

© Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., 2018
УДК 616-092.9

Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н.

Диазепам нормализует тревожность у крыс на модели тревожно-депрессивного состояния, вызванного введением дипротина А в первую постнатальную неделю развития

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

В предыдущих исследованиях мы показали, что у крысят, подвергнутых на второй—третьей неделях постнатального развития действию ингибиторов дипептидилпептидазы IV (ДП-IV), в дальнейшем развивалось смешанное тревожно-депрессивное состояние, которое характеризовалось повышением уровня кортикостерона в сыворотке крови. Трициклический антидепрессант имипрамин купировал проявления депрессивноподобного поведения у таких крыс в тесте принудительного плавания. Данные свидетельствовали в пользу соответствия данных моделей основным критериям валидности — «внешней схожести», прогностическому и конструкционному критериям. Недавно в наших исследованиях была разработана новая модель смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцируемая действием ингибитора ДП-IV дипротина А в первую неделю постнатального развития крысят. **Цель** настоящего исследования — валидизация данной модели тревожно-депрессивного состояния. **Методы.** Крысам опытной группы вводили дипротин А (2 мг/кг, внутривенно), животным контрольной группы — физиологический раствор. У крыс подросткового возраста и взрослых животных оценивали двигательную активность (тест «Автоматизированное открытое поле»), уровень тревожности (тест «Приподнятый крестообразный лабиринт») и депрессивно-подобное поведение (тест принудительного плавания). Двухмесячным животным однократно вводили анксиолитик диазепам (1,25 мг/кг) с последующей оценкой уровня тревожности. Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** Действие дипротина А индуцировало развитие депрессивноподобного поведения у крыс в возрасте 1 и 2 мес., и повышало уровень тревожности у двухмесячных крыс. Содержание кортикостерона в крови таких животных превышало контрольный уровень. Диазепам нормализовал уровень тревожности и привыкание в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт». **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют в пользу валидности новой модели смешанного тревожно-депрессивного состояния у крыс, создаваемой действием ингибитора ДП-IV дипротина А в первую неделю постнатального развития.

Ключевые слова: модель тревожно-депрессивного состояния; крысы; ингибитор дипептидилпептидазы-IV дипротин А; Приподнятый крестообразный лабиринт; постнатальные дни 1-7; диазепам; кортикостерон.

Для цитирования: Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Диазепам нормализует тревожность у крыс на модели тревожно-депрессивного состояния, вызванного введением дипротина А в первую постнатальную неделю развития. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 5—12.

DOI:

Для корреспонденции: Крупина Наталья Александровна, e-mail: krupina-na@yandex.ru

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 15-04-08784.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность ведущему инженеру лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» В.М. Комкову за техническую поддержку исследования.

Поступила 10.10.2018

Krupina N.A., Khlebnikova N.N.

Diazepam normalizes anxiety in rats with experimental anxiety-depressive state induced by diprotin A in the first postnatal week

Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315 Moscow, Russia

Earlier we have shown that rat pups treated with dipeptidyl peptidase IV (DP-IV) inhibitors in the second to third postnatal weeks further developed a mixed anxiety-depressive state, which was characterized by increased blood

corticosterone. Imipramine, a tricyclic antidepressant, suppressed the depressive-like behavior in such rats in the forced swim test. This supported the consistency of these models with the main criteria of validity, «outward similarity» and predictive and construction criteria. Recently we have developed a new model of mixed anxiety-depressive state, induced by a DP-IV inhibitor, diprotin A, administered in the first postnatal week. The **aim** of this study was to validate this model of anxiety-depressive state. **Methods.** Diprotin A (2 mg/kg, i.p.) was administered to rats of the experimental group, and saline — to the control animals. Motor activity (automated open field test), anxiety (elevated plus-maze test), and depressive-like behavior (forced swim test) were evaluated in adolescent and adult rats. Two-month-old animals were injected with a single dose of the anxiolytic diazepam (1.25 mg/kg) followed by the anxiety tests. Serum corticosterone level was measured using enzyme immunoassay. **Results.** Diprotin A induced depressive-like behavior in rats aged one and two months and increased anxiety in two-month-old rats. In these animals, serum corticosterone concentration exceeded the control level. Diazepam normalized anxiety and habituation in the elevated plus-maze test. **Conclusion.** The study supported the validity of the new model of mixed anxiety-depressive state in rats induced by the DP-IV inhibitor, diprotin A, administered in the first postnatal week.

Keywords: model of an anxiety-depressive state; rats; inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV diprotin A; elevated plus-maze; postnatal days 1-7; diazepam; corticosterone.

For citation: Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Diazepam normalizes anxiety in rats with experimental anxiety-depressive state induced by diprotin A in the first postnatal week. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (4): 5—12. (in Russian).

DOI:

For correspondence: Krupina Nataliya A., Krupina-na@yandex.ru

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 15-04-08784).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. We thank Mr. V.M. Komkov, a lead engineer from the «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia, for technical support of the research.

Information about authors:

Krupina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2462-899X>

Received 10.10.2018

Введение

В наших предыдущих исследованиях показано, что ингибиторы пролинспецифической пептидазы дипептидилпептидазы IV (ДП-IV, ЕС 3.4.14.5) с разным механизмом действия в условиях их введения на второй — третьей неделях постнатального развития приводят к развитию смешанного тревожно-депрессивного состояния у крыс подросткового возраста и взрослых животных [1, 2]. По характеру нарушений поведения экспериментальные тревожно-депрессивные состояния отвечали требованиям критерия «внешней схожести» (face validity) с клиническим прообразом.

На этих моделях трициклический антидепрессант имипрамин нормализовал поведение животных в тесте принудительного плавания и снижал повышенный уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс [3, 4]. Известно, что повышение уровня гормона надпочечников — кортизола у человека и кортикостерона у грызунов, — отражающее активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси), связано с развитием депрессивности [5, 6]. Для соответствия экспериментальной модели важному критерию валидности — конструкционному критерию (const-

ruct validity) — интерпретация выявляемых на модели нарушений должна быть схожей с интерпретацией тех же нарушений в клинике моделируемого расстройства; более того, выявленные нарушения должны быть связаны с заболеванием [7]. В наших экспериментах такая связь была показана. Эффективность используемого в клинике антидепрессанта имипрамина в подавлении признаков депрессивности у крыс на указанных моделях подтверждала их соответствие критерию прогностической валидности (predictive validity).

Однако до настоящего времени не была проведена валидизация еще одной новой модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием дипротина А в первую неделю постнатального развития [8].

Цель настоящего исследования заключалась в проверке воспроизведения результатов моделирования тревожно-депрессивного состояния у крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили ингибитор ДП-IV дипротин А, изучении эффектов диазепама на уровень тревожности и исследовании уровня кортикостерона в крови таких животных.

Методика

Работа выполнена на 39 белых крысах-самцах Вистар (из питомника ФГБНУ НИИОПП). Животные, находившиеся в стандартных условиях вивария с естественной сменой светового цикла, имели свободный доступ к пище и воде. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и Межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», соответствующими Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS N 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006). Исследования проводили под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

Каждой самке после родов оставляли по 5 детенышей мужского пола, взятых из трех-четырех пометов. День рождения считали нулевым постнатальным днем (ПНД). Непосредственно перед введением навеску ингибитора ДП-IV дипротина А (Н-Пе-Ро-Пе-ОН, МВ 341.45, Sigma-Aldrich, USA) растворяли в физиологическом растворе (ФР). Дипротин А вводили крысам опытной группы ($n = 18$) в дозе 2 мг/кг (0,1 мл на 10 г массы, внутривентриально, один раз в день) в течение первых семи постнатальных дней (ПНД 1-7). Животным контрольной группы ($n = 21$) вводили ФР в ПНД 1-7. В возрасте около одного мес. крысят отделяли от самок и формировали экспериментальные группы. Таким образом, в состав каждой группы входили детеныши из трех-четырех пометов. Оценивали поведение крыс по достижении ими возраста одного и двух мес.

Оценку двигательной активности осуществляли в тесте «Автоматизированное открытое поле» («Opto-Varimex», Columbus Instruments, США) в условиях комнатной освещенности, в течение 10 мин. Пройденный путь определяли в см.

Тревожность оценивали в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) в течение 5 мин с помощью видеосистемы «VideoMot2» (TSE System, Германия). Конструкция ПКЛ и процедура тестирования подробно описаны в работе [8]. Поведение оценивали по следующим параметрам: предпочтение открытых рукавов (ОР) (о котором судили по отношению числа заходов в ОР к сумме заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта), общий пробег (см) и скорость перемещения (см/с) животного в лабиринте. Кроме того, определяли число свешиваний с ОР. О росте тревожности судят по снижению предпочтения ОР [9] и снижению числа свешиваний с ОР [10].

Проверку эффектов диазепама проводили у крыс в возрасте 2 мес. На этом сроке крыс подвергали тестированию в тесте ПКЛ в лабиринте дважды. По результатам первого тестирования формировали 4 подгруппы животных — две опытных и две контрольных. Эффекты диазепама проверяли во втором тестировании через 4 дня после первого. Животным двух подгрупп вводили диазепам: подгруппы «Дипротин А + диазепам» ($n = 6$) и «ФР + диазепам» ($n = 6$); животным двух остальных подгрупп вводили ФР: подгруппы «Дипротин А + ФР» ($n = 6$) и «ФР + ФР» ($n = 6$). Перед вторым тестированием у животных опытных подгрупп число свешиваний с ОР было статистически значимо меньше, а предпочтение ОР — в тенденции ниже, чем у животных контрольных подгрупп (рис. 2), что свидетельствовало о повышенном уровне тревожности у крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 1-7. Крысам опытных подгрупп вводили транквилизатор бензодиазепинового ряда диазепам (препарат «Реланиум», ампулы 10 мг/2 мл, «АО Варшавский фармацевтический завод Польша», Польша) в дозе 1,25 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно, за 30 мин до тестирования. Крысам контрольных подгрупп вводили ФР в том же объеме.

Оценку депрессивноподобного поведения проводили в течение 10 мин в тесте *принудительного плавания*. Оценивали ритмологическую структуру плавания: число периодов активного плавания (энергичные движение четырьмя лапами с перемещением), общую длительность и число периодов иммобильности (периоды, когда крыса не совершает плавательных движений); рассчитывали индекс депрессивности (ИД) как отношение числа кратких периодов иммобильности (до 6 с) к числу периодов активного плавания, как описано в работе [8].

Крыс, не подвергавшихся действию диазепама, в возрасте 2,5 мес. декапитировали, отбирали пробы крови, которые использовали для получения сыворотки, и определяли абсолютную и относительную массу стресс-компетентных органов (отношение массы тимуса, селезенки и надпочечников к массе тела крысы перед декапитацией, в процентах). Образцы сыворотки хранили при -20°C до момента измерения в них уровня кортикостерона, который определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора EIA-4164 (DRG ELISA, США).

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». По результатам проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса для анализа результатов применяли либо параметрические (в слу-

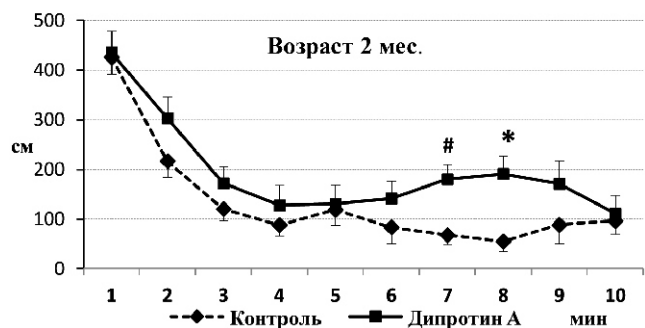
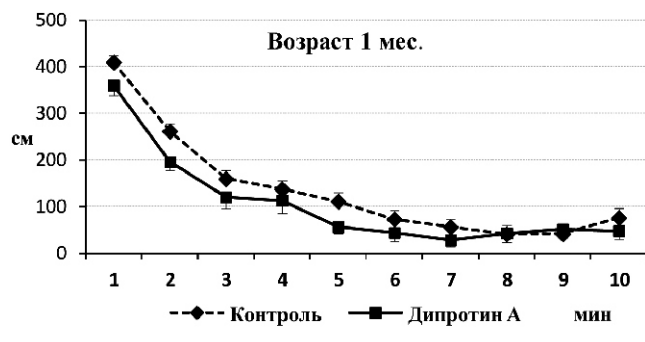


Рис. 1. Возрастная динамика двигательной активности крыс, подвергнутых действию дипротина А (2 мг/кг) в ПНД 1-7, и контрольных животных, которым вводили физиологический раствор, в тесте «Автоматизированное открытое поле». * $p < 0,05$; # $p < 0,09$ — по сравнению со значением в контрольной группе (по LSD-тесту после Two-Way ANOVA).

чае принятия гипотезы), либо непараметрические (в случае отклонения гипотезы) критерии. В работе использованы двухфакторный дисперсионный анализ Two-Way ANOVA с апостериорным сравнением средних дисперсионного комплекса по LSD-тесту, од-

нофакторный дисперсионный анализ One-Way ANOVA, непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых переменных (в случае множественных сравнений — с корректировкой по методу FDR-контроля [11] с расчетом критического значения p ($p_{критич}$), с которым сравнивали достигнутый уровень статистической значимости) и парный непараметрический критерий Вилкоксона (для внутригрупповых сравнений). Принятый уровень значимости составлял 5%. Данные представлены в виде $M \pm S.E.M.$

Результаты и обсуждение

По массе тела крысы опытной и контрольной групп в динамике наблюдения не различались: соответственно масса тела животных в возрасте 1 мес. составляла $49,2 \pm 2,0$ г и $51,5 \pm 2,4$ г, в возрасте 2 мес. — $179,1 \pm 8,1$ г и $181,1 \pm 12,8$ г.

У крыс в возрасте 1 мес. Two-Way ANOVA выявил влияние факторов «Группа» ($F = 5,2890$, $p = 0,027$) и «Минута измерения»: ($F = 84,602$, $p < 0,001$) на двигательную активность крыс в тесте «Автоматизированное открытое поле»; взаимодействие факторов не обнаружено ($F = 1,163$, $p > 0,05$). Привыкание по показателю снижения двигательной активности в динамике обследования в тесте у крыс обеих групп было выражено, но двигательная активность у крыс опытной группы на протяжении обследования была ниже, чем в контроле (рис. 1). По результатам One-Way ANOVA двигательная активность в сумме за 10 мин тестирования у крыс, подвергнутых неонатальному действию дипротина А, была ниже, чем у крыс контрольной груп-

Таблица 1

Показатели тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили ингибитор ДП-IV дипротин А или физиологический раствор (ФР)

Показатели	Группы	
	Дипротин А (n = 17)	ФР (n = 21)
Возраст 1 мес.		
Предпочтение ОР, %	$18,7 \pm 4,1$	$23,7 \pm 1,9$
Число свешиваний с ОР	$3,9 \pm 1,1$	$4,9 \pm 0,7$
Суммарный пробег, см	$1997,6 \pm 64,7 *$	$2189,9 \pm 83,8$
Средняя скорость, см/с	$6,7 \pm 0,2 *$	$7,3 \pm 0,3$
Возраст 2 мес.		
Предпочтение ОР, %	$14,7 \pm 3,26 \#$	$24,0 \pm 3,91$
Число свешиваний с ОР	$2,1 \pm 0,78 \#$	$6,2 \pm 1,32$
Суммарный пробег, см	$1869,0 \pm 122,75$	$1998,1 \pm 130,07$
Средняя скорость, см/с	$6,2 \pm 0,41$	$6,7 \pm 0,43$
Примечание. * $p \leq 0,05$; # $p < 0,07$ — по сравнению со значением в группе с введением ФР на том же сроке обследования (по U-критерию Манна-Уитни).		

пы ($F(1,36) = 4.825$, $\rho = 0.035$) и составила, соответственно: $1059,9 \pm 117,1$ см и $1364,9 \pm 81,5$ см.

В возрасте 2 мес. двигательную активность в тесте «Автоматизированное открытое поле» оценивали только у тех крыс, которым не вводили диазепам. Two-Way ANOVA выявил влияние факторов «Группа» ($F = 9,307$, $\rho = 0,006$) и «Минута измерения»: ($F = 21,068$, $\rho < 0,001$) на двигательную активность крыс в тесте «Автоматизированное открытое поле»; взаимодействие факторов не обнаружено ($F = 0,933$, $\rho > 0,05$). Привыкание было отмечено в обеих группах, однако у крыс опытной группы на завершающем этапе тестирования (минуты 7—9) двигательная активность в сравнении с контрольными значениями была выше (рис. 1). По результатам One-Way ANOVA двигательная активность в сумме за 10 мин тестирования у крыс опытной группы была выше, чем у крыс контрольной группы ($F(1,23) = 9,307$, $\rho = 0,006$) и составила соответственно $1964,7 \pm 89,2$ см и $1360,5 \pm 149,6$ см.

В возрасте 1 мес. у крыс, которым в течение первой недели постнатального развития вводили дипротин А, не было отличий от контрольных животных по показателям тревожности в ПКЛ, но у этих крыс по

сравнению с контролем был меньше пробег в ПКЛ при меньшей скорости (табл. 1).

Крысы опытной группы в возрасте 2 мес. не отличались от животных контрольной группы по величине пробега в ПКЛ и скорости перемещения, однако у них была выражена тенденция к снижению предпочтения ОР и числа свешиваний с ОР (табл. 1), что свидетельствовало о появлении признаков повышенной тревожности.

До введения диазепама/ФР в сформированных опытных подгруппах «Дипротин А + ФР» и «Дипротин А + диазепам» у крыс была выражена тенденция к снижению предпочтения ОР по сравнению с контрольными значениями (также как в целой группе), а число свешиваний с ОР было статистически значимо меньше, чем в соответствующих контрольных подгруппах «ФР + ФР» и «ФР + диазепам» (рис. 2). Суммарный пробег и скорость перемещения в ПКЛ у крыс опытных и контрольных подгрупп не различались (табл. 2), так же, как в целой группе.

После введения диазепама число свешиваний с ОР в подгруппе «Дипротин А + диазепам» не отличалось статистически значимо от числа свешиваний в подгруппе «ФР + диазепам», тогда как после вве-

Таблица 2

Влияние диазепама (1,25 мг/кг, острое введение) на двигательную активность в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у двухмесячных крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили дипротин А или ФР

Показатели	Группы			
	Дипротин А + ФР	ФР + ФР	Дипротин А + диазепам	ФР + диазепам
До введения диазепама/ФР				
Суммарный пробег, см	$1655,7 \pm 265,2$	$2213,5 \pm 198,9$	$1996,2 \pm 177,9$	$2450,4 \pm 141,6$
Средняя скорость, см/с	$5,5 \pm 0,9$	$7,4 \pm 0,7$	$6,7 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,5$
После введения диазепама/ФР				
Суммарный пробег, см	$1498,4 \pm 172,6$	$1707,5 \pm 190,3\#$	$1394,1 \pm 216,1 \#$	$2005,4 \pm 160,9\#$
Средняя скорость, см/с	$5,0 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,6 \#$	$4,6 \pm 0,7 \#$	$6,7 \pm 0,5 \#$

Примечание. Во всех группах $n = 6$; $\#p < 0,050$ по сравнению со значением в той же группе крыс до начала введения диазепама/ФР (парный критерий Вилкоксона).

Таблица 3

Показатели поведения в тесте принудительного плавания у крыс, которым в первую неделю постнатального развития вводили ингибитор ДП-IV дипротин А или физиологический раствор (ФР)

Показатели	Группы			
	Дипротин А		ФР	
	1 мес.	2 мес.	1 мес.	2 мес.
Иммобильность, с	$15,3 \pm 3,4 *$	$20,8 \pm 6,0 \#$	$5,6 \pm 1,7$	$7,5 \pm 2,7$
Число периодов иммобильности (до 6 с)	$5,8 \pm 1,1 *$	$6,9 \pm 1,8 *$	$2,4 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,7$
Число периодов активного плавания	$7,9 \pm 0,8$	$7,9 \pm 0,7$	$8,3 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,8$
Индекс депрессивности	$0,8 \pm 0,2 *$	$1,0 \pm 0,2 *$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$

Примечание. $*p < 0,05$; $\#p < 0,08$ — по сравнению со значением в группе с введением ФР на том же сроке обследования (по U-критерию Манна-Уитни).

дения ФР в подгруппах «Дипротин А + ФР» и «ФР + ФР» сохранялось статистически значимое различие по этому показателю (рис. 2).

У животных опытной подгруппы после введения диазепама не наблюдали тенденции к снижению предпочтения ОР по сравнению с соответствующей контрольной подгруппой, тогда как у крыс из подгруппы «Дипротин А + ФР» такая тенденция сохранялась.

В подгруппе «ФР + диазепам» было отмечено увеличение предпочтения ОР (в тенденции). Результаты свидетельствовали об эффективности диазепама как анксиолитика и подтверждали повышенную тревожность у крыс, подвергнутых действию дипротина А в первую постнатальную неделю развития.

Суммарный пробег и скорость перемещения в ПКЛ во всех подгруппах, кроме подгруппы «Дипротин А + ФР», снижались (табл. 2).

У крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 1-7, в возрасте 1 и 2 мес. были выявлены признаки депрессивноподобного поведения в *тесте принудительного плавания*: увеличение длительности иммобильности и рост ИД (табл. 3).

Уровень кортикостерона в крови крыс, которым в ПНД 1-7 вводили дипротин А, составил $161,4 \pm 5,8$ нг/мл, что было статистически значимо выше, чем у крыс, которым неонатально вводили ФР: $63,4 \pm 17,3$ нг/мл ($p = 0,021$, One-Way ANOVA).

Обнаружена тенденция к уменьшению относительной массы надпочечников у крыс опытной группы по сравнению с контрольным значением: соответственно $0,0159 \pm 0,0009$ и $0,0185 \pm 0,0010$ ($p = 0,060$, U-критерий Манна-Уитни). Различий в абсолютной массе селезенки, тимуса и надпочечников, а также в относительной массе селезенки и тимуса не выявлено.

Сравнительный анализ нарушений эмоционально-мотивационной сферы, выявленных у крыс в двух сериях по моделированию нарушений поведения путем действия ингибитора ДГ-IV в ПНД 1-7 — предыдущей [8] и настоящей — позволяет говорить о принципиальном сходстве выявленных отклонений.

В возрасте 1 мес. у крысят в обеих сериях наблюдали снижение двигательной активности в тесте «Автоматизированное открытое поле», однако в возрасте 2 мес. в предыдущей серии была выявлена нормализация уровня двигательной активности, а в настоящей серии обнаружено превышение суммарного пробега над контрольным уровнем. Такое отличие может быть связано с тем, что в предыдущем исследовании тестирование длилось 3 мин, тогда как в настоящей работе — 10 мин. Увеличение времени тестирования позволило обнаружить различия в паттерне привыкания к условиям «открытого поля» у крыс опытной и контрольной групп: на завершающем этапе тестирования у крыс, подвергнутых неонатальному действию дипротина А, привыкание было менее выражено. Результаты предполагают нарушение неассоциативного обучения у подопытных животных.

В возрасте 1 мес. в обеих сериях животные опытной и контрольной групп не различались по уровню тревожности, тогда как в возрасте 2 мес. тревожность в обоих случаях была повышена. В возрасте 1 мес. в обеих сериях у крыс опытных групп были обнаружены признаки депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания, которые сохранялись в возрасте 2 мес. только в настоящей серии.

В совокупности, данные двух экспериментальных серий свидетельствуют в пользу соответствия внешних проявлений эмоционально-мотивационных расстройств, возникающих у крыс, которым в ПНД 1-7

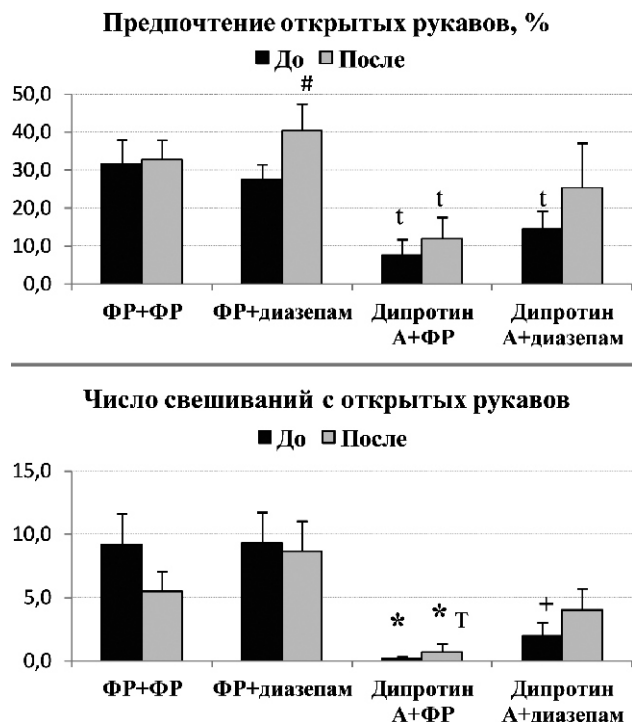


Рис. 2. Влияние диазепама на уровень тревожности в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 1-7 в сравнении с крысами контрольной группы, которым вводили ФР.

По непарному непараметрическому U-критерию Манна-Уитни (двустороннему) с поправкой FDR: * $p \leq p_{критич}$ - статистически значимые отличия по сравнению со значением в группе «ФР + ФР» на том же этапе исследования; ^t $p \leq p_{критич}$ - статистически значимые отличия по сравнению со значением в группе «ФР + диазепам» на том же этапе исследования; ^T - тенденция по сравнению с группой «Дипротин А + диазепам» после введения препаратов ($p_{критич} < p < 0,05$); ^t - тенденция по сравнению с соответствующей контрольной группой с введением ФР ($p_{критич} < p < 0,065$).

По парному критерию Вилкоксона: [#] $p = 0,075$ по сравнению со значением в той же группе крыс до начала введения диазепама.

вводили дипротин А, критерию «внешней схожести» (face validity) с тревожно-депрессивным состоянием и позволяют рассматривать эти нарушения как модель такого состояния.

Как показано в настоящей работе, анксиолитик диазепам нормализовал уровень тревожности у крыс опытной группы, о чем судили по восстановлению сниженного предпочтения ОР и увеличению числа свешиваний с ОР в ПКЛ. Таким образом, новая модель тревожно-депрессивного состояния прошла первую проверку на соответствие критерию прогностической валидности (predictive validity).

Эффекты диазепама были выявлены в условиях двукратного тестирования в ПКЛ с интервалом в 4 дня: по результатам первого тестирования формировали группы, во втором тестировании непосредственно изучали влияние диазепама. В этом тестировании мы наблюдали снижение величины пробега и скорости перемещения в ПКЛ во всех подгруппах, кроме подгруппы «Дипротин А + ФР». Можно полагать, что незначительный интервал между повторным помещением крыс в ПКЛ привел к развитию привыкания к обстановке ПКЛ в контрольных подгруппах «ФР ± ФР» и «ФР ± диазепам», а также в опытной подгруппе с введением диазепама, у животных которой также было обнаружено снижение пробега и скорости в ПКЛ. По-видимому, диазепам нормализовал не только уровень тревожности, но и нарушенный процесс привыкания у крыс с тревожно-депрессивным состоянием.

Повышенный уровень кортикостерона в крови крыс с тревожно-депрессивным состоянием свидетельствует о гиперактивации ГГА-оси. Данные согласуются с представлениями о дисрегуляции ГГА-оси в клинике у особей, подвергнутых аверсивным воздействиям в ранний период жизни [12], что повышает у них риск развития депрессии. С учетом сказанного, можно считать, что получено свидетельство соответствия новой модели конструкционному критерию валидности модели.

Тревожно-депрессивное состояние возникает на разных моделях у крыс, подвергнутых действию ингибитора ДП-IV. К субстратам данной пептидазы относят некоторые провоспалительные цитокины [13], которые могут принимать участие в патогенезе депрессии, в том числе путем гиперактивации ГГА-оси за счет снижения эффективности обратной связи, опосредованной уменьшением чувствительности глюкокортикоидных рецепторов [14].

Заключение

Результаты настоящего исследования принципиально воспроизводят полученные в предыдущем исследовании [8] данные о нарушении эмоционально-мотивационного поведения у крыс, подвергнутых

действию ингибитора ДП-IV дипротина А, что проявляется формированием у них тревожно-депрессивного состояния. Выявленные нарушения поведения можно рассматривать как новую модель тревожно-депрессивного состояния у крыс, которая хорошо воспроизводится. Модель соответствует основным критериям валидности — в полной мере, критерию «внешней схожести», и, по первым экспериментальным свидетельствам, — также прогностическому и конструкционному критериям.

Литература (п.п. 2;5-7; 9-14 -см. References)

1. Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю., Хлебникова Н.Н., Золотов Н.Н., Крыжановский Г.Н. Поведенческие изменения у крыс, вызванные ингибитором дипептидилпептидазы IV метионил-2(S)-цианопирролидином: экспериментальная модель тревожно-депрессивного состояния. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 147(3): 254-60.
2. Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю. Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс при экспериментальном моделировании депрессивно-подобных состояний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 4: 3-9.
3. Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4):4-12. DOI: <https://doi.org/10.25557/IGPP.2017.4.8517>.
4. Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н. Эмоционально-мотивационные расстройства у крыс как следствие действия дипротина А и ситаглиптина в первую неделю постнатального развития. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2016; 66(3): 367-81. DOI: 10.7868/S0044467716030059.

References

1. Krupina N.A., Kushnareva E. Yu., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Behavioral changes in rats induced by a dipeptidyl peptidase iv inhibitor methionyl-2(s)-cyanopyrrolidine: Experimental model of anxiety-depression disorder. *Bulluten Experimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2009; 147(3): 285-90. DOI: 10.1007/s10517-009-0493-3.
2. Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-iv inhibitors diprotin A and sitagliptin induces depression-like behavior, anxiety, and latent aggression in adolescent and adult rats. *J Behav Brain Sci*. 2016; 6(4): 167-83. Pub. Date: April 15, 2016. DOI: 10.4236/jbbs.2016.64018.
3. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Y. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2013; 4: 3-9. (in Russian)
4. Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal action of the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV diprotin A: imipramine effects. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2017; 61(4): 3-9. DOI: <https://doi.org/10.25557/IGPP.2017.4.8517>. (in Russian)

5. Stetler C., Miller G.E. Depression and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activation: A Quantitative Summary of Four Decades of Research. *Psychosom. Med.* 2011; 73: 114-26. DOI: 10.1097/PSY.0b013e31820ad12b.
6. Nishi M., Horii-Hayashi N., Sasagawa T. *Front Neurosci.* 2014 Jun 17; 8:166. DOI: 10.3389/fnins.2014.00166.
7. Belzung C., Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2011; 1(1): 9. DOI: 10.1186/2045-5380-1-9.
8. Krupina N.A., Khlebnikova N.N., Orlova I.N. [Emotional Motivational Disorders in Rats as a Result of Diprotin A and Sitagliptin Administration in the First Postnatal Week]. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatelnosti Im IP Pavlova.* 2016; 66(3): 367-81. DOI: 10.7868/S0044467716030059. (in Russian)
9. Walf A.A., Frye Ch.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols.* 2007; 2: 322-28. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
10. O'Leary T.P., Gunn R.K. and Brown R.E. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behavior Genetics.* 2013; 43: 34-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s10519-012-9572-8>.
11. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B.* 1995. 57(1): 289-300.
12. Anacker C., O'Donnell K.J., Meaney M.J. Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014; 16(3): 321-33.
13. Klemann C., Wagner L., Stephan M., von Horsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Immunol.* 2016; 185(1): 1-21. DOI: 10.1111/cei.12781.
14. Ogiodek E., Szota A., Just M., Mos D., Araszkie-wicz A. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. *Pharmacol. Rep.* 2014; 66(5): 776-81. DOI: 10.1016/j.pharep.2014.04.009.

Сведения об авторах:

Крупина Наталья Александровна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП

Хлебникова Надежда Николаевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ НИИОПП