

ЦИТАЛОПРАМ ПРОТИВОДЕЙСТВУЕТ РАЗВИТИЮ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ МЫШЕЙ В МОДЕЛИ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ АГЕДОНИИ

Стрекалова Т.В.^{1,2,3}, Лыско А.И.¹, Трофимов А.Н.^{2,4}, Прошин А.Т.⁵, Помыткин И.А.⁶, Умрюхин А.Е.^{2,3,5}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, e-mail: tatslova@hotmail.com, allysko@mail.ru;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России», лаборатория психиатрической нейробиологии Института молекулярной медицины, Москва, e-mail: alum1@yandex.ru, tatslova@hotmail.com, iem@iemrams.ru;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России», кафедра нормальной физиологии, Москва, e-mail: alum1@yandex.ru;

⁴ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, e-mail: iem@iemrams.ru;

⁵ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», Москва, e-mail: proshin_at@mail.ru, alum1@yandex.ru;

⁶ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России», отдел передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины, Москва, e-mail: ipomytkin@gmail.com

Снижение предпочтения к раствору сахара на фоне хронического стресса у грызунов рассматривается как показатель агедонии, ключевого симптома депрессии, которое часто сопровождается нарушением когнитивных функций. Однако хронический стресс сам по себе известен негативным действием на когнитивные функции и гиппокампальную пластичность. Мы изучали эффекты антидепрессанта циталопрама на предпочтение к раствору сахара, поведение в тесте вынужденного плавания и гиппокамп-зависимое поведение в модели стресса на мышах C57BL/6N. В этой модели хронический стресс вызывает агедонию у 50-70% мышей, тогда как остальные животные не проявляют депрессивноподобных изменений. Циталопрам (15 мг/кг/сут) вводили с питьевой водой за 1 неделю до стресса и далее в течение 4 недель стресса, включающего экспозицию мыши крысе, подвешивание за хвост и иммобилизацию. Агедонию оценивали в тесте предпочтения к 1% р-ру сахара, за критерий агедонии принимали снижение предпочтения к раствору сахара менее 65%. Когнитивные функции исследовали в аудиторной и контекстуальной моделях условно-рефлекторного замирания, а также в тесте извлечения предметов из цилиндра. Циталопрам снизил процент агедоничных мышей в стрессированной группе, потерю массы тела, предотвратил стресс-индуцированное увеличение поведения флотинга и нарушение гиппокамп-зависимых показателей поведения. Среди животных, не получавших циталопрам, наблюдалось снижение показателей контекстуальной памяти и дислокации предметов из трубки только у агедоничной, но не у неагедоничной группы. Аудиторное условно-рефлекторное замирание не менялось ни у одной из групп. Таким образом, настоящие данные указывают на нарушение гиппокамп-зависимых функций у хронически стрессированных животных на фоне развития агедонии, но не у животных, устойчивых к формированию депрессивноподобного синдрома. В целом полученные результаты подтверждают валидность предложенной модели в симуляции депрессии у мышей.

Ключевые слова: сахарозный тест, агедония, хронический стресс, когнитивные функции, устойчивость к стрессу, депрессия, циталопрам, мышь.

CITALOPRAM COUNTERACTS THE DEVELOPMENT OF COGNITIVE IMPAIRMENT IN THE MODEL OF STRESS-INDUCED ANHEDONIA IN MICE

Strekalova T.V.^{1,2,3}, Lysko A.I.¹, Trofimov A.N.^{2,4}, Proshin A.T.⁵, Pomytkin I.A.⁶, Umriukhin A.E.^{2,3,5}

¹FSBSI "Institute of General Pathology and Pathophysiology", Moscow, e-mail: tatslova@hotmail.com, allysko@mail.ru;

²MSMU I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Molecular Medicine, Laboratory of Psychiatric Neurobiology, e-mail: tatslova@hotmail.com, alum1@yandex.ru, iem@iemrams.ru;

³MSMU I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Normal Physiology, First Moscow State University, e-mail: alum1@yandex.ru;

⁴FSBSI I.P.Pavlov "Institute of experimental medicine", Sankt-Peterburg, e-mail: iem@iemrams.ru;

5FSBSI "P.K. Anokhin Research Institute of normal Physiology", Moscow, e-mail: proshin_at@mail.ru, alum1@yandex.ru;

⁶MSMU I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Regenerative Medicine, Department of Advanced Cell Technologies, e-mail: ipomytkin@gmail.com

A decrease in sucrose preference in rodents is regarded as a sign of anhedonia, a key symptom of depression. We studied effects of citalopram, the antidepressant from serotonin re-uptake inhibitors, on sucrose preference, hippocampus-dependent behaviour and behaviour in the forced swim test in the optimized model of chronic stress / anhedonia. In this model, chronic stress induced anhedonia in 50-70% of mice C57BL/6N, whereas remaining animals do not display depressive-like changes. Citalopram (15 mg/kg/day) was administered via drinking water starting 1 week prior the onset of stress and then in a course of a 4 week stress. Stress procedure was comprised of mouse exposure to a predator (a rat), immobilization stress. A state of anhedonia was determined in a sucrose preference test using 1% sucrose solution, floating behavior was studied in the forced swim test. Cognitive parameters were studied in the model of fear conditioning. For a criterion of anhedonia, a decrease of a sucrose preference below 65% was applied, in accordance with previously validated results that were obtained in the current stress model Citalopram decreased percentage of anhedonic mice in stress group, loss of body weight, has prevented stress-induced increase of floating behaviour and impairment of hippocampus-dependent parameters of behaviour. These data suggest greater accuracy of proposed here protocols of the sucrose test and chronic stress paradigm in modelling a depressive like state in mice, and assessment of antidepressant pharmacological treatments. Together, these results support the validity of proposed model in simulation of depression in mice.

Keywords: sucrose test; anhedonia; chronic stress; cognitive functions; resilience to stress; depression; citalopram; mouse.

Депрессия является тяжелым заболеванием, распространяющимся более чем на 12% населения экономически развитых стран; к 2020 году она может стать второй по частоте причиной нетрудоспособности в мире [1; 2]. В России проблема заболеваемости депрессией приобрела большую значимость из-за колоссальных социальных потрясений последних десятилетий [1]. Все это предполагает высокую социальную ценность исследований основ этого заболевания, что может улучшить его профилактику и лечение.

Согласно диагностической системе DSM V-TR, агедония, или сниженная способность воспринимать положительные стимулы, относится к основным симптомам депрессии [2; 3]. Когнитивные нарушения часто сопутствуют депрессивным расстройствам [3]. Хронический стресс является наиболее разработанным способом индукции агедонии у грызунов [4-6], снижение потребления сахара / сахарина в этой модели расценивают как признак агедонии [7-9], поскольку антидепрессанты препятствуют его развитию [10; 11].

Ранее нами была разработана мышьяная модель хронического стресса [10-12], в которой стресс вызывает агедонию, определяемую по снижению предпочтения к раствору сахара, у части, но не у всех животных. Это позволяет отдельно исследовать агедоничную и неагедоничную подгруппы и обеспечивает внутренний контроль тех эффектов хронического стресса, которые не связаны с депрессивным состоянием. В данном исследовании мы изучали вопрос, нарушены ли когнитивные функции при агедонии и в результате воздействия хроническим стрессом, не сопровождающегося ее развитием. Так, известно, что хронический стресс нарушает пластичность гиппокампа [5; 9]. Также для изучения этой взаимосвязи использовали хроническую подачу антидепрессанта циталопрама [10].

Цель исследования

Изучить эффекты антидепрессантной терапии на показатели агедонии и когнитивные функции в мышинной модели стресса.

Материал и методы исследования

Животные. Использовали 3.5-месячных самцов C57BL/6N, содержащихся в стандартных лабораторных условиях, как описано ранее [10], в соответствии с действующими положениями этических норм в ЕС и одобрением этического комитета Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии.

Схема эксперимента. За 2 недели до стресса у всех мышей были изучены социальное поведение, предпочтение к 1%-ному раствору сахара. 12 контрольных животных и 23 мыши из группы стресса получали обычную воду для питья, 10 контрольных животных и 22 мыши из группы стресса получали раствор циталопрама за 1 неделю до начала стресса. 4-недельный стресс включал три вида стресса (см. ниже), через 2.5, 3.5 и 4 недели стресса определяли вес мышей и предпочтение к 1%-ному раствору сахара, после чего животные были классифицированы как агедоничные либо неагедоничные. Далее мыши были протестированы в модели вынужденного плавания, модели аудиторного и контекстуального условно-рефлекторного замирания и тесте гиппокамп-зависимого поведения дислокации предметов из рубки.

Хронический стресс. Стрессоры ротировали по дням: 1-7 – непрерывная экспозиция крысы; 8-10 – иммобилизация 11-17 – периодическая экспозиция крысы; 18-19 – водная иммерсия; 20-22 - водная иммерсия и иммобилизация; 23 – подвешивание за хвост; 24-26 – подвешивание за хвост и водная иммерсия; 27-28 – стресс подвешивания за хвост и иммобилизация [10].

Непрерывная экспозиция крысы в клетках. Мышь помещалась в клетку (22x8.5x14 см), которую ставили в домашнюю клетку крысы (21.00 - 9.00).

Периодическая экспозиция крысы. Мышей в прозрачных цилиндрических контейнерах (15xØ8 см) помещали в крысиную клетку на 12 ч (21.00 - 9.00).

Стресс иммобилизации. Животных помещали в пластиковые трубки (8xØ2,6 см) на 2 часа в светлое время цикла освещения.

Стресс водной иммерсии. Животных помещали в пластиковые трубки (8xØ2,6 см), в которых они могли двигаться, и ставили их в емкость с водой 21 °С на 10 мин, так что тела были в воде наполовину.

Стресс подвешивания за хвост. Мышей подвешивали за хвост на 40 мин.

Сахарозный тест. Между 9.00 – 19.00 мыши получали 10-ч доступ к 1%-ному раствору сахара и обычной воде. Бутылки взвешивали до и после теста, предпочтение к

раствору сахара рассчитывали в процентах от объема выпитой жидкости. По его снижению <65% мышей определяли как агедоничных, остальных мышей причисляли к неагедоничным.

Тест вынужденного плавания. Мышей помещали на 2 мин в прозрачный контейнер (20x35x15 см) с водой (30 °С). При красном свете измеряли латентный период флотирования и его общую длительность.

Модель условно-рефлекторного замирания. Установка (Evolocus LLC Tarrytown, NY, USA и «Открытая наука», Москва) состояла из прозрачного пластикового контейнера (25x25x50 см) с решётчатым полом из нержавеющей стали (33 стержня 2 мм в диаметре). Одинокный разряд переменного тока (АС, 50 Гц, 0,7 мА) подавался на решётчатый пол после двухминутного периода акклиматизации, по окончании 30-секундного звукового сигнала, который производился с помощью звукового генератора (80дБ). Поведение замирания или его отсутствие отмечалось каждые 10 сек через 24 часа при помещении мышей в экспериментальный контейнер для оценки контекстуальной памяти и через 30 часов при помещении мышей в новый контейнер (15x20x40 см) и подаче звукового сигнала в течение 180-секундного интервала. Подсчитывался процент времени, в течение которого животное проявляло поведение замирания.

Тест на гиппокамп-зависимое поведение. В домашнюю клетку мышей помещали бумажную трубку (10xØ4 см), заполненную 20 фрагментами корма, и определяли динамику ее опустошения в течение 20 мин [13].

Подача циталопрама. Циталопрам (Lundbeck, Копенгаген, Дания) вводили растворенный в воде, исходя из дозы 15 мг/кг и среднего потребления воды 3 мл/сут.

Статистический анализ. Использовали программу Statistica 5.01 (Чикаго, Иллинойс, США), применяя непараметрические тесты Kruskal-Wallis test и Mann-Whitney U, множественный регрессионный анализ Multiple R и F и тест Fischer. Доверительный интервал был 95% ($p < 0.05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Эффекты циталопрама в сахарозном тесте. В стрессированной группе животных, не получавших циталопрам, через 2,5, 3,5 недели (данные не представлены) и 4 недели стресса наблюдалось достоверное снижение предпочтения к раствору сахара в сравнении с контролем ($p=0,003$, $p=0,002$ и $p=0,042$ соответственно; рис. 1). При этом на фоне введения антидепрессанта этот эффект наблюдался после 4 недель стресса ($p=0,025$), но не через 2,5 и 3,5 недели стресса ($p < 0,05$). Через 3,5 и 4,5 недели стресса стрессированные животные, не получавшие циталопрам, имели достоверно сниженное потребление раствора сахара в сравнении с контролем ($p=0,008$ и $p=0,01$), а также стрессированной группой, получавшей антидепрессант ($p=0,035$ и $p=0,46$).

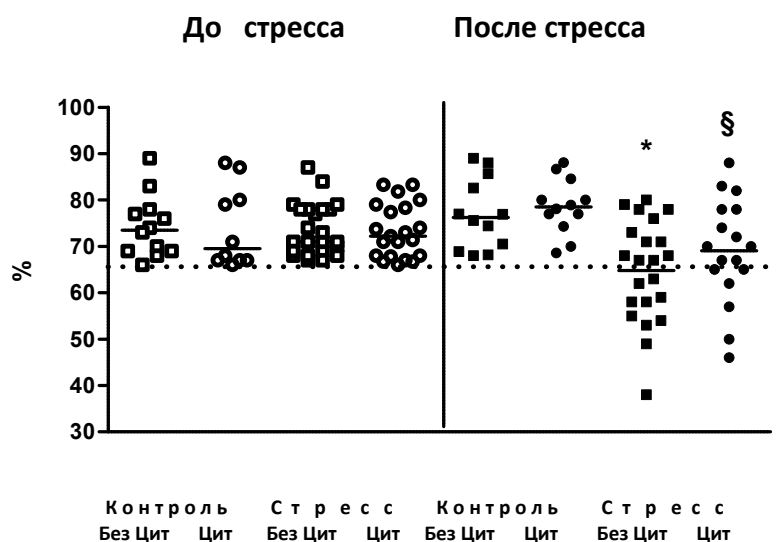


Рис. 1. Предпочтение к раствору сахара

До стресса после недельного введения циталопрама предпочтение к раствору сахара (ось У) не различалось между группами. Мыши, подвергнутые стрессу и не получавшие циталопрам, проявили достоверное снижение предпочтения к раствору сахара в сравнении с контрольными. У мышей, подвергнутых стрессу и получавших циталопрам, таких изменений не наблюдалось (* $p < 0,05$ в сравнении с контролем, § $p < 0,05$ в сравнении с группой стресса, получавшей циталопрам); пунктирная линия обозначает 65% - предпочтение к раствору сахара - порог критерия «агедонии» (см. текст). **БезЦит / Цит**: без введения циталопрама, с введением циталопрама соответственно.

Последняя группа не отличалась по этому параметру от контрольных мышей ($p < 0,05$); введение циталопрама контрольной группе не меняло параметры сахарозного теста (данные не представлены).

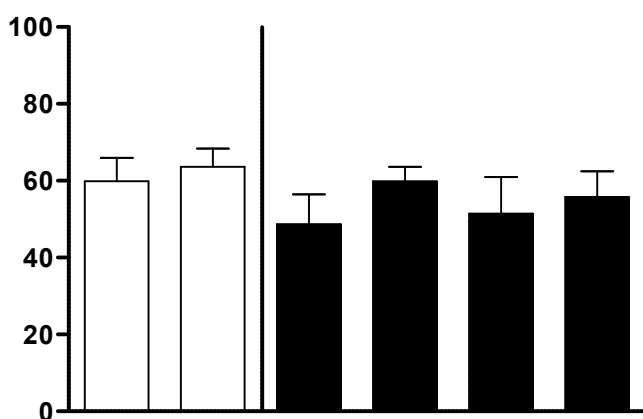
Согласно 65%-ному критерию агедонии, введение циталопрама приводило к достоверному снижению доли агедоничных животных после стрессирования ($p = 0,028$). Таким образом (Т.о.), циталопрам замедлял развитие агедонии, что считается классическим проявлением антидепрессантного воздействия в различных моделях депрессии [4; 13]. Описанные эффекты известны как типичные для длительного введения антидепрессантов при стрессе [4; 5; 11].

Эффекты циталопрама в тесте вынужденного плавания. В сравнении с контролем стрессированные животные без антидепрессанта, но не стрессированные мыши, получавшие циталопрам, проявляли укорочение латентного периода и увеличение продолжительности флотирования ($p = 0,044$, $p = 0,015$, $p = 0,25$ и $p = 0,86$ соответственно, данные не представлены). Т.о., введение циталопрама препятствовало увеличению продолжительности поведения

флотирования в результате стресса; эти эффекты считаются классическими признаками антидепрессантного воздействия в моделях депрессии [3; 11].

Влияние циталопрама на массу тела. Вес тела был достоверно снижен у стрессированной группы на протяжении всего периода стресса; циталопрам противодействовал этому эффекту стресса в период 2,5–4 недель стрессирования (данные не представлены). Этот эффект, как было ранее показано, сопровождается антидепрессивное воздействие, в частности, циталопрама [10; 12].

Эффекты стресса и циталопрама на гиппокамп-зависимое поведение в тесте



ти замирания в тесте аудиторного ий между группами ($p=0,62$, рис. 2А), индалина-зависимой памяти на фоне и подаче циталопрама. Сравнение 'ального кондиционирования выявило показало, что группа стрессированных признаки агедонии, имела значительно ю с контрольной группой ($p<0,01$, рис.

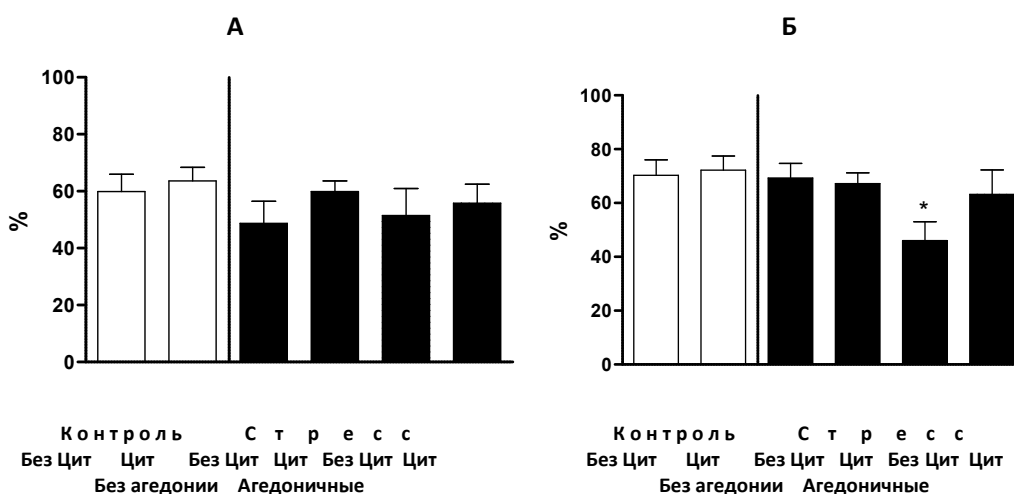


Рис. 2. Условно-рефлекторное замирание при кондиционировании

(А) Процент продолжительности замирания в модели аудиторного кондиционирования достоверно между группами не различался. (Б) Мыши, подвергнутые стрессу, классифицированные как агедоничные (см. текст) и не получавшие циталопрам, проявили достоверное снижение продолжительности замирания в модели контекстуального кондиционирования в сравнении с контрольными. У остальных групп мышей таких изменений не наблюдалось (* $p< 0,05$ в сравнении с контролем). Ось У - процент

продолжительности замирания от времени тестирования. **БезЦит / Цит**: без введения циталопрама, с введением циталопрама соответственно.

Других достоверных различий между группами выявлено не было. Т.о., развитие стресс-индуцированной агедонии сопровождается снижением показателей гиппокамп-зависимой формы памяти. Введение циталопрама предотвращало эти нарушения у стрессированных мышей.

Эффекты стресса и циталопрама на гиппокамп-зависимое поведение в тесте дислокации предметов. Агедоничные мыши проявляли резкое увеличение латентного периода с мелкими предметами ($p < 0,001$), тогда как (рис. 3). Т.о., циталопрам предупреждал состояние агедонии в данной модели [12].

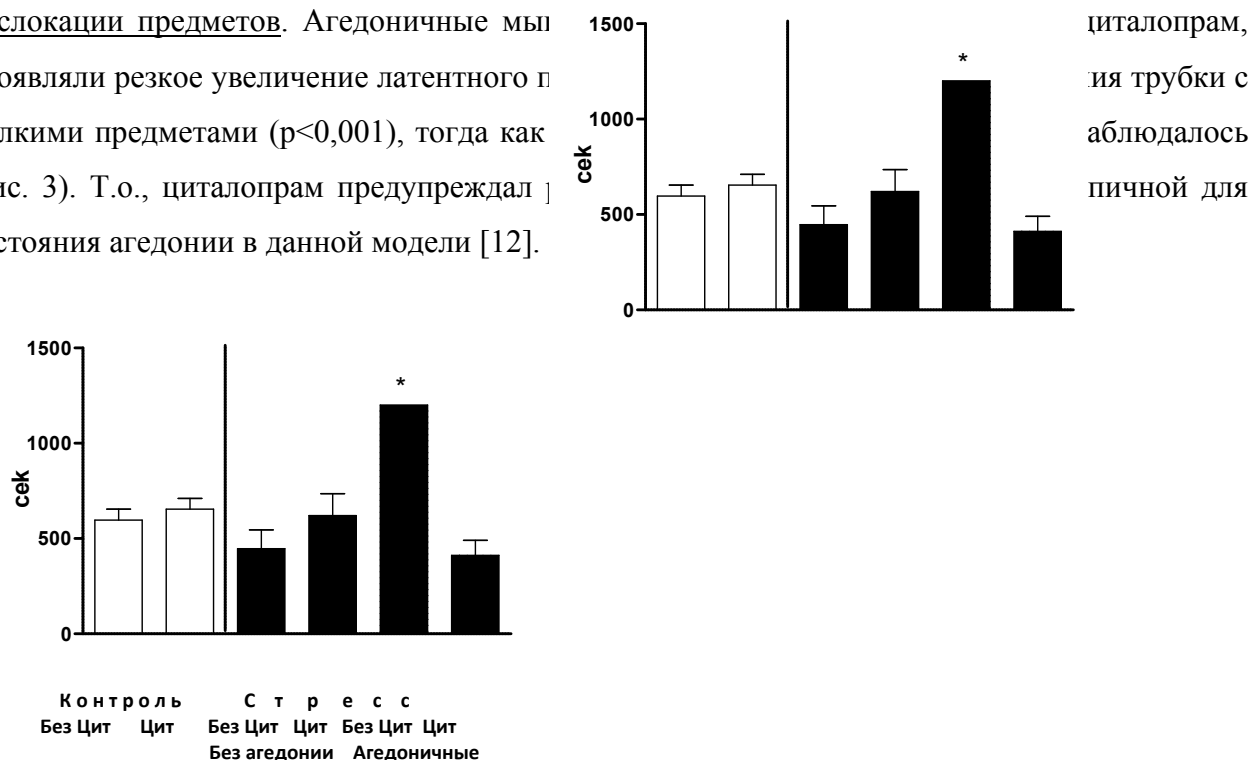


Рис. 3. Поведение в тесте дислокации предметов

Агедоничные мыши среди животных, не получавших циталопрам, проявляли резкое увеличение латентного периода 50%-ного опустошения трубки с мелкими предметами ($*p < 0,05$, в сравнении с контролем), тогда как в других группах такого явления не наблюдалось. Ось Y - латентный период 50%-ного опустошения трубки с мелкими предметами. **БезЦит / Цит**: без введения циталопрама, с введением циталопрама соответственно.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что хронический стресс нарушает гиппокамп-зависимые когнитивные функции исключительно у подгруппы животных, предрасположенных к развитию агедонии, что также отражает ограниченную функцию генома в регуляции системных функций, учитывая использование инбредной линии в работе [13]. Животные, устойчивые к развитию депрессивноподобного синдрома на фоне стресса не обнаружили снижения показателей контекстуальной памяти и поведения дислокации мелких

предметов из трубки. Миндалино-зависимая форма обучения, как показали данные в модели аудиторного кондиционирования, не была нарушена на фоне стресса и агедонии. Введение циталопрама предотвращало вышеописанные нарушения у группы мышей, классифицированных как агедоничные, что требует дальнейшего изучения и может быть интерпретировано как проявление антидепрессантных эффектов хронической подачи циталопрама в данной модели, подтверждая основное заключение работы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11-04-14, программы «5-100» и Министерства здравоохранения Российской Федерации (программа «Изучение механизмов гиппокампальной пластичности у устойчивых и предрасположенных к стресс-индуцированному синдрому депрессии мышей»).

Список литературы

1. Ольбинская Л.И. О проблеме депрессии в терапевтической практике. Что показала программа КОМПАС // Терапевтический архив. 2005. №10. С.85-89.
2. Kessler R.C., Chiu W.T., Demler O., Merikangas K.R., Walters E.E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Archives of General Psychiatry. 2005. vol. 62. no. 6. P. 617-627.
3. Hamilton M. Development of a rating scale for primary depressive illness. British Journal of Clinical Psychology. 1967. vol. 6. no. 4. P. 278-296.
4. Григорьян Г.А., Гуляева Н.В. Моделирование депрессии на животных: поведение как основа методологии, критериев оценки и классификации // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2015. Т. 65. №6. С.643-660.
5. Nestler E.J., Hyman S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. Nature Neuroscience. 2010; vol. 13. no.10. P. 1161-1169.
6. Коваленко И.Л., Вишнинецкая Г.Б., Бондарь Н.П., Кудрявцева Н.Н. Снижение потребления раствора сахарозы мышами линии cba/lac в условиях хронического социального стресса // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2010. Т. 60. № 5. С.609-614.
7. Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Мидзяновская И.С., Бирюкова Л.М., Фоломкина А.А., Базян А.С. Нейрохимические механизмы депрессивноподобного поведения у крыс линии WAG/RIJ // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2013. Т. 63. № 3. С.303-316.
8. Couch Y., Anthony D.C., Dolgov O., Revischin A., Festoff B., Santos A.I., Steinbusch H.W.M., Strekalova T. Microglial activation, increased TNF and SERT expression in the prefrontal cortex

define stress-altered behaviour in mice susceptible to anhedonia. *Behavior, Brain, Immunity*. 2013. no. 29. P. 136-146.

9. Iniguez S.D., Aubry A., Riggs L.M., Alipio J.B., Zanca R.M., Flores-Ramirez F.J., Hernandez M.A., Nieto S.J., Musheyev D., Serrano P.A. Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiology of Stress*. 2016. vol. 21. no. 5. P. 54-64.

10. Strekalova T., Couch Y., Kholod N., Boyks M., Malin D., Leprince P., Steinbusch H.M. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Mechanisms of Stress Resistance. Behavioral and Brain Functions*. 2011. vol. 7. no. 9. P. 1-18.

11. Cline B.H., Costa-Nunes J.P., Cespuglio R., Markova N., Santos A.I., Bukhman Y.V., Kubatiev A., Steinbusch H.W.M., Lesch K.P., Strekalova T. Dicholine succinate, the neuronal insulin sensitizer, normalizes behavior, REM sleep, hippocampal pGSK3 beta and mRNAs of NMDA receptor subunits in mouse models of depression, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2015. vol. 9. no. 37. P. 1-18.

12. Strekalova T., Steinbusch H. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2010. vol. 34. no. 2. P. 348-361.

13. Анохин К.В., Судаков К.В. Геном нейронов мозга в организации системных механизмов поведения // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2003. №2. С.124-131.