

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092.9

Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А.

Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина

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

В наших предыдущих исследованиях было показано, что ингибитор пролинспецифической пептидазы дипептидилпептидазы-IV (ДП-IV, ЕС 3.4.14.5) трипептид дипротин А, введенный крысам в 5—18 постнатальные дни, приводит к развитию у крыс подросткового возраста и взрослых животных эмоционально-мотивационных расстройств. Такие расстройства можно рассматривать как модель смешанного тревожно-депрессивного состояния. Однако специальных исследований по валидности данной модели проведено не было. **Цель** настоящей работы состояла в проверке влияния трициклического антидепрессанта имипрамина (ИМИ) на депрессивноподобное поведение крыс и уровень кортикостерона в сыворотке крови животных на модели смешанного тревожно-депрессивного состояния. **Методика.** У крыс в возрасте одного и двух мес. определяли уровень тревожности в автоматизированном тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и оценивали депрессивноподобное поведение в тесте принудительного плавания. ИМИ вводили взрослым животным в течение 10 дней (20 мг/кг/день, интрагастрально). Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** Неонатальное действие дипротина А приводило к повышению тревожности у крыс в возрасте 1 мес. Депрессивноподобное поведение обнаружено у животных в возрасте одного и двух мес. ИМИ нормализовал поведение животных в тесте принудительного плавания и снижал уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс. Кроме того, ИМИ снижал вес крыс. **Заключение.** Результаты исследования свидетельствуют в пользу адекватности модели смешанного тревожно-депрессивного расстройства, возникающего у крыс вследствие действия ингибитора ДП-IV дипротина А на второй-третьей неделях постнатального развития, клиническому прообразу заболевания по критериям «внешней схожести», прогностической и конструктивной валидности.

Ключевые слова: экспериментальное тревожно-депрессивное состояние; крысы; ингибитор дипептидилпептидазы-IV дипротин А; тест принудительного плавания; имипрамин; кортикостерон.

Для цитирования: 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: 10.25557/IGPP.2017.4.8517

Для корреспонденции: Хлебникова Надежда Николаевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: nanikh@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 студентке психологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова П.В. Мавренковой за помощь в проведении экспериментов, а также ведущему инженеру лаб. общей патологии нервной системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» В.М. Комкову за техническую поддержку исследования.

Поступила 15.08.2017

Khlebnikova N.N., Krupina N.A.

Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal exposure to the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, diprotin A: effects of imipramine

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

Previously, we have shown that the inhibitor of proline-specific peptidase, dipeptidyl peptidase-IV (DP-IV, EC 3.4.14.5), tripeptide diproptin A administered on postnatal days 5-18 induced emotional and motivational disorders in adolescent and adult rats. These disorders can be considered a model of a mixed anxiety-depression-like disorder. However, validation studies of this model are not available. The **aim** of this work was to test the effect of the tricyclic antidepressant, imipramine (IMI), on depressive-like behavior in rats and the level of serum corticosterone using the model of mixed anxiety-depressive state. **Methods.** The level of anxiety was assessed by the automated Elevated Plus Maze test and the depressive-like behavior was evaluated by the forced swimming test in one- and two-month old rats. IMI was administered to adult animals for ten days (20 mg/kg a day, intragastrically). Serum corticosterone concentrations were measured using ELISA. **Results.** The neonatal exposure to diproptin A increased anxiety in one-month old rats. The depressive-like behavior was observed in animals aged one and two months. IMI normalized behavior of animals in the forced swimming test and reduced serum levels of corticosterone. Also, IMI reduced body weight of rats. **Conclusion.** The results of the study evidenced adequacy of the model of mixed anxiety-depressive state induced by the DP-IV inhibitor, diproptin A, on the second and third postnatal weeks to the clinical prototype of disease according to criteria of face validity, predictive and construct validity.

Keywords: experimental anxiety-depressive state; inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV, diproptin A; rats; forced swimming test; imipramine; corticosterone.

For citation: Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal exposure to the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, diproptin A: effects of imipramine. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61 (4): 4–12. (in Russ). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8517

For correspondence: Nadezhda N. Khlebnikova, PhD, Leading Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: nanikh@yandex.ru

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

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

Acknowledgments. We thank Mrs. Polina Mavrenkova, the student of the Faculty of Psychology, Lomonosov Moscow State University, who kindly assisted in providing the data necessary for the analysis, and 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 15.08.2017

Введение

В раннем постнатальном периоде, когда продолжается формирование ЦНС, нервная система обладает особой чувствительностью к действию внешних факторов, вызывающих нейропластические изменения и, тем самым, изменяющих фенотип особи [1]. Эти изменения могут носить дезадаптивный характер. Вмешательство в развитие ЦНС путем стрессирования [2] или действия биологически активных соединений разной природы [3] приводит к изменению физиологических показателей, в первую очередь, состояния гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси (ГГА-оси) [4], и нарушению поведенческих реакций, что часто проявляется усилением депрессивности и тревоги [2].

Повышение активности одной из пролинспецифических пептидаз дипептидилпептидазы-IV (ДП-IV, EC 3.4.14.5) обнаружено в крови пациентов с симптомами депрессии и тревожности [5, 6]. Крысы с дефицитом ДП-IV, обусловленным мутацией гена, кодирующего пептидазу, напротив, менее тревожны, чем контрольные животные и демонстрируют менее

выраженный ответ на стресс на фоне сниженного уровня АКТГ и кортикостерона в плазме крови [7].

В наших исследованиях показано, что неонатальное действие ингибиторов пролинспецифической пептидазы дипептидилпептидазы IV (ДП-IV) — метионил-2(S)-цианопрролидина, дипротина А и ситаглиптина — индуцирует развитие длительных эмоционально-мотивационных нарушений у крыс, проявляющихся повышением уровня тревожности, развитием депрессивноподобного поведения и ростом стресс-провоцируемой агрессивности у животных подросткового возраста и взрослых особей [8–10]. В структурах мозга крыс с экспериментальным тревожно-депрессивным состоянием обнаружено повышение активности ДП-IV [11] и экспрессии гена, кодирующего ДП-IV [12]. На модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием метионил-2(S)-цианопрролидина, было показано, что развитие признаков депрессивности в поведении сопровождается повышением уровня кортикостерона в сыворотке крови, а трициклический антидепрессант имипрамин норма-

лизует поведение и уровень кортикостерона [13]. Эти данные подтверждали валидность данной модели для критерия прогностической значимости [14] и свидетельствовали о вовлеченности ГГА-оси в патогенез эмоционально-мотивационных нарушений, вызванным синтетическим ингибитором ДП-IV.

Цель настоящего исследования заключалась в проверке эффектов имипрамина на депрессивноподобное поведение и уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс на модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием ингибитора ДП-IV дипротина А в неонатальном периоде.

Методика

Работа выполнена на белых крысах-самцах популяции Вистар (питомник ФГБНУ «НИИОПП»). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с Директивой ЕС о защите животных, используемых в научных целях, — EU Directive 2010/63/EU от 22.09.2010 г. и «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

В каждом помете сразу после рождения оставляли по 5 крысят мужского пола. День рождения считали нулевым постнатальным днем (ПНД). Свежеприготовленный раствор ингибитора ДП-IV дипротина А (Д, H-Ilе-Pro-Ile-OH, MW 341.45, Sigma-Aldrich, USA) в физиологическом растворе (ФР) вводили крысам опытной группы ($n = 30$) в дозе 2 мг/кг, в объеме 0,1 мл на 10 г веса, внутривентриально, один раз в день, в течение двух недель (с 5-го по 18-й ПНД включительно). Контрольным животным ($n = 27$) по той же схеме вводили ФР. В возрасте около 1 мес. крысят отделяли от матери и формировали экспериментальные группы таким образом, чтобы в состав каждой группы входили детеныши из трех-четырех пометов. Поведение крыс оценивали в возрасте одного и двух мес.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) применяли для оценки тревожности. Конструкция ПКЛ подробно описана ранее [10]. В течение 5 мин с помощью автоматизированной видеосистемы «VideoMot2» (TSE System, Германия) определяли число заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта (соответственно, ОР и ЗР), предпочтение ОР (отношение числа заходов в ОР к общему числу заходов в рукава), общий пробег и скорость перемещения животного в лабиринте. Снижение пред-

почтения открытых пространств расценивается как показатель увеличения тревожности [15]. Кроме того, под визуальным контролем определяли число свешиваний из ОР — показатель, который используют как характеристику поведения, связанного с риском: увеличение числа свешиваний из ОР свидетельствует о сниженном уровне тревожности и наоборот [16].

Тест принудительного плавания применяли для оценки депрессивноподобного поведения. Тестирование крыс проводили в цилиндрическом пластмассовом баке (высота — 47 см, внутренний диаметр — 35 см), заполненном водой на высоту 35 см, температура воды составляла 25—26°C. Использовали модификацию классического теста Порсолта [17], заключающуюся в том, что животное тестируют однократно, а не дважды с интервалом в 24 ч, так как показано, что однократное тестирование достаточно для выявления уже существующего депрессивноподобного состояния у крыс или эффектов хронического действия антидепрессантов [18]. Фиксировали число и суммарную длительность периодов активного плавания (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением и/или попыткой выбраться). Длительность пассивного плавания (включает периоды полной неподвижности и периоды, когда крыса совершает слабые гребки одной-двумя лапами, необходимые для поддержания тела на плаву, — «иммобильность» по Порсолту) рассчитывали по разнице между длительностью тестирования, которая составляла 10 мин, и длительностью активного плавания. Увеличение длительности пассивного плавания рассматривается как признак развития депрессивноподобного поведения («поведенческого отчаяния») [19].

Проверка эффектов имипрамина. По результатам тестирования двухмесячных крыс в ситуации принудительного плавания формировали две пары групп животных, каждая пара состояла из опытной и контрольной подгрупп. В опытных подгруппах длительность пассивного плавания (включая периоды полной неподвижности) была статистически значимо выше, чем у крыс контрольных подгрупп (рис. 1), что свидетельствовало о депрессивноподобном поведении у крыс опытных подгрупп. В течение 10 дней ежедневно животным одной группы вводили классический трициклический антидепрессант имипрамин (ИМИ, препарат «Мелипрамин» таблетированный, «EGIS», Венгрия) в дозе 20,0 мг/кг, интрагастрально: «ФР + ИМИ», $n = 8$; «Д + ИМИ», $n = 8$; животным второй группы вводили воду: «ФР + вода», $n = 8$; «Д + вода», $n = 8$. Использовали свежеприготовленный раствор ИМИ: таблетки размельчали в ступе и растворяли в требуемом объеме воды. Повторное тестирование плавательного поведения проводили через сутки после последнего введения препаратов.

Определение уровня кортикостерона. Через 30 мин после окончания плавательного теста крыс декапитировали, немедленно отбирали пробы крови, которые использовали для получения сыворотки. Образцы сыворотки хранили при -20°C до момента измерения содержания кортикостерона. Определение уровня кортикостерона проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора EIA-4164 (DRG ELISA, США).

Относительную массу стресс-компетентных органов рассчитывали как отношение массы тимуса, селезенки или надпочечников к массе тела крысы перед декапитацией, в процентах.

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». После предварительной проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова—Смирнова и Лиллиефорса применяли параметрические методы анализа, если гипотезу не отклоняли, и непараметрические методы, если гипотезу отклоняли. Использовали параметрический двухфакторный дисперсионный анализ Two-Way ANOVA [факторы «Группа» (дипротин А/ФР) и «Препарат» (ИМИ/вода)] и однофакторный дисперсионный анализ One-Way ANOVA (фактор «Группа») с *post hoc* анализом по тесту Ньюмана—Кеулса,

непараметрический критерий Манна—Уитни для независимых переменных 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

Оценка уровня тревожности. Результаты оценки основных показателей поведения в тесте ПКЛ приведены в табл. 1. У крыс опытной группы в возрасте 1 мес. пробег и скорость перемещения в ПКЛ были меньше, чем в контрольной группе. Животные опытной группы также имели меньшее число свешиваний из ОР (на уровне выраженной тенденции), длительность свешиваний была статистически значимо меньше, чем у крыс контрольной группы. Результаты свидетельствовали о наличии признаков повышения тревожности и снижении психомоторной активности у крыс подросткового возраста, подвергнутых действию Д в неонатальном периоде.

В возрасте 2 мес. животные опытной и контрольной групп не различались по поведению в ПКЛ. Как в опытной, так и в контрольной группе взросление крыс сопровождалось статистически значимым снижением величины приведенных в табл. 1 показателей поведения в ПКЛ (во всех случаях $p < 0,05$; критерий Вилкоксона).

Таблица 1

Показатели поведения в приподнятом крестообразном лабиринте у крыс, которым в раннем постнатальном периоде вводили ингибитор ДП-IV дипротин А, и у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор (ФР)

Показатели	Группы	
	ФР	Дипротин А
Возраст — 1 мес.		
Число заходов в ОР	$3,5 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,4$
Число заходов в ЗР	$10,7 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,6$
Предпочтение ОР, %	$21,9 \pm 2,5$	$23,6 \pm 2,0$
Общий пробег, см	$2571,7 \pm 86,5$	$2276,8 \pm 83,0^*$
Скорость, см/с	$8,6 \pm 0,3$	$7,6 \pm 0,3^*$
Число свешиваний из ОР	$7,4 \pm 1,0$	$4,8 \pm 0,7^+$
Длительность свешиваний, с	$6,8 \pm 1,1$	$3,2 \pm 0,6^*$
Возраст — 2 мес.		
Число заходов в ОР	$1,0 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
Число заходов в ЗР	$6,5 \pm 0,8$	$6,1 \pm 0,7$
Предпочтение ОР, %	$10,7 \pm 3,0$	$6,9 \pm 2,2$
Общий пробег, см	$1846,3 \pm 84,9$	$1704,7 \pm 89,1$
Скорость, см/с	$6,2 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,3$
Число свешиваний из ОР	$1,0 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$
Длительность свешиваний, с	$0,7 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$
Примечание. * $p < 0,05$; + $p = 0,083$ — по сравнению со значением показателя в контрольной группе (U-критерий Манна—Уитни).		

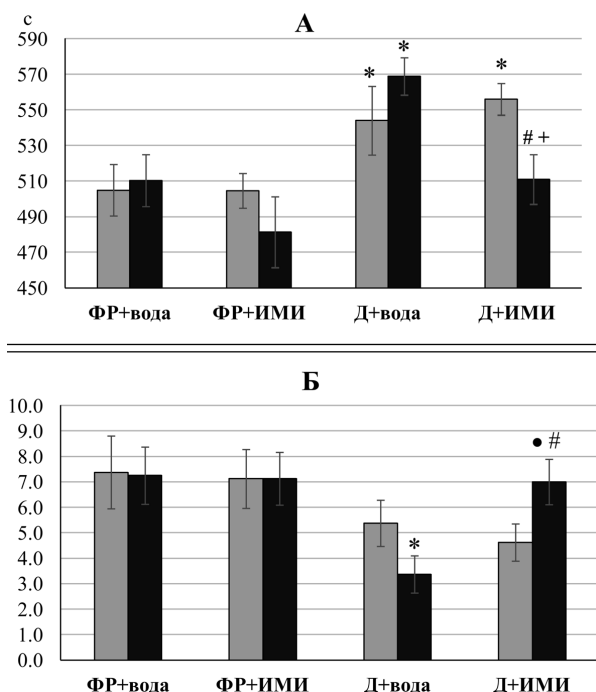


Рис. 1. Влияние имипрамина (ИМИ) на длительность пассивного плавания (А) и число периодов активного плавания (Б) у крыс с депрессивноподобным состоянием, вызванным неонатальным действием дипротина А (Д), в сравнении с крысами контрольной группы (введение ФР).

Серые столбики – фоновые значения показателей в возрасте 2 мес.; черные столбики – через 10 сут. ежедневного введения ИМИ (20 мг/кг) или воды; * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей контрольной группой; • $p < 0,05$; + $p = 0,053$ по сравнению с группой «Д + вода» (post hoc анализ по тесту Ньюмана–Кеулса); # $p < 0,05$ по сравнению со значениями показателей в данной группе в тестирувании до введения ИМИ (по парному t -критерию Стьюдента).

Оценка депрессивноподобного поведения, эффект имипрамина. У крыс опытной группы в возрасте 1 мес. вес не отличался статистически значимо от веса животных в контрольной группе (табл. 2). Однако длительность пассивного плавания была выше, чем в контроле: соответственно $472,0 \pm 13,1$ с и

$425,6 \pm 13,9$ с [$F(1,54) = 5,903$; $p = 0,018$, One-Way ANOVA]. Число периодов активного плавания в опытной группе было ниже, чем в контрольной: соответственно $5,9 \pm 0,5$ и $10,0 \pm 0,8$ [$F(1,54) = 20,279$; $p < 0,001$, One-Way ANOVA]. Результаты свидетельствовали о наличии признаков депрессивноподобного поведения у крыс подросткового возраста, которых в неонатальном периоде подвергали действию Д.

В возрасте двух мес. перед исследованием эффектом ИМИ животные групп «ФР + вода», «ФР + ИМИ», «Д + вода» и «Д + ИМИ» не различались по весу (табл. 2). В группах крыс, которым неонатально вводили Д, длительность пассивного плавания была выше, чем в контрольных подгруппах: $F(3,28) = 3,753$; $p = 0,022$, One-Way ANOVA, результаты post hoc анализа приведены на рис. 1, А. Просматриваемое снижение числа периодов активного плавания в опытных подгруппах не достигало уровня статистической значимости: $F(3,28) = 1,517$; $p = 0,232$, One-Way ANOVA. Таким образом, у взрослых животных опытных подгрупп сохранялись признаки повышения уровня депрессивности в поведении.

По окончании субхронического действия ИМИ/воды Two-Way ANOVA выявил влияние фактора «Группа» [$F = 8,481$; $p = 0,007$] и фактора «Препарат» [$F = 8,195$; $p = 0,008$] на длительность пассивного плавания крыс, взаимодействия факторов не обнаружено [$F = 0,916$; $p = 0,347$]. По результатам апостериорных сравнений сохранялось статистическое значимое превышение величины длительности пассивного плавания в группе «Д + вода» по сравнению с величиной показателя в группе «ФР + вода», то есть сохранялся депрессогенный эффект неонатального действия Д (рис. 1, А). Однако длительность пассивного плавания в группе «Д + ИМИ» не отличалась от величины показателя в группе «ФР + ИМИ», то есть ИМИ оказывал антидеп-

Таблица 2

Влияние имипрамина (ИМИ) в сравнении с водой на вес (г) крыс, которым в раннем постнатальном периоде вводили ингибитор ДП-IV дипротин А, и контрольных животных, которым вводили физиологический раствор (ФР)

Группы, возраст 1 мес.							
ФР				Дипротин А			
$75,0 \pm 1,8$ (n = 27)				$79,4 \pm 1,5$ (n = 30)			
Группы, возраст 2 мес.							
ФР + вода		ФР + ИМИ		Д + вода		Д + ИМИ	
До	После	До	После	До	После	До	После
$200,8 \pm 6,6$ (n = 8)	$249,0 \pm 7,5$ (n = 8)	$180,5 \pm 9,9$ (n = 8)	$211,8 \pm 10,1$ * (n = 8)	$192,0 \pm 7,9$ (n = 8)	$245,3 \pm 7,8$ (n = 8)	$198,8 \pm 4,8$ (n = 8)	$222,8 \pm 4,4$ * (n = 8)

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой крыс, которым вводили воду (post hoc анализ по тесту Ньюмана–Кеулса).

рессивное действие. Кроме того, длительность пассивного плавания в группе «Д + ИМИ» в тенденции была ниже, чем в группе «Д + вода». По результатам внутригрупповых сравнений в группе «Д + ИМИ» длительность пассивного плавания после введения ИМИ также снижалась.

После введения ИМИ/воды с помощью Two-Way ANOVA обнаружено влияние фактора «Группа» на число периодов активного плавания: $F = 4,387$; $p = 0,045$; в тенденции также выявлено влияние фактора «Препарат» ($F = 3,357$; $p = 0,078$) и взаимодействие факторов ($F = 3,856$; $p = 0,060$). По результатам *post hoc* анализа (рис. 1, Б) в группе «Д + вода» число периодов активного плавания было ниже, чем в группе «ФР + вода», то есть в отсутствие ИМИ депрессивноподобное поведение у крыс опытной подгруппы было выражено. В группе «Д + ИМИ», напротив, число периодов активного плавания было больше, чем в группе «Д + вода». Кроме того, величина показателя в группе «Д + ИМИ» повышалась после ИМИ по сравнению со значением, полученным в предыдущем тестировании.

По результатам внутригруппового анализа во всех группах вес крыс по окончании введения препаратов был выше, чем перед введением (во всех случаях $p < 0,001$, парный *t*-критерий Стьюдента). Двухфакторный анализ Two-Way ANOVA выявил влияние фактора «Препарат» на вес крыс: $F = 15,009$; $p < 0,001$. Вес животных в подгруппах с введением ИМИ был статистически значимо ниже, чем в соответствующих подгруппах животных, которым вводили воду (табл. 2).

Уровень кортикостерона и относительная масса стресс-компетентных органов. С помощью двухфакторного дисперсионного анализа Two-Way ANOVA обнаружено влияние фактора «Препарат» (выраженная тенденция) на уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс: $F = 3,801$; $p = 0,061$; не обнаружено статистически значимого влияния фактора «Группа», однако установлено статистически значимое взаимодействие факторов «Группа» и «Препарат»:

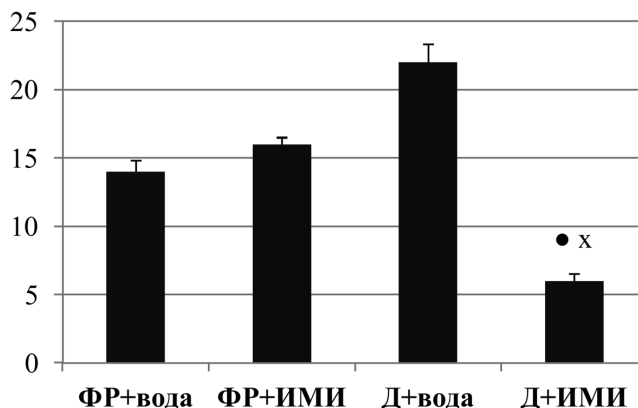


Рис. 2. Влияние имипрамина (ИМИ) на уровень кортикостерона (нг/мл) в сыворотке крови крыс с депрессивноподобным состоянием, вызванным неонатальным действием дипротина А (Д), и крыс контрольной группы (введение ФР). • $p < 0,05$ по сравнению с группой «Д + вода»; * $p = 0,090$ по сравнению с группой «ФР + ИМИ» (*post hoc* анализ по тесту Ньюмана—Кеулса).

У крыс подгруппы «Д + ИМИ» уровень кортикостерона в сыворотке крови был статистически значимо ниже, чем у крыс подгруппы «Д + вода» и, в тенденции, ниже, чем у крыс в группе «ФР + ИМИ» (рис. 2), что свидетельствовало о нормализующем действии ИМИ на величину показателя. В совокупности, полученные результаты позволяют связать высокий уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс с депрессивноподобным состоянием животных.

Выявлено влияние фактора «Группа» на относительную массу селезенки у крыс после введения препаратов: $F = 4,145$; $p = 0,051$. У крыс, получавших неонатально Д, относительная масса селезенки была снижена. Фактор «Препарат» не оказывал влияния на величину данного показателя и не взаимодействовал с фактором «Группа»: соответственно, $F = 2,760$; $p = 0,108$ и $F = 0,030$; $p = 0,863$. Факторы «Группа» и «Препарат» не оказывали влияние на относительную массу тимуса и надпочечников у крыс опытных и контрольных подгрупп и не взаимодействовали. Относительная масса стресс-компетентных органов приведена в табл. 3.

Таблица 3

Относительная масса органов, вовлеченных в стресс-реакцию (мг/г веса тела), после введения ИМИ/воды крысам, которым в раннем постнатальном периоде вводили ингибитор ДП-IV дипротин А (Д), и контрольным животным, которым вводили физиологический раствор (ФР)

Группы	Органы, вовлеченные в стресс-ответ		
	Селезенка	Тимус	Надпочечники
ФР + ИМИ	3,94 ± 0,31	1,20 ± 0,08	0,17 ± 0,01
ФР + Вода	3,50 ± 0,20	1,37 ± 0,08	0,18 ± 0,01
Д + ИМИ	3,38 ± 0,45	1,36 ± 0,13	0,17 ± 0,01
Д + Вода	2,84 ± 0,12	1,51 ± 0,12	0,19 ± 0,01

В данной серии исследований были воспроизведены описанные ранее [10] нарушения поведения, проявившиеся повышением тревожности и депрессивности у крыс подросткового возраста и взрослых особей, которых подвергали действию ингибитора ДП-IV дипротина А на второй-третьей неделях постнатального развития. У животных опытной группы наблюдали признаки повышения тревожности в возрасте 1 мес., которые не выявлялись у взрослых крыс. Кроме того, крысы опытной группы демонстрировали депрессивно-подобное поведение в тесте принудительного плавания в возрасте 1 и 2 мес. В совокупности результаты свидетельствуют о том, что стойкое, воспроизводимое в разных сериях, смешанное тревожно-депрессивное состояние, которое развивается у крыс после неонатального действия дипротина А, удовлетворяет требованиям одного из критериев валидности моделей эмоционально-мотивационных расстройств на животных — критерия «внешней схожести» (face validity) с клиническим прообразом [14].

Нормализация показателей поведения крыс в тесте принудительного плавания после субхронического действия ИМИ свидетельствует о том, что модель, по крайней мере, по ответу на действие антидепрессанта ИМИ, также удовлетворяет требованиям другого критерия валидности — прогностического критерия (predictive validity). В наших исследованиях ИМИ в условиях субхронического введения снижал вес крыс, что согласуется с данными других исследователей и объясняется тем, что в использованных дозах ИМИ снижает потребление пищи [20]. Кроме того, ИМИ нормализовал уровень кортикостерона у животных, которым в неонатальном периоде вводили Д. Эти данные демонстрируют вовлеченность ГГА-оси в патогенез смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием Д на второй-третьей неделях постнатального онтогенеза.

С учетом ранее полученных данных о гиперактивации ГГА-оси у животных со смешанным тревожно-депрессивным состоянием, вызванным постнатальным действием другого ингибитора ДП-IV метионил-2(S)-дианоипиролидина [13], и схожести внешних проявлений расстройств на двух моделях [8, 10] можно говорить о том, что нарушение функционирования ГГА-оси является общим механизмом развития этих смешанных тревожно-депрессивных состояний. Результаты работы хорошо согласуются с принятыми представлениями о гиперактивации ГГА-оси в механизмах развития эмоционально-мотивационных расстройств при аверсивных воздействиях, в том числе в раннем возрасте — в период становления нейроэндокринной регуляции организма [21, 22]. В наших исследованиях антидепрессант ИМИ в условиях субхронического введения снижал уровень кортикостеро-

на в плазме крови, что укладывается в представления о подавлении гиперактивности ГГА-оси имидами [23].

ДП-IV может участвовать в регуляции активности ГГА-оси опосредованно, через свои субстраты, к числу которых относится ряд провоспалительных цитокинов [24, 25]. Считается, что воспалительный ответ играет важную роль в патофизиологии депрессии [26, 27]. Так, депрессогенное действие длительного стрессирования сопровождается усилением симпатического тонуса и последующим повышением высвобождения из макрофагов провоспалительных цитокинов [28]. Эти цитокины участвуют в патогенезе расстройств психической деятельности по нескольким путям, в том числе вызывая гиперактивацию ГГА-оси путем снижения эффективности обратной связи за счет уменьшения чувствительности глюкокортикоидных рецепторов [27], с последующим развитием депрессивных расстройств. Выявленное в настоящей работе снижение относительной массы селезенки свидетельствует о нарушении иммунного ответа, что характерно для депрессий [29] и наблюдается при экспериментальном моделировании депрессивно-подобных расстройств [30].

Классический конструкционный критерий валидности модели депрессии (construct validity) предполагает, что наблюдаемые на модели нарушения интерпретируются так же, как при заболевании и находятся в установленной эмпирической и теоретической взаимосвязи с депрессией [14]. Исходя из этого, можно считать, что по наличию признаков нарушения функционирования ГГА-оси и иммунной системы модель смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием ингибитора ДП-IV, удовлетворяет критерию конструкционной валидности.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют в пользу адекватности модели смешанного тревожно-депрессивного расстройства, возникающего у крыс вследствие действия ингибитора ДП-IV дипротина А на второй-третьей неделях постнатального развития, клиническому прообразу заболевания.

Заключение

В работе показано, что трициклический антидепрессант ИМИ в условиях его субхронического интрагастрального введения в дозе 20 мг/кг крысам с эмоционально-мотивационными расстройствами, возникшими вследствие действия ингибитора ДП-IV в 5-18 постнатальные дни, подавляет депрессивно-подобное поведение животных и снижает уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс.

References

1. Hochberg Z., Feil R., Constancia M., Fraga M., Junien C., Carel J.-C. et al. Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. *Endocr. Rev.* 2011. 32(2): 159-224. doi: 10.1210/er.2009-0039
2. Gershon A., Sudheimer K., Tirouvanziam R., Williams L.M., O'Hara R. The long-term impact of early adversity on late-life psychiatric disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 2013; 15(4): 352. doi: 10.1007/s11920-013-0352-9
3. Poletaeva I.I., Perepelkina O.V., Boiarshinova O.S., Lil'p I.G., Markina N.V., Timoshenko T.V. et al. Neonatal injections of pharmacological agents and their remote genotype-dependent effects in mice and rats. *Ontogenez.* 2012; 43(6): 387-400. (in Russian)
4. van Bodegom M., Homberg J.R., Henckens M.J.A.G. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front. Cell Neurosci.* 2017; 11: 87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087
5. Deng J., Lamb J.R., McKeown A.P., Miller S., Murgia P., Guest P.C. et al. Identification of altered dipeptidyl-peptidase activities as potential biomarkers for unipolar depression. *J. Affect. Disord.* 2013; 151(2): 667-72. doi: 10.1016/j.jad.2013.07.015.
6. Neznamov G.G., Zolotov N.N., Syunyakov T.S., Syunyakov S.A., Metlina M.V., Nazarova G.A. Activity of prolyl-specific enzymes in patients with anxiety disorders and its changes during Afobazole treatment. *Psihiatrija i psihofarmakoterapija.* 2014; 16(1): 21-7. (in Russian)
7. Frerker N., Raber K., Bode F., Skripuletz T., Nave H., Klemann C. et al. Phenotyping of congenic dipeptidyl peptidase 4 (DP4) deficient Dark Agouti (DA) rats suggests involvement of DP4 in neuro-, endocrine, and immune functions. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009; 47(3): 275-87. doi: 10.1515/CCLM.2009.064
8. Krupina N.A., Kushnareva E.Iu., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Experimental model of anxiety-depression state in rats exposed to inhibitor of dipeptidyl peptidase IV methionyl-2(S)-cyano-pyrrolidine in early postnatal period. *Zh. Vyssh Nerv Dejat Im I P Pavlova.* 2009; 59(3): 360-372. (in Russian)
9. Khlebnikova N.N., Kushnareva E.Yu., Krupina N.A., Rodina V.I. Novel synthetic inhibitor of dipeptidyl peptidase IV methionyl-2(S)-cyanopyrrolidine induces latent aggression in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011; 21(Suppl.3): S302. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X(11)70477-1
10. 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): 167-183. doi: 10.4236/jbbs.2016.64018.
11. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Yu., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Effect of imipramine and prolyl endopeptidase inhibitor benzyloxycarbonyl-methionyl-2(s)-cyanopyrrolidine on activity of proline-specific peptidases in the brain of rats with experimental anxious-depressive syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 152(4): 409-12. doi: 10.1007/s10517-012-1540-z
12. Krupina N.A., Zubkov E.A., Orshanskaya E.V., Zorkina Y.A., Khlebnikova N.N. Gene expression in the brain of adult rats with behavioural alterations caused by neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-IV inhibitors diprotin A and sitagliptin. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016; 26(Suppl. 2): S173. doi: 10.1016/S0924-977X(16)31000-8
13. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Y. Blood serum corticosterone level in modeling depression-like states in rats. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2013; 4:3-9. (in Russian)
14. 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.
15. Wolf 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.
16. 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.
17. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 1978; 47 (4): 379 — 91.
18. Overstreet D.H., Pucilowski O., Rezvani A.H., Janowsky D.S. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* 1995; 121(1): 27-37.
19. Wang Q., Timberlake M.A. Prall K., Dwivedi Y. The recent progress in animal models of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017; 77: 99-109. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.008.
20. Mogensen J., Pedersen T.K., Holm S. Effects of chronic imipramine on exploration, locomotion, and food/water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 47(3): 427-35. https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90139-2
21. Kasyanov E.D., Mazo G.E. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in depressive disorder: current state of the problem. *Psihicheskoe zdorov'e.* 2017. 8: 27-34. (in Russian)
22. 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.
23. Frost P., Bornstein S., Ehrhart-Bornstein M., O'Kirwan F., Hutson C., Heber D. et al. The prototypic antidepressant drug, imipramine, but not Hypericum perforatum (St. John's Wort), reduces HPA-axis function in the rat. *Horm. Metab. Res.* 2003; 35(10): 602-06. doi: 10.1055/s-2003-43507
24. 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
25. Mentlein R. Cell-surface peptidases. *Int. Rev. Cytol.* 2004; 235: 165-213.
26. Raison C.L., Capuron L., Miller A.H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 2006; 27(1): 24-31. doi: 10.1016/j.it.2005.11.006
27. Oglodek 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.
28. Maletic V., Robinson M., Oakes T., Iyengar S., Ball S.G., Russell J. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Clin. Pract.* 2007; 61(12): 2030-40. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01602.x
29. Suzuki H., Savitz J., Kent Teague T., Gandhapudi S.K., Tan C., Misaki M. et al. Altered populations of natural

killer cells, cytotoxic T lymphocytes, and regulatory T cells in major depressive disorder: Association with sleep disturbance. *Brain Behav. Immun.* 2017; 66:193-200. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.011

30. Zhai X.J, Chen F, Chen C, Zhu C.R, Lu Y.N. LC-MS/MS based studies on the anti-depressant effect of hypericin in the chronic unpredictable mild stress rat model. *J. Ethnopharmacol.* 2015;169: 363-9. doi: 10.1016/j.jep.2015.04.053.

Сведения об авторах:

Крупина Наталия Александровна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: krupina-na@yandex.ru