

## УЧАСТИЕ ДИГИДРОПИРИМИДИНАЗА-ПОДОБНОГО БЕЛКА 2 В РЕГУЛЯЦИИ ТРЕВОЖНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Ш. М. Гулиева<sup>1</sup>, А. А. Мехтиев<sup>2</sup>, \*

<sup>1</sup>Нахичеванский государственный университет, Нахичевань, Азербайджан

<sup>2</sup>Институт физиологии им. академика Абдуллы Гараева НАН, Баку, Азербайджан

\*E-mail: arifmekht@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.06.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

Целью исследования было изучение роли дигидропиримидиназа-подобного белка 2 (ДПБ2) в регуляции тревожности у человека и животных. Для этого определяли уровень ДПБ2 в тромбоцитах и слюне и уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови у пациентов, имевших назначение на операцию, а также изучали влияние ДПБ2 на поведение крыс в модели приподнятого крестообразного лабиринта. Пробы крови у пациентов, испытывавших ощущение тревожности в день операции, забирали из вены в пробирки, содержавшие 5%-й раствор ЭДТА в качестве антикоагулянта, выделяли тромбоциты и сыворотку, и методом непрямого иммуноферментного анализа в тромбоцитах определяли уровень ДПБ2, а в сыворотке крови – уровень естественных аутоантител к ДПБ2. В слюне у этих больных также определяли уровень ДПБ2. Результаты исследования выявили повышение уровня ДПБ2 в тромбоцитах ( $p < 0.05$  по  $t$ -критерию Стьюдента) и уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке ( $p < 0.001$ ) у пациентов по сравнению со здоровыми испытуемыми. Также выявлено увеличение уровня стрессорного гормона кортизола в сыворотке крови у пациентов ( $p < 0.01$ ). В то же время в слюне у них было обнаружено снижение уровня ДПБ2 ( $p < 0.01$ ). Внутримозговое введение крысам ДПБ2 вызывало увеличение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах лабиринта относительно крыс контрольной группы (инактивированный ДПБ2;  $p < 0.01$  по  $U$ -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни), что свидетельствует о снижении у них уровня тревожности. Основываясь на повышении уровней ДПБ2 в тромбоцитах и аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови, а также снижении его уровня в слюне при параллельном повышении уровня кортизола в сыворотке у пациентов, испытывавших ощущение тревожности, можно сделать заключение о том, что определение уровня ДПБ2 и естественных аутоантител к ДПБ2 в указанных средах организма может служить показателем адаптации к уровню тревожности у человека.

**Ключевые слова:** пациенты, тромбоциты, сыворотка крови, слюна, дигидропиримидиназа-подобный белок 2, естественные аутоантитела, кортизол, приподнятый крестообразный лабиринт

**DOI:** 10.31857/S0869813923010077, **EDN:** IZMQDE

Современная жизнь человека характеризуется высокими скоростями, информационной перегруженностью и чрезвычайным возбуждением. Следует указать, что определенные виды деятельности требуют спокойного и уравновешенного психоэмоционального состояния, правильной и безошибочной оценки часто возникаю-

щих непредвиденных ситуаций и принятия быстрых и адекватных решений в подобных ситуациях. К настоящему времени доказано, что причиной более, чем 80% авиакатастроф является человеческий фактор, т.е. ошибки авиадиспетчеров, обусловленные неверным или несвоевременным принятием решений [1]. В этой связи представляют интерес изучение вырабатываемого навыка подкрепления/наказания у пациентов с патологией генерализованного возбуждения, с генерализованной социальной фобией и у здоровых испытуемых. Использование этого навыка позволяет оценить способность индивидуумов определять значимость объектов и осуществлять выбор между ними с целью усиления подкрепления и ослабления эффекта наказания. При этом было обнаружено, что у пациентов с патологией общего возбуждения наблюдалось нарушение выполнения навыка подкрепления/наказания при сравнении как с пациентами с генерализованной социальной фобией, так и со здоровыми испытуемыми [2]. Аналогичным образом, исследование, выполненное на субклинических индивидуумах, обладавших повышенным уровнем тревожности, показало, что в большинстве случаев такие участники демонстрировали признаки нарушения принятия правильного решения: выбор правильных решений у лиц с высоким уровнем тревожности был значительно ниже в сравнении с индивидуумами с низким уровнем тревожности [3]. При анализе пациентов с генерализованной тревожностью в модели пассивного избегания было обнаружено, что пациенты допускали больше ошибок при выборе пассивного избегания, чем здоровые испытуемые, причем уровень совершаемых ошибочных реакций коррелировал с уровнем их функциональных нарушений [4]. Принимая во внимание приведенные аргументы, становится очевидным, что одной из важных проблем современной жизни является разработка точного, быстрого и неинвазивного метода оценки психоэмоционального состояния и/или переутомления лиц, выполняющих свои профессиональные обязанности в сферах деятельности, несовместимых с принятием ошибочных решений.

Рассматривая возможные молекулярные агенты, которые могли бы быть использованы в качестве надежных индикаторов психоэмоционального состояния человека, следует выделить серотонинергическую систему головного мозга, наиболее быстро и адекватно реагирующую на изменение психоэмоционального состояния индивидуумов. В частности, установлено участие серотонинергической системы в патогенезе депрессий и соответствие изменений уровня серотонина в тромбоцитах степени тяжести заболевания [5, 6]. В этой связи представляет интерес изучение дигидропиримидиназа подобного белка 2 (ДПБ2), находящегося в прямой зависимости от уровня серотонина в структурах головного мозга [7].

ДПБ2, также называемый в англоязычной литературе “collapsing-response mediator protein (CRMP2)”, экспрессируется на ранней стадии нейронной дифференциации, совпадающей с очень активным периодом развития нейронов, включающим формирование аксонов и синаптических связей [8]. Кроме того, ДПБ2 был обнаружен в растущих аксонах, и была выявлена его способность индуцировать аксональный спраунтинг у нейронов гиппокампа [9]. Методом двумерного дифференциального электрофореза в геле с последующей идентификацией белковых фракций методом масс-спектрометрии было продемонстрировано изменение уровня ДПБ2 в вентральном гиппокампе у крыс под влиянием продолжительного умеренного стресса, а также под влиянием транквилизатора эсциталопрама, нивелирующего его воздействие [10]. Наряду с этим было показано, что отсроченные последствия отнятия крысят от матерей (материнская депривация) проявляются в виде депрессивно-подобного поведения во взрослом состоянии и сопровождаются нарушением функционирования сигнального пути, опосредованного ДПБ2, а также повышенным фосфорилированием ДПБ2 в гиппокампе, снижающим его способность к взаимодействию с тубулином [11]. Уровень метилирования ДНК в области

промотора ДПБ2 в гиппокампе у крыс, подвергнутых воздействию продолжительного непредсказуемого умеренного стресса, также был значительно выше, чем у животных контрольной группы. Кроме того, уровни экспрессии мРНК ДПБ2 и самого ДПБ2 в гиппокампе и префронтальной коре в группе подвергнутых стрессу крыс были значительно ниже, чем у контрольных животных [12].

В задачу проведенного нами исследования входило определение уровня ДПБ2 в тромбоцитах и слюне людей, испытывающих выраженную тревожность, уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке их крови, а также влияние внутримозгового введения ДПБ2 на поведение крыс в модели приподнятого крестообразного лабиринта, которая широко применяется в мировой практике для исследования состояния тревожности.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на пациентах обоего пола в возрасте до 40 лет, которым было назначено проведение планового оперативного вмешательства в хирургических отделениях Центральной больницы Нахичеванской Автономной Республики (г. Нахичевань, ул. А. Алиева, 1), НИИ Клинической хирургии им. М. Топчубашева (г. Баку, ул. А.М. Шариф-заде, 196) и Премиум клиники (г. Баку, ул. А. Магеррамова, 25В). Предварительно от пациентов было получено письменное согласие на предмет использования проб крови и слюны в проводимом исследовании. Поведенческие эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар массой тела 160–220 г из вивария Института физиологии им. академика Абдуллы Гараева.

У пациентов из локтевой вены забирали кровь в объеме 5 мл в пробирки, содержащие 0.5 мл 5%-го антикоагулянта этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Пробирки с пробами крови центрифугировали со скоростью 1000 *g* в течение 7 мин, собирали плазму, переносили в пробирки эппендорф и центрифугировали со скоростью 9000 *g* в течение 15 мин. Полученную сыворотку собирали в отдельные пробирки эппендорф. Пробирки с осевшими тромбоцитами, плазмой и сывороткой хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . У этих же больных собирали слюну и замораживали. В качестве контроля использовали пробы крови и слюну здоровых испытуемых того же возраста.

ДПБ2 выделяли из головного мозга коров. Основным этапами фракционирования были: 1) дробное осаждение белков из белкового экстракта головного мозга сульфатом аммония в конечной концентрации 40%; 2) гель-хроматография на колонке сефадекс G-150 (3 × 60 см); 3) экспозиция в 40 мМ растворе ЭДТА в течение ночи на встряхивателе; 4) препаративное изоэлектрическое фокусирование в геле с использованием амфолинов узкого диапазона (рН 4–6). Фракционирование осуществляли под контролем непрямого иммуноферментного анализа с использованием иммуноглобулинов к ДПБ2. Гомогенность выделенного белка определяли методом электрофореза с додецилсульфатом натрия в присутствии белков-стандартов с известными значениями молекулярных масс.

Поликлональные иммуноглобулины к ДПБ2 получали в результате 5-месячной иммунизации трех кроликов очищенным белком в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Sigma, Германия) по следующей схеме: первые три инъекции с интервалом 14 сут, далее 1 раз в месяц. Через 10 сут после 3-й и последующих инъекций из краевой ушной вены забирали кровь, отделяли сыворотку и осаждали иммуноглобулины добавлением 100% раствора сульфата аммония до конечной 50%-й концентрации.

В первой серии исследований из тромбоцитов пациентов ( $n = 18$ ) и здоровых испытуемых ( $n = 11$ ) экстрагировали водорастворимые белки 0.05 М фосфатным бу-

фером, содержащим 0.3 М NaCl, 5 мМ ЭДТА и 0.1% тритон X-100 (pH 7.3), после чего гомогенат тромбоцитов центрифугировали при 9000 *g* в течение 10 мин, собирали надосадочную жидкость, которую использовали в качестве антигенов в концентрации 20 мкг/мл в 0.1 М буфере трис-HCl (pH 8.6) в твердофазном непрямом иммуноферментном анализе (ТНИФА) на 96-луночных полистироловых планшетах с умеренным уровнем сорбции (Sigma, Германия). В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные иммуноглобулины к ДПБ2, разведенные в 40 раз буфером для антител, содержащим 0.04 М фосфатный буфер, 0.15 М хлористый натрий, 0.05%-й Tween-20 и 1%-й бычий сывороточный альбумин (pH 7.3). В качестве вторичных антител использовали противокроличьи козы иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена, разведенные в 2000 раз буфером для антител (pH 7.3). Визуализацию реакции осуществляли с помощью субстрата пероксидазы хрена – ортофенилендиамина в концентрации 0.5 мг/мл в 0.05 М цитрат-фосфатном буфере (pH 4.5). Реакцию останавливали заливанием в лунки по 50 мкл 3 М раствора гидроксида натрия. Результаты реакции считывали в фотометре для иммуноферментного анализа “Molecular Devices Spectra Max 250” (MTX Lab Systems, Inc., США) на длине волны 492 нм (длина волны сравнения – 630 нм).

Одновременно проводили ТНИФА с пробами слюны, взятых у этих же пациентов и у здоровых испытуемых. Реакцию осуществляли так же, как и с белковыми экстрактами тромбоцитов.

Во второй серии исследований методом ТНИФА определяли уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови и слюне у этих же пациентов. В качестве антигена использовали очищенный ДПБ2 в концентрации 20 мкг/мл в 0.1 М буфере трис-HCl (pH 8.6). В качестве первичных антител использовали пробы сыворотки крови и слюны, разведенные в 100 раз буфером для антител (pH 7.3). В качестве вторичных антител использовали мышиные иммуноглобулины против иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена и разведенные в 1000 раз буфером для антител (pH 7.3). Далее, реакцию проводили, как описано выше.

В третьей серии исследований в сыворотке крови этих же пациентов определяли уровень кортизола методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием сенсibilизированных полистироловых планшетов (Хема, РФ). На основании стандартов набора строили калибровочную кривую, по которой определяли концентрацию кортизола в образцах сыворотки больных.

Четвертая серия исследований была выполнена на крысах-самцах линии Вистар в крестообразном лабиринте, приподнятом на высоту 1 м над полом и предназначенном для исследования изменения уровня тревожности у животных под влиянием вводимых препаратов, с целью изучения влияния внутримозгового введения ДПБ2 на поведение. Были сформированы 2 группы крыс: 1) контрольная группа ( $n = 9$ ) и 2) опытная группа ( $n = 9$ ). В 1-й день животных помещали в лабиринт на 300 сек и регистрировали количество пересеченных ими квадратов в закрытых и открытых рукавах лабиринта в целях определения у них исходного уровня тревожности. Изучение поведения животных в лабиринте осуществляли в затемненной комнате для создания естественных для крыс условий обитания. Через 24 ч животным, наркотизированным этиналом натрия (40 мг/кг массы тела, внутривенно), вводили препараты: в контрольной группе вводили инактивированный ДПБ2 (35 мин на водяной бане при температуре 60°C), а в опытной группе – нативный ДПБ2. Введение препаратов осуществляли в левый боковой желудочек головного мозга крыс, в концентрации 1.0 мг/мл и объеме 10 мкл в физиологическом растворе на фосфатном буфере (pH 7.3). Через 24 ч после введения препаратов жи-

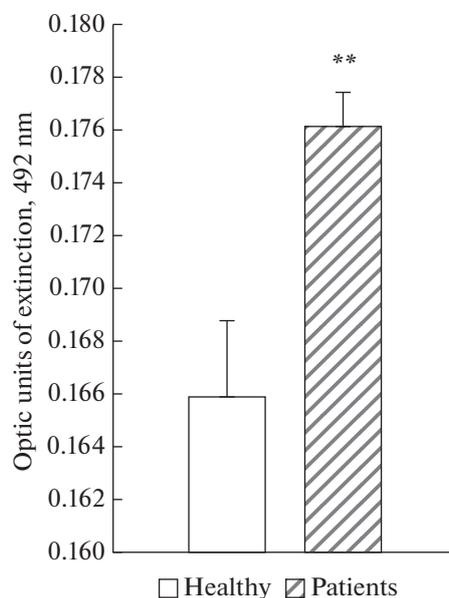


Рис. 1. Изменение уровня ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов. \*\* –  $p < 0.01$  по  $t$ -критерию Стьюдента.

вотных обеих групп вновь помещали в лабиринт на 300 с и регистрировали количество пересеченных квадратов в открытом и закрытом рукавах.

По биохимическим показателям уровень достоверности различий между группами пациентов и здоровых испытуемых оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента. По показателям поведения крыс в ПКЛ межгрупповые различия анализировали по  $U$ -критерию Вилкоксона и Манна–Уитни. Значения считались статистически достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Анализ уровня ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов*

По итогам первой серии исследований было обнаружено повышение уровня ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов непосредственно перед плановой полостной операцией относительно его уровня у здоровых испытуемых. В частности, если уровень ДПБ2 у здоровых испытуемых в тромбоцитах составлял  $0.165 \pm 0.004$  оптических единиц поглощения, то у пациентов его уровень достигал  $0.176 \pm 0.001$  опт. ед. ( $p < 0.01$  по  $t$ -критерию Стьюдента; рис. 1).

В то же время в слюне у этих пациентов, напротив, отмечалось заметное снижение уровня ДПБ2 относительно его уровня у здоровых испытуемых: у здоровых испытуемых уровень ДПБ2 составлял  $0.199 \pm 0.005$  опт. ед., тогда как у пациентов –  $0.147 \pm 0.009$  опт. ед. ( $p < 0.001$  по  $t$ -критерию Стьюдента; рис. 2).

### *Определении уровня естественных аутоантител к ДПБ2*

Во второй серии исследований при определении уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов было обнаружено его резкое повышение (в 2.5 раза) относительно уровня здоровых испытуемых. Так, уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у здоровых испытуемых равнялся  $0.0063 \pm$

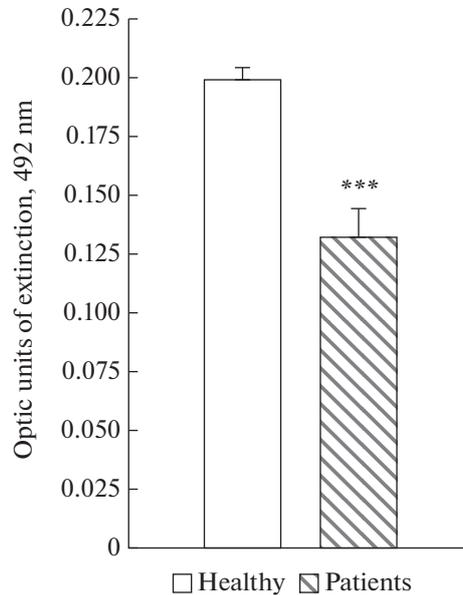


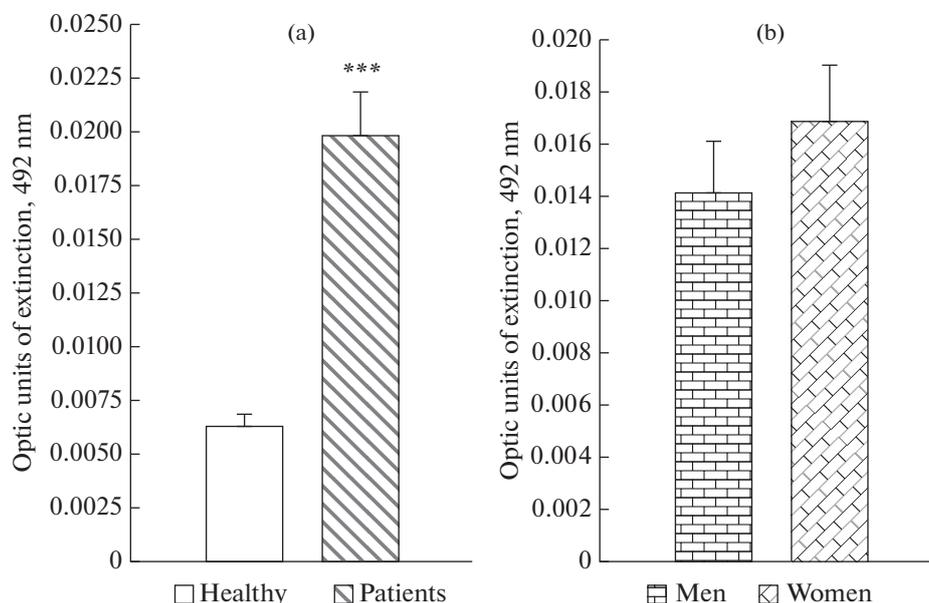
Рис. 2. Изменение уровня ДПБ2 в слюне у пациентов. \*\*\* –  $p < 0.001$  по  $t$ -критерию Стьюдента.

$\pm 0.0005$  опт. ед., тогда как в сыворотке у больных их уровень составлял  $0.01583 \pm 0.0013$  опт. ед. ( $p < 0.001$  по  $t$ -критерию Стьюдента; рис. 3а). Параллельно было проведено сравнение уровней естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов, согласно их половой принадлежности. Вследствие того, что разница в уровнях аутоантител к ДПБ2 у мужчин ( $0.014 \pm 0.002$ ) и у женщин ( $0.017 \pm 0.002$ ) была недостоверной ( $p > 0.05$ ; рис. 3б), объединение их значений в одну группу, равно как и других показателей в первой и второй сериях исследований, считалось правомочным.

При определении уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в слюне у пациентов и здоровых испытуемых было обнаружено, что величины оптического поглощения в лунках полистироловой планшеты с пробами слюны, полученных как от пациентов, так и от здоровых испытуемых, не отличались от величины оптического поглощения в “пустых” лунках, в которые вместо антигенов был нанесен 0.1 М трис-НС1 (рН 8.6), использовавшийся для разведения проб слюны. Нанесение в лунки только буфера для разведения антигенов (“blank control”) обычно используют при постановке ТНИФА для оценки уровня неспецифической сорбции первичных и вторичных антител: чем ниже значения оптического поглощения в “пустых” лунках в конце реакции, тем ниже уровень неспецифической сорбции обоих видов антител и тем более убедительны получаемые в ТНИФА различия между исследуемыми группами. На основании того, что различий между оптическим поглощением в лунках с пробами слюны от обеих групп испытуемых и в “пустых” лунках не было обнаружено (т.е. в лунках, отведенных для проб слюны пациентов и здоровых испытуемых, антитела отсутствовали), было сделано заключение о том, что антитела не способны проникать через гемато-саливарный барьер.

#### Определение уровня кортизола

В третьей серии исследований определение уровня стрессорного гормона кортизола в сыворотке у пациентов выявило повышение его уровня относительно уров-



**Рис. 3.** Изменение уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов. \*\*\* —  $p < 0.001$  (а) по  $t$ -критерию Стьюдента. Сравнение уровней естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке у пациентов разного пола (б).

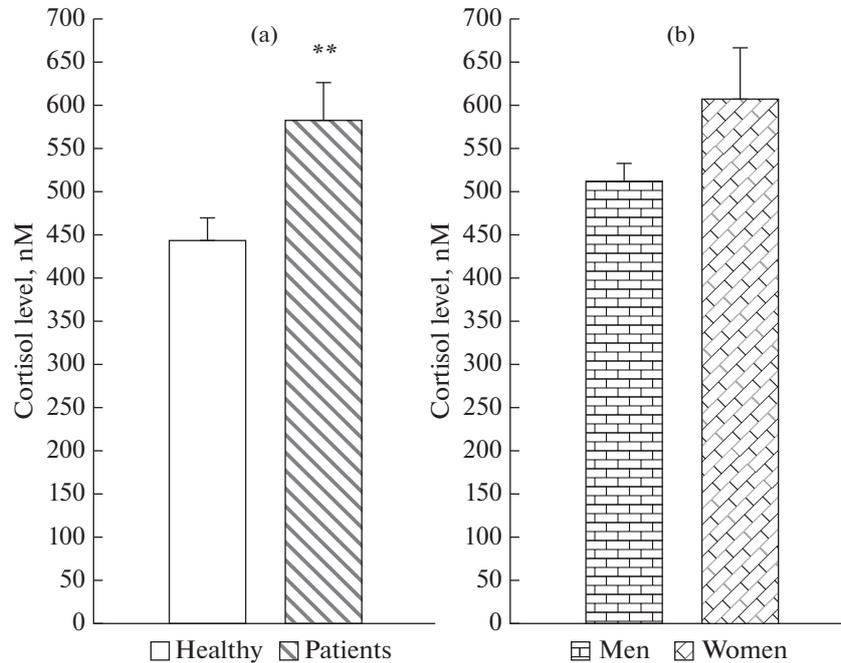
ня у здоровых испытуемых. В частности, если у здоровых испытуемых уровень кортизола в сыворотке составил  $443.3 \pm 26.1$  нМ, то у пациентов —  $582.9 \pm 43.5$  нМ ( $p < 0.01$ ; рис. 4а).

В этой серии также проводили сравнение уровней кортизола у пациентов в связи с их половой принадлежностью. Поскольку достоверных различий между группами пациентов разного пола выявлено не было:  $511.8 \pm 21.6$  нМ у мужчин против  $607.4 \pm 59.2$  нМ у женщин ( $p > 0.05$ ; рис. 4б), значения уровней кортизола у пациентов обоего пола также объединили в одну общую группу.

Таким образом, результаты первых трех серий исследований свидетельствуют о повышении уровня ДПБ2 в тромбоцитах и повышении уровня аутоантител в сыворотке наряду со снижением его уровня в слюне у пациентов непосредственно перед запланированным оперативным вмешательством. Наряду с указанными изменениями, в сыворотке у этих пациентов было выявлено повышение уровня кортизола. Для выявления роли ДПБ2 в формировании состояния тревожности в следующей (четвертой) серии изучали влияние его введения на поведение крыс.

#### *Изучение влияния внутримозгового введения ДПБ2 на поведение крыс*

В этой серии экспериментов было проведено изучение влияния внутримозгового введения ДПБ2 на поведение крыс в модели приподнятого крестообразного лабиринта. Было обнаружено заметное увеличение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах лабиринта у крыс опытной группы после введения ДПБ2 по сравнению с количеством пересеченных квадратов этими животными до введения белка —  $5.9 \pm 2.4$  квадратов после введения ДПБ2 против  $1.4 \pm 1.4$  квадрата до его введения ( $p < 0.01$  по  $U$ -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни; рис. 5). В группе животных с введением инактивированного ДПБ2 не было выявлено достоверных



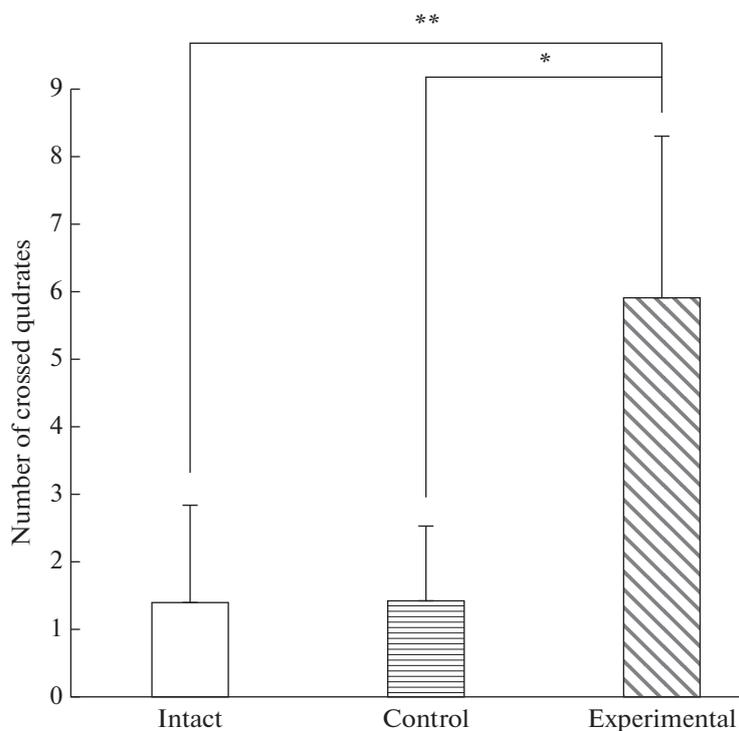
**Рис. 4.** Изменение уровня кортизола в сыворотке крови у пациентов, \*\* –  $p < 0.01$  по  $t$ -критерию Стьюдента (а) и сравнение уровней кортизола в сыворотке у пациентов разного пола (б).

отличий по количеству пересеченных квадратов ( $1.4 \pm 1.1$ ) в открытых рукавах камеры по сравнению с интактными животными. Наконец, следует отметить, что было выявлено значительное увеличение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах камеры крысами опытной группы после введения ДПБ2 по сравнению с животными контрольной группы, получивших инъекции инактивированного ДПБ2 ( $5.9 \pm 2.4$  квадратов против  $1.4 \pm 1.1$ ,  $p < 0.05$  по  $U$ -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни; рис. 5).

Таким образом, внутримозговое введение крысам ДПБ2 вызывало повышение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта относительно значений этого показателя до введения ДПБ2 у животных опытной группы и относительно его значений у контрольных крыс, что свидетельствует о снижении их тревожности. Результаты исследований, полученные как на пробах пациентов, так и в экспериментальной модели на животных свидетельствуют о непосредственном участии ДПБ2 в развитии состояния тревожности.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день довольно сложно подобрать адекватный показатель для оценки уровня состояния тревожности и беспокойства у человека. В настоящее время большинство используемых иммунохимических методов, ориентированных на выявление этого состояния, по сути, определяют уровень общего стресса. Вместе с тем следует указать, что состояние тревожности имеет характерную нейрoхимическую и поведенческую (на соответствующих моделях животных) специфичность.



**Рис. 5.** Изменение количества пересеченных квадратов крысами в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта под влиянием внутримозгового введения ДПБ2 (Experimental) в сравнении с интактными животными (Intact) и контрольной группой (Control), инъецированных инактивированным ДПБ2. \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$  по  $U$ -критерию Уилкоксона и Манна–Уитни.

Модель приподнятого крестообразного лабиринта служит адекватной и широко используемой моделью для определения уровня тревожности у крыс под влиянием различных фармакологических препаратов [13, 14].

Выявленное в наших экспериментах повышение количества пересеченных квадратов в открытых рукавах лабиринта у животных опытной группы после внутримозгового введения ДПБ2 по сравнению с их количеством у этих животных до введения им белка и относительно количества пересеченных квадратов в открытых рукавах у животных контрольной группы (инактивированный ДПБ2) указывает на снижение уровня тревожности (анксиолитическое влияние) у животных под влиянием искусственного повышения уровня ДПБ2 в головном мозге. Заключение об анксиолитическом влиянии ДПБ2 на поведение животных, сделанное на основании повышения количества пересеченных ими квадратов в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта, согласуется с результатами других авторов, продемонстрировавших наличие отрицательной коррелятивной взаимосвязи между нахождением животных в области открытых рукавов лабиринта и уровнем стресса, оцененного по содержанию стрессорного гормона кортикостерона в их плазме [15, 16]. Следовательно, определения уровня этого белка в тромбоцитах и слюне, а также уровня естественных аутоантител к нему в сыворотке крови у человека могут быть использованы в качестве показателей развития состояния тревожности.

Следует отметить, что определенный в данном исследовании повышенный уровень ДПБ2 в тромбоцитах у пациентов отражает его уровень в коре головного мозга [5, 6], тогда как повышенный уровень естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови у пациентов – уровень ДПБ2 в подкорковых структурах их головного мозга. Взаимосвязь между уровнем естественных аутоантител к ДПБ2 и его уровнем в подкорковых структурах головного мозга была ранее выявлена методом ТНИФА в экспериментах, выполненных на модели доминантного поведения у крыс [17].

Снижение уровня ДПБ2 в слюне у пациентов, находящихся в состоянии тревожности, видимо, связано с повышенным уровнем естественных аутоантител к этому белку в сыворотке крови, связывающихся с ДПБ2 и препятствующих его прохождению через гемато-саливарный барьер. При этом комплекс белка со связанными с ним антителами не способен проходить через гемато-саливарный барьер, поскольку, как показали наши результаты, гемато-саливарный барьер непроницаем для самих естественных аутоантител к ДПБ2.

Таким образом, результаты проведенных исследований продемонстрировали, что повышение уровня ДПБ2 в тромбоцитах и снижение его уровня в слюне, а также повышение уровня естественных аутоантител к ДПБ2 в сыворотке крови у пациентов, сопровождавшиеся повышением уровня кортизола в сыворотке крови, могут служить маркерами адаптивной и мобилизационной тревожности и отражать изменения уровня ДПБ2 в соответствующих структурах головного мозга. О влиянии ДПБ2 на изменение поведенческих коррелятов тревожности также свидетельствуют данные, полученные на животных после внутримозгового введения им очищенного препарата этого белка.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института физиологии им. академика Абдуллы Гараева НАН, Баку, Азербайджан.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам и принципам Базельской декларации и рекомендациям Национального биоэтического комитета Азербайджана (Протокол заседания № 4 от 10.09.2019 г.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование экспериментов, руководство экспериментальной работой и редактирование манускрипта – А.А.М. Сбор проб для анализа, проведение иммунохимических и поведенческих экспериментов, обработка данных и написание манускрипта – Ш.М.Г.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shapell S, Detwiler C, Boquet A, Wiegmann D* (2006) Human error and commercial aviation accidents: A comprehensive, fine-grained analysis using HFACS. Federal Aviation Administration. DOT/FAA/AM-06/18. Office of Aerospace Medicine Washington, DC 20591.
2. *Devido G, Jones M, Geraci M, Hollon N, Blair RJ, Pine DS, Blair K* (2009) Stimulus-reinforcement-based decision making and anxiety: impairment in generalized anxiety disorder (GAD) but not in generalized social phobia (GSP). *Psychol Med* 39: 1153–1161.  
<https://doi.org/10.1017/S003329170800487X>
3. *Luhman CC, Ishida K, Hajcak G* (2011) Intolerance of uncertainty and decisions about delayed, probabilistic rewards. *Behav Ther* 42: 378–386.  
<https://doi.org/10.1016/j.beth.2010.09.002>
4. *Teng C, Otero M, Geraci M, Blair RJR, Pine DS, Grillon Ch, Blair KS* (2016) Abnormal decision-making in generalized anxiety disorder: Aversion of risk or stimulus-reinforcement impairment? *Psych Res* 237: 351–356.  
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.12.031>
5. *Elliott JM, Kent A* (1989) Comparison of [<sup>125</sup>I]iodolysergic acid diethylamide binding to human frontal cortex and platelet tissue. *J Neurochem* 53: 191–196.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07313.x>
6. *Collins ChM, Kloek J, Elliott JM* (2013) Parallel changes in serotonin levels in brain and blood following acute administration of MDMA. *J Psychopharm* 27: 109–112.  
<https://doi.org/10.1177/0269881112463123>
7. *Мехтеев АА* (2000) Обнаружение в головном мозге крыс белка, обладающего антиконсолидационными свойствами. *Бюл экспер биол мед* 129: 147–150. [*Мехтеев АА* (2000) Revealing in the brain of rats the protein possessing anticonsolidation properties. *Bull Exp Biol Med* 129: 147–150. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1007/BF02766081>
8. *Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM* (1995) Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376: 509–514.  
<https://doi.org/10.1038/376509a0>
9. *Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano MN, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K* (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4: 781–782.  
<https://doi.org/10.1038/90476>
10. *Bisgaard ChF, Jayatissa MN, Enghild JJ, Sánchez C, Artemychyn R, Wiborg O* (2007) Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression. *J Mol Neurosci* 32: 132–144.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-007-0025-4>
11. *Wei Y, Wang G, Chen J, Xiao L, Wu Z, He J, Zhang N* (2021) Maternal deprivation induces cytoskeletal alterations and depressive-like behavior in adult male rats by regulating the AKT/GSK3 $\beta$ /CRMP2 signaling pathway. *Physiol & Behav* 242: 113625.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113625>
12. *Xiang D, Xiao J, Sun S, Fu L, Yao L, Wang G, Liu Z* (2020) Differential regulation of DNA methylation at the CRMP2 promoter region between the hippocampus and prefrontal cortex in a CUMB depression model. *Front Psychiatr* 11: 141.  
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00141>
13. *Walf AA, Frye CA* (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2: 322–328.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
14. *Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z* (2019) The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol* 1916: 69–74.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4)
15. *File SE, Zangrossi H Jr, Sanders FL, Mabbitt PS* (1994) Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 113: 543–546.  
<https://doi.org/10.1007/BF02245237>
16. *Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF* (1999) Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 68: 47–53.  
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00140-7)
17. *Hasanova LF* (2022) The changes of serotonin-modulating anticonsolidation protein and dihydropyrimidinase-related protein 2 in the amygdala and blood of depressive rats. *Azerb J Physiol* 37: 7–12.

**Involvement of Dihydropyrimidinase-Related Protein 2 in Regulation of Anxiety in Humans****Sh. M. Guliyeva<sup>a</sup> and A. A. Mekhtiev<sup>b, \*</sup>**<sup>a</sup> *Nakhchivan State University, Nakhchivan, Azerbaijan*<sup>b</sup> *Academician Abdulla Garayev Institute of Physiology, NAS, Baku, Azerbaijan**\*e-mail: arifmekht@yahoo.com*

The goal of the study was analysis of the role for dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP2) in regulation of anxiety in humans and animals. For this purpose, the levels of DRP2 in the platelets and saliva and the levels of natural autoantibodies to DRP2 in the blood serum of the patients, admitted for a surgical operation, were analyzed alongside with the effects of DRP2 on rat behavior using the model of elevated plus-maze. Blood samples were collected from the veins of the patients, feeling anxiety at the day of surgery, into test tubes containing 5% EDTA as an anticoagulant. Platelets and serum were purified and through indirect ELISA-test the levels of DRP2 were evaluated in the platelets, while the levels of natural anti-DRP2 autoantibodies were measured in the blood serum. Concomitantly, the levels of DRP2 were estimated in the patients' saliva sampled on the same day. The results showed upregulation of DRP2 in the platelets ( $p < 0.05$  on Student's *t*-criterion) and natural anti-DRP2 autoantibodies in the serum of the patients ( $p < 0.001$ ) relative to healthy persons. Evaluation of the level of the stress hormone cortisol in the patients' serum revealed its upregulation ( $p < 0.01$ ). At the same time downregulation of DRP2 in the patients' saliva ( $p < 0.01$ ) was noticed. Intra-cerebral administration of DRP2 to the rats resulted in an increase in the number of crossed squares in the open arms of the maze relative to the control rats injected with inactivated DRP2 ( $p < 0.01$ , Wilcoxon and Mann-Whitney *U*-criterion) which indicates their reduced anxiety. Based on the data obtained we conclude that evaluation of DRP2 in the platelets, natural anti-DRP2 autoantibodies in the blood serum and DRP2 in the saliva might serve as an indicator of anxiety levels in humans.

*Keywords:* patients, platelets, blood serum, saliva, dihydropyrimidinase-related protein 2, natural autoantibodies, cortisol, elevated plus-maze