

УДК 57.024; 57.034; 611.81

ТЕСТ ПОРСОЛТА КАК ЛОНГИТЮДНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ДИНАМИКИ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КРЫС В МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО УМЕРЕННОГО СТРЕССА

Чайка А. В., Коношенко Е. В., Хусаинов Д. Р., Шахматова В. И.,

Можаровская И. А., Черетаев И. В.

*Таврическая академия (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: andrew.chajka@yandex.ru*

В статье анализируется ежедневное изменение поведения животных под воздействием хронического непредсказуемого умеренного стресса в 3-минутном тесте Порсолта. Установлено, что динамика времени иммобильности в группе «стресс» близка к той, что наблюдалась ранее в эксперименте с блокированием D₂-подобных рецепторов галоперидолом: присутствует начальный период (1–3 дни), период выраженных колебаний показателя (4–15 дни) и период затухания (16–21 дни). Это может говорить об общем биологическом субстрате регистрируемых процессов.

Ключевые слова: депрессия, хронический умеренный непредсказуемый стресс, тест Порсолта, D₂-рецепторы, галоперидол.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным ВОЗ, в мире около 350 миллионов людей страдает депрессией, которая приводит к серьезным проблемам со здоровьем, являясь главной причиной нетрудоспособности и общего ухудшения качества жизни населения по всему миру, оставив далеко позади диабет, мигрень, железодефицитную анемию, расстройства, вызванные употреблением алкоголя, тревожность, хронические болезни легких и прочие заболевания [1]. Важной особенностью депрессии является ее универсальность: от нее никто не застрахован, вне зависимости от возраста [2, 3], расы [4], социального статуса [5] и места работы [6, 7].

В соответствии с классическими представлениями главенствующая роль в патофизиологических механизмах депрессии принадлежит серотонину и норадреналину, что доказано многочисленными исследованиями [8–13]. Однако участие дофамина в развитии и течении тревожно-депрессивных расстройств изучено не так полно [14].

Хронический стресс уже достаточно давно стал ассоциироваться с рядом патологических состояний, таких, как болезни сердечно-сосудистой системы, язвообразование, повышенная восприимчивость к инфекции, а также психические расстройства, среди которых паника, тревожность и депрессия [15]. На сегодняшний день уже доподлинно известно, что хронический стресс является одной из основных

причин возникновения депрессивного синдрома, для которого характерно нарушение нормального функционирования центральной дофаминергической системы [16–19], что приводит к возникновению таких симптомов, как ангедония, тревожность, неophobia, снижение двигательной активности и т. д. [20–23]. Поэтому хронический непредсказуемый умеренный стресс является наиболее валидной и широко используемой моделью депрессии на животных [24, 25].

В современной литературе присутствуют убедительные доказательства вовлеченности биоритмов в патогенез депрессии [26–28] и наличия ритмических изменений в проявлении симптомов заболевания [29–31]. В то же время нами не было обнаружено работ, в которых бы в полной мере изучалась динамика депрессивных симптомов, более того, методический аппарат для подобных исследований в доклинике до конца не разработан. Поэтому мы предлагаем использовать ежедневно трехминутный тест Порсолта как один из вариантов для решения данной проблемы и ставим целью детально проанализировать полученные результаты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 30 беспородных крысах-самцах массой 200–250 г, разделенных на 3 выборки. Группа «стресс» (n=10) на протяжении 21 дня подвергалась хроническому непредсказуемому умеренному стрессу (табл. 1), группе «стресс+галоперидол» (n=10) в течение 24 дней (3 дня предварительного введения) ежедневно в 10:00 вводили внутривентриально селективный блокатор D₂-подобных рецепторов галоперидол (Мосхимфармпрепараты им. Н. А. Семашко, Россия) в дозе 2,5 мг/кг [32], разведенный в физрастворе, а контрольной (n=10) – физраствор в аналогичном объеме.

Таблица 1

План стресс-протокола

| | Неделя 1 | Неделя 2 | Неделя 3 |
|--------|----------|----------|----------|
| Стресс | 1 | 5 | 9 |
| | 3 | 10 | 11 |
| | 6 | 4 | 4 |
| | 8 | 11 | 8 |
| | 7 | 2 | 6 |
| | 9 | 3 | 7 |
| | 2 | 5 | 1 |

Примечание:

1 – предъявление звуков хищников (30 мин.); 2 – белый шум (80 дБ, 2 ч.); 3 – пищевая депривация (14 ч.); 4 – удаление подстилки из клетки (14 ч.); 5 – включение освещения в ночное время; 6 – вкл/выкл яркого освещения (1000 люкс) днем каждые 20 мин. (2 ч); 7 – предъявление нового неизвестного объекта в домашней клетке (14 ч.); 8 – ограничение двигательной активности (1 ч); 9 – подсаживание в домашнюю клетку других крыс (2 шт, 1 час); 10 – водная депривация (14 ч.); 11 – перенаселение (14 ч.).

Стресс-стимулы были предъявлены в полуслучайном порядке дважды за 21-дневный период, за исключением водной депривации, применявшейся лишь однажды.

Начиная с 4-го дня эксперимента поведение животных ежедневно исследовали в тесте Порсолта через 30 мин. после инъекций. Установка данного теста представляет собой прозрачный цилиндр из оргстекла высотой 45 см и диаметром 20 см (НПК «Открытая наука», Россия). Цилиндр заполняли на 2/3 водой температурой $+22\pm 1$ °С. Длительность тестирования – 3 минуты (укороченная процедура) [33, 34]. Регистрировались следующие показатели: иммобильность (с), плавание (с), климбинг (с), а также груминг и отряхивания (шт.). Достоверность различий между группами определялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки и теста множественных сравнений Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По итогам проведенного исследования установлено, что хронический стресс приводит к достоверному увеличению времени пассивного плавания у крыс по сравнению с контролем в течение всего эксперимента (рис. 1).

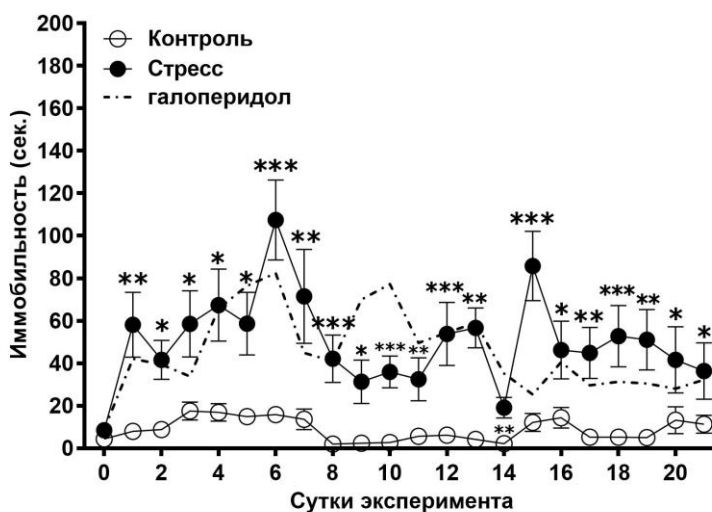


Рис. 1. Динамика времени иммобильности в группах «стресс», «контроль» и «галоперидол»

Примечание: звездочками отмечены достоверные отличия при $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ между группами «контроль» и «стресс». Пунктирной линией указаны данные группы «галоперидол» из предыдущего эксперимента нашей лаборатории [35]

Пиковые значения показателя приходились на 6 ($107,40\pm 18,84$ с) и 15 сутки эксперимента ($77,80\pm 18,11$ с), минимальные – на 9 ($31,30\pm 10,19$ с), 11 ($34,20\pm 9,45$ с) и 14 ($19,10\pm 4,87$ с) сутки. Результаты группы «стресс+галоперидол» в течение первых 8 дней эксперимента значительно не отличались от данных группы «стресс» (за исключением первого дня), хотя и динамика имела иной, прямолинейный тренд,

однако с 9 дня эксперимента уровень иммобильности начинает резко возрастать и выходит на плато (пик на 20 день, $132,90 \pm 15,63$ с), после чего наблюдается стремительное снижение показателя на 21 день ($85,50 \pm 16,41$ с) (рис. 2).

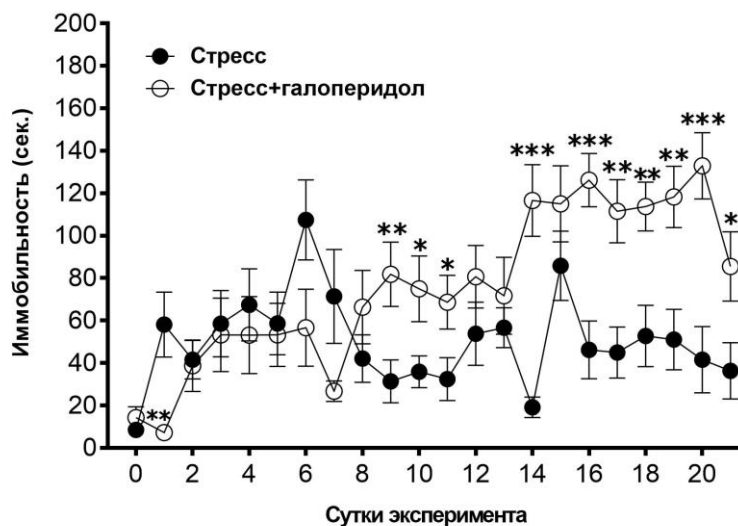


Рис. 2. Динамика времени иммобильности в группах «стресс» и «стресс+галоперидол»

Примечание: звездочками отмечены достоверные отличия при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ относительно контроля

Различия в 21-дневной динамике показателей активного поведения оказались не столь очевидными: животные группы «стресс» демонстрировали уровень плавания, сходный с контролем, достоверные различия были выявлены только на 1 день эксперимента ($35,86 \pm 10,62$ против $98,83 \pm 13,1$ с); отличия между контролем и группой «стресс+галоперидол» – на 15–20 дни, а между группами «стресс» и «стресс+галоперидол» – на 14, 16–20 дни (рис. 3). В случае с климбингом статистически значимые различия были получены на 2, 6, 7, 10 дни между группами «контроль» и «стресс», а между группами «контроль» и «стресс+галоперидол» – на 10, 14, 18, 19 дни (рис. 4). Также были выявлены значимые различия и в суммарном количестве отряхиваний и груминга: между группами «контроль» и «стресс» – на 6, 9, 12, 21 сутки эксперимента, между группами «контроль» и «стресс+галоперидол» – на 18, 20 сутки, а между группами «стресс» и «стресс+галоперидол» – на 18 и 21 сутки (рис. 5)

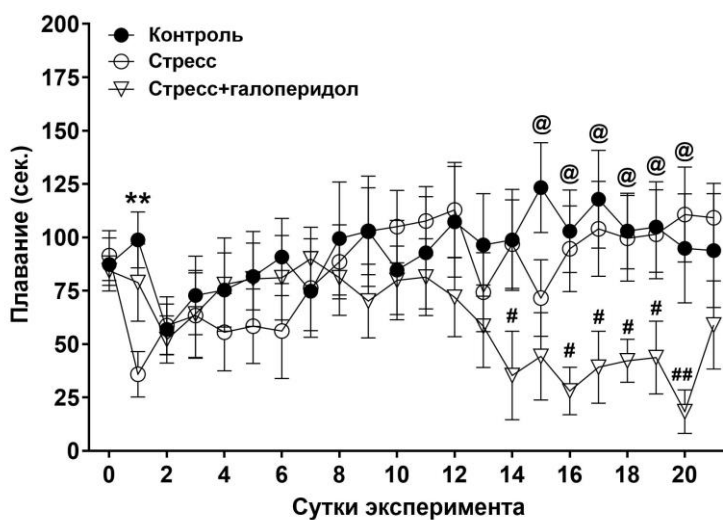


Рис. 3. Динамика времени плавания в исследуемых группах животных
 Примечание: отмечены достоверные отличия при $**p < 0,01$ между группами «контроль» и «стресс», при $@p < 0,05$ между группами «контроль» и «стресс+галоперидол», при $\#p < 0,05$ и при $\#\#p < 0,01$ между группами «стресс» и «стресс+галоперидол»

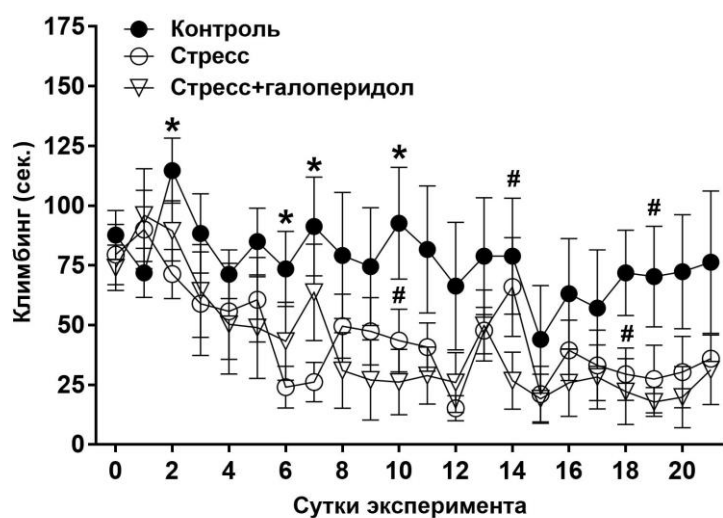


Рис. 4. Динамика времени климбинга в исследуемых группах животных
 Примечание: отмечены достоверные отличия при $p < 0,05$ между группами «контроль» и «стресс» (*), между группами «контроль» и «стресс+галоперидол» (#)

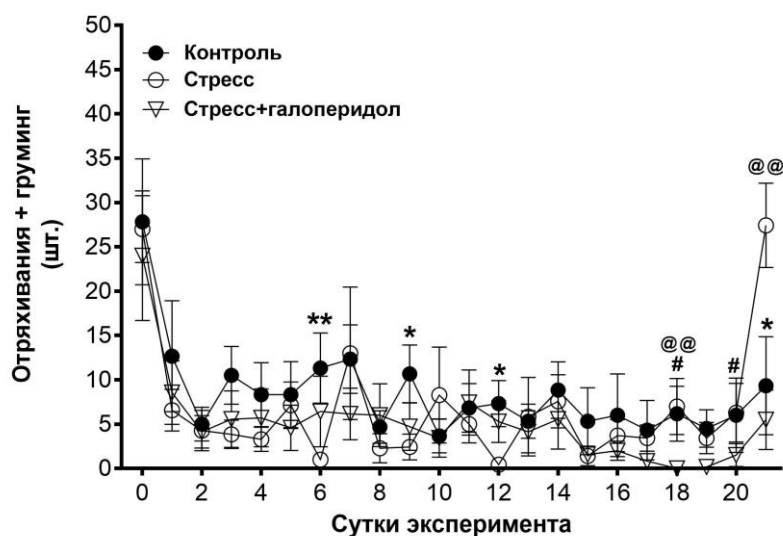


Рис. 5. Динамика количества отряхиваний и груминга у исследуемых животных
Примечание: отмечены достоверные отличия при $*p<0,05$ и $**p<0,01$ между группами «контроль» и «стресс», при $^{\#}p<0,05$ между группами «контроль» и «стресс+галоперидол», при $@@p<0,01$ между группами «стресс» и «стресс+галоперидол»

Тест Порсолта доказал свою эффективность как средство поиска антидепрессантов [36] и также успешно применяется для оценки депрессии как таковой, с фундаментальной точки зрения [27, 37–39]. Исследования S. Dal-Zotto и соавт. показали, что стресс, сообщаемый хроническим плаванием (14 дней по 20 мин.) в установке, разработанной Р. Д. Порсолтом, не является сильным и животные к нему хорошо адаптируются [40]. Принимая во внимание то обстоятельство, что мы используем данную методику в значительно более мягкой модификации (21 день по 3 мин.), считаем уровень стресса в этой процедуре несущественно влияющим на итоговый результат, что также подтверждает и стабильно низкий уровень иммобильности в контрольной группе (см. рис. 1). В итоге мы рассматриваем полученные данные как свидетельство того, что хронический непредсказуемый умеренный стресс приводит к возникновению депрессивноподобного поведения у беспородных крыс-самцов, что согласуется с литературными данными [41–44]. Наиболее ярко этот процесс характеризует время иммобильности. Дополнительные показатели (плавание, климбинг, отряхивания+груминг) в нашем случае имеют значительно большую вариабельность данных и, соответственно, меньшую надежность, чем иммобильность, но их изменение с течением эксперимента также указывает на ухудшение эмоционального состояния животных в группах «стресс» и «стресс+галоперидол». Несмотря на то, что достоверных отличий между группами больше всего по показателю «плавание», именно климбинг оказался чувствительнее в регистрации ответа на стресс-воздействия у грызунов, т. к. в обеих группах

наблюдается четкий тренд к снижению его уровня ото дня ко дню, в отличие от контрольных значений, что держатся на достаточно стабильном уровне (см. рис. 4). В Тесте Порсолта, хотя и кажется на первый взгляд, что есть один основной показатель – пассивное плавание, именно детальное рассмотрение каждого из возможных типов поведения в данной установке позволит наиболее полно и точно понять полученные результаты. Такая практика уже давно применяется в других экспериментальных парадигмах, например, «резидент – интродер», где регистрируется большое количество показателей [45]. Мы поддерживаем инициативу некоторых исследователей схожим комплексным образом оценивать и результаты теста Порсолта [46, 47].

Динамика времени иммобильности в группе «стресс» существенно не отличается от таковой, что была получена нашей лабораторией в предыдущем эксперименте, где использовался только галоперидол в дозе 2,5 мг/кг (см. рис. 1) [35]: в данном случае также можно выделить начальный период (1–3 дни), период выраженных колебаний показателя (4–15 дни) и период затухания (16–21 дни). Однако стоит отметить, что начальный период в группе «стресс» характеризуется более высоким уровнем иммобильности и более резким ее увеличением с первого дня эксперимента, чем в группе «галоперидол». Это и прочие отличия с группой «галоперидол», такие, как неполное совпадение максимумов значений (в особенности на 9 и 10 дни) и менее четкая и последовательная структура колебаний, мы связываем с разным характером стресс-стимулов – психическим и фармакологическим, соответственно.

Несколько иная ситуация наблюдается при совместном воздействии стресса и галоперидола, где, в отличие от групп «стресс» и «галоперидол», в первый день эксперимента не наблюдается увеличения пассивного плавания у животных: данные остаются на уровне контрольных, и в последующие 7 дней достоверно не отличаются от группы «стресс», демонстрируя даже более низкую линию тренда (см. рис. 2). Однако уже на 9 день эксперимента показатель в группе «стресс+галоперидол» статистически значимо превышал значения группы «стресс» ($81,80 \pm 15,16$ против $31,30 \pm 10,19$ с), а с 14 дня резко увеличиваются ($116,5 \pm 16,88$ против $19,1 \pm 4,87$ с). Мы предполагаем, что в данном случае адаптационный процесс протекает по-другому, т. к. сочетанное применение сразу двух стрессоров незамедлительно включает компенсаторные механизмы, которые до определенного момента удерживают уровень иммобильности даже ниже такового у группы «стресс». По-видимому, их истощение и приводит к той картине, что мы наблюдаем на 14–20 дни исследования, а значительный спад уровня пассивного плавания на 21-й день, возможно, предвосхищает начало нового витка адаптации.

21-дневный период является классическим временным отрезком, применяемым для определения влияния хронического стресса на организм, например для формирования депрессивного состояния у лабораторных животных [48, 49]. В то же время результаты наших исследований наглядно показали, что к окончанию данного периода у крыс вырабатывается адаптация к стресс-воздействиям различного характера, обеспеченная эффективной работой компенсаторных механизмов («стадия устойчивости» по Г. Селье) [50], в том числе и конкретно

дофаминергической системы [35]. К подобным выводам пришли и М. Ю. Ходанович с соавт., исследуя 3-недельную динамику агрессивного поведения у крыс, используя в качестве стрессора электромагнитное экранирование [51]. Вследствие этого можно заключить, что 21-дневный период является неким универсальным отрезком времени, необходимым для приспособления организма к новым условиям среды. Данный факт по-новому заставляет посмотреть на планирование экспериментов по длительному воздействию стресса на лабораторных животных и проблему плохой воспроизводимости научных результатов [52]. По крайней мере, это утверждение правомочно для аутбредных крыс и требует перепроверки на других породах грызунов.

Эффективность антидепрессантных агентов в доклинических экспериментальных тест-системах принято проверять в ключевые дни, зачастую еженедельно [25, 53] либо по схеме «до – после» [54], не учитывая ежедневную динамику симптомов. Подобные исследования характерны скорее для клиники и практически не имеют аналогов в работе с лабораторными животными. Учет того, как конкретные методы лечения депрессии воздействуют не только количественно в определенные дни, но и качественно на динамику симптомов заболевания в целом, позволит увидеть картину в общем, лучше подбирать антидепрессанты и прогнозировать их эффективность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Хронический непредсказуемый умеренный стресс приводит к возникновению депрессивноподобного поведения у беспородных крыс-самцов, ярко проявляющегося в увеличении уровня иммобильности и снижении времени климбинга в тесте Порсолта по сравнению с контрольной группой.
2. Динамика времени пассивного плавания в группе «стресс» существенно не отличается от таковой, что была получена нашей лабораторией в предыдущем эксперименте, где применялась блокада D₂-подобных рецепторов галоперидолом, что может свидетельствовать об общем биологическом субстрате протекаемых процессов.
3. Трехминутный тест Порсолта является многообещающим инструментом для ежедневной оценки депрессивного поведения у крыс в течение хронического эксперимента, однако, требует дальнейшей более обстоятельной валидации.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» «Экспериментальная физиология и биофизика».

Список литературы

1. Smith K. Mental health: a world of depression / K. Smith // Nature News. – 2014. – Vol. 515, № 7526. – P. 181–182.
2. Kim O. Sex differences in social support, loneliness, and depression among Korean college students / O. Kim // Psychological Reports. – 2001. – Vol. 88, № 2. – P. 521–526.

3. Briggs R. What is the Prevalence of Untreated Depression and Death Ideation in Older People? Data from Tilda / R. Briggs, R. A. Kenny, S. Kennelly // *Age and Ageing*. – 2017. – Vol. 46, Supp. 3. – P. iii13.
4. Lin K. M. Biological differences in depression and anxiety across races and ethnic groups / K. M. Lin // *The Journal of clinical psychiatry*. – 2001. – Vol. 62, № 13. – P. 13–19
5. Niedzwiedz C. L. The relationship between wealth and loneliness among older people across Europe: Is social participation protective? / C. L. Niedzwiedz, E. A. Richardson, H. Tunstall [et al.] // *Preventive medicine*. – 2016. – Vol. 91. – P. 24–31.
6. Bonde J. P. E. Psychosocial factors at work and risk of depression: a systematic review of the epidemiological evidence / J. P. E. Bonde // *Occupational and environmental medicine*. – 2008. – Vol. 65, № 7. – P. 438–445.
7. Ребко А. А. Распространенность признаков тревожности и депрессии у военнослужащих срочной военной службы / А. А. Ребко, В. Я. Латышева // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2012. – № 2 (32). – С. 92–95.
8. Berton O. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines / O. Berton, E. J. Nestler // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2006. – Vol. 7, № 2. – P. 137–151.
9. Pittenger C. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms / C. Pittenger, R. S. Duman // *Neuropsychopharmacology*. – 2008. – Vol. 33, № 1. – P. 88–109.
10. Baffa A. Norepinephrine and serotonin transporter genes: impact on treatment response in depression / A. Baffa, C. Hohoff, B. T. Baune [et al.] // *Neuropsychobiology*. – 2010. – Vol. 62, No 2. – P. 121–131.
11. Бахшалиева А. Я. Особенности развития депрессивного состояния у крыс с различным индивидуально-типологическим поведенческим статусом / А. Я. Бахшалиева // *Нейрофизиология*. – 2010. – Т. 42, № 2. – С. 153–161.
12. Левчук Л. А. Серотонинергическая система в патогенезе и терапии депрессивных расстройств (обзор литературы) / Л. А. Левчук, М. В. Шмиголь, Р. А. Иванова // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. – 2012. – № 2. – С. 75–79.
13. Григорьян Г. А. Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. Роль глюкокортикоидов, цитокинов, нейротрансмиттеров и трофических факторов в генезе депрессивных расстройств / Г. А. Григорьян, Н. Н. Дыгало, А. Б. Гехт [и др.] // *Успехи физиологических наук*. – 2014. – Т. 45, № 2. – С. 3–19.
14. Федотова Ю. О. Дофаминовые D₂-рецепторы и тревожно-депрессивноподобное поведение самок крыс / Ю. О. Федотова // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2012. – Т. 75, № 2. – С. 3–6.
15. Melia K. R. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress / K. R. Melia, A. E. Ryabinin, R. Schroeder [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 1994. – Vol. 14, No 10. – P. 5929–5938.
16. Dunlop B. W. The role of dopamine in the pathophysiology of depression / B. W. Dunlop, C. B. Nemeroff // *Archives of general psychiatry*. – 2007. – Vol. 64, No 3. – P. 327–337.
17. Lucas L. R. Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat / L. R. Lucas, C. J. Wang, T. J. McCall [et al.] // *Brain research*. – 2007. – Vol. 1155. – P. 108–115.
18. Tye K. M. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour / K. M. Tye, J. J. Mirzabekov, M. R. Warden [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 493, No 7433. – P. 537.
19. Francis T. C. Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress / T. C. Francis, R. Chandra, D. M. Friend [et al.] // *Biological psychiatry*. – 2015. – Vol. 77, No 3. – P. 212–222.
20. Willner P. The mesolimbic dopamine system as a target for rapid antidepressant action / P. Willner // *International Clinical Psychopharmacology*. – 1997. – Vol. 12. – P. 7–14.
21. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation / P. Willner // *Psychopharmacology*. – 1997. – Vol. 134, No 4. – P. 319–329.
22. Gambarana C. A chronic stress that impairs reactivity in rats also decreases dopaminergic transmission in the nucleus accumbens: a microdialysis study / C. Gambarana, F. Masi, A. Tagliamonte [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 1999. – Vol. 72, No 5. – P. 2039–2046.
23. Loonen A. J. M. Circuits regulating pleasure and happiness in major depression / A. J. M. Loonen, S. A. Ivanova // *Medical hypotheses*. – 2016. – Vol. 87. – P. 14–21.

24. Willner P. Animal models of depression: a diathesis/stress approach / P. Willner, P. J. Mitchell / H. D'haenen, J. A. den Boer and P. Willner (eds.) // *Biological psychiatry*. – Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. – P. 701–726.
25. Wang J. M. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress / J. M. Wang, L. H. Yang, Y. Y. Zhang [et al.] // *Physiology & behavior*. – 2015. – Vol. 151. – P. 360–368
26. Bunney J. N. Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression / J. N. Bunney, S. G. Potkin // *British medical bulletin*. – 2008. – Vol. 86, No 1. – P. 23–32.
27. Leach G. Depression-like responses induced by daytime light deficiency in the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*) / G. Leach, W. Adidharma, L. Yan // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. e57115.
28. Logan R. W. Chronic stress induces brain region-specific alterations of molecular rhythms that correlate with depression-like behavior in mice / R. W. Logan, N. Edgar, A. G. Gillman [et al.] // *Biological psychiatry*. – 2015. – Vol. 78, No 4. – P. 249–258.
29. Nutt D. J. Depression, anxiety and the mixed conditions / D. J. Nutt, C. Bell, J. Potokar. – London: Martin Dunitz. 1997. – 72 pp.
30. Минутко В. Л. Депрессия / В. Л. Минутко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 320 с.
31. Тювина Н. А. Сравнительная характеристика клинических особенностей депрессии при биполярном аффективном расстройстве I и II типа / Н. А. Тювина, И. Г. Коробкова // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 22–28
32. Фролова Г. А. Индивидуальная чувствительность к блокированию D₂-рецепторов: изменение временной динамики поведения белых крыс в открытом поле / Г. А. Фролова, И. В. Мельникова, Р. А. Богданова // *Світ медицини та біології*. – 2009. – Т. 5, № 4. – С. 61–65.
33. Калуев А. В. Стресс, тревожность и поведение / А. В. Калуев – Киев: Энигма, 1998. – 95 с.
34. Фролова Г. А. Этологические эффекты антиэстрогенного и антиандрогенного воздействия на самок и самцов белых крыс, отличающихся по уровню депрессивности / Г. А. Фролова // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2016. – № 4. – С. 110–116.
35. Чайка А. В. Хроническая блокада D₂-рецепторов и поведение низкодепрессивных крыс / А. В. Чайка, Д. Р. Хусаинов, И. В. Черетаев [и др.] // *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. – 2017. – Т. 103, № 2. – P. 172–181.
36. Castagné V. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice / V. Castagné, P. Moser, S. Roux // *Curr Protoc Neurosci*. – 2010. – Vol. 49 (5.8.1-5.8.14). – P. 1–8.
37. Naitoh H. “Swimming-induced head twitching” in rats in the forced swimming test induced by overcrowding stress: a new marker in the animal model of depression? / H. Naitoh, S. Nomura, Y. Kunimi [et al.] // *The Keio journal of medicine*. – 1992. – Vol. 41, No 4. – P. 221–224.
38. Brenes J. C. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats / J. C. Brenes, M. Padilla, J. Fornaguera // *Behavioural brain research*. – 2009. – Vol. 197, No 1. – P. 125–137.
39. Iijima M. Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats / M. Iijima, A. Ito, S. Kurosu [et al.] // *Brain research*. – 2010. – Vol. 1359. – P. 75–80.
40. Dal-Zotto S. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor / S. Dal-Zotto, O. Martí, A. Armario // *Behavioural brain research*. – 2000. – Vol. 114, No 1. – P. 175–181.
41. Rygula R. Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam / R. Rygula, N. Abumaria, U. Havemann-Reinecke [et al.] // *Behavioural pharmacology*. – 2008. – Vol. 19, No 3. – P. 183–196.
42. Kompagne H. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats / H. Kompagne, G. Bárdos, G. Szénási [et al.] // *Behavioural brain research*. – 2008. – Vol. 193, № 2. – P. 311–314.
43. Yang J. Enhanced antidepressant-like effects of electroacupuncture combined with citalopram in a rat model of depression / J. Yang, Y. Pei, Y. L. Pan [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2013. – Vol. 2013, Article ID 107380. – P. 1–12.

44. Kafetzopoulos V. The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression / V. Kafetzopoulos, N. Kokras, I. Sotiropoulos [et al.] // *Molecular psychiatry*. – 2018. – Vol. 23, No 3. – P. 579.
45. de Boer S. F. 5-HT 1A and 5-HT 1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis / S. F. de Boer, J. M. Koolhaas // *European journal of pharmacology*. – 2005. – Vol. 526, No 1. – P. 125–139.
46. Detke M. J. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants / M. J. Detke, M. Rickels, I. Lucki // *Psychopharmacology*. – 1995. – Vol. 121, No 1. – P. 66–72.
47. Белозерцева И. В. Проблема повторяемости и воспроизводимости данных в свете эволюции экспериментального метода / И. В. Белозерцева // Семинар FarmBioLine: Доклинические исследования. Современные тенденции и проблемы. GLP в виварии. Москва, 30 марта 2016 г. – 31 слайд. Режим доступа к публикации: <http://docplayer.ru/29223082-Problema-povtoryaemosti-i-vosproizvodimosti-dannyh-v-svete-evolyucii-eksperimentalnogo-metoda.html> (Дата обращения: 25. 04. 2018).
48. Katz R. J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit / R. J. Katz // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 1982. – Vol. 16, No 6. – P. 965–968.
49. Ducotet C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice / C. Ducotet, G. Griebel, C. Belzung // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2003. – Vol. 27, No 4. – P. 625–631.
50. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме / Г. Селье. – М: Медгиз, 1960. – 254 с.
51. Ходанович М. Ю. Влияние длительного ослабления геомагнитного поля на агрессивность лабораторных крыс и активацию опиоидергических нейронов / М. Ю. Ходанович, Е. В. Гуль, А. Е. Зеленская [и др.] // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. – 2013. – № 1 (21). – С. 146–160.
52. Lithgow G. J. A long journey to reproducible results / G. J. Lithgow, M. Driscoll, P. Phillips // *Nature News*. – 2017. – Vol. 548, No 7668. – P. 387.
53. Haraguchi A. Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test / A. Haraguchi, M. Fukuzawa, S. Iwami [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, No 1. – P. 1081.
54. Guo J. Y. Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain / J. Y. Guo, C. Y. Li, Y. P. Ruan [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2009. – Vol. 612, No 1–3. – P. 54–60.

FORCED SWIM TEST AS A LONGITUDE METHOD OF ASSESSMENT THE DYNAMICS OF THE EMOTIONAL STATE OF RATS IN THE MODEL OF CHRONIC UNPREDICTABLE MILD STRESS

Chajka A. V., Konoshenko E. V., Khusainov D. R., Shakhmatova V. I., Mozharovskaya I. A., Cheretaev I. V.

*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia
E-mail: andrew.chajka@yandex.ru*

According to WHO, in the world, about 350 million people suffer from depression, which leads to serious health problems, being the main cause of disability and a general deterioration in the quality of life of the population around the world. To date, it is already known for sure that chronic stress is one of the main causes of the depressive syndrome, which is characterized by a disruption of the normal functioning of the central dopaminergic system. However, the involvement of dopamine in the development and

course of anxiety-depressive disorders has not been studied as fully as, for example, serotonin.

In the modern literature there are convincing evidence of the involvement of biorhythms in the pathogenesis of depression and the presence of rhythmic changes in the manifestation of the symptoms of the disease. At the same time, we did not find any work in which the dynamics of depressive symptoms were fully studied, moreover, the methodological approach for such preclinical studies was not fully developed. Therefore, we propose to use the daily three-minute Forced swim test (FST) as one of the options for solving this problem, and we aim to analyze the results in detail.

Experiments were carried out on 30 outbred male rats (200–250 g), divided into 3 groups. The stress group (n = 10) underwent chronic unpredictable mild stress for 21 days, the «stress+haloperidol» group (n = 10) for 24 days (3 days of preliminary administration) daily at 10:00 injected intraperitoneally a selective blocker of D₂-like receptors haloperidol (Moshimfarmpreparaty N. A. Semashko, Russia) at a dose of 2.5 mg/kg, diluted in saline, and control (n = 10) - saline in a similar volume. Beginning on the 4th day of the experiment, the behavior of the animals was tested daily in the FST, 30 minutes after the injections. Duration of testing – 3 minutes (short procedure). The following indicators were recorded: passive swimming, swimming, climbing, and grooming+shaking. Differences between the groups was determined using a single-factor analysis of variance (ANOVA) with the Tukey test and the Dunn's multiple comparisons test.

The FST has proven to be effective in detecting antidepressants, and has also been used successfully to assess depression as such, from a fundamental point of view. Research by S. Dal-Zotto et al. showed that the stress reported by chronic swimming (14 days for 20 minutes) in the installation developed by R. D. Porsolt is not strong and the animals adapt well to it. Considering the fact that we use this technique in a much milder modification (day 21 for 3 minutes), we believe that the level of stress in this procedure has little effect on the final result, which is also confirmed by the consistently low level of immobility in the control group.

Eventually, established that chronic unpredictable mild stress leads to depressive behavior in outbred male rats, which is clearly manifested in an increase in the level of immobility and a decrease in the climbing time in the FST in comparison with the control group. The dynamics of the passive swimming time in the stress group does not differ significantly from that obtained by our laboratory in the previous experiment, where the blockade of D₂-like receptors with haloperidol was applied, which may indicate a common biological substrate of the processes that are being carried out.

A different situation is observed in the joint effect of stress and haloperidol, where, in contrast to the groups "stress" and "haloperidol", in the first day of the experiment there is no increase in passive swimming in animals - the data remain at the control level, and in the next 7 days differ from the "stress" group wasn't found, showing even a lower trend line. However, already on the 9th day of the experiment, the data of the "stress+haloperidol" group begin to statistically significantly exceed the level of the "stress" group (81.80 ± 15.16 versus 31.30 ± 10.19 s), and from the 14th day increase sharply (116.5 ± 16.88 against 19.1 ± 4.87 s). We assume that in this case the adaptation

process proceeds in a different way, because the combined use of two stressors immediately includes compensatory mechanisms that, until a certain moment, keep the level of immobility even lower than that of the "stress" group. Apparently, their depletion leads to the picture that we see on the 14–20 days of the study, and a significant decline in the level of passive navigation on the 21st day may be anticipating the beginning of a new round of adaptation.

Referring to all these data, we believe that the 3-minute FST is a promising tool for daily assessment of depressive behavior in rats during a chronic experiment, but requires further validation.

Keywords: depression, chronic mild unpredictable stress, Forced swim test, D₂-receptors, haloperidol.

References

1. Smith K. Mental health: a world of depression, *Nature News*, **515** (7526), 180 (2014).
2. Kim O. Sex differences in social support, loneliness, and depression among Korean college students, *Psychological Reports*, **88**(2), 521 (2001).
3. Briggs R., Tobin K., Kenny R. A., & Kennelly S. P. What is the prevalence of untreated depression and death ideation in older people? Data from the Irish Longitudinal Study on Aging, *International psychogeriatrics*, **46** (3), 13 (2017).
4. Lin K. M. Biological differences in depression and anxiety across races and ethnic groups, *The Journal of clinical psychiatry*, **62**, 13 (2001).
5. Niedzwiedz C. L., Richardson E. A., Tunstall H., Shortt N. K., Mitchell R. J., & Pearce J. R. The relationship between wealth and loneliness among older people across Europe: Is social participation protective? *Preventive medicine*, **91**, 24 (2016).
6. Bonde J. P. E. Psychosocial factors at work and risk of depression: a systematic review of the epidemiological evidence, *Occupational and environmental medicine*, **65**(7), 438 (2008).
7. Rebko A. A., Latysheva V. Ya. Prevalence rate of anxiety and depression signs in national servicemen, *Problemy zdorov'ya i ekologii*, **2** (32), 92 (2012).
8. Berton O., & Nestler E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines, *Nature Reviews Neuroscience*, **7**(2), 137 (2006).
9. Pittenger C., & Duman R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms, *Neuropsychopharmacology*, **33**(1), 88 (2008).
10. Bakhshalieva A. Ya. Peculiarities of depressive state development in rats with different individual-typological behavioral state, *Neurophysiology*, **42** (2), 153 (2010).
11. Baffa A., Hohoff C., Baune B. T., Müller-Tidow C., Tidow N., Freitag C. & Domschke K. Norepinephrine and serotonin transporter genes: impact on treatment response in depression, *Neuropsychobiology*, **62**(2), 121 (2010).
12. Levchuk L. A., Shmigol M. V., Ivanova S. A. Serotonergic system in pathogenesis and therapy of depressive disorders (review), *Siberian gerald of psychiatry and addiction psychiatry*, **2**, 75 (2012).
13. Grigoryan G. A., Dygalo N. N., Guekht A. B., Stepanichev M. Yu., Gulyaeva N. V. Molecular and cellular mechanisms of depression. Role of glucocorticoids, cytokines, neurotransmitters, and trophic factors in genesis depressive disorders, *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, **45** (2), 3 (2014).
14. Fedotova Yu. O. D₂-type dopaminergic receptors and anxiety-depression-like behavior in female rats, *Experimental and clinical pharmacology*, **75** (2), 3 (2012).
15. Melia K. R., Ryabinin A. E., Schroeder R., Bloom F. E., & Wilson M. C. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress, *Journal of Neuroscience*, **14**(10), 5929-5938 (1994).
16. Dunlop B. W., & Nemeroff C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression, *Archives of general psychiatry*, **64**(3), 327 (2007).
17. Lucas L. R., Wang C. J., McCall T. J., & McEwen B. S. Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat, *Brain research*, **1155**, 108 (2007).

18. Tye K. M., Mirzabekov J. J., Warden M. R., Ferenczi E. A., Tsai H. C., Finkelstein J. & Gunaydin L. A. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour, *Nature*, **493(7433)**, 537 (2013).
19. Francis T. C., Chandra R., Friend D. M., Finkel E., Dayrit G., Miranda J. & Lobo M. K. Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress, *Biological psychiatry*, **77(3)**, 212 (2015).
20. Willner P. The mesolimbic dopamine system as a target for rapid antidepressant action. *International Clinical Psychopharmacology*, **12** (Suppl 3), 7 (1997).
21. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation, *Psychopharmacology*, **134(4)**, 319 (1997).
22. Gambarana C., Masi F., Tagliamonte A., Schegg S., Ghiglieri O., & Graziella De Montis M. A chronic stress that impairs reactivity in rats also decreases dopaminergic transmission in the nucleus accumbens: a microdialysis study, *Journal of neurochemistry*, **72(5)**, 2039 (1999).
23. Loonen A. J. M., & Ivanova S. A. Circuits regulating pleasure and happiness in major depression, *Medical hypotheses*, **87**, 14 (2016).
24. Willner P., Mitchell P. J. *Animal models of depression: a diathesis/stress approach* In: H. D'haenen, J. A. den Boer and P. Willner (eds.) *Biological psychiatry*. (Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2002), 701 (2002).
25. Wang J. M., Yang L. H., Zhang Y. Y., Niu C. L., Cui Y., Feng W. S., & Wang G. F. BDNF and COX-2 participate in anti-depressive mechanisms of catalpol in rats undergoing chronic unpredictable mild stress, *Physiology & behavior*, **151**, 360 (2015).
26. Bunney J. N., & Potkin S. G. Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression, *British medical bulletin*, **86(1)**, 23 (2008).
27. Leach G., Adidharma W., & Yan L. Depression-like responses induced by daytime light deficiency in the diurnal grass rat (*Arvicanthis niloticus*), *PLoS One*, **8(2)**, e57115. (2013).
28. Logan R. W., Edgar N., Gillman A. G., Hoffman D., Zhu X., & McClung C. A. Chronic stress induces brain region-specific alterations of molecular rhythms that correlate with depression-like behavior in mice, *Biological psychiatry*, **78(4)**, 249 (2015).
29. Nutt D. J., Bell C., Potokar J. *Depression, anxiety and the mixed conditions*, 72 p. (London: Martin Dunitz, 1997).
30. Minutko V. L. *Depression*, 320 p. (GEOTAR-Media, Moscow, 2006).
31. Tyuvina N. A., Korobkova I. G. Comparative clinical characteristics of depression in bipolar affective disorders types I and II. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*, **8(1)**, 22 (2016).
32. Frolova G., Melnikova I., Bogdanova S. Individual sensitiveness to blocking of D2-receptor: a dynamics change of white rats behavior in the opened field, *World of Medicine and Biology*, **5 (4)**, 61 (2009).
33. Kalueff A. V. *Stress, anxiety and behavior*, 95 p. (Kyiv: Enigma, 1998).
34. Frolova G. A. Comparative ethological characteristics of males and females of white rats in porsolt test in blocking receptors of sex hormone, *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, **4**, 110 (2016).
35. Чайка А. В., Хусаинов Д. Р., Черетаев И. В., Koreniuk I. I., Nozdrachev A. D. Chronic D2 -receptor blockade and behavior of low depressive rats, *Russian journal of physiology*, **103 (2)**, 172 (2017).
36. Castagné V., Moser P., Roux S., & Porsolt R. D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice, *Current Protocols in Pharmacology*, **49**, 1 (2010).
37. Naitoh H., Nomura S., Kunimi Y., & Yamaoka K. "Swimming-induced head twitching" in rats in the forced swimming test induced by overcrowding stress: a new marker in the animal model of depression? *The Keio journal of medicine*, **41(4)**, 221 (1992).
38. Brenes J. C., Padilla M., & Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats, *Behavioural Brain Research*, **197(1)**, 125 (2009).
39. Iijima M., Ito A., Kurosu S., & Chaki S. Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats, *Brain research*, **1359**, 75 (2010).
40. Dal-Zotto S., Martí O., & Armario A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor, *Behavioural brain research*, **114 (1-2)**, 175 (2000).

41. Rygula R., Abumaria N., Havemann-Reinecke U., Rütther E., Hiemke C., Zernig G. & Flügge G. Pharmacological validation of a chronic social stress model of depression in rats: effects of reboxetine, haloperidol and diazepam, *Behavioural pharmacology*, **19**(3), 183 (2008).
42. Kompagne H., Bárdos G., Szénási G., Gacsályi I., Hársing L. G., & Lévy G. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats, *Behavioural brain research*, **193**(2), 311 (2008).
43. Yang J., Pei Y., Pan Y. L., Jia J., Shi C., Yu Y., ... & Wang X. M. Enhanced antidepressant-like effects of electroacupuncture combined with citalopram in a rat model of depression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013** (107380), 1 (2013).
44. Kafetzopoulos V., Kokras N., Sotiropoulos I., Oliveira J. F., Leite-Almeida H., Vasalou A. & Sousa N. The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression, *Molecular psychiatry*, **23**(3), 579 (2018).
45. de Boer S. F., & Koolhaas J. M. 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis, *European journal of pharmacology*, **526**(1-3), 125 (2005).
46. Detke M. J., Rickels M., & Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants, *Psychopharmacology*, **121**(1), 66 (1995).
47. Belozertseva I. V. The problem of repeatability and reproducibility of data in the light of the evolution of the experimental method. *Seminar FarmBioLine: Preclinical research. Modern trends and problems. GLP in the vivarium*. Moscow, March 30, 2016. 31 slides. URL: <http://docplayer.ru/29223082-Problema-povtoryaemosti-i-vozproizvodimosti-dannyh-v-svete-evolyucii-eksperimentalnogo-metoda.html>
48. Katz R. J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **16**(6), 965 (1982).
49. Ducottet C., Griebel G., & Belzung C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **27**(4), 625 (2003).
50. Selye H. *The story of the adaptation syndrome*, 254 p. (Medgiz, Moscow, 1960).
51. Khodanovich M. U., Gul E. V., Zelenskaya A. E., Pan E. S., Krivova N. A. Effect of long-term weakening of the geomagnetic field on the aggressiveness of laboratory rats and activation of opioidergic neurons, *Bulletin of the Tomsk State University. Biology*, **1**(21), 146 (2013).
52. Lithgow G. J., Driscoll M., & Phillips P. A long journey to reproducible results, *Nature News*, **548** (7668), 387 (2017).
53. Haraguchi A., Fukuzawa M., Iwami S., Nishimura Y., Motohashi H., Tahara Y., & Shibata S. Night eating model shows time-specific depression-like behavior in the forced swimming test, *Scientific reports*, **8**(1), 1081 (2018).
54. Guo J. Y., Li C. Y., Ruan Y. P., Sun M., Qi X. L., Zhao B. S., & Luo F. Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain, *European journal of pharmacology*, **612** (1-3), 54 (2009).