enzimatică (SOD, catalază) și non-enzimatică (GSH) a scăzut [101, 102]. Rezultatele raportate în teza de față arată că stresul cronic, mediu și imprevizibil nu a determinat modificări semnificative la nivelul rinichiului în ceea ce privește stresul oxidativ sau activitatea caspazei-3.

Bolile hepatice cronice se asociază cu TDM, iar pacienții cu depresie au un risc cu 40-50% mai mare pentru steatoză hepatică non-alcoolică [103, 104]. Duda și colab. (2016) au examinat efectele stresului cronic, mediu și imprevizibil la nivelul ficatului de șobolan. Rezultatele obținute arată că depresia experimentală a determinat creșterea nivelului de SRO, a nivelului de grupări sulfhidril non-proteice și de sulfur sulfane, precum și a MDA. Totodată, stresul cronic a condus, cel mai probabil ca efect compensator, și la creșterea activității GPx și catalazei, însă nu și la cea a SOD [105]. Lopez-Lopez și colab. (2016) au examinat în dinamică parametrii de stres oxidativ și cei inflamatori din ficat. Valorile GSH au crescut la 20 de zile de stres cronic, însă, pe măsură ce stresul s-a cronicizat, nivelul de GSH a revenit la normal. Lopez-



Lopez și colab. (2016) au mai demonstrat că SOD și capacitatea antioxidantă totală nu au fost afectate de stresul cronic și imprevizibil, indiferent de momentul evaluării, însă nivelul de peroxidare lipidică, cuantificat prin măsurarea lipoperoxizilor, s-a intensificat în timp, fiind semnificativ mai crescut la 60 de zile [106]. Rezultatele din studiul de față arată că stresul cronic, mediu și imprevizibil nu a determinat modificări ale parametrilor de stres oxidativ, ale activității antioxidante sau ale gradului de apoptoză. Administrarea de fluoxetină a determinat pe un model de depresie prin izolare socială creșterea GPx, glutathione reductazei și a capacității totale antioxidante dar scăderea SOD [107]. În studiul nostru, escitalopramul, un antidepresiv cu efect farmacologic asemănător fluoxetinei, nu a influențat parametrii de stres oxidativ, apărarea antioxidantă enzimatică și non-enzimatică sau caspaza-3.

## 4. Concluzii și contribuții originale și inovative ale tezei

### 4.1. Concluzii

În studiul 1 „*Utilitatea clinică a unor noi indici hematologici de inflamație ca markeri biologici în tulburările afective*” am prezentat rezultate importante referitoare la relația dintre RNL, RML, RPL și IIS, ca biomakeri inflamatori, și TAB și TDM. Rezultatele obținute demonstrează că activarea imun-inflamatorie, cuantificată prin indicii hematologici de inflamație, a fost mai crescută la pacienții cu episod maniacal comparativ cu cei aflați în depresie bipolară sau unipolară. Totodată, cercetarea de față a arătat că RNL și IIS sunt mai crescute în depresia bipolară față de cea unipolară. Un aspect important, care contribuie la caracterul de originalitate a acestei teze, este faptul că am arătat că RNL este un predictor pentru depresia bipolară. Aceste rezultate sugerează că RNL ar putea fi propus ca factor de risc pentru depresie bipolară la pacienții cu episod depresiv. Rezultatele studiului au adus argumente și pentru ipoteza conform căreia răspunsul inflamator este modulat de tipul de episod afectiv.

Studiul 2 „*Rolul stresului oxidativ, caspazei-3, BDNF și MeCP2 în patogeneza depresiei experimentale și în efectul terapeutic al escitalopramului*” aduce informații importante referitoare la potențialele mecanisme care stau la baza interacțiunii complexe între stresul cronic, depresie și tratamentul cu escitalopram. Acest studiu a arătat că escitalopram a blocat instalarea stresului oxidativ și a crescut apărarea antioxidantă la nivelul hipocampului și a cortexului frontal, în asociere cu ameliorarea simptomelor depresive. De asemenea, escitalopramul a dovedit a avea efecte anti-apoptotice și pro-neurotrofice prin scăderea caspazei-3, creșterea MeCP2 și modularea sintezei de BDNF, în funcție de zona cerebrală analizată. Escitalopram a avut un efect modulator și asupra numărului de oligodendrocite. Toate aceste efecte au fost oglindite de aspectul histologic ameliorat al neuronilor, ceea ce a sugerat un efect protectiv al escitalopramului în ceea ce privește injuria neuronală asociată depresiei.

În studiu 3 „*Implicațiile sistemice ale depresiei experimentale și ale tratamentului cu escitalopram*” sunt prezentate rezultate referitoare la modificările de stres oxidativ și apoptoză din cord, rinichi și ficat la un model animal de depresie indusă prin stres cronic, mediu și imprevizibil. De asemenea, am prezentat și efectele terapiei cu escitalopram, în 2 regimuri de dozare, asupra aceluiași parametrii. Această cercetare arată că depresia experimentală prin stres cronic determină creșterea peroxidării lipidice la nivelul cordului iar terapia cu escitalopram doar amplifică apărarea antioxidantă în acest organ. Stresul cronic nu influențează activitatea

caspazei-3 din inimă. În acest studiu, depresia experimentală și administrarea de escitalopram nu au o implicație semnificativă asupra biomarkerilor analizați în ficat și rinichi.

#### **4.2. Contribuții originale și inovative ale tezei**

- Raportul Neutrofile/Limfocite și Indexul Imun-Inflamator Sistemic sunt mai mari în depresia bipolară față de depresia unipolară
- Raportul Neutrofile/Limfocite este un predictor pentru depresia bipolară, astfel că pacienții cu depresie cu valori mai mari ale RNL au de 5,31 mai multe șanse să aibă depresie de tip bipolar
- Identificarea unor valori cut-off pentru RNL și IIS cu rol în discriminarea între depresia unipolară și bipolară
- Având în vedere datele contradictorii, insuficiente și limitate din literatura actuală, rezultatele prezentate aduc argumente necesare și noi pentru implicarea stresului oxidativ în patogeneza depresiei induse de stresul cronic
- Escitalopram scade nivelul de MDA din hipocamp, dar nu și din cortexul frontal, la animalele cu depresie indusă prin stres cronic, mediu și imprevizibil
- Escitalopram crește GSH și GSH/GSSG în hipocamp la animalele cu depresie indusă prin stres cronic, mediu și imprevizibil
- Escitalopram a redus activitatea caspazei-3 din hipocamp la animalele cu depresie indusă prin stres cronic, mediu și imprevizibil
- Depresia indusă prin stres cronic are un efect asupra BDNF dependent de regiunea cerebrală
- Depresia indusă prin stres cronic nu determină modificări ale nivelurilor de MeCP2 din hipocamp sau cortexul frontal
- Escitalopram modulează nivelul de MeCP2 în funcție de doză
- Depresia indusă prin stres cronic, mediu și imprevizibil determină reducerea numărului de oligodendrocite din cortexul frontal
- Doza de escitalopram titrată la 10mg/kg corp/zi determină creșterea numărului de oligodendrocite din cortexul frontal
- Având în vedere datele contradictorii, insuficiente și limitate din literatura actuală, rezultatele raportate de această cercetare aduc argumente necesare și noi pentru efectul antioxidant al escitalopramului la nivelul cordului unui model animal de depresie prin stres cronic, mediu și imprevizibil

## Bibliografie selectivă

- [1] Hirschfeld R, Harris Chair TH, Davis Professor HK. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders* 2014; 169: S12–S16.
- [2] Merikangas KR, Jin R, He J-P, et al. Prevalence and Correlates of Bipolar Spectrum Disorder in the World Mental Health Survey Initiative. *Archives of General Psychiatry* 2011; 68: 241–251.
- [3] Malhi GS, Mann JJ. Depression. *The Lancet* 2018; 392: 2299–2312.
- [4] Grande I, Berk M, Birmaher B, et al. Bipolar disorder. *The Lancet*; 387. Epub ahead of print April 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00241-X.
- [5] Hirschfeld RMA, Cass AR, Holt DCL, et al. Screening for Bipolar Disorder in Patients Treated for Depression in a Family Medicine Clinic. *The Journal of the American Board of Family Medicine* 2005; 18: 233–239.
- [6] Gitlin MJ. Antidepressants in bipolar depression: an enduring controversy. *International Journal of Bipolar Disorders* 2018; 6: 25.
- [7] Zou W, Feng R, Yang Y. Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. *PLOS ONE* 2018; 13: e0197267.
- [8] Munkholm K, Braüner JV, Kessing LV, et al. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research* 2013; 47: 1119–1133.
- [9] Bai S, Guo W, Feng Y, et al. Efficacy and safety of anti-inflammatory agents for the treatment of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020; 91: 21–32.
- [10] Köhler-Forsberg O, N. Lydholm C, Hjorthøj C, et al. Efficacy of anti-inflammatory treatment on major depressive disorder or depressive symptoms: meta-analysis of clinical trials. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 2019; 139: 404–419.
- [11] Rosenblat JD, Kakar R, Berk M, et al. Anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar depression: a systematic review and meta-analysis. *Bipolar Disorders* 2016; 18: 89–101.
- [12] Rosenblat JD. Targeting the immune system in the treatment of bipolar disorder. *Psychopharmacology* 2019; 236: 2909–2921.

- [13] Dionisie V, Filip GA, Manea MC, et al. The anti-inflammatory role of SSRI and SNRI in the treatment of depression: a review of human and rodent research studies. *Inflammopharmacology* 2021; 29: 75–91.
- [14] Duman RS. A Molecular and Cellular Theory of Depression. *Archives of General Psychiatry* 1997; 54: 597–606.
- [15] Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Molecular Psychiatry* 2014; 19: 791–800.
- [16] Karege F, Perret G, Bondolfi G, et al. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Research* 2002; 109: 143–148.
- [17] Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, et al. Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological Psychiatry* 2005; 57: 1068–1072.
- [18] Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, et al. Effects of Stress on Neurotrophic Factor Expression in the Rat Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995; 771: 234–239.
- [19] Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, et al. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience* 2003; 121: 847–853.
- [20] Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, et al. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neuroscience Research* 1997; 28: 103–110.
- [21] Seo MK, Lee CH, Cho HY, et al. Effects of antipsychotic drugs on the expression of synapse-associated proteins in the frontal cortex of rats subjected to immobilization stress. *Psychiatry Research* 2015; 229: 968–974.
- [22] Roceri M, Cirulli F, Pessina C, et al. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biological Psychiatry*; 55. Epub ahead of print 2004. DOI: 10.1016/j.biopsych.2003.12.011.
- [23] Dionisie V, Filip GA, Manea MC, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, a Novel Inflammatory Marker, as a Predictor of Bipolar Type in Depressed Patients: A Quest for Biological Markers. *Journal of Clinical Medicine* 2021; 10: 1924.

- [24] Inanli I, Aydin M, Çaliskan AM, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio, monocyte/lymphocyte ratio, and mean platelet volume as systemic inflammatory markers in different states of bipolar disorder. *Nordic Journal of Psychiatry* 2019; 73: 372–379.
- [25] Kalelioglu T, Akkus M, Karamustafalioglu N, et al. Neutrophil-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratios as inflammation markers for bipolar disorder. *Psychiatry Research* 2015; 228: 925–927.
- [26] Mayda H, Ahsen A, Bagcioglu E, et al. Effect of Increased Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) and Decreased Mean Platelet Volume (MPV) Values on Inflammation in Acute Mania. *Noro Psikiyatri Arsivi* 2016; 53: 317–320.
- [27] Özdin S, Usta MB. A comparison of inflammatory markers in manic and euthymic states of bipolar disorder. *Nordic Journal of Psychiatry* 2021; 75: 124–129.
- [28] Özdin S, Sarisoy G, Böke Ö. A comparison of the neutrophil-lymphocyte, platelet-lymphocyte and monocyte-lymphocyte ratios in schizophrenia and bipolar disorder patients – a retrospective file review. *Nordic Journal of Psychiatry* 2017; 71: 509–512.
- [29] Mert DG, Terzi H. Mean platelet volume in bipolar disorder: the search for an ideal biomarker. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2016; Volume 12: 2057–2062.
- [30] Mazza MG, Lucchi S, Tringali AGM, et al. Neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio in mood disorders: A meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2018; 84: 229–236.
- [31] Wang J, Zhou D, Dai Z, et al. Association Between Systemic Immune-Inflammation Index and Diabetic Depression. *Clinical Interventions in Aging* 2021; 16: 97–105.
- [32] Zhou L, Ma X, Wang W. Inflammation and Coronary Heart Disease Risk in Patients with Depression in China Mainland: A Cross-Sectional Study. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2020; 16: 81–86.
- [33] Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2017; 360: 201–205.
- [34] Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, et al. Lipopolysaccharide Induces Rac1-dependent Reactive Oxygen Species Formation and Coordinates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Secretion through IKK Regulation of NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 30188–30198.
- [35] Mucci F, Marazziti D, della Vecchia A, et al. State-of-the-Art: Inflammatory and Metabolic Markers in Mood Disorders. *Life* 2020; 10: 82.

- [36] Tomaz V de S, Chaves Filho AJM, Cordeiro RC, et al. Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro- and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. *Journal of Affective Disorders* 2020; 268: 188–200.
- [37] Wang Q, Dong X, Wang Y, et al. Adolescent escitalopram prevents the effects of maternal separation on depression- and anxiety-like behaviours and regulates the levels of inflammatory cytokines in adult male mice. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2017; 62: 37–45.
- [38] Eller T, Vasar V, Shlik J, et al. Pro-inflammatory cytokines and treatment response to escitalopram in major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2008; 32: 445–450.
- [39] Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International* 2009; 54: 358–362.
- [40] Dionisie V, Ciobanu AM, Toma VA, et al. Escitalopram targets oxidative stress, caspase-3, bdnf and mecp2 in the hippocampus and frontal cortex of a rat model of depression induced by chronic unpredictable mild stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22: 7483.
- [41] Martín-Hernández D, Bris ÁG, MacDowell KS, et al. Modulation of the antioxidant nuclear factor (erythroid 2-derived)-like 2 pathway by antidepressants in rats. *Neuropharmacology* 2016; 103: 79–91.
- [42] Rai A, Gill M, Kinra M, et al. Catechin ameliorates depressive symptoms in Sprague Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. *Biomedical Reports* 2019; 11: 79–84.
- [43] Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, et al. Activation of the TrkB Neurotrophin Receptor Is Induced by Antidepressant Drugs and Is Required for Antidepressant-Induced Behavioral Effects. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23: 349–357.
- [44] Monteggia LM, Barrot M, Powell CM, et al. Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 10827–10832.
- [45] Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, et al. TrkB Regulates Hippocampal Neurogenesis and Governs Sensitivity to Antidepressive Treatment. *Neuron* 2008; 59: 399–412.
- [46] Adachi M, Barrot M, Autry AE, et al. Selective Loss of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Dentate Gyrus Attenuates Antidepressant Efficacy. *Biological Psychiatry* 2008; 63: 642–649.

- [47] Bath KG, Jing DQ, Dincheva I, et al. BDNF Val66Met Impairs Fluoxetine-Induced Enhancement of Adult Hippocampus Plasticity. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 1297–1304.
- [48] Chen Z-Y, Jing D, Bath KG, et al. Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety-Related Behavior. *Science* 2006; 314: 140–143.
- [49] Leßmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neuroscience Research* 2009; 65: 11–22.
- [50] Mazza MG, Tringali AGM, Rossetti A, et al. Cross-sectional study of neutrophil-lymphocyte, platelet-lymphocyte and monocyte-lymphocyte ratios in mood disorders. *General Hospital Psychiatry* 2019; 58: 7–12.
- [51] Fusar-Poli L, Natale A, Amerio A, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte, Platelet-to-Lymphocyte and Monocyte-to-Lymphocyte Ratio in Bipolar Disorder. *Brain Sciences* 2021; 11: 58.
- [52] Hurley LL, Akinfiresoye L, Kalejaiye O, et al. Antidepressant effects of resveratrol in an animal model of depression. *Behavioural Brain Research* 2014; 268: 1–7.
- [53] Gamberini MT, Rodrigues DS, Rodrigues D, et al. Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 168: 45–49.
- [54] Gill M, Kinra M, Rai A, et al. Evaluation of antidepressant activity of methanolic extract of *Saraca asoca* bark in a chronic unpredictable mild stress model. *NeuroReport* 2018; 29: 134–140.
- [55] Scotton E, Colombo R, Reis JC, et al. BDNF prevents central oxidative damage in a chronic unpredictable mild stress model: The possible role of PRDX-1 in anhedonic behavior. *Behavioural Brain Research* 2020; 378: 112245.
- [56] Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, et al. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochemistry International* 2012; 61: 1072–1080.
- [57] Liu J, Wang X, Shigenaga MK, et al. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996; 10: 1532–8.
- [58] Fontella FU, Siqueira IR, Vasconcellos APS, et al. Repeated Restraint Stress Induces Oxidative Damage in Rat Hippocampus. *Neurochemical Research* 2005; 30: 105–111.



- [59] Wang C, Wu H, Jing X, et al. Oxidative Parameters in the Rat Brain of Chronic Mild Stress Model for Depression: Relation to Anhedonia-Like Responses. *The Journal of Membrane Biology* 2012; 245: 675–681.
- [60] Matchkov V v., Kravtsova V v., Wiborg O, et al. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2015; 309: R814–R823.
- [61] Che Y, Zhou Z, Shu Y, et al. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neuroscience Letters* 2015; 584: 208–213.
- [62] Eren İ, Nazıroğlu M, Demirdaş A. Protective Effects of Lamotrigine, Aripiprazole and Escitalopram on Depression-induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Neurochemical Research* 2007; 32: 1188–1195.
- [63] Kurhe Y, Radhakrishnan M, Gupta D, et al. QCM-4 a novel 5-HT<sub>3</sub> antagonist attenuates the behavioral and biochemical alterations on chronic unpredictable mild stress model of depression in Swiss albino mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 66: 122–132.
- [64] McEwen BS, Gianaros PJ. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. *Annual Review of Medicine* 2011; 62: 431–445.
- [65] Orlovsky MA, Dosenko VE, Spiga F, et al. Hippocampus remodeling by chronic stress accompanied by GR, proteasome and caspase-3 overexpression. *Brain Research* 2014; 1593: 83–94.
- [66] Liu Y, Ma S, Qu R. SCLM, total saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang, reduces chronic mild stress-induced apoptosis in the hippocampus in mice. *Pharmaceutical Biology* 2010; 48: 840–848.
- [67] Wang J, Xu S, Chen X, et al. Antidepressant effect of EGCG through the inhibition of hippocampal neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress-induced depression rat model. *Journal of Functional Foods* 2020; 73: 104106.
- [68] Filipović D, Zlatković J, Inta D, et al. Chronic isolation stress predisposes the frontal cortex but not the hippocampus to the potentially detrimental release of cytochrome c from mitochondria and the activation of caspase-3. *Journal of Neuroscience Research* 2011; 89: 1461–1470.
- [69] Bachis A, Cruz MI, Nosheny RL, et al. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 2008; 442: 104–108.

- [70] Yang L, Zheng L, Wan Y, et al. Metoprolol, N-Acetylcysteine, and Escitalopram Prevents Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression by Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress. *Frontiers in Psychiatry* 2018; 9: 696.
- [71] Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *Journal of Psychiatric Research* 2010; 44: 808–816.
- [72] Nowacka M, Obuchowicz E. BDNF and VEGF in the pathogenesis of stress-induced affective diseases: An insight from experimental studies. *Pharmacological Reports* 2013; 65: 535–546.
- [73] Schulte-Herbrüggen O, Fuchs E, Abumaria N, et al. Effects of escitalopram on the regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor protein levels in a rat model of chronic stress. *Journal of Neuroscience Research* 2009; 87: 2551–2560.
- [74] Alboni S, Benatti C, Capone G, et al. Time-dependent effects of escitalopram on brain derived neurotrophic factor (BDNF) and neuroplasticity related targets in the central nervous system of rats. *European Journal of Pharmacology* 2010; 643: 180–187.
- [75] Seo MK, Lee JG, Park SW. Effects of escitalopram and ibuprofen on a depression-like phenotype induced by chronic stress in rats. *Neuroscience Letters* 2019; 696: 168–173.
- [76] Doron R, Lotan D, Versano Z, et al. Escitalopram or Novel Herbal Mixture Treatments during or following Exposure to Stress Reduce Anxiety-Like Behavior through Corticosterone and BDNF Modifications. *PLoS ONE* 2014; 9: e91455.
- [77] SU M, HONG J, ZHAO Y, et al. MeCP2 controls hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression via homeostatic interactions with microRNA-132 in rats with depression. *Molecular Medicine Reports* 2015; 12: 5399–5406.
- [78] Hutchinson AN, Deng J v., Cohen S, et al. Phosphorylation of MeCP2 at Ser421 Contributes to Chronic Antidepressant Action. *Journal of Neuroscience* 2012; 32: 14355–14363.
- [79] Webb LM, Phillips KE, Ho MC, et al. The Relationship between DNA Methylation and Antidepressant Medications: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21: 826.
- [80] Jin H-J, Pei L, Li Y-N, et al. Alleviative effects of fluoxetine on depressive-like behaviors by epigenetic regulation of BDNF gene transcription in mouse model of post-stroke depression. *Scientific Reports* 2017; 7: 14926.

- [81] Kim J-M, Stewart R, Kang H-J, et al. BDNF methylation and depressive disorder in acute coronary syndrome: The K-DEPACS and EsDEPACS studies. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 62: 159–165.
- [82] Kuhn S, Gritti L, Crooks D, et al. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* 2019; 8: 1424.
- [83] Edgar N, Sibille E. A putative functional role for oligodendrocytes in mood regulation. *Translational Psychiatry* 2012; 2: e109–e109.
- [84] Luo Y, Xiao Q, Wang J, et al. Running exercise protects oligodendrocytes in the medial prefrontal cortex in chronic unpredictable stress rat model. *Translational Psychiatry* 2019; 9: 322.
- [85] Wang J, Luo Y, Tang J, et al. The effects of fluoxetine on oligodendrocytes in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depressed model rats. *Journal of Comparative Neurology* 2020; 528: 2583–2594.
- [86] Tang J, Liang X, Zhang Y, et al. The effects of running exercise on oligodendrocytes in the hippocampus of rats with depression induced by chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin* 2019; 149: 1–10.
- [87] Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic localization of PSD-95 is regulated by all three pathways downstream of TrkB signaling. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2014; 6: 6.
- [88] Yoshii A, Constantine-Paton M. BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience* 2007; 10: 702–711.
- [89] Luo J, Zhang L, Ning N, et al. Neotrofin reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior via regulating BDNF, PSD-95 and synaptophysin expression in rat. *Behavioural Brain Research* 2013; 253: 48–53.
- [90] Liu S-C, Hu W-Y, Zhang W-Y, et al. Paeoniflorin attenuates impairment of spatial learning and hippocampal long-term potentiation in mice subjected to chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 2019; 236: 2823–2834.
- [91] Qiao H, An S-C, Xu C, et al. Role of proBDNF and BDNF in dendritic spine plasticity and depressive-like behaviors induced by an animal model of depression. *Brain Research* 2017; 1663: 29–37.
- [92] Zhu Y, Duan X, Cheng X, et al. Kai-Xin-San, a standardized traditional Chinese medicine formula, up-regulates the expressions of synaptic proteins on hippocampus of

- chronic mild stress induced depressive rats and primary cultured rat hippocampal neuron. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 193: 423–432.
- [93] Li X-L, Yuan Y-G, Xu H, et al. Changed Synaptic Plasticity in Neural Circuits of Depressive-Like and Escitalopram-Treated Rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2015; 18: pyv046.
- [94] Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine* 2006; 3: e442.
- [95] Steptoe A, Kivimäki M. Stress and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* 2012; 9: 360–370.
- [96] Hasan S, Bilal N, Naqvi S, et al. Multivitamin–Mineral and Vitamins (E + C) Supplementation Modulate Chronic Unpredictable Stress-Induced Oxidative Damage in Brain and Heart of Mice. *Biological Trace Element Research* 2011; 142: 589–597.
- [97] Anwar MJ, Pillai KK, Samad A, et al. Effect of escitalopram on cardiomyopathy-induced anxiety in mice. *Human & Experimental Toxicology* 2013; 32: 632–639.
- [98] Sonei N, Amiri S, Jafarian I, et al. Mitochondrial dysfunction bridges negative affective disorders and cardiomyopathy in socially isolated rats: Pros and cons of fluoxetine. *The World Journal of Biological Psychiatry* 2017; 18: 39–53.
- [99] Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, et al. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. *Biochemistry Research International* 2016; 2016: 2645237.
- [100] Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 87: 223–229.
- [101] Demirdaş A, Nazıroğlu M, Ünal GÖ. Agomelatine reduces brain, kidney and liver oxidative stress but increases plasma cytokine production in the rats with chronic mild stress-induced depression. *Metabolic Brain Disease* 2016; 31: 1445–1453.
- [102] Lee K, Otgonsuren M, Younoszai Z, et al. Association of Chronic Liver Disease with Depression: A Population-Based Study. *Psychosomatics* 2013; 54: 52–59.
- [103] Xiao J, Lim LKE, Ng CH, et al. Is Fatty Liver Associated With Depression? A Meta-Analysis and Systematic Review on the Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Depression and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Medicine* 2021; 8: 691696.
- [104] Shea S, Lionis C, Kite C, et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Potential Links to Depression, Anxiety, and Chronic Stress. *Biomedicines* 2021; 9: 1697.

- [105] Duda W, Curzytek K, Kubera M, et al. The Effect of Chronic Mild Stress and Imipramine on the Markers of Oxidative Stress and Antioxidant System in Rat Liver. *Neurotoxicity Research* 2016; 30: 173–184.
- [106] López-López AL, Jaime HB, Escobar Villanueva M del C, et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiology & Behavior* 2016; 161: 15–23.
- [107] Zlatković J, Todorović N, Tomanović N, et al. Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: A histopathological study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 59: 20–30.