

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра Физиологии человека и животных



На правах рукописи

Мальшев Антон Викторович

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАССТРОЙСТВ
АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА И ДЕПРЕССИИ; ПОИСК ПУТЕЙ
ПЕПТИДЕРГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н., профессор
Дубынин Вячеслав Альбертович

Москва – 2014

Оглавление

1. Список сокращений	4
2. Введение	5
3. Обзор литературы	11
3.1. <i>Расстройства аутистического спектра. Характеристика и классификация</i>	11
3.2. <i>Этиология и патогенез РАС. Известные генетические и эпигенетические факторы</i>	13
3.3. <i>Диагностика и виды расстройств аутистического спектра. Терапия РАС.</i>	16
3.4. <i>Экспериментальные подходы к изучению РАС.</i>	18
3.5. <i>Фармакологическая модель РАС. Введение высокой дозы солей вальпроевой кислоты как модель дисфункции нервной системы</i>	20
3.6. <i>Генетические модели нарушений развития и работы нервной системы. Характеристика крыс линии WAG/Rij</i>	24
3.7. <i>Депрессивные заболевания в клинической практике. Нейробиологические и нейрохимические основы депрессий</i>	27
3.8. <i>Пептидные регуляторы и лечение заболеваний ЦНС</i>	31
4. Материалы и методы исследования	33
4.1. <i>Экспериментальные животные</i>	33
4.2. <i>Экспериментальные серии</i>	34
4.3. <i>Параметры установок и протоколы экспериментов.</i>	39
5. Результаты	49
5.1. <i>Оценка поведения белых крыс в модели фетального вальпроатного синдрома</i>	49
5.2. <i>Изучение зависимого от матери («детского») поведения детенышей крыс на модели фетального вальпроатного синдрома</i>	57
5.3. <i>Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов на проявления фетального вальпроатного синдрома. Гептапептид семакс</i>	63
5.4. <i>Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов на проявления ФВС. Гептапептид бета-казоморфин-7 (БКМ-7).</i>	69
5.5. <i>Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов на проявления ФВС. Аналог фрагмента АВП(6-9) тетрапептид Ac-D-MPRG</i>	77
5.5. <i>Изучение особенностей поведения крыс линии WAG/Rij в раннем возрасте (1-2 месяцы жизни)</i>	82
5.6. <i>Изучение зависимого от матери («детского») поведения крыс линии WAG/Rij</i>	91

5.7. Изучение когнитивных функций у крыс линии WAG/Rij.....	97
5.8. Модель депрессивноподобного состояния с использованием хронического введения клеоприда в дозе 0,4 мг/кг.....	103
6. Обсуждение результатов	105
6.1. Оценка поведения белых крыс в модели фетального вальпроатного синдрома	105
6.2. Изучение зависимого от матери («детского») поведения детенышей крыс на модели фетального вальпроатного синдрома.....	115
6.3. Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов. Гептапептид Семакс, гептапептид бета-казоморфин-7 (БКМ-7) и аналог фрагмента АВП тетрапептид Ас-D-MPRG.....	120
6.4. Магнитно-резонансная томография (МРТ)	135
6.5. Изучение особенностей поведения крыс линии WAG/Rij в раннем возрасте (1-2 месяцы жизни)	139
6.6. Изучение зависимого от матери («детского») поведения крыс линии WAG/Rij	143
6.7. Изучение когнитивных функций у крыс линии WAG/Rij.....	145
6.8. Модель депрессивноподобного состояния с использованием хронического введения клеоприда	149
7. Заключение	150
8. Выводы	152
9. Список литературы.....	154

1. Список сокращений

5-НТ – серотонин
АВП – аргинин-вазопрессин
АКТГ – адренкортикотропный гормон
в/б – внутривенное введение
ВКМ-7 – бета-казоморфин-7
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ВПК – вальпроевая кислота
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
и/н – интраназальное введение
КМ – казоморфины
ЛП – латентный период
МКБ – международная классификация болезней
ОИР – ориентировочно-исследовательская реакция
ОП – открытое поле
ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт
РАС – расстройства аутистического спектра
СЗН – система зеркальных нейронов
СПЛ – сложный пищевой лабиринт
УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
ФВС – фетальный вальпроатный синдром
ЦНС – центральная нервная система
Ac-D-MPRG – Ac-D-Met-Pro-Arg-Gly-NH₂
ANOVA – ANalysis Of Variance
BDNF – brain-derived neurotrophic factor
CDC – Center for disease control and prevention
HDAC – деацетилазы гистонов
NMDA – N-метил-D-аспартат
NSF – novelty suppressed feeding

2. Введение

Актуальность проблемы

Расстройства аутистического спектра (РАС) являются одной из наиболее часто встречающихся форм нарушения нервно-психического развития ребенка. Более чем в 80% случаев они приводят к тяжелой инвалидности. По данным Всемирной организации аутизма, в 2008 году 1 случай аутизма приходился на 150 детей, при этом за последние 10 лет количество детей с аутизмом выросло в 10 раз. Существенную роль в развитии аутизма играет наследственный фактор; серьезное влияние оказывают патологии развития центральной нервной системы в пренатальном периоде и раннем детстве. Депрессивные расстройства характеризуются аномально сниженным настроением с негативной оценкой себя и своего будущего. В настоящее время именно депрессия – наиболее распространенное психическое заболевание (Cardemil et al., 2014). Коморбидность аутизма, депрессии и эпилепсии вызывает все нарастающий интерес исследователей. Известно, что у четверти аутичных лиц встречаются эпилептические припадки (Levisohn, 2007); выявлены генные мутации, ассоциированные как с РАС, так и с эпилепсией (D'Adamo et al., 2011). Депрессивные симптомы не связаны с возрастом, но значимо коррелируют с клиническим диагнозом РАС (Gotham et al., 2014; Matson et al., 2014).

Для полноценного изучения любого заболевания, механизмов патогенеза и способов коррекции, необходимы достоверные экспериментальные модели на лабораторных животных. В целях исследования аутизма в представленной работе использована модель дисфункции нервной системы при пренатальном введении высокой дозы вальпроевой кислоты. Данное воздействие приводит к появлению фетального вальпроатного синдрома, который характеризуется комплексом признаков схожим с РАС, в том числе нарушениями в социальном взаимодействии. Модель фетального вальпроатного синдрома является относительно новой и дает перспективные результаты на уровне нейроанатомии и поведения (Chomiak et al., 2013). В свете взаимосвязи РАС с эпилептическими и депрессивными нарушениями большой интерес представляет генетическая линия крыс WAG/Rij. Характерной особенностью крыс этой линии является наличие неконвульсивной

формы эпилепсии (абсанс-эпилепсии), а также коморбидные депрессивноподобные особенности поведения, неассоциированные с повышенной тревожностью (Sarkisova, 2011). В рамках представленной работы проверялась гипотеза о наличии у детенышей WAG/Rij симптомов PAC. Наконец, в последние годы все большее внимание уделяется связи депрессивных расстройств с когнитивными нарушениями, а также вовлеченности в генез депрессии дофаминергической системы мозга (Kennedy et al., 2014). С учетом этого, нами было продолжено изучение депрессивноподобных изменений поведения крыс, возникающих в результате хронического постнатального введения блокатора D2-рецепторов клебоприда.

Традиционные методы лечения аутизма включают применение медикаментов различных фармакологических групп – антидепрессантов, транквилизаторов, нейролептиков. Однако, по клиническим данным, у перечисленных препаратов отмечена лишь частичная эффективность, а также имеются противопоказания и существенное побочное действие (Kohane, 2014). Таким образом, разработка новых способов коррекции расстройств аутистического спектра является актуальной и важной задачей, первые этапы решения которой проводятся на экспериментальных моделях патологических состояний. Кафедра физиологии человека и животных в этой области традиционно концентрирует внимание на пептидных биорегуляторах. Исследуются препараты, которые потенциально обладают высокоспецифичным положительным влиянием на состояние и созревание ЦНС. Для оценки возможностей коррекции последствия пренатального введения высокой дозы вальпроевой кислоты мы использовали: синтетический фрагмент адренкортикотропного гормона (семакс); опиоидный фрагмент бета-казеина материнского молока (бета-казоморфин-7); аналог фрагмента аргинин-вазопрессина (Ac-D-MPRG).

Цель и задачи исследования

Основной целью представленной диссертационной работы стало сравнительное исследование поведения детенышей крыс с фетальным вальпроатным синдромом, детенышей крыс линии WAG/Rij и крыс после

хронического постнатального введения клебоприда, а также изучение корректирующего влияния пептидных регуляторов.

В работе были поставлены следующие конкретные задачи:

1. Исследовать наличие патологических особенностей в поведении детенышей крыс на модели пренатального введения высокой дозы вальпроевой кислоты и детенышей крыс линии WAG/Rij.
2. Провести сравнительный анализ зоосоциального поведения крысят с фетальным вальпроатным синдромом и крысят линии WAG/Rij, а также оценить вклад дофаминергической системы мозга при помощи селективного D2-антагониста клебоприда.
3. Исследовать влияние пептидов семакс, бета-казоморфин-7 и Ac-D-MPRG на поведение крыс на модели фетального вальпроатного синдрома.
4. Исследовать влияние хронического введения D2-антагониста клебоприда в малых дозах на поведенческие показатели и гедонический статус крыс.

Научная новизна

По итогам работы получено большое количество новых данных об экспериментальных моделях расстройств аутистического спектра и депрессии на животных. Нами была успешно воспроизведена модель фетального вальпроатного синдрома у потомства крыс после пренатального воздействия высокой дозы вальпроевой кислоты. Обнаружены значимые нарушения психомоторного развития детенышей (1-2 недели жизни); позже наблюдаются изменения в ориентировочно-исследовательской деятельности, рост уровня тревожности и депрессивности, изменение болевой чувствительности. Использована оригинальная методика оценки внутривидового взаимодействия, направленная на анализ стремления к расширению социальной активности и новым контактам, выходящим за рамки «своей семьи». Обнаружено, что показатель «социальной новизны» в группе крыс, получавших вальпроевую кислоту, достоверно ниже, чем в контроле, что указывает на избыточную привязанность подопытных животных к матери и согласуется с клиническими наблюдениями за детьми с проявлениями аутизма (Moy et al., 2004).

Впервые показана способность регуляторных пептидов различных групп (фрагмент АКТГ, опиоидный пептид, фрагмент АВП) корректировать проявления

фетального вальпроатного синдрома. Вероятно, это связано с известной способностью нейроактивных пептидов модулировать работу многих нейромедиаторных систем, а также изменять уровень нейротрофических факторов.

В экспериментах с крысами линии WAG/Rij впервые показано, что изменения их поведения регистрируются уже в течение 1-го месяца жизни, задолго до проявления признаков эпилепсии, которые традиционно считают причиной депрессивноподобного состояния. Серия экспериментов с использованием обучения и переучивания с положительным пищевым подкреплением позволила выявить и исследовать когнитивные нарушения в поведении крыс WAG/Rij.

Впервые показано, что хроническое введение блокатора D2-рецепторов клебоприда взрослым крысам способно привести к появлению некоторых признаков депрессивноподобного состояния, в частности ангедонии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты позволяют значительно расширить представления о поведенческих отклонениях на моделях расстройств аутистического спектра и депрессии. Теоретическая значимость работы состоит в расширении данных о нейробиологических и нейрохимических основах социально значимых заболеваний ЦНС. Показано, что пренатальное введение высокой дозы вальпроевой кислоты обладает негативным воздействием на формирование внутривидовых реакций, в частности снижает стремление к социальной новизне. Также на модели фетального вальпроатного синдрома продемонстрированы отклонения в зависимом от матери поведении крысят. Сходные с моделью PAC поведенческие нарушения были выявлены у крыс линии WAG/Rij в раннем возрасте, что свидетельствует о некоей общности механизмов дезорганизации работы ЦНС. Применение фармакологического подхода позволило установить вовлеченность дофаминергической системы в наблюдаемые состояния.

С практической точки зрения полученные результаты позволяют значительно расширить представления о физиологической роли исследованных пептидов ряда групп. Для фрагментов АКТГ, АВП и бета-казоморфина-7 показано влияние на эмоциональные реакции и болевую чувствительность животных. Для БКМ-7 и семакса продемонстрировано анксиолитическое, антидепрессантное и

ноотропное действие; Ac-D-MPRG по результатам нашей работы нормализует ноцицепцию и оказывает антидепрессантный эффект. Также показано, что пептидные биорегуляторы способны оказывать значимое влияние на параметры социального взаимодействия животных, а также на их когнитивные функции. Сравнительный анализ активности регуляторных пептидов различных групп позволяет предложить их совместное применение. Представляется перспективным тестирование смеси изученных пептидов для коррекции мозговых дисфункций различного генеза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Пренатальное введение вальпроевой кислоты в дозе 600 мг/кг вызывает у потомства крыс ряд аутистическиподобных изменений в поведении, а также изменения в структуре головного мозга, в частности уменьшение объема гиппокампа.

2. У крысят на модели фетального вальпроатного синдрома зарегистрированы изменения зоосоциального взаимодействия, в частности снижение стремления к социальной новизне, а также изменения зависимого от матери поведения (повышение стремления находиться в контакте с матерью, не зависящее от D2-антагониста клебоприда).

3. Выявленные на экспериментальной модели фетального вальпроатного синдром изменения в значительной мере могут быть скорректированы хроническим постнатальным введением регуляторных пептидов.

4. У генетической линии крыс WAG/Rij в возрасте 1-2 месяцев наблюдается комплекс поведенческих нарушений, многие из которых схожи с таковыми при введении высокой дозы вальпроевой кислоты.

5. У крысят линии WAG/Rij зарегистрированы изменения зоосоциального взаимодействия, в частности снижение стремления к социальной новизне, а также изменения зависимого от матери поведения; последние заключаются в снижении стремления находиться в контакте с матерью и зависят от D2-антагониста клебоприда.

6. Хроническое постнатальное введение D2-антагониста клебоприда в дозе 0,4 мг/кг взрослым самцам белых крыс способно вызвать некоторые признаки депрессивноподобного состояния, в частности ангедонию.

Апробация работы

Апробация результатов представленного диссертационного исследования успешно прошла на Всероссийских молодежных школах-конференциях «БиоН нейротехнологии» 2010 и 2011 гг., XIV и XV конференциях молодых учёных по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (Москва, 2010 и 2011 гг.), VII международной медицинской студенческой конференции LIMSC (Нидерланды, 2011 г.), XVI, XVII и XVIII международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2012, 2013, 2014 гг.), международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине" (Санкт-Петербург, 2012 г.), конференции "Физиология висцеральных систем в норме и патологии" (Киев, 2012 г.), международной конференции среди молодых ученых ECNP (Франция, 2012 г.), XXII Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013 г.), VI российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Уфа, 2013 г.), ежегодном съезде American Epilepsy Society (США, 2013 г.), конференции IUPS (Великобритания, 2013 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург, 2014 г.), а также на заседаниях кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 173 страницах, содержит 28 рисунков и 21 таблицу. Список литературы включает 204 источника, из них 23 отечественных.

3. Обзор литературы

3.1. Расстройства аутистического спектра. Характеристика и классификация

Расстройства аутистического спектра (РАС) – группа заболеваний, характеризующихся комплексными нарушениями в работе мозга. К данному типу расстройств относятся такие заболевания как собственно аутизм, детское дезинтегративное расстройство, синдром Аспергера, синдром Ретта и т.д. (Myers, 2007). У больных наблюдаются выраженные проблемы с общением, речевыми и двигательными функциями, эмоциональным состоянием, уровнем умственных способностей (Rapin, 2008). Их активность и интересы ограничены, а поведение характеризуется шаблонностью и однообразностью.

В клинической практике выражения «аутизм» и «расстройства аутистического спектра» зачастую являются взаимозаменяемыми (Caronna et al., 2008). Проявления РАС характеризуются широким спектром: от пациентов с тяжёлыми нарушениями (немых и умственно неполноценных) до высокофункциональных аутистов, расстройство которых проявляется в странностях при общении, узости интересов и многословной речи (Harpe, 1999).

Исходя из рекомендаций ВОЗ для определения РАС используется следующая триада симптомов (World Health Organization F84. Pervasive developmental disorders // (ICD-10):

- недостаток социальных взаимодействий;
- нарушенная взаимная коммуникация;
- ограниченность интересов и повторяющийся репертуар поведения.

Впервые подобные признаки проявляются в младенческом или детском возрасте, и обычно сохраняются у взрослых людей, иногда в смягченной форме (Rapin, 2008).

Социальные отклонения становятся заметными в раннем детстве. Младенцы с РАС реже улыбаются и смотрят на других людей, реже откликаются на собственное имя. В период обучения ходьбе ребёнок ещё значительно отклоняется от социальных правил: он редко смотрит в глаза, не предвосхищает изменением позы попытку взять его на руки (Volkmar, Chawarska, 2008). В возрасте трёх-пяти

лет дети с РАС реже проявляют способность к пониманию социальной обстановки, не склонны спонтанно приближаться к другим людям, реагировать на проявление ими эмоций или имитировать чужое поведение, участвовать в невербальном общении, действовать по очереди с другими людьми. В то же время они слишком сильно привязываются к тем, кто непосредственно о них заботится (Sigman et al., 2004).

У лиц с аутизмом наблюдаются различные формы повторяющегося или ограниченного поведения, среди которых:

- стереотипия (взмахи руками, вращение головы, раскачивание туловища);
- компульсивное поведение (намеренное соблюдение неких правил);
- ограниченное, узкофокусированное поведение;
- аутоагрессия.

Только при аутизме повторяющееся поведение наблюдается часто и носит выраженный характер (Bodfish et al., 2000).

Среди других симптомов РАС:

- генерализованная недостаточная обучаемость, которая имеется у большинства больных (Dawson et al., 2008);
- эпилептические припадки (встречаются у четверти аутичных лиц) (Levisohn, 2007);
- гиперактивность и дефицит внимания;
- отклонения в пищевом поведении;
- проблемы со сном.

По данным ВОЗ на 2013 год более 7,6 миллионов людей страдало РАС по всему миру. По данным американской организации CDC (Center for disease control and prevention) распространенность аутистических расстройств весьма высока: в 2011-2012 годах РАС имелись в США у каждого 50-го школьника, причем эта цифра составляет 178% от уровня 2007 года (CDC and HRSA issue report on changes in prevalence of parent-reported Autism Spectrum Disorder in school-aged children).

По эпидемиологическим данным РАС встречаются чаще у мальчиков, чем у девочек: примерно 4:1 в пользу мужского пола (Newschaffer et al., 2007). Развитие аутизма может быть ассоциировано также с пре- и перинатальными факторами

риска, такими, как повышенный возраст матери либо отца, низкий вес при рождении, короткая беременность, гипоксия при родах (Kolevzon et al., 2007). Обнаружена ассоциация аутизма с:

- рядом генетических отклонений, например, генов SHANK2, SYNGAP1, DLGAP2 и локуса DDX53-PTCHD1, связанного с икс-хромосомой (Zafeiriou et al., 2007);
- тревожными расстройствами (около 50% детей с РАС) (White et al., 2009);
- физическими аномалиями, которые встречаются у аутистов значительно чаще, чем в общей популяции (Ozgen et al., 2008);
- депрессивными состояниями (Falk, 2014).

3.2. Этиология и патогенез РАС. Известные генетические и эпигенетические факторы

Наибольшее внимание специалистов сосредоточено на развитии аутистических расстройств в раннем детстве. До определенного возраста (первый год жизни) довольно сложно диагностировать какие-либо симптомы. Однако затем начинается резкий регресс когнитивных функций, приходящийся именно на тот период, когда у здоровых детей наблюдаются важнейшие процессы социализации. Полная картина заболевания формируется, как правило, к трем годам (American Psychiatric Association Diagnostic criteria for Autistic Disorder). Считается, что необратимые изменения в мозге происходят еще до проявления первых симптомов, возможно даже в период пренатального развития.

Известно, что причины аутизма тесно связаны с генами, влияющими на созревание синаптических связей в головном мозге. Вместе с тем, генетика заболевания сложна, на его возникновение влияет как взаимодействие множества генов, так и редко возникающие мутации (Abrahams, 2008). Кроме того, следует учитывать эпигенетические факторы, которые могут модифицировать экспрессию генов (Rapin, 2008). Эпигенетические факторы являются своеобразным посредником между генетическими факторами и влиянием окружающей среды, т. е. наблюдается явление так называемого эпигенетического импринтинга: под влиянием воздействий внешней среды происходят модификации ДНК, которые

могут наследоваться у дочерних форм. Методом полногеномного поиска ассоциаций некоторых участков хромосом, известных в качестве «горячих точек» эпигенетической модификации, были найдены локусы 7q и 15q, наиболее часто измененные у людей с расстройствами аутистического спектра.

В ранних близнецовых исследованиях наследуемость РАС оценивалась более чем в 90%, при условии проживания детей в одной обстановке и отсутствии иных болезней (Freitag, 2007). Однако большинство мутаций, повышающих риск аутизма, пока остаются невыясненными, обнаружено множество генов-кандидатов, но эффект большинства из них мал (Abrahams, 2008). Возможной причиной появления детей с РАС в здоровых семьях могут быть вариации числа копий (спонтанные делеции и дупликации геномных участков), вызвавшие аутизм у ребёнка, но отсутствующие у родителей (Beaudet, 2007). Опыты на экспериментальных животных позволяют предположить, что проявления РАС связаны с поздними этапами развития, на которых важную роль играет синаптическая активность, а также то, что модулирование активности генов апоптотических факторов после рождения может смягчить симптомы либо обратить нарушения вспять (Gottfried et al., 2014).

Некоторые данные также показывают, что заболевание может быть вызвано проблемами в окружающей среде ребенка, например, неблагоприятными экологическими условиями или побочными эффектами приема лекарственных препаратов (Arndt et al., 2005). Среди экологических факторов – определённые продукты питания, инфекционные заболевания, тяжёлые металлы, растворители, выхлопы дизельных двигателей, фталаты и фенолы, используемые в производстве пластиков, пестициды, броминированные огнезащитные материалы, алкоголь, курение, наркотики и пренатальный стресс (Kinney et al., 2008).

Нейроанатомические исследования заставляют предположить, что частью механизма развития РАС является нарушение формирования мозга вскоре после зачатия. Например, талидомид при использовании на 20-24 день беременности, что соответствует времени смыкания нервной трубки и закладке моторных ядер черепных нервов, вызывает тератогенные отклонения, которые по некоторым признакам сходны с РАС (Lenz, 1962). Затем локализованная аномалия приводит к каскаду патологических взаимодействий, подверженных значительному влиянию

факторов внешней среды (Casanova, 2007). Все известные тератогены, связанные с риском аутизма, оказывают своё воздействие в течение первых восьми недель после зачатия.

Исходя из накопленных нейрцитологических и нейрофизиологических данных при РАС предполагается:

1. Избыток нейронов, ведущий к чрезмерному количеству локальных связей в ключевых участках головного мозга (Chomiak, 2014).
2. Нарушение нейромиграции на ранней стадии развития (Schmitz, 2008).
3. Разбалансировка возбuditельно-тормозных нейросетей (Persico, 2006).
4. Нарушение формирования синапсов в связи с нарушением деятельности системы клеточной адгезии или из-за сбоя в регулировке синтеза синаптических белков (Kelleher, 2008). Нарушенное синаптическое развитие может также играть роль при эпилепсии, что, возможно, объясняет пересечение двух расстройств (Jeste, 2011).

Следует отдельно остановиться на патологических изменениях в структуре ЦНС. К ним относятся: снижение числа нейронов в моторных ядрах глазодвигательного, тройничного, добавочного и языкоглоточного черепно-мозговых нервов, уменьшенный мозжечок со сниженным числом клеток Пуркинье (преимущественно в передней доле червя и полушарий); префронтальной и височной коре (Amaral et al, 2008).

При аутизме наблюдается ряд нейротрансмиттерных отклонений, а именно повышенный уровень серотонина и измененное состояние систем дофамина и норадреналина (Hughes, 2008).

Согласно одному из предположений, характерные для РАС социальная дисфункция и коммуникативные проблемы связаны с нарушением работы системы зеркальных нейронов (СЗН). Благодаря СЗН человек способен понимать других людей, повторяя их реакции, имитируя их действия, намерения и эмоции в своем поведении (Williams, 2008). Ряд работ продемонстрировали структурные отклонения в СЗН-областях у лиц с РАС, задержку активации базовой имитационной нейросети, а также корреляцию сниженной активности СЗН с тяжестью заболевания (Iacoboni, 2006).

Как уже было сказано выше, при расстройствах аутистического спектра нарушены когнитивные процессы, речь, двигательная активность, чувствительность. Структуры мозга, в норме регулирующие эти функции, хорошо известны; их изменения при РАС вызывают соответствующие нарушения поведения. Так, обширные регионы лобной доли, верхней височной коры, теменной коры, миндалины – ответственны за социальное поведение; зоны Брока и Вернике – за формирование связанной речи и ее восприятие. Изменения в структуре миндалины могут объяснять большую тревожность индивидуумов с расстройствами аутистического спектра (Chomiak, 2014). Стереотипные и повторяющиеся действия при расстройствах аутистического спектра обусловлены нарушениями в орбитофронтальной коре и хвостатом ядре.

3.3. Диагностика и виды расстройств аутистического спектра. Терапия РАС

В случае РАС примерно половина родителей замечают необычное поведение ребёнка по достижении 18 месяцев, а к 24 месяцам на отклонения обращают внимание уже 80% родителей (Landa, 2008). Ребенка рекомендуется незамедлительно показать врачу при наличии одного из следующих клинических признаков:

- к 12 месяцам ребенок не лепечет и не жестикулирует;
- к 16 месяцам не выговаривает слов;
- к 24 месяцам не произносит спонтанно фразы из двух слов.

В основе клинической диагностики аутизма лежит анализ поведения, а не механизмов расстройств. Согласно руководству по диагностике и статистике психических расстройств (DSM-IV-TR) в списке симптомов — отсутствие социальной или эмоциональной взаимности, стереотипный или повторяющийся характер использования речи или речевая идиосинкразия, постоянный интерес к определённым деталям или предметам и т.д. При аутизме должно наблюдаться как минимум шесть симптомов из предлагаемого списка, по меньшей мере, два из них должны относиться к нарушению социальных взаимодействий, один должен описывать ограниченное и повторяющееся поведение. Само расстройство должно отмечаться в возрасте до трёх лет и характеризоваться задержкой развития либо

отклонениями в социальных взаимодействиях, использовании речи при общении, либо проблемами участия в символических или требующих воображения играх (Baird et al., 2003).

Развитие детского аутизма принято делить на несколько стадий. Первая из них – от рождения и до 36 месяца жизни – носит название синдрома Каннера. Эта стадия характеризуется специфическими особенностями поведения: отгороженностью от реального мира, неспособностью формирования общения, асинхронным дизонтогенезом с неравномерным созреванием психической, речевой, моторной и эмоциональной сфер жизнедеятельности. При игнорировании данных признаков болезнь может перерасти в синдром Геллера – быстро прогрессирующее тотальное слабоумие у детей раннего возраста. Ребенок становится своенравным, раздражительным, тревожным и гиперактивным; речь обедняется, а затем распадается. Утрачиваются ранее приобретенные поведенческие, игровые и социальные навыки; теряется контроль за функцией кишечника и мочевого пузыря. Данный синдром развивается за 6-12 месяцев. Следующей стадией развития аутизма является синдром Крамера-Польнова, характеризующийся бредовыми и бредоподобными фантазиями, «плавающим» вниманием, пирамидными и экстрапирамидными расстройствами, мозжечковой атаксией (Башина, 1999).

Важнейшим моментом в терапии аутизма является его своевременная диагностика, поскольку на поздних стадиях развития заболевания существенно снижаются шансы коррекции патологического состояния. В основе терапии РАС лежит сочетание методик специального обучения детей и психосоциальной помощи с применением медикаментов. Специалисты-дефектологи и педагоги способны помочь ребёнку в освоении навыков самопомощи, общения, рабочих навыков, что часто повышает уровень функционирования, снижает тяжесть симптомов и неадаптивного поведения (Rogers, 2008). В ряду фармакологических препаратов обычно назначают антиконвульсанты, антидепрессанты, психостимуляторы, нейролептики (Oswald, 2007). Эффективность и безопасность применения различных средств при РАС остается сомнительной; лекарство может вызвать атипичную реакцию либо неблагоприятные побочные эффекты; ни одно из

средств не показало способности надежно смягчать ключевые для аутизма коммуникативные и социальные проблемы (Vuitelaar, 2003).

3.4. Экспериментальные подходы к изучению РАС

Изучение патогенеза расстройств аутистического спектра, а также поиск новых методов их коррекции – одна из важнейших задач современной психофармакологии. Для ее решения активно используются экспериментальные модели на лабораторных животных, создаваемые с учетом клинических данных.

В клинической практике замечено, что фармакологическая терапия, получаемая матерью при депрессии, гипертензии и эпилепсии (вальпроевая кислота, карбамазепин, талидомид, фенитоин) может повышать риск возникновения у детей РАС и пороков развития (Hellings et al., 2005). Недавний обзор заболеваемости РАС у детей показывает, что среди 655 615 детей, рожденных в Дании между 1996 и 2006 гг., у 5437 были диагностированы РАС. Рассчитанный абсолютный риск составил 1,5%. Среди 508 детей, чьи матери принимали вальпроевую кислоту (ВПК) во время беременности, риск заболеваемости составил 4,4% (Christensen, 2013). По другим данным у 5-х из 56 детей (8,6%), чьи матери использовали монотерапию вальпроевой кислотой, и у 4-х из 21 ребенка (19%), в случае политерапии, были диагностированы впоследствии симптомы РАС (Chomiak, 2014). Повреждающее воздействие ВПК на нервную систему детей было названо фетальным вальпроатным синдромом (более подробно он рассмотрен в следующей главе).

На основе указанных наблюдений была предложена экспериментальная модель аутизма на животных. Впервые предложенная Rodier, она базируется на том, что ВПК вводят беременным крысам в момент, прохождения зародышами стадии закрытия нервной трубки (Rodier et al., 1996, 1997; Arndt et al., 2005). Показано, что крысята, подвергшиеся действию ВПК in utero характеризуются пониженной болевой чувствительностью, локомоторной и повторяющейся однотипной гиперактивностью, повышенным уровнем беспокойства и уменьшением социального взаимодействия (Schneider et al., 2007; Markram et al., 2007). Таким образом, изменения в поведении животных имеют

феноменологическое сходство с характерными для РАС симптомами (нарушения социальной активности, взаимной коммуникации и стереотипическое поведение).

Наряду с фетальным вальпроатным синдромом характерные аутистическоподобные поведенческие нарушения обнаружены также при синдроме хрупкой X-хромосомы, синдроме Ретта и фетальном алкогольном синдроме. Для указанных патологических состояний также разработаны животные модели. В частности, сходными с РАС нейрохимическими и поведенческими изменениями характеризуется генетический синдром хрупкой X-хромосомы. При этом известны специфические генетические мутации, вызывающие данную болезнь и позволяющие создавать относительно точные модели на животных. Исследования последних лет на экспериментальных моделях синдрома хрупкой X-хромосомы позволили выделить новые биохимические изменения в ЦНС животных, в то время как генетические исследования с участием людей-аутистов выявили новые гены, связанные с патогенезом заболевания. Эти данные позволяют сопоставить нейрохимические нарушения при РАС и синдроме хрупкой X-хромосомы. В частности, замедленное созревание синапсов и их нетипичная структура, а также изменения во внутриклеточных сигнальных путях связаны с патогенезом обеих болезней. Среди медиаторных систем выявлены нарушения в структуре и/или функциях ионотропных ГАМК_A и метаботропных ГАМК_B рецепторов (Hampson et al., 2011, Coghilana et al., 2012). Предполагается, что ухудшение в системе ГАМКергической передачи критически способствует увеличению коэффициента между возбуждением и торможением. Подобный дисбаланс может влиять на корковых связи, отвечающие за эмоциональные и социальные функции (Banerjee et al., 2013).

Литературные данные также указывают на вовлеченность глутаматергической системы в развитие различных форм РАС. Недавние исследования подчеркивают общность организации глутаматергической системы и вовлеченность одних и тех же генов как в патогенез РАС, так и в патогенез некоторых схожих моногенных заболеваний, например, синдрома Ангельмана и синдрома хрупкой X-хромосомы (Pesa et al., 2012). Исследования на животной модели синдрома хрупкой X-хромосомы указывают на важную роль метаботропного глутаматного рецептора 5 типа (mGluR5). Анализ других

экспериментальных моделей РАС указывает также на вовлеченность каинатных, NMDA и AMPA рецепторов (Carlson et al., 2012). Вероятно, в ближайшее время именно глутаматергическая система станет новой мишенью для создания лекарственных препаратов. В частности, ингибиторы mGluR5 рассматриваются в качестве нового и перспективного пути лечения аутизма (Spooren et al., 2012).

Клинические данные указывают на повышенный в крови (гиперсеротонинемия) и пониженный в мозге уровень серотонина у людей с РАС. Вероятно, на ранних стадиях развития плода серотонин из крови может попадать в мозг плода, что приводит к дефициту серотонинергических связей по принципу отрицательной обратной связи, и это, в свою очередь, может вызвать нарушения функционирования серотонинергической системы (McNamara et al., 2008). В работе McNamara самкам крыс вводили серотонинергический агонист 5-метокситриптамиин в период развития детенышей. У экспериментальной группы наблюдались судорожные припадки, отсутствовавшие в контроле. Поведенческие данные указывают на то, что крысы, получавшие препарат, характеризуются недостатком зоосоциального взаимодействия с матерью, повышенной тревожностью и обедненным репертуаром зоосоциального поведения, основанного на ольфакторных стимулах.

Таким образом, литературные данные указывают на определенное сходство различных экспериментальных моделей РАС. В представленном исследовании нами была выбрана модель фетального вальпроатного синдрома, потому что соли вальпроевой кислоты по-прежнему используются в клинической практике в качестве терапевтических агентов. Изучение особенностей данного состояния и поиск путей его коррекции остается крайне актуальным. Также на этой модели продемонстрированы многие поведенческие нарушения, характерные для РАС, и данную модель относительно легко адаптировать.

3.5. Фармакологическая модель РАС. Введение высокой дозы солей вальпроевой кислоты как модель дисфункции нервной системы

Вальпроевая кислота (2-пропил-пентановая кислота, см. рис. 1) представляет собой производное валерьяновой кислоты – важнейшего компонента эфирного масла валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis*) (Hendriks et al., 1981). В

клинической практике ВПК служит распространенным антиконвульсантом. В том числе препарат применяется у беременных женщин с эпилепсией в составе моно- или политерапии. ВПК и ее натриевая соль используются также при шизофрении, депрессивных и тревожно-фобических расстройствах, посттравматическом синдроме, пограничных расстройствах личности, нарушениях пищевого поведения, токсикомании.

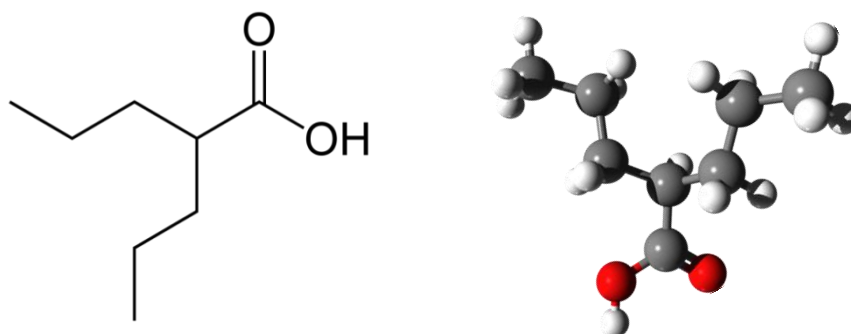


Рис. 1. Химическая структура вальпроевой кислоты.

Механизм действия ВПК обусловлен ее влиянием как на медиаторно-зависимые, так и на медиаторно-независимые клеточные процессы. Наиболее изученный путь – блокада ГАМКергической передачи: ВПК повышает обмен главного тормозного медиатора за счет ингибирования ГАМК-трансаминазы, расщепляющей ГАМК (Levy et al., 2002). Помимо этого, под действием ВПК показана блокада гистондеацетилаз (HDACs), а также мозговой микросомальной ацетил-КоА синтетазы, изменение транскрипции многих генов в мозге, снижение уровня нейропротекторного белка bcl-2 и мозгового нейротрофического фактора, блокада возбуждения через NMDA-рецепторы. Модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, гистондеацетилазы играют важнейшую роль в регуляции экспрессии генов. В то время как гиперацетилирование гистонов под действием гистонацетилаз обычно связано с повышением транскрипционной активности, гистондеацетилазы вызывают гипоацетилирование и репрессию генов. Гипоацетилирование приводит к уменьшению промежутка между нуклеосомой и намотанной на неё ДНК, более плотная упаковка ДНК уменьшает её доступность (Gottfried et al., 2013).

Всасывание ВПК в желудочно-кишечном тракте происходит быстро, и до 90% вещества связывается с белками плазмы крови. Метаболизируется препарат преимущественно в печени с участием уридин-дифосфат-глюкоронил-трансферазы путем бета-окисления. Время полужизни препарата сильно различается у разных живых объектов: у экспериментальных животных – 0,3-4,0 часа (у мышей и обезьян соответственно), у людей – 9-18 часов (Nau, 1987). На фоне беременности общая концентрация ВПК в плазме крови может снижаться на 25-50%, но концентрация свободной ВПК не меняется (Sabers, Tomson, 2009).

Известно, что ВПК способна проходить плацентарный барьер; она присутствует в эмбрионе даже в более высокой концентрации, чем в организме матери, и отношение концентраций ВПК в плоде и в женском организме на момент рождения может достигать 4,6 (Kondo et al., 1987). Как показано для крыс, морских свинок (Haberger and Pollack, 1994), овец (Sanjeev et al., 2000) и человека (Gal et al., 1988), возможность выведения ВПК организмом новорожденного намного снижена: время полужизни препарата увеличено в 2-8 раз. Рассмотрим влияния вальпроевой кислоты на процесс имплантации зародыша. На седьмой день беременности стромальные клетки должны превратиться в децидуальные и экспрессировать определенный набор белков. При воздействии ВПК эмбрион хоть и не теряет способности имплантироваться в эндометрий матки, но вместо эктодермы, из которой образуются внешние покровы и нервная система, и энтодермы, дающей начало пищеварительному тракту, легким, печени, развиваются клетки с большим количеством цитоплазмы и крупным ядром (Dekker and Sibai, 1998). Для облегчения процесса имплантации децидуальные клетки накапливают и высвобождают белки внеклеточного матрикса: ламинин, коллаген, фибронектин, виментин. В группе с введением ВПК обнаружили слабую экспрессию ламинина, отсутствие экспрессии коллагена IV и виментина (Seren et al., 2012).

В высоких дозах (600-800 мг/кг) ВПК и ее соли проявляют свойства нейротоксина, вызывая дисфункции нервной системы, описываемые как фетальный вальпроатный синдром (ФВС) у потомства. Применение вальпроевой кислоты во время беременности влечет за собой ряд серьезных нарушений плода, включающие образование расщелин в позвоночнике и развитие тригоноцефалии,

эпикантуса, медиального дефицита бровей, широкий носовой корень, длинную нижнюю губу и др. (Kulkarni et al., 2006). Воздействие ВПК на эмбрион также является причиной дефектов развития нервной трубки.

Известные и другие побочные эффекты приема ВПК:

- различные метаболические осложнения: гипонатриемия, снижение концентрации карнитина, нарушения секреции антидиуретического гормона, гиперглицинемия (Branten et al, 1998);
- вальпроат-индуцированная энцефалопатия. Например, в Германии за 2006 год было определено 19 новых случаев, добавленных к 51, зарегистрированным ранее;
- обратимая деменция с атрофией головного мозга (Walstra, 1997);
- паркинсонизм, индуцированный ВПК. Авторы различных статей объясняют его появление уменьшением количеством не дофаминергических нейронов, а протоплазматических астроцитов и снижением числа глиальных филаментов (Sechi et al, 2008);
- эмоциональные расстройства, депрессия, психотические реакции, агрессия, гиперактивность и поведенческие расстройства (Trimble, 1991; Болдырев, 2000);
- такие поведенческие расстройства как раздражительность, инсомния, гиперсомния, гиперактивность, повышенная утомляемость (Herranz et al., 1982).

У крыс закрытие нервной трубки происходит на 11-й день эмбрионального развития, в течение 12-го дня происходит завершение развития двигательных ядер тройничного, отводящего и подъязычного нервов (Altman, Bayer, 1980). У детенышей самок, которым вводили высокую дозу солей ВПК на 12,5 день беременности, наблюдались следующие аномалии развития головного мозга:

1. уменьшение количества двигательных нейронов в ядрах глазодвигательного, тройничного, отводящего и подъязычного черепно-мозговых нервов;
2. уменьшение каудального отдела и удлинение рострального отдела ядра лицевого нерва;
3. уменьшение объема мозжечка с уменьшением количества клеток Пуркинье в полушариях и черве;

4. снижение количества нейронов в ядрах мозжечка (Schneider, Przewłocki, 2005).

Перечисленные анатомические аномалии сходны с обнаруженными при исследовании головного мозга людей, страдающих аутизмом (Hashimoto et al., 1995). Также, наряду с расстройствами центральной нервной системы, при применении высоких доз вальпроевой кислоты во время беременности у потомства наблюдаются тератогенный эффект и соматические дефекты (Bescoby Chambers et al., 2001).

Потомство самок крыс, которым вводили высокую дозу солей ВПК на 12,5 день беременности, отличается большей депрессивностью, тревожностью, измененной болевой и тактильной чувствительностью, сниженной исследовательской активностью в подростковом периоде (Bryson, 1998). Также отмечают следующие поведенческие особенности у ВПК-крыс: пониженную болевую чувствительность и повышенную чувствительность к неболевым стимулам; уменьшенное акустическое преимпульсное ингибирование при оценке стартл-рефлекса; двигательную и стереотипическую гиперактивность в сочетании с низкой исследовательской мотивацией; пониженный репертуар компонентов социального поведения в сочетании с повышенной латентностью социального поведения. Кроме того, у ВПК-крыс наблюдается отставание в созревании, сниженный вес, задержка моторного развития, а также ослабление целого комплекса зоосоциальных рефлексов, в том числе задержанная «реакция поиска гнезда», связанная с обонятельной системой. Именно эти признаки позволяют предположить, что данные особи имеют отклонение, сходное с человеческими РАС. Все описанные нарушения проявляются до полового созревания, что отличает ВПК-аутизм от схожих моделей поведенческих расстройств, особенно модели шизофрении на грызунах (Sabuncu, 2014).

3.6. Генетические модели нарушений развития и работы нервной системы. Характеристика крыс линии WAG/Rij

Помимо экспериментальных моделей на животных, в которых негативные изменения вызываются введением фармакологических агентов, существует большое количество генетических моделей различных патологий. Коморбидность

аутизма, депрессии и эпилепсии вызывает все нарастающий интерес исследователей. Депрессивные симптомы не связаны с возрастом, но значимо коррелируют с клиническим диагнозом РАС (Gotham et al., 2014; Matson et al., 2014). Так выявлены точечные мутации в гене KCNJ10, кодирующем калиевые каналы преимущественно в астроцитах и связанные как с РАС, так и с эпилепсией (D'Adamo et al., 2011). В качестве обязательной терапевтической процедуры врачи рекомендуют проводить ЭЭГ-исследование у детей с аутизмом с целью выявить аномальные паттерны электрической активности и предотвратить развитие эпилептического статуса (Elsayed et al., 2012).

В свете описанной взаимосвязи РАС с эпилептическими нарушениями (см. также Trimble, 1991; Болдырев, 2000; Levisohn, 2007; Tuchman, 2009) особый интерес представляют крысы WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/from Rijswijk, the Netherlands). Характерной особенностью животных этой линии является наличие врожденной неконвульсивной формы эпилепсии – абсанс-эпилепсии. Показано, что у крыс WAG/Rij также имеются коморбидные депрессивноподобные особенности поведения, неассоциированные с повышенной тревожностью (Саркисова с соавт., 2002). Наличие и повторяемость пик-волновых разрядов считаются необходимым условием или причиной возникновения депрессивноподобных симптомов в поведении у крыс линии WAG/Rij (Sarkisova et al., 2011). Таким образом, данная генетическая линия уже является уникальным в своем роде модельным объектом «двойной патологии» - абсанс-эпилепсии и депрессии (Sarkisova et al., 2010). При этом сравнении поведенческих реакций детенышей крыс линии WAG/Rij и крыс после пренатального введения ВПК до сих пор не проводилось.

Особенности поведения крыс линии WAG/Rij, такие как пониженный уровень двигательной и исследовательской активности, повышенная депрессивность, пониженное потребление и предпочтение сахарозы, имеют феноменологическое сходство с симптомами депрессии человека – психомоторной заторможенностью, депрессивным настроением, ангедонией. Возможность коррекции особенностей поведения у крыс линии WAG/Rij при помощи антидепрессанта имипрамина свидетельствует об их фармакологическом сходстве с клиническими формами депрессивных расстройств. Агонисты D2/D3 рецепторов ослабляют симптомы депрессии в поведении у крыс линии WAG/Rij, а

антагонисты D2/D3 рецепторов их усиливают (Sarkisova et al., 2008). Биохимические исследования указывают на гипофункцию дофаминергической системы мозга у крыс линии WAG/Rij: по сравнению с крысами Wistar у них меньше концентрация дофамина в префронтальной коре, nucleus accumbens и моторном стриатуме (Sarkisova et al., 2011).

К настоящему времени накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о ключевой роли дофамина, прежде всего D2/D3 рецепторов мозга, в патогенезе депрессивных нарушений у животных и человека (Drago et al., 2000), а также в опосредовании терапевтического эффекта антидепрессантов (D'Aquila et al., 2000). Показано, что блокада D2/D3 рецепторов может вызвать депрессивноподобное состояние и/или каталепсию у нормальных крыс и здоровых людей, а также привести к возобновлению депрессивной симптоматики после ее купирования с помощью антидепрессантной терапии у больных депрессией (Willner et al., 2005). В связи с этим у нас возникло предположение о том, что блокада D2/D3 рецепторов дофамина может вызвать у нормальных крыс Wistar депрессивноподобное поведение, подобное поведению крыс линии WAG/Rij.

Возвращаясь к крысам WAG/Rij отметим, что у них снижена активность не только дофаминергической, но и ГАМКергической системы. По всей видимости, именно это нарушение является нейрхимической основой для возникновения у крыс данной линии пик-волновой активности (Sarkisova et al., 2003). Еще одной особенностью нейромедиаторных систем крыс линии WAG/Rij является нарушение серотонинергической системы. В стрессогенных условиях у данных животных преобладает пассивно-оборонительное поведение по сравнению с крысами Wistar, которое, по всей видимости, сопровождается сниженным выбросом серотонина в ответ на стресс во фронтальной коре. Повышенная чувствительность крыс WAG/Rij к стрессу также может провоцировать возникновение депрессивноподобного состояния (Sarkisova et al., 2011).

Клинические данные свидетельствуют о том, что депрессивные расстройства сопровождаются нарушениями когнитивных функций, таких как память и обучение (Goodwin et al., 1997). Когнитивные нарушения, как и другие симптомы депрессивноподобного состояния, снимаются хроническим введением антидепрессантов, таких как пароксетин (блокатор обратного захвата 5-НТ)

(Elizalde et al., 2008), дезипрамин (блокатор обратного захвата норадреналина) и эскиталопрам (блокатор обратного захвата 5-HT) (Bondi et al., 2007). С учетом этого особый интерес представляют исследования когнитивных функций на генетических моделях депрессии, не ассоциированной с повышенной тревожностью, например, крысах линии WAG/Rij. Наиболее адекватным подходом к выявлению возможных когнитивных нарушений при депрессивных расстройствах является использование методик для оценки способности к обучению, связанному с решением гиппокамп-зависимой пространственной задачи (Schulz et al., 2007), с одной стороны, и к переучиванию (решение обратной задачи), связанному с префронтальной корой (так называемое реверсивное обучение), с другой стороны. В экспериментах на здоровых добровольцах показано, что реверсивное обучение является дофамин-зависимым (Cools et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о том, что использование реверсивного обучения (в зеркально отраженном лабиринте) с позитивным подкреплением у крыс линии WAG/Rij может позволить не только выявить когнитивные нарушения при депрессивноподобном состоянии, но и оценить вклад различных составляющих дофаминергической системы мозга в патогенез этих нарушений.

3.7. Депрессивные заболевания в клинической практике. Нейробиологические и нейрохимические основы депрессий

Депрессия – психическое расстройство, характеризующееся патологически сниженным настроением (гипотимией) с негативной, пессимистической оценкой себя, своего положения в окружающей действительности и своего будущего. Депрессивное изменение настроения наряду с искажением когнитивных процессов сопровождается моторным торможением, снижением побуждений к деятельности, соматовегетативными дисфункциями, а также утратой способности переживать радость (ангедония) (Смулевич, 2003).

По данным клинко-статистических исследований заболеваемость депрессиями на сегодняшний день приближается к 3%. Типичные формы депрессий выявляются не менее, чем у 12-25% пациентов, обращающихся за помощью в медицинские учреждения, причем не более половины из них получают правильный диагноз, и еще меньшему числу назначаются антидепрессанты

(Mischoulon et al., 2001). Одним из объяснений такой ситуации является предубежденность пациента против констатации психического расстройства и назначения препаратов. Отсутствие лечения депрессивных симптомов влечет за собой ряд негативных последствий: возникновение тягостных психологических проблем, усугубление телесного страдания, снижение качества жизни пациента и его семьи, попытки суицида.

Согласно МКБ-10 депрессивные симптомы разделяются на типичные (основные) и дополнительные. К первым из них относятся: подавленное настроение, не зависящее от обстоятельств, в течение длительного времени (от двух недель и более); ангедония; стабильная утомляемость.

Дополнительные симптомы: пессимизм; чувство вины, бесполезности, тревоги, страха; неспособность концентрироваться и принимать решения; нестабильный аппетит, изменения в весе; нарушенный сон.

Различают «униполярные» депрессии, при которых настроение остается в пределах сниженного «полюса», и депрессии, являющиеся составной частью биполярного расстройства и перемежающиеся маниакальными эпизодами (Parker, 1996).

Нарушения нормального функционирования механизмов регуляции эмоций при депрессивных расстройствах связано, прежде всего, с лимбической системой и гиппокампом. Методами нейроморфологии и нейровизуализации показано расширение боковых желудочков мозга человека, что можно интерпретировать как атрофию гиппокампа (Stoll et al., 2000). У животных в ситуации хронического стресса (одна из экспериментальных моделей депрессии) развивается атрофия дендритов пирамидных клеток гиппокампа (Костенкова и др., 2003).

Стимуляция таких структур, как вентромедиальный гипоталамус и голубое пятно, вызывает поведенческие реакции характерные для стрессогенных условий. При этом достоверно увеличивается концентрация норадреналина и снижается уровень серотонина (Мамедов, 2002). При депрессиях отмечается нарушение также целого ряда высших (корковых) функций и функций базальных ганглиев.

В настоящее время общепринято, что ключевые патогенетические механизмы депрессии связаны с функциональным дефицитом серотонинергической системы и со сложной дисрегуляцией норадренергической

системы (Ressler et al., 2000). Кроме того, обе эти системы тесно взаимодействуют с дофамин-, ацетилхолин-, глутамат- и ГАМКергическими системами.

О снижении уровня функционирования серотонинергической системы при депрессии свидетельствуют данные (Ignacio et al., 2014):

- об уменьшении метаболизма серотонина (снижение концентрации 5-окси-индолуксусной кислоты в спинномозговой жидкости у больных в депрессивной фазе и ее некотором увеличении при клиническом улучшении);
- о появлении или обострении симптомов депрессии при недостатке в диете триптофана;
- о снижении плотности белков-транспортеров, осуществляющих обратный захват серотонина через пресинаптическую мембрану;

На участие норадренергической системы указывают (Ressler et al., 2000):

- терапевтическая эффективность ингибиторов обратного захвата норадреналина (мапротилин, миансерин);
- снижение концентрации метаболитов норадреналина в спинномозговой жидкости и моче больных.

Предполагается, что антидепрессанты оказывают свое терапевтическое влияние путем потенцирования синаптической передачи в норадренергических и серотонинергических синапсах. В связи с различиями эффективности терапии разными антидепрессантами допускается существование нескольких нейрхимических типов депрессий, связанных преимущественно с дефицитом серотонина; с избытком серотонина, но снижением чувствительности постсинаптических рецепторов; с истощением норадреналина и серотонина или с нарушением баланса этих нейротрансмиттеров (Levinstein et al., 2014).

В последние годы появились данные об участии в патогенезе депрессий регуляторных пептидов, в первую очередь кортикотропин релизинг-фактора (КРФ). Он синтезируется клетками гипоталамуса и вызывает выделение в кровь из передней доли гипофиза адренотропного гормона (АКТГ), который, в свою очередь, провоцирует выброс кортизола корой надпочечников. В норме кортизол тормозит функционирование гипоталамо-гипофизарной системы по механизму отрицательной обратной связи. При депрессии этот механизм нарушается, в

результате чего в крови большинства больных постоянно повышено содержание АКТГ и кортизола, причем концентрация последнего прямо коррелирует с тяжестью депрессии (Rotzinger et al., 2010).

Группой нейропептидов, связанных с развитием депрессий, являются эндорфины, о чем свидетельствуют изменение плотности опиоидных рецепторов в мозге депрессивных больных (Negadoren et al., 2009). Депрессивное расстройство сопровождается повышением порога болевой чувствительности (гипоалгезия) (Kundermann et al., 2009), с чем может быть связано возрастание риска суицида у депрессивных больных. Повышение порога болевой чувствительности обнаружено и в экспериментах на животных: при стресс-вызываемой депрессии (Avgustinovich et al., 2005) и у генетической модели депрессии – крыс линии Flinders Sensitive (Pucilowski et al., 1991).

На протяжении последних 10 лет в исследованиях депрессивных расстройств все большее внимание уделяется вовлеченности дофамина (Stein et al., 2008). По существующим данным две дофаминергические системы мозга (мезолимбическая и nigrostriарная) участвуют в патогенезе депрессии. Такой симптом, как психомоторная заторможенность, ассоциирован с двигательной функцией черной субстанции и основной части базальных ганглиев. Вторая из систем включает в себя вентральную область стриатума (прилежащее ядро, n. accumbens), которая связана с префронтальной корой, являющейся физиологическим субстратом оценки ситуации, а также выбора и запуска адекватной поведенческой программы. В n. accumbens дофамин играет ключевую роль в активации поведенческих программ, связанных с той или иной биологической потребностью, а также в развитии положительных эмоциональных состояний, обусловленных удовлетворением потребности, поощрением. По одной из теорий патогенеза депрессии человека индивидуум не испытывает должного удовольствия от того, что обычно вызывает чувство удовольствия, в том числе от нормальных социальных взаимодействий, именно из-за недостатка дофамина в мезолимбической системе мозга (Willner et al., 1995). Также депрессивные больные характеризуются предрасположенностью к формированию аддикций (Gillies et al., 2014).

В работах, посвященных исследованию нейробиологических основ депрессивных расстройств, показано, что такие симптомы, как ангедония, потеря мотивации, а также неспособность концентрироваться и принимать решения, могут быть связаны со сниженным ответом на положительное подкрепление. Существуют экспериментальные доказательства того, что значительное снижение или даже полное отсутствие ответов на позитивные раздражители связано с дисфункцией дофаминергической системы мозга (Martin-Soelch et al., 2009). Не исключено, что дофаминергическая система может стать мишенью для нового класса антидепрессантных препаратов.

Таким образом, не решенными и очень актуальными, остаются вопросы о вовлеченности дофаминергической системы мозга в патогенез депрессии и связанных с ней когнитивных нарушений, а также о коморбидности депрессивных расстройств с заболеваниями аутистического спектра.

3.8. Пептидные регуляторы и лечение заболеваний ЦНС

Как было сказано выше, традиционно для коррекции расстройств аутистического спектра применяются препараты таких групп, как нейролептики, антидепрессанты, транквилизаторы. При этом фармакотерапия эффективна всего в 25% случаев, а ее существенными недостатками оказываются генерализованное воздействие на ЦНС ребенка и побочные эффекты, ущерб от которых может превысить пользу.

Одним из решений существующей проблемы является внедрение в клиническую практику пептидных нейротропных препаратов. Перспективы их практического применения связаны с неинвазивным интраназальным способом введения, низкими эффективными дозами, высокой безопасностью и отсутствием побочных эффектов. Регуляторные пептиды уже успешно используются в отечественной клинической практике для лечения множества заболеваний – панкреатита, сахарного диабета, дистрофии сетчатки, бронхиальной астмы и т.д. Короткие пептиды обладают высокоспецифичным положительным влиянием на состояние и созревание ЦНС. Модифицированные аналоги природных пептидов обладают увеличенной устойчивостью к ферментативной деградации и улучшенным прохождением гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). В зарубежной

литературе также широко обсуждаются возможности по созданию лекарственных препаратов на основе нейропептидов (Goodwin et al., 2012; Craik et al., 2013).

Для коррекции моделируемых патологий мы использовали фрагмент адренкортикотропного гормона (лекарственный препарат семакс); опиоидный пептид материнского молока (бета-казоморфин-7); аналог фрагмента аргинин-вазопрессина (тетрапептид Ac-D-MPRG).

Семакс (АКТГ[4-7]PGP) обладает мощным ноотропным эффектом (Ашмарин, 1997), снижает тревожность и депрессивность (Виленский, 2007), положительно влияет на экспрессию нейтрофических факторов (BDNF) (Dolotov, 2006) и систему биогенных аминов (Eremin, 2005), снижает болевую чувствительность (Иванова, 2003), оказывает нейротрофическое модулирующее воздействие на развивающийся мозг (Себенцовас соавт., 2005).

Для бета-казоморфинов показано анксиолитическое и антидепрессантное действие, способность изменять характеристики материнско-детского взаимодействия. Особый интерес представляет их отставленное нейротропное действие (Дубынин с соавт., 2010). Можно с большой уверенностью предполагать способность опиоидных фрагментов молочных белков корректировать патологические состояния.

Ноотропное действие АВП и его аналогов на поведение было отмечено уже в ранних работах De Wied (1977), где была также продемонстрирована независимость этого эффекта от гормонального действия АВП. АВП принимает активное участие в регуляции эмоциональных реакций и обладает антидепрессантным действием (Wigger, 2004). Социальное поведение также зависит от содержания в головном мозге АВП (Young et al., 2004). Показано, что вазопрессинергическая система может участвовать в генезе различных заболеваний центральной нервной системы человека; развитие PAC связывают с полиморфизмом гена V1a-рецепторов (Kim, 2002). Введение в состав использованного нами пептида D-аминокислоты повышает стабильность, а также позволяет снизить эффективные дозы (Воскресенская с соавт., 2007).

4. Материалы и методы исследования

4.1. Экспериментальные животные

В работе были использованы беспородные белые крысы и их потомство, а также крысы линий Wistar и WAG/Rij и их потомство. Работа была выполнена на базе Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Регулируемая длительность светового дня: с 8:00 до 20:00 – свет включен. Взрослых животных содержали по 6-8 в одной клетке, детенышей – по одному выводку в клетке. День рождения крысят считался нулевым днем жизни. Мать отсаживали от крысят, когда они достигали возраста 35 дней; самцов и самок-сибсов распределяли по отдельным клеткам в возрасте 42 дней. Взрослые животные были старше 80 дней (средний вес в день первого эксперимента не менее 200 грамм). Эксперименты были проведены в соответствии с международными биоэтическими нормами (Директива Европейского Сообщества от 24 ноября 1986 г. – 86/609/ЕЕС).

Всего в работе было использовано 751 животное. В серии с адаптацией модели фетального вальпроатного синдрома (ФВС) было задействовано – 127 детенышей беспородных белых крыс обоих полов (13 выводков). В серии с изучением параметров зависимого от матери («детского») поведения крыс с ФВС – 82 детеныша беспородных белых крыс обоих полов (7 выводков). В серии с изучением корректирующего эффекта аналога АКТГ гептапептида семакс – 57 детенышей беспородных белых крыс обоих полов (6 выводков). В серии с изучением корректирующего эффекта гептапептида материнского молока бетаказоморфина-7 (БКМ-7) – 63 детеныша беспородных белых крыс обоих полов (5 выводков). В серии с изучением корректирующего эффекта модифицированного N-концевого аналога фрагмента аргинин-вазопрессина (тетрапептида Ac-D-MPRG) – 69 детенышей беспородных белых крыс обоих полов (8 выводков). В серии с изучением поведения крыс линии WAG/Rij в возрасте 1-2 месяцев – 140 крыс обоих полов (12 пометов). В серии с изучением параметров зависимого от матери (детского) поведения крыс линии WAG/Rij – 132 крысы обоих полов (15

выводков). В серии с изучением когнитивных особенностей крыс линии WAG/Rij – 34 взрослых самца. В серии с хроническим введением D2-антагониста клебоприда (экспериментальная модель депрессивноподобного состояния) – 47 взрослых самца беспородных белых крыс. Подробное описание экспериментальных серий приведено ниже.

4.2. Экспериментальные серии

Серия 1. Оценка специфики фетального вальпроатного синдрома у детенышей белых беспородных крыс

Для выработки у потомства фетального вальпроатного синдрома самкам на 12,5 день беременности вводили Na-соль вальпроевой кислоты (Sigma-Aldrich, США) в дозе 600 мг/кг. Сухой препарат соли вальпроевой кислоты растворяли в физиологическом растворе (1 мг/мл). Инъекцию проводили внутривентриально инсулиновым шприцем. Контрольной группе вводили эквивалентный объем растворителя (Rodier et al., 1996, 1997).

Потомство разделили на две группы:

- «опыт» - с пренатальным введением ВПК: 71 животное обоего пола (39 самок, 32 самца), 7 выводков.
- «интактный контроль»: 56 особей обоего пола (28 самок, 28 самцов), 6 выводков.

С потомством проводили ряд стандартизированных неврологических и поведенческих тестов, позволяющих оценить: развитие ЦНС, двигательную и ориентировочную активность, физическое развитие, тревожность и депрессивность, а также социальное поведение, способность к обучению и болевую чувствительность. Последовательность экспериментов представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательность экспериментальных процедур, использованных в серии 1 и некоторых других сериях.

День жизни	Экспериментальная процедура
6	Рефлекс переворота со спины на лапы («righting reflex»)
10	Детская двигательная активность («gait reflex»)
11	«Ольфакторная дискриминация»
12	«Отрицательный геотаксис»
12-16	Регистрация открытия глаз
16	Чувствительность к тактильной стимуляции
21	«Открытое поле со сменой освещенности» (ОП)
26	«Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)
29	«Социальное поведение с матерью»
36	«Социальное поведение с сибсом»
38	«Принудительное плавание»
42	«Горячая пластина»
48-50	Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)

Серия 2. Изучение параметров зависимо от матери (детского) поведения крыс с ФВС

Для оценки зависимо от матери («детского») поведения крысят было использовано 37 контрольных крыс (3 помета) и 45 крыс (4 помета) с фетальным вальпроатным синдромом в возрасте 10 и 15 дней.

В данной серии экспериментов использовали с небольшими модификациями метод оценки детского поведения, разработанный ранее (см. Таблицу 2). (Стоволосов, 2010).

Для оценки функционального состояния дофаминергической системы мозга у потомства контрольных животных и крыс с ФВС использовали антагонист D2-рецепторов клебоприд (Sigma-Aldrich, США). Препарат в дозе 0,1 мг/кг вводили детенышам в возрасте 15 дней внутривентриально за 20 мин до поведенческого тестирования.

Таблица 2. Последовательность экспериментальных процедур, использованная в сериях 2 и 7.

День жизни	Экспериментальная процедура
9	Детская двигательная активность («gait reflex»)
10	Детское поведение
14	«Малое открытое поле»
15	Детское поведение.

Серия 3. Оценка влияния гептапептида семакс на проявления фетального вальпроатного синдрома

В этом разделе работы было использовано 6 выводков крысят после пренатальной инъекции ВПК, причем каждый выводок был разделен на 2 половины:

- группа «семакс»: детеныши подвергались интраназальному (и/н) введению семакса в дозе 0,05 мг/кг (разведение семакса - 1 мг/мл) с 1-го по 14-й день жизни; 29 крыс обоего пола; препарат «семакс» произведен ООО «ИНПЦ Пептоген» (Россия);
- группа «плацебо»: получали и/н эквивалентный объем растворителя; 28 крыс обоего пола.

С потомством проводили последовательность поведенческих тестов, аналогичную серии 1 (представлена в Таблице 1).

Серия 4. Оценка влияния бета-казоморфина-7 на проявления фетального вальпроатного синдрома

В данной серии было использовано 3 выводка крысят после пренатальной инъекции ВПК; каждый выводок был разделен на 2 половины:

- группа «ВПК+ВКМ-7»: детеныши подвергались внутрибрюшинному (в/б) введению бета-казоморфина-7 в дозе 1 мг/кг (разведение пептида - 1 мг/мл) с 1-го по 14-й день жизни; 14 особей; гептапептид ВКМ-7 был синтезирован на химическом факультете СПбГУ в группе В.Н. Калихевича;
- группа «ВПК+Н₂О»: получали в/б эквивалентный объем растворителя, 16 особей.

Для исследования влияния ВКМ-7 на контрольных крыс было использовано 2 выводка крысят после пренатальной инъекции растворителя (H₂O), каждый выводок был разделен на 2 половины:

- группа «H₂O+ВКМ» – получали ВКМ-7 в/б в дозе 1 мг/кг с 1-го по 14-й день жизни; 17 особей.
- группа «H₂O+H₂O» – получали в/б эквивалентный объем растворителя с 1-го по 14-й день жизни; 16 особей.

С потомством проводили батарею поведенческих тестов, аналогичных серии 1 (представлена в Таблице 1).

Серия 5. Оценка влияния модифицированного С-концевого фрагмента аргинин-вазопрессина (Ac-D-MPRG) на проявления фетального вальпротного синдрома

В данной серии было использовано 4 выводка крысят после пренатальной инъекции ВПК; каждый выводок был разделен на 2 половины:

- группа «ВПК+Ac-D-MPRG»: детеныши с 1-го по 14-й день жизни получали и/н инъекции пептида в дозе 0,01 мг/кг (разведение пептида - 1 мг/мл); 15 особей; пептид Ac-D-MPRG был синтезирован в Институте биоорганической химии НАН Белоруссии в группе В.Н. Голубовича;
- группа «ВПК+H₂O»: детеныши с 1-го по 14-й день жизни получали и/н эквивалентный объем растворителя; 17 особей.

Также проводили исследование влияния аналога аргинин-вазопрессина на поведение контрольных крыс. Было использовано 4 выводка крысят после пренатальной инъекции растворителя (H₂O); каждый выводок был разделен на 2 половины:

- группа «H₂O+Ac-D-MPRG»: детеныши с 1-го по 14-й день жизни получали и/н инъекцию аналога аргинин-вазопрессина в дозе 0,01 мг/кг (разведение пептида - 1 мг/мл); 19 особей.
- группа «H₂O+H₂O»: детеныши с 1-го по 14-й день жизни получали и/н эквивалентный объем растворителя; 18 особей.

С потомством проводили батарею поведенческих тестов, аналогичных серии 1 (представлена в Таблице 1).

В сериях №1, 4 и 5 помимо поведенческого тестирования проводилось изучение морфологии головного мозга животных с применением методики магнитно-резонансной томографии (подробнее см. в разделе «Обсуждение результатов»).

Серия 6. Изучение поведения крыс линии WAG/Rij в возрасте 1-2 месяцев

В данной части работы было использовано 56 беспородных (контрольных) белых крыс (5 пометов) и 84 крысы линии WAG/Rij обоего пола (7 пометов).

Поведенческое тестирование было выполнено согласно плану, представленному в Таблице 1.

Серия 7. Изучение параметров зависимо от матери (детского) поведения крыс линии WAG/Rij

В данной серии экспериментов было использовано 58 детенышей беспородных крыс (6 выводков) и 74 детенышей крыс линии WAG/Rij обоего пола (9 выводков).

В данной серии также проводилась оценка функционального состояния дофаминергической системы мозга у потомства контрольных животных и крыс линии WAG/Rij. Для этого использовали антагонист D2-рецепторов клебоприд (Sigma-Aldrich, США). Препарат в дозе 0,1 мг/кг вводили детенышам в возрасте 15 дней в/б за 20 мин до поведенческого тестирования.

Поведенческое тестирование проводили согласно плану, представленному в Таблице 2.

Серия 8. Изучение когнитивных функций крыс линии WAG/Rij

Серия была направлена на оценку способности к формированию пищедобывательного навыка у крыс линии WAG/Rij в тесте «сложный лабиринт с переучиванием». Контрольная группа представлена 11 самцами крыс Wistar; опытная – 23 самцами линейных крыс WAG/Rij. Возраст животных составлял 5-6 месяцев, средний вес – 450 гр.

Таблица 3. Последовательность экспериментальных процедур, использованных в серии 8.

День эксперимента	Тест	Комментарий
1	ОП	
2	Адаптация к «сложному пищевому лабиринту» (СПЛ)	
3-14	СПЛ с переучиванием	До достижения критерия обученности
15	Novelty suppressed feeding (NSF)	
18	Принудительное плавание	
21	Горячая пластина	

Серия 9. Модель депрессивноподобного состояния с использованием хронического введения клебоприда в дозе 0,4 мг/кг

Данная серия была направлена на оценку депрессивноподобных изменений в поведении взрослых крыс Wistar после хронического введения на протяжении двух недель введения селективного антагониста D2-дофаминовых рецепторов клебоприда. Для оценки наличия у крыс такого признака депрессивноподобного расстройства, как ангедония, был проведен тест на потребление сахарозы. Контрольная группа представлена 24 самцами крыс Wistar; опытная – 23 самцами линейных крыс Wistar. Возраст животных составлял 3 месяца, средний вес – 270 гр.

4.3. Параметры установок и протоколы экспериментов.

В представленной диссертационной работе был использован ряд поведенческих методик. Более подробное описание «ранних» тестов (возраст 6-16 дней, см. Таблицу 1) представлено в работе Schneider, Przewłocki (2005); описание методики для оценки «детского» поведения – в работе Стоволосова с соавт. (2010); описание остальных поведенческих методов – в монографии Дубынина с соавт. (2010).

Тест «Righting reflex» (рефлекс переворота со спины на лапы, возраст 6 дней).

Крысенка переворачивали на спину, а затем отмечали время, когда он встанет на все 4 лапы.

Тест «Gait reflex» (детская двигательная активность, возраст 10 дней).

Крысенка помещали в центр круга ($d=15$ см), а затем отмечали время, когда он всеми 4-мя лапами пересечет границу круга.

Тест «Ольфакторная дискриминация» (возраст 11 дней).

Тестирование проводили в установке, представляющей собой пластиковый контейнер 25×8 см. На одном конце установки помещали опилки из домашней клетки, на противоположном конце – чистые опилки. В центр установки помещали крысенка и регистрировали время, за которое он доберется до опилок. Также отмечали выбор типа опилок («свои» опилки обозначались баллом 1, а «чужие» - 0) для оценки выраженности одной из форм социального поведения – «привязанности» к своему гнезду, своим сородичам (attachment behavior).

Тест «Отрицательный геотаксис» (возраст 12 дней).

Крысенка помещали вниз головой на наклонную поверхность (длина 25 см, угол наклона 20° , а затем 45°) и отмечали латентный период поворота и время, за которое он достигал конца поверхности. Данный тест позволяет оценить развитие вестибулярной системы, а также координацию движений и двигательную активность (Altman, 1975).

Тест «Чувствительность к тактильной стимуляции» (возраст 16 дней).

С помощью ватного тампона дотрагивались до уха крысенка, отмечали его реакцию: 0 – нет реакции, 1 – избегание стимуляции с помощью поворота головы, 2 – активное избегание стимуляции.

Тест «Открытое поле со сменой освещенности» (возраст 21 день).

Открытое поле (ОП) представляет собой круглую пластиковую арену диаметром 100 см с высокими стенками. Пол арены расчерчен двумя концентрическими окружностями, находящимися на равном расстоянии (20 см) друг от друга и от края арены, а также отрезками прямых, делящими поле на 19 приблизительно равных по площади областей (Рис. 2). Кроме того, на линиях и в центре арены расположены норки (13 штук).

В начале опыта крысу помещали в центр арены. Каждое животное тестировалось в течение 5 минут, из них первые 3 мин при ярком свете, затем 1 мин при красном свете и последняя 1 мин снова при ярком. Красная (15 Вт) и яркая (60Вт) лампы были подвешены на высоте 80 см от центра «поля»; при включении яркой лампы красная не выключалась.

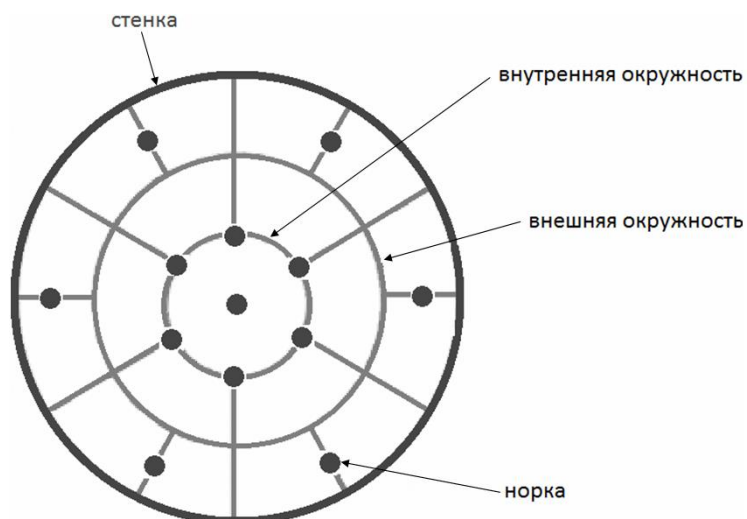


Рис. 2. Схема «открытого поля».

Во время опыта оценивали по минутам (в течение первой минуты – каждые 30 секунд) следующие показатели:

- горизонтальную активность (по числу пройденных областей-сегментов поля);
- вертикальную активность (число стоек), отдельно учитывали стойки в центре;
- число радиальных перемещений с пересечением внешней окружности (отходы от стенки арены);
- число радиальных перемещений с пересечением внутренней окружности (выходы в центр арены);
- число радиальных перемещений с пересечением обеих окружностей (переходы);
- груминг (умывания);
- число обследованных норок, отдельно учитывали норки в центре.

Также отмечали латентный период выхода из центра (когда животное доходило до стенки арены) и число дефекаций за время опыта.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ; возраст 26 дней).

ПКЛ представляет собой сделанный из пластика горизонтально лежащий равносторонний крест (длина лучей 50 см, ширина 15 см), два луча которого, расположенные друг напротив друга, имеют боковые и торцевые стенки высотой 30 см, а два других открыты (Рис. 3). Открытые лучи размечены: один отрезок отделяет светлый луч от центрального квадрата (внутренняя граница), второй делит длину луча пополам (наружная граница). Открытые лучи освещаются яркими лампами (60 Вт), находящимися на расстоянии 25-30 см от конца луча.

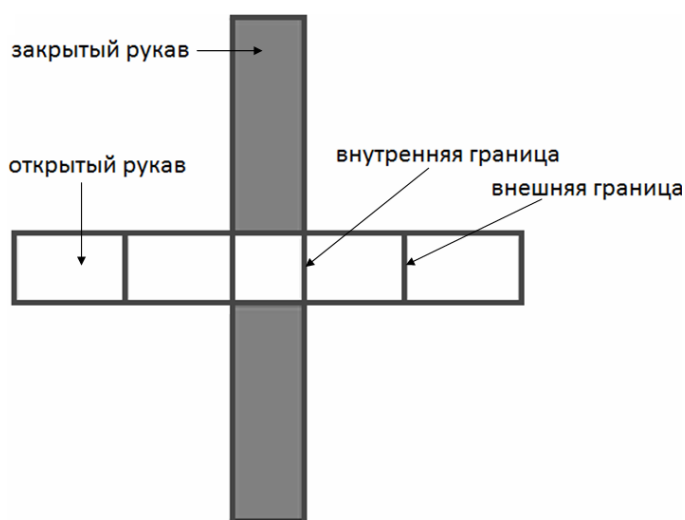


Рис. 3. Схема «приподнятого крестообразного лабиринта».

Животное в начале опыта помещали в центр ПКЛ носом в сторону света. Каждая крыса проводила в ПКЛ 3 минуты. Отмечали следующие параметры (за каждую минуту и суммарно за всё время тестирования):

- число стоек на свету и в темноте;
- число умываний;
- число выглядываний из темного отсека;
- число пересечений внутренней границы освещенного луча (выходы в 1-й отсек);

- число пересечений наружной границы освещенного луча (выходы во 2-й отсек);
- число свешиваний с края освещенного луча в первом и во втором отсеках;
- число переходов через центр «свет-свет»;
- число переходов через центр «темнота-темнота».

Также отмечали суммарное время, проведенное на свету, первый латентный период входа в темный отсек и число дефекаций за время опыта.

Тест «Социальное поведение с мамой» (возраст 29 дней).

Экспериментальная установка была собрана на основе Т-образного лабиринта, удаленные от центра части правого и левого отсеков которого отделили решетчатыми перегородками (отсеки Л и П). В отсеках Л и П животным обеспечивали доступ к поилкам с водой. Лабиринт был разделен на квадраты со стороной 14 см для оценки двигательной активности тестируемых животных. Высота стенок лабиринта – 30 см. Эксперименты проводили в условиях равномерного красного освещения. До начала эксперимента крысят поочередно переносили в специальную клетку – «отсадку», разделенную на изолированные отсеки. Каждый крысенок был изолирован от матери и остального выводка в течение 1 ч. до начала тестирования. Затем исследуемое животное помещали в стартовый (С) отсек лабиринта (Рис. 4) спиной к выходу из отсека. Регистрировали следующие показатели:

- латентный период выхода из стартового отсека;
- время подхода к отсекам Л и П;
- время контакта – время, проведенное исследуемым животным в квадрате рядом с отсеком (Л и П);
- количество подходов к отсекам;
- общее количество пересеченных квадратов;
- стойки (отдельно стойки в центральной части лабиринта и около отсеков Л и П);
- подъемы на решетчатые перегородки, отделяющие отсеки Л и П;
- обнюхивания – акты обнюхивания исследуемого животного с животными, находящимися за перегородками в отсеках Л и П;
- груминг;

- количество заходов в стартовый отсек.

За 10 минут до начала эксперимента за перегородки в отсеки Л и П помещали взрослых крыс (в отсек Л помещали мать, в отсек П – некормлящую самку), которые принимали участие в эксперименте.

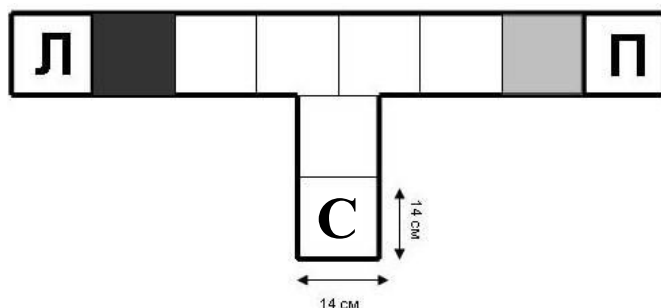


Рис. 4. Схема установки для исследования социального поведения.

Тест «Социальное поведение с сибсом» (возраст 36 дней).

Данный тест проводили по описанной выше схеме. Различие заключается в том, что в отсек Л помещали сибса, в отсек П – детеныша того же возраста, но из другого помета.

Тест «Принудительное плавание» (возраст 38 дней).

Использовали прозрачный пластиковый цилиндр высотой 39 см и диаметром 20 см, в который наливали воду температурой 23°C до уровня около 28 см. Крысу помещали в воду носом вверх. Каждое животное находилось в воде 5 минут, регистрировали суммарное время активного плавания, пассивного плавания и иммобилизации, а также латентный период и количество этих реакций.

Тест «Горячая пластина» (возраст 42 дня).

В тесте “горячая пластина” (UgoBasile, Италия) животное помещали на металлическую поверхность, разогретую до 53°C. Регистрировали латентный период поведенческой реакции на болевой раздражитель - время от момента посадки до первого облизывания задней лапы. Проводили 4 измерения болевой чувствительности с интервалом в 15 мин, при обработке данных определяли ЛП_{min}, ЛП_{max} и ЛП_{сред}.

Выработка условного рефлекса пассивного избегания болевого раздражителя (УРПИ; возраст 48-50 дней).

Установка представляет собой камеру 50×25×40 см, разделенную на две неравные части перегородкой с дверцей, которую можно приподнимать или опускать до пола. Одна половина камеры (длина 22 см) не имеет верхней крышки, вторая (бóльшая, длина 28 см) прикрыта темно-красной прозрачной крышкой. Пол в камере представляет собой металлическую решетку и подключен к электростимулятору ЭСЛ-1. Над открытой сверху половиной камеры установлена яркая лампа (60 Вт). Животное сажали в светлый отсек камеры носом в дальний от темной части угол; перегородка была поднята. В течение трех минут регистрировали поведение крысы: латентный период входа в темный отсек, время на свету, число заглядываний в темноту, заходов в темноту и выходов на свет, число грумингов, стоек и дефекаций. Поскольку крысы, как правило, предпочитают не находиться на свету, к концу первых трех минут практически все животные находились в темном отсеке. Убедившись в этом, экспериментатор опускал дверцу и включал ток (50 Гц, длительность одиночного импульса 10 мс) напряжением 80-100 В (в зависимости от появления вокализации) на 5 секунд, после чего животное вынимали из камеры. Через 48 часов после электрической стимуляции крысу повторно помещали в камеру и регистрировали ЛП захода в темный отсек. По изменению данного параметра относительно первой посадки судили об обучаемости крыс.

«Детское» поведение.

В сериях №2 и 7 изучение зависимость от матери (детского) поведения проводили по следующей методике. Исследование ориентированного на мать поведения проводили на 10-й и 15-й дни жизни крысят. Использовали квадратную арену размером 60×60 см. В центр площадки помещали самку, наркотизированную с помощью ветеринарного наркоза (смесь препаратов «золетил» и «ксилазин» в соотношении 1:5 в объеме 70 мкл смеси на 100 г массы тела крысы). Исследование поведения детенышей проводили при красном свете. До начала эксперимента крысят, принадлежащих к одному выводку, поочередно переносили в специальную клетку – «отсадку», разделенную на изолированные отсеки. В «отсадке» поддерживалась температура, соответствующая температуре «гнезда» (около 28°C). Каждый крысенок был изолирован от матери и остального выводка в течение 1 ч. до начала тестирования. Самке вводили наркоз и помещали ее в центр

арены. После этого детеныша 3 раза помещали на 1 мин к спине лежащей на боку самки на равном расстоянии от ее хвоста и головы и регистрировали: латентный период (ЛП) полуобхода (доползания до уха или хвоста) самки; ЛП присасывания к соску самки; груминг, число подталкиваний самки детенышем, клайминг (число попыток влезания на тело матери). Если влезание завершалось успехом, то детеныш мог некоторое время находиться сверху на теле матери («длительность контакта с матерью»).

Также в сериях с детским поведением использовали фармакологический тест с использованием препарата клебоприд в дозе 0,1 мг/кг. Как было показано ранее, в такой дозе клебоприд не влияет на уровень общей двигательной активности животных, но способен изменять их «детские» реакции (Стоволосов, 2010). Зависимое от матери поведение крысят на 15-й день жизни тестировали дважды: до инъекции клебоприда и через 20 мин после введения препарата (в контроле – растворителя). Для того чтобы определить, не связано ли изменение детского поведения у детенышей крыс, вызываемое клебопридом, с изменением общей двигательной активности, использовали дополнительные тесты – «детская двигательная активность» («*Gait reflex*»; описан ранее) и «малое открытое поле».

Тест «Малое открытое поле».

Малый вариант арены «Открытого поля» представляет собой деревянную арену без норок диаметром 40 см с высотой стенок 25 см и одной внутренней окружностью диаметром 20 см. Пол расчерчен на 28 секторов. Тестирование проводили 2 мин при красном свете. Регистрировали пробег (число пересеченных секторов), число стоек и число актов груминга.

Эти два теста позволяют оценить двигательную активность крысят и, тем самым, отделить ее от мотивации находится в контакте с матерью.

Тест на пищевую мотивацию («novelty suppressed feeding», NSF).

Тест NSF направлен на оценку баланса уровня тревожности и пищевой мотивации животных (Bessa et al., 2009). Перед тестированием животных подвергали 24-часовой пищевой депривации, после чего помещали на 10 мин в новую, незнакомую обстановку (модификация арены ОП, не использованная ранее), где находилась 1 гранула корма. После того, как крыса находила корм, лежащий в центре арены, ее возвращали в домашнюю клетку, в которой было

заранее взвешенное количество корма. Измеряли латентный период нахождения пищевого подкрепления в ОП и количество корма в граммах, съеденное в домашней клетке непосредственно после тестирования в течение 10 минут.

Выработка пищедобывательного навыка в «Сложном пищевом лабиринте» (СПЛ).

Выработку условного рефлекса с положительным подкреплением проводили в «сложном пищевом лабиринте». СПЛ представляет собой квадратную камеру (размер 60×60×25 см), разделенную пятью прозрачными перегородками на 6 равных по ширине коридоров. В каждой перегородке имеется небольшое прямоугольное отверстие. Перед экспериментом животных подвергали 24-часовой пищевой депривации. Затем проводилась адаптация крыс к условиям опыта. При этом их на 15 минут помещали в лабиринт с равномерно разбросанными по отсекам сахарозными таблетками с целью угашения ориентировочно-исследовательской реакции и снижения тревожности, а также формирования первичной ассоциации между условиями эксперимента и получением пищевого подкрепления. В последующие дни животное помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно, длительность каждой посадки не превышала 3-х минут. В качестве подкрепления использовались те же стандартные сахарозные таблетки (45 mg sugar dustless precision pellets, BioServ, Frenchtown, NJ, USA). После достижения критерия обученности, который составлял не менее 4-х реакций из 5-ти посадок в день в течение 2-х дней подряд, крыс переучивали (reverse learning task) в условиях зеркально перевернутых перегородок с отверстиями вплоть до достижения того же критерия обученности (максимальная длительность эксперимента – 12 дней). В процессе обучения крысу переносили в стартовый отсек (ближайший к экспериментатору коридор), после чего регистрировали время реакции (латентный период взятия подкрепления); число выполненных реакций (число случаев, когда животное находило подкрепление в течение 3-х минут пребывания в лабиринте); количество ошибок (число отклонений от оптимальной траектории движения, когда крыса после прохода очередного отверстия в перегородке сворачивает в "неверную" сторону). Также регистрировалось количество стоек и актов груминга. В дни опыта животных кормили один раз в сутки непосредственно после эксперимента. Сочетание обучения и переучивания в СПЛ позволяет оценить

свойства памяти, ассоциированные с функцией гиппокампа и префронтальной коры, соответственно.

Тест на потребление сахарозы.

Крысу помещали на 15 мин в экспериментальную камеру, где регистрировали количество выпитой жидкости (20% раствор сахарозы) и число подходов к поилке (косвенный показатель мотивации). Потребление сахарозы определяли как разницу в массе (в граммах) бутылки до и после теста. Животных не подвергали специальной процедуре пищевой или питьевой депривации.

Статистическая обработка данных

Полученные результаты обрабатывали на компьютере с помощью пакета статистических программ «Statistica V8.0» (Statsoft, США) и «MS Office Excel 2013» (Microsoft, США). Вычисляли средние арифметические (AM) и стандартные ошибки средних (SEM) массивов данных. Для определения нормальности применялись критерии Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова, а также проводилась проверка равенства дисперсий. Статистическая обработка проводилась с использованием параметрических методов анализа (t-критерий Стьюдента для независимых и зависимых выборок), непараметрических методов (критерии Манна-Уитни, χ^2 , Фишера), а также дисперсионного анализа (ANOVA).

5. Результаты

5.1. Оценка поведения белых крыс в модели фетального вальпроатного синдрома

В первой серии экспериментов была адаптирована модель мозговой дисфункции, вызванная пренатальным воздействием высокой дозы вальпроевой кислоты (ВПК). Была поставлена задача исследовать, какого вида нарушения развиваются у потомства. В первую очередь были проведены «ранние» тесты, направленные на оценку неврологического развития и поведения детенышей.

По результатам теста «рефлекс переворота со спины на лапы» у крыс, подвергнутых пренатальному воздействию ВПК (опытная группа), увеличено время реакции по сравнению с контрольной: в опытной группе время переворота составило $2,4 \pm 0,2$ секунд, в контрольной – $1,8 \pm 0,2$ секунд ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента; в качестве разброса здесь и далее приводится SEM). По результатам тестов «детская двигательная активность» и «отрицательный геотаксис» значимых различий между интактными детенышами и детенышами опытной группы не наблюдалось. В контрольной группе на 16-й день постнатального развития 100% крысят (56 из 56) открыли оба глаза, тогда как среди детенышей, подвергнутых воздействию ВПК, только 77% (55 из 71) открыли оба глаза ($p < 0,01$ по критерию хи-квадрат). В тесте «тактильная стимуляция» отсутствие ответа на тактильный раздражитель было зарегистрировано у 37 крысят из опытной группы, тогда как в контроле таких было всего 18 особей ($p < 0,01$ по критерию хи-квадрат).

По результатам «ранних» тестов можно заключить, что инъекция высокой дозы ВПК вызывает заметные нарушения психомоторного развития у потомства: более позднее открытие глаз, пониженную реактивность к тактильным стимулам, ухудшение рефлекса переворота со спины на лапы, но не затрагивает развитие более сложных моторных навыков.

В дальнейшем проводилась оценка ряда показателей функционирования нервной системы в стандартных и оригинальных поведенческих методиках. Для оценки ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) использовали тесты «открытое поле со сменой освещенности» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Результаты теста «открытое поле со сменной освещенности»

показывают, что ВПК-крысы вели себя менее активно по сравнению с интактными детенышами, в частности у них значимо снижено число стоек на 2-й, 3-й, 4-й минутах, а также их суммарное количество за 5 минут наблюдений (рис. 5; здесь и далее рисунки приведены в конце подраздела). Также в опытной группе было снижено число актов груминга суммарно за 5 минут наблюдений: величина параметра в опыте составила $2,7 \pm 0,2$, в контроле – $7,4 \pm 0,9$ ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). По результатам теста «приподнятый крестообразный лабиринт» также можно заключить, что детеныши опытной группы вели себя менее активно. У опытной группы по сравнению с контролем был значимо снижен ряд показателей «поведения риска», среди которых количество выходов в начало открытых рукавов, суммарное количество стоек в открытых и закрытых рукавах, количество свешиваний с открытых частей лабиринта, количество выглядываний из закрытых рукавов и число переходов между рукавами (табл. 4). По результатам тестов «открытое поле со сменной освещенности» и «приподнятый крестообразный лабиринт» можно заключить, что у детенышей с фетальным вальпроатным синдромом баланс между ориентировочно-исследовательской активностью и тревожностью смещен в сторону последней. Результаты по снижению числа актов груминга также указывают на измененную эмоциональную напряженность. В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что пренатальное воздействие вальпроевой кислоты влечет за собой функциональные изменения в отделах головного мозга, связанных с мотивационно-эмоциональной сферой (прежде всего в лимбической системе).

Исследование зоосоциального взаимодействия проводилось по оригинальной методике, позволяющей оценить такой параметр, как стремление к социальной новизне. Данный параметр определяется как общее время, проведенное рядом с чужой крысой, деленное на общее время, проведенное с матерью или сибсом (Nam et al., 2014).

В ситуации выбора между некормящей самкой и матерью опытные крысята не проявляли большого интереса к новому для них социальному объекту. У них достоверно снижен целый ряд показателей активности в отсеке рядом с чужой самкой и повышен рядом с матерью. Наиболее значимые различия по временам контакта представлены на рисунке 6. Также в группе опытных животных значимо

снижено количество стоек в отсеке с чужой самкой (опыт – $3,0 \pm 0,3$, контроль – $5,6 \pm 0,6$, $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента); снижено число подходов (опыт – $2,4 \pm 0,1$, контроль – $3,1 \pm 0,1$, $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента); снижено число актов груминга (опыт – $0,7 \pm 0,1$, контроль – $3,0 \pm 0,6$, $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента).

В ситуации выбора сибс-чужак значимых отличий между опытной и контрольной группами не наблюдалось. Значение параметра социальная новизна среди ВПК-крыс понижено, но не достигает уровня достоверности ($p = 0,09$ по t-критерию Стьюдента).

Уменьшение параметра социальной новизны в группе детенышей, подвергнутых воздействию высокой дозы вальпроевой кислоты в пренатальный период, свидетельствует о том, что данная мозговая дисфункция сходна с расстройствами аутистического спектра. Измененное в условиях Т-камеры поведение также может косвенно свидетельствовать о слабой устойчивости к стрессогенным факторам (новая обстановка) и повышению уровня тревожности среди ВПК-крыс.

В возрасте 38 дней был проведен тест «принудительное плавание», результаты для детенышей контрольной и опытной групп представлены в таблице 5. Заметно, что животные, подвергнутые пренатальному воздействию нейротоксической дозы ВПК, вели себя менее активно. У опытной группы по сравнению с контрольной суммарная длительность активного плавания снижена на 22%, тогда как суммарное время иммобилизации увеличено на 19% ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). Также среди крыс опытной группы достоверно увеличен латентный период 1-го эпизода активного плавания и его длительность. Подобные поведенческие изменения свидетельствуют о повышении уровня депрессивности под воздействием ВПК.

Оценка болевой чувствительности животных проводилась в тесте «горячая пластина». У крыс, подвергнутых пренатальному воздействию ВПК, средний латентный период (ЛП) рефлекса облизывания задней лапы увеличен относительно контрольной группы на 20% ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). При этом достоверно повышены ЛП при 1-ом и 2-ом измерениях, а также максимальный из 4-х измерений латентный период. Данные представлены в таблице 6.

Полученные результаты свидетельствует о том, что вальпроевая кислота вызывает изменение болевой чувствительности в виде гипоальгезии.

Для оценки способности к обучению проводилась выработка условной реакции пассивного избегания болевого раздражителя. Латентные периоды захода в темный отсек в день обучения в группах достоверно различались: в опытной группе ЛП составил $28,9 \pm 3,36$ с, а в контроле – $19,8 \pm 1,9$ с ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). При этом в день проверки различий между ЛП не было: в опытной группе ЛП составил $146,0 \pm 9,6$ с, а в контроле – $133,7 \pm 11,8$ с. Полученные результаты свидетельствуют о базовом повышении уровня тревожности и отсутствии изменений в способности к обучению с отрицательным подкреплением у ВПК-крыс.

Подводя итог 1-ой серии экспериментов, отметим, что, в целом, полученные результаты подтвердили способность высокой дозы ВПК вызывать развитие фетального вальпроатного синдрома у потомства. У детенышей крыс выявлены некоторые нарушения психомоторного развития. Также наблюдается снижение ориентировочно-исследовательской активности и рост уровня тревожности, изменения в зоосоциальном взаимодействии, повышение уровня депрессивности и изменение болевой чувствительности. Изменения данных параметров поведения могут свидетельствовать о нарушении в работе таких отделов мозга, как средний мозг, мозжечок, задний мозг, таламус и лимбическая система, а также об изменениях в ряде нейромедиаторных систем (см. также раздел «Обсуждение результатов»). Наблюдаемый комплекс поведенческих изменений подтверждает состоятельность гипотезы о том, что фетальный вальпроатный синдром является экспериментальной моделью расстройств аутистического спектра.

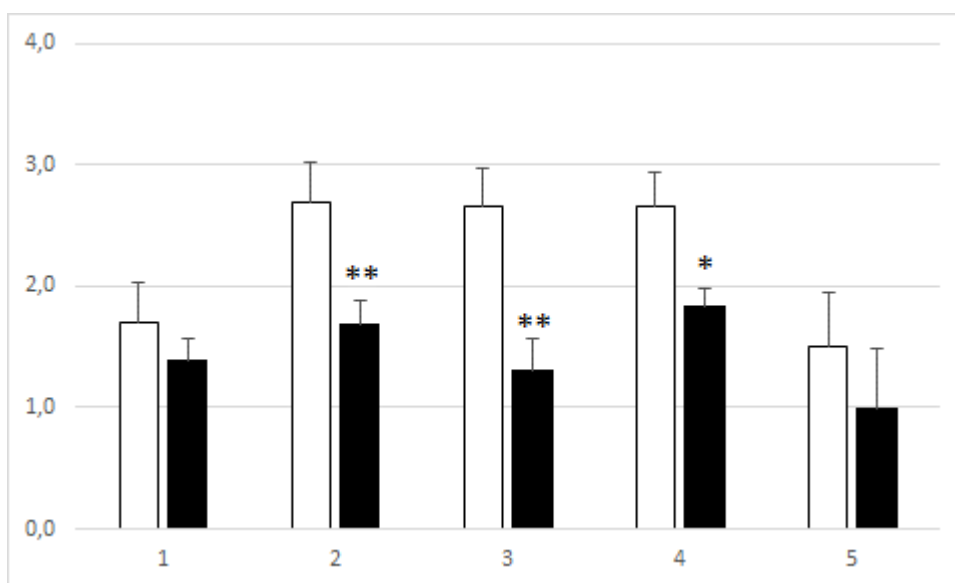


Рис. 5. Вертикальная двигательная активность в тесте «открытое поле со сменной освещенности» после пренатальной инъекции ВПК. По оси абсцисс – минуты. По оси ординат – количество стоек. Возраст 21 день.

Условные обозначения: белый цвет – контрольная группы (n=56), черный цвет – опытная группа (n=71). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 4. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» после пренатальной инъекции ВПК. Возраст 26 дней.

Условные обозначения: К – контрольная группа (белые беспородные крысы), О – опытная группа (белые беспородные крысы, подвергнутые воздействию ВПК в пренатальный период). АМ – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента.

Параметр	К (n=56), АМ±SEM	О (n=71), АМ±SEM	P, Стьюдент
Латентный период, с	7,4 ± 2,5	16,7 ± 4,4	0,09
Время нахождения в закрытых рукавах, с	134,2 ± 3,9	138,8 ± 5,2	0,50
Время в центре, с	12,6 ± 1,2	10,6 ± 1,1	0,23
Время нахождения в открытых рукавах, с	32,6 ± 3,4	30,1 ± 5,1	0,70
Выходы в центр	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,08
Выходы в начало открытого рукава	2,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,0002**
Выходы в конец открытого рукава	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,11
Стойки в закрытых рукавах	7,5 ± 0,6	5,5 ± 0,4	0,01*
Стойки в открытых рукавах	0,1 ± 0,01	0,014 ± 0,01	0,31
Стойки в центре	0,1 ± 0,01	0,015 ± 0,01	0,06
Стойки суммарные	7,6 ± 0,6	5,5 ± 0,4	0,004**
Акты груминга	5,1 ± 0,4	3,8 ± 0,3	0,01*
Свешивания из центра	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,26
Свешивания с открытых рукавов	3,7 ± 0,4	2,4 ± 0,4	0,02*
Свешивания суммарные	4,5 ± 0,5	3,0 ± 0,4	0,01*
Выглядывания из закрытых рукавов	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,01*
Переходы из закрытого в закрытый отсек	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,0001**
Переходы из открытого в открытой отсек	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,05	0,001*

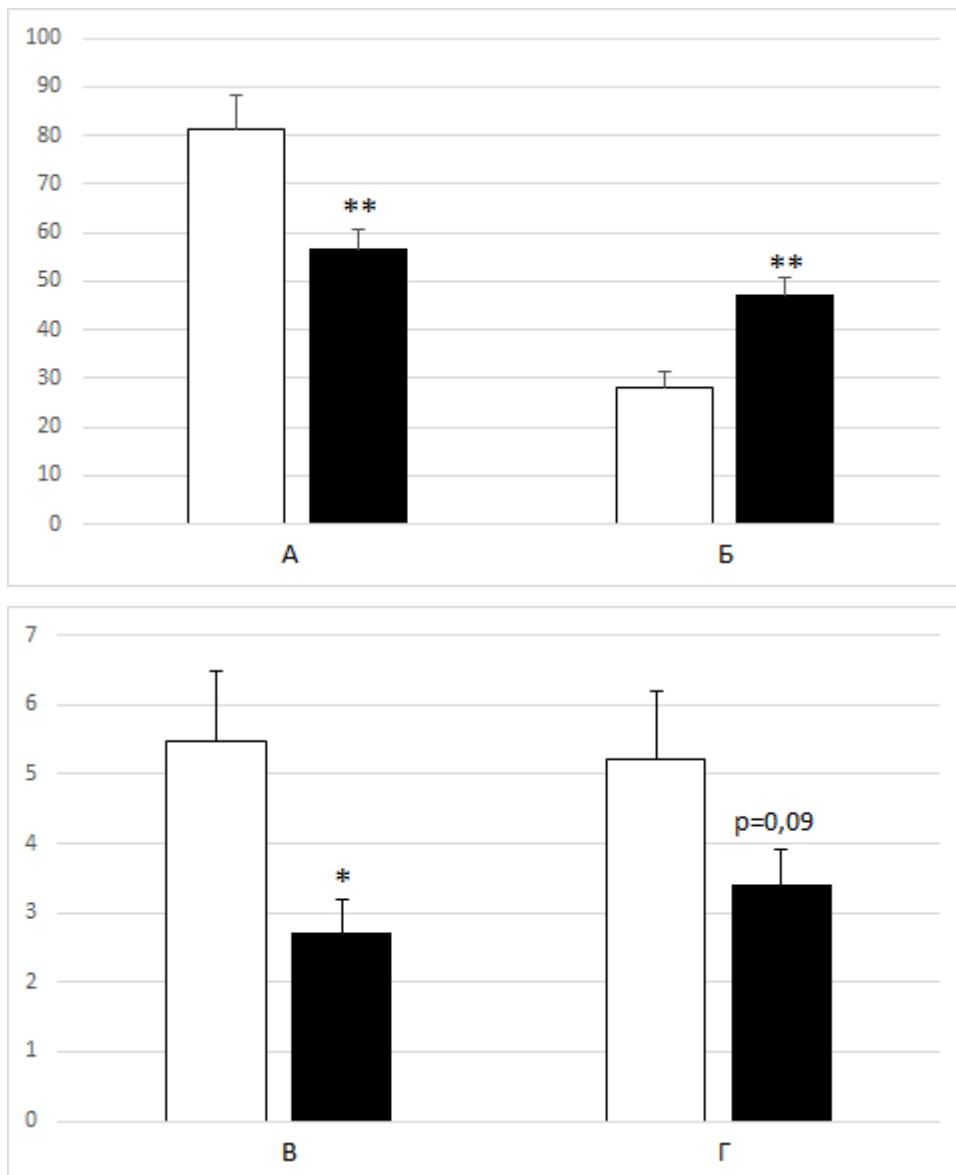


Рис. 6. Параметры зоосоциального взаимодействия в тестах «социальное поведение с мамой» и «социальное поведение с сибсом» после пренатальной инъекции ВПК. А – время в отсеке рядом с чужой самкой; Б – время в отсеке рядом с матерью; В – социальная новизна в тесте «социальное поведение с матерью»; Г – социальная новизна в тесте «социальное поведение с сибсом». По оси ординат: А и Б – время, с.; В и Г – усл. ед. Возраст 29 и 36 дней.

Условные обозначения: белый цвет – контрольная группы (n=56), черный цвет – опытная группа (n=71). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 5. Результаты теста «Принудительное плавание» после пренатальной инъекции ВПК.

Условные обозначения как в таблице 4. Возраст 38 дней.

Параметр	К (n=56), AM±SEM	О (n=71), AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период 1го эпизода активного плавания, с	2,6 ± 0,6	25,7 ± 7,4	0,01*
Длительность 1го эпизода активного плавания, с	79,4 ± 4,2	55,5 ± 3,7	0,004**
Суммарная длительность активного плавания, с	135,0 ± 4,3	104,9 ± 5,6	0,000009**
Латентный период иммобилизации, с	94,8 ± 5,7	97,1 ± 7,7	0,82
Суммарное время иммобилизации, с	97,7 ± 4,9	122,2 ± 6,9	0,01*
Время пассивного плавания, с	67,1 ± 5,3	72,9 ± 6,2	0,5

Таблица 6. Результаты теста «Горячая пластина» после пренатальной инъекции ВПК. Измерения в с.

Параметр, сек	К (n=56), AM±SEM	О (n=71), AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период при 1м измерении	9,1 ± 0,8	13,5 ± 0,9	0,001**
Латентный период при 2м измерении	9,5 ± 0,7	12,4 ± 0,9	0,02*
Латентный период при 3м измерении	9,2 ± 0,9	10,8 ± 0,9	0,21
Латентный период при 4м измерении	9,1 ± 0,8	9,4 ± 0,7	0,73
Средний латентный период рефлекса облизывания лапы	9,2 ± 0,7	11,5 ± 0,8	0,03*
Минимальный латентный период рефлекса	6,7 ± 0,6	7,7 ± 0,6	0,25
Максимальный латентный период рефлекса	12,4 ± 0,8	15,5 ± 0,9	0,02*

Условные обозначения как в таблице 4. Возраст 42 дня.

5.2. Изучение зависимого от матери («детского») поведения детенышей крыс на модели фетального вальпроатного синдрома

Оценка параметров зависимых от матери реакций проводилась по оригинальной экспресс-методике, позволяющий оценить свободное поведение крысят и их активность по отношению к самке на 10 и 15 дне жизни (Столосов с соавт., 2010).

По результатам тестов «gait reflex» и «малое открытое поле» можно заключить, что базовый уровень двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у крысят опытной и контрольной групп не различался. Это позволяет нам предположить, что различия групп при тестировании на арене с наркотизированной самкой характеризуют только выраженность детской мотивации.

При оценке зависимого от матери поведения на 10-й день постнатального развития нами не было обнаружено значимых различий между крысятами опытной и контрольной групп. Эти различия стали достоверными при тестировании на 15-й день (таблица 7 и рисунок 7). В группе ВПК-крыс средний из 3-х попыток латентный период полуобхода тела матери снижен на 40%, ЛП присасывания к соску матери – на 43%, средний ЛП перелезания тела матери снижен на 47%, суммарное по 3-м попыткам время пассивного контакта с матерью (ситуация, в которой крысенок сидит сверху на матери) – на 67,5%.

До нашей работы оценка зависимого от матери поведения на модели фетального вальпроатного синдрома не проводилась и не была описана в литературе. Тем не менее очевидно, что стремление находиться в контакте с матерью в постнатальном периоде является важной характеристикой состояния нервной системы детеныша, и его нарушение может свидетельствовать о раннем развитии патологических процессов в ЦНС. Нами показано, что у крысят с фетальным вальпроатным синдромом на 15-й день жизни происходит чрезмерное повышение привязанности к матери. Полученные результаты так же, как данные о снижении стремления к социальной новизне, указывают на изменения в зоосоциальном взаимодействии крыс после пренатального воздействия ВПК.

Известно, что одной из основных систем подкрепления, формирующих детское поведение, является дофаминергическая система. Для оценки ее вклада на

модели фетального вальпроатного синдрома было проведено тестирование детского поведения после острой инъекции блокатора D2-рецепторов клебоприда в дозе 0,1 мг/кг.

При оценке параметров детского поведения контрольных крыс отмечается ослабление детских реакций животных, получавших клебоприд. После инъекции блокатора у крысят повышаются латентные периоды полуобхода тела матери и присасывания к соску. Средний ЛП полубхода у них оказался увеличен на 39%, а ЛП присасывания к соску – на 16% ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента, таблица 8).

При проведении аналогичного сравнения между ВПК-крысами, половина из которых получала растворитель, а половина – клебоприд, значимых различий обнаружить не удалось. Таким образом, введение клебоприда не оказало влияния на детенышей, подвергнутых пренатальному воздействию ВПК.

Из сказанного выше ясно, что введение клебоприда снизило детскую мотивацию контрольных животных, но не повлияло на ВПК-крыс, увеличив тем самым разницу между ними, которая существовала изначально, еще сильнее. Для того, чтобы продемонстрировать это более наглядно мы провели анализ дельт, т.е. разницы поведенческих показателей в зависимых выборках «до-после» введения блокатора (таким образом, отрицательное значение дельты соответствует увеличению показателя после введения вещества). Полученные в контрольной и опытной группах дельты сравнивались между собой. Подобный анализ показывает, что сильнее всего под влиянием клебоприда изменился средний ЛП полуобхода тела матери (см. рис. 8). Также отсутствие воздействия клебоприда на ВПК-крыс хорошо иллюстрирует тот факт, что дельта по показателю средний ЛП присасывания к соску у ВПК-крыс, получавших клебоприд, была положительной и составила 2,5, а у контрольных крыс, получавших клебоприд, отрицательной и составила -1,7 ($p = 0,09$ по t-критерию Стьюдента).

Таблица 7. Результаты теста «Детско-материнское взаимодействие» после пренатальной инъекции ВПК на 15-й день жизни крысят.

Условные обозначения: К – контрольная группа (белые беспородные крысы), ВПК – опытная группа (белые беспородные крысы, подвергнутые воздействию ВПК в пренатальный период). АМ – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента.

Параметр	К (n=37), АМ±SEM	ВПК (n=45), АМ±SEM	P (Стьюдент)
ЛП полуобхода 1, с	30,2 ± 3,4	21,0 ± 3,1	0,046*
ЛП полуобхода 2, с	40,4 ± 3,8	22,0 ± 3,3	0,001**
ЛП полуобхода 3, с	37,1 ± 3,9	22,2 ± 3,5	0,006**
Средний ЛП полуобхода, с	35,9 ± 2,3	21,7 ± 2,7	$p < 0,01$ **
ЛП присасывания 1, с	58,6 ± 0,8	33,1 ± 4,6	$p < 0,01$ **
ЛП присасывания 2, с	58,9 ± 0,7	32,4 ± 4,6	$p < 0,01$ **
ЛП присасывания 3, с	55,7 ± 1,8	32,2 ± 4,5	$p < 0,01$ **
Средний ЛП присасывания, с	57,7 ± 0,7	32,6 ± 4,4	$p < 0,01$ **
ЛП перелезания 1, с	58,0 ± 1,4	30,7 ± 4,7	$p < 0,01$ **
ЛП перелезания 2, с	58,5 ± 1,1	31,0 ± 4,6	$p < 0,01$ **
ЛП перелезания 3, с	57,9 ± 1,4	31,3 ± 4,6	$p < 0,01$ **
Средний ЛП перелезания, с	58,2 ± 0,8	31,0 ± 4,6	$p < 0,01$ **
Время контакта 1, с	4,5 ± 1,4	1,0 ± 0,6	0,025*
Время контакта 2, с	9,2 ± 2,5	1,9 ± 1,4	0,01*
Время контакта 3, с	9,4 ± 2,4	4,5 ± 1,9	0,11
Время контакта суммарное, с	23,1 ± 4,6	7,5 ± 3,4	0,01*
Время отхода суммарное, с	11,0 ± 3,2	17,4 ± 3,7	0,20
Суммарные подталкивания	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,50

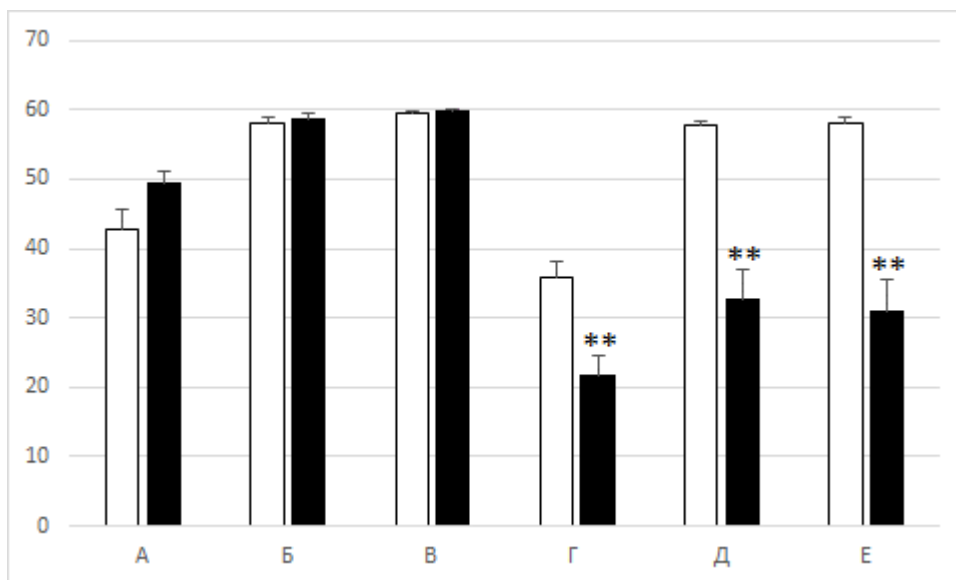


Рис. 7. Параметры зоосоциального взаимодействия в тестах «детское поведение» на 10 и 15 дни жизни крысят после пренатальной инъекции ВПК. А, Б, В – ЛП полуобхода, присасывания и перелезания на 10-й день; Г, Д, Е – ЛП полуобхода, присасывания и перелезания на 15-й день. По оси ординат: время, с.

Условные обозначения: белый цвет – контрольная группы (n=37), черный цвет – опытная группа (n=45). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 8. Результаты теста «Детско-материнское взаимодействие» на 15-й день жизни крысят при введении блокатора D2-рецепторов клебоприда в дозе 0,1 мг/кг.

Условные обозначения: К-Н2О – контрольная подгруппа, получавшая инъекции растворителя; К-клеб – контрольная подгруппа, получавшая инъекции клебоприда; ВПК-Н2О – опытная подгруппа, получавшая инъекции растворителя; ВПК-клеб – опытная подгруппа, получавшая инъекции клебоприда АМ – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента.

Параметр	К-Н2О (n=19), АМ±SEM	К-клеб (n=18), АМ±SEM	P (Стьюдент)
ЛП полуобхода 1,с	24,7 ± 5,3	46,5 ± 5,1	0,005**
ЛП полуобхода 2, с	36,5 ± 5,34	55,7 ± 3,1	0,004**
ЛП полуобхода 3, с	37,2 ± 5,3	58,7 ± 1,3	0,001**
Средний ЛП полуобхода, с	32,8 ± 3,8	53,6 ± 2,1	0,001**
ЛП присасывания 1, с	50,7 ± 3,4	56,6 ± 2,1	0,16
ЛП присасывания 2, с	49,7 ± 3,4	60,0 ± 0,0	0,006**
ЛП присасывания 3, с	48,4 ± 3,3	60,0 ± 0,0	0,002**
Средний ЛП присасывания, с	49,6 ± 2,7	58,9 ± 0,7	0,003**
Параметр	ВПК-Н2О (n=22), АМ±SEM	ВПК-клеб (n=19), АМ±SEM	P (Стьюдент)
ЛП полуобхода 1,с	12,0 ± 3,1	16,7 ± 5,3	0,44
ЛП полуобхода 2, с	25,1 ± 5,2	33,0 ± 6,1	0,33
ЛП полуобхода 3, с	21,3 ± 4,7	28,0 ± 6,8	0,42
Средний ЛП полуобхода, с	19,5 ± 2,9	25,9 ± 5,1	0,27
ЛП присасывания 1, с	33,7 ± 5,9	26,4 ± 5,2	0,57
ЛП присасывания 2, с	36,6 ± 5,8	27,5 ± 4,6	0,37
ЛП присасывания 3, с	31,0 ± 5,9	28,3 ± 3,3	0,78
Средний ЛП присасывания, с	33,8 ± 5,7	27,4 ± 4,3	0,56

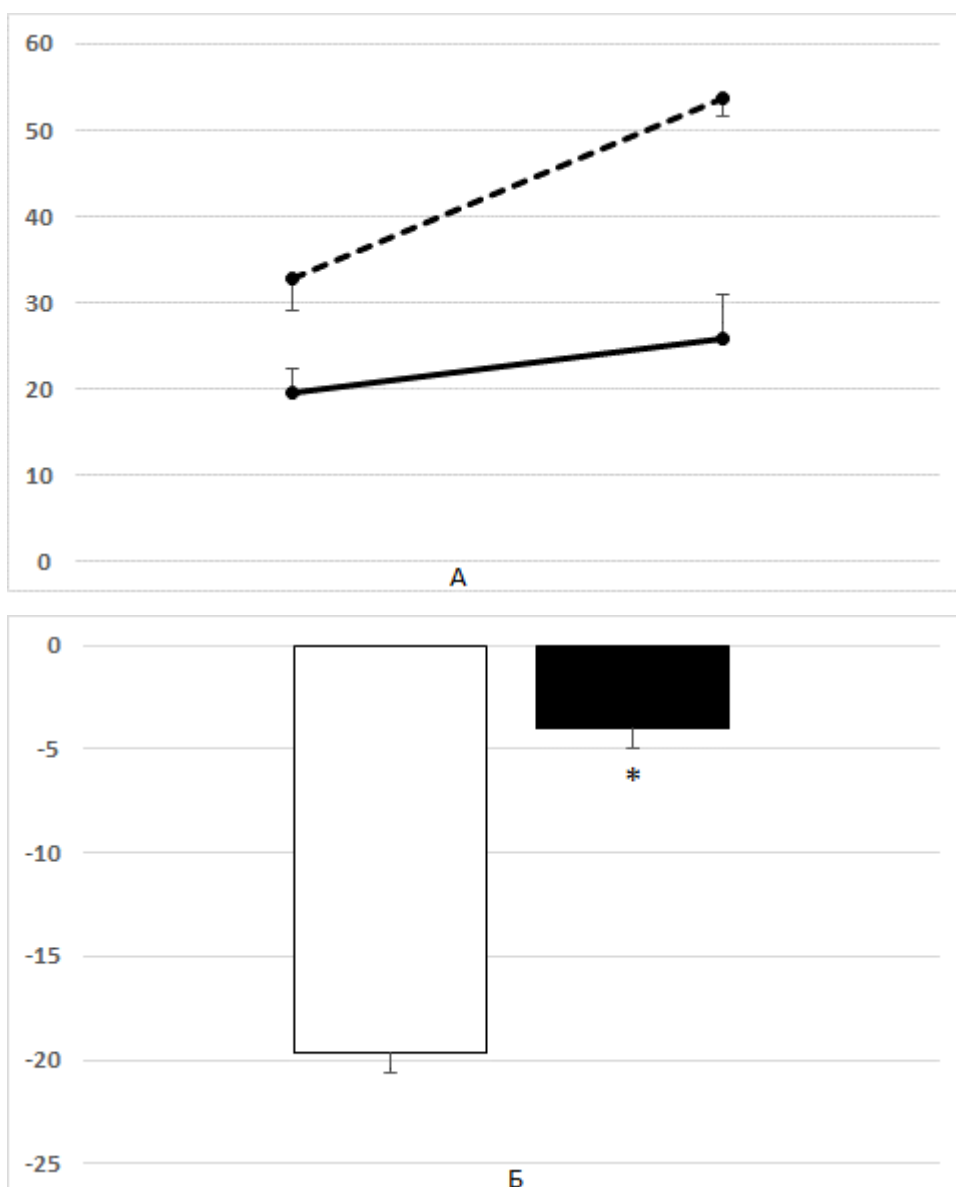


Рис. 8. Средний латентный период полуобхода тела матери в тесте «детское поведение» на 15-й день жизни. А – абсолютные значения до и после введения клебоприда (0,1 мг/кг). Б – изменение (дельта) «до-после» введения препарата. По оси ординат – время, с.

Условные обозначения: пунктирная линия и белый цвет – подгруппа контрольных животных, получавших клебоприд (n=18); сплошная линия и черный цвет – подгруппа ВПК-животых, получавших клебоприд (n=19). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

5.3. Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов на проявления фетального вальпроатного синдрома. Гептапептид семакс

Серия была посвящена оценке возможного корректирующего действия гептапептида семакс на проявления описанного выше фетального вальпроатного синдрома (ФВС), который можно рассматривать в качестве модели РАС. В дальнейшем группа детенышей с ФВС, получавших в течение 1-14 дней жизни и/н воду будет обозначаться как «плацебо», группа детенышей с ФВС, получавших в течение 1-14 дней жизни и/н пептид семакс, – «семакс».

При проведении «ранних» тестов в возрасте 6-16 дней и анализе психомоторного развития детенышей значимого эффекта семакса выявлено не было. В тестах «рефлекс переворота со спины на лапы», «двигательная активность», «отрицательный геотаксис», а также по скорости открытия глаз и чувствительности к тактильной стимуляции между группами «семакс» и «плацебо» достоверные различия отсутствовали. Можно отметить тенденции к улучшению параметров психомоторного развития практически во всех тестах, но они не достигали уровня достоверности, оставаясь на уровне $p=0,2-0,3$. Отсутствие положительного эффекта семакса можно объяснить тем, что он не влияет на структуры мозга, ответственные за анализируемые реакции, а также тем, что необходим более длительный курс воздействия семакса на организм детеныша.

При анализе результатов тестов «открытое поле со сменой освещенности» и «приподнятый крестообразный лабиринт» также не обнаружено влияния препарата. Существуют единичные эффекты, например, значимое отличие между крысами, получавшими семакс, и крысами, получавшими воду, имеется в числе актов груминга в ОП на 4-й минуте: в группе «семакс» показатель составил $1,1 \pm 0,3$, а в группе «плацебо» – $2,1 \pm 0,3$ ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Эти данные могут свидетельствовать о положительном влиянии гептапептида на эмоциональный фон животных.

Существенно иную картину дают результаты теста «социальное поведение с матерью». Они указывают на корректирующее влияние семакса и его способность повышать стремление к социальной новизне. Надо отметить, что в группе животных, получавших препарат, достоверно увеличено общее время контакта с чужой самкой и интегральный параметр «социальная новизна», а также более, чем

в 2 раза повышено количество стоек в отсеке рядом с чужой самкой ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). Основные результаты представлены на рисунке 9.

По результатам теста «социальное поведение с сибсом» также заметны улучшения показателей в группе, получавшей семакс. В группе «семакс» по сравнению с группой «плацебо» увеличено время, проведенное в отсеке с детенышем из чужого выводка и уменьшено время, проведенное в отсеке с сибсом (интегральный показатель «социальная новизна» достоверно повышен, см. рис. 10). Также в опытной группе с введением препарата уменьшено количество стоек в отсеке с сибсом: значение показателя в группе «семакс» – $3,0 \pm 0,4$, а в группе «плацебо» – $5,6 \pm 0,7$ ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента).

Таким образом, после применения гептапептида, заметен положительный эффект в социальном взаимодействии. Способность семакса положительно влиять на стремление к социальной новизне указывает на его важные терапевтические свойства в свете коррекции нарушений аутистического спектра.

Положительный эффект семакса оказался заметен также в тесте «принудительное плавание». У животных, получавших пептид, увеличена длительность 1-ого эпизода активного плавания, увеличен латентный период иммобилизации и суммарное время иммобилизации. Полученные данные свидетельствуют об ослаблении под влиянием семакса поведенческих проявлений депрессивности. Результаты теста представлены в Таблице 9.

По результатам теста «горячая пластина» в группах вальпроатных крыс, получавших дистиллированную воду и семакс, достоверно различаются латентные периоды 3-го и 4-го эпизода рефлекса облизывания лапы и средний ЛП облизывания. Результаты представлены в Таблице 10. В опытной группе наблюдается снижение времени латентных периодов, т.е. повышение болевой чувствительности, что в сравнении с ВПК-животными, является положительным результатом. Нормализация ноцицепции свидетельствует о том, что семакс благотворно влияет на центральные структуры, отвечающие за болевую чувствительность.

При анализе результатов выработки условной реакции пассивного избегания обнаружено, что у крыс, получавших семакс, ЛП в день обучения составил $22,4 \pm 2,4$ с, а в группе крыс, получавших воду – $38,2 \pm 7,1$ с ($p < 0,05$ по t-критерию

Стьюдента). При этом достоверной разницы ни по ЛП в день проверки навыка (в опыте – $133,0 \pm 13,4$ с, в контроле – $154,8 \pm 10,3$ с) ни по изменению (дельте) ЛП обнаружено не было, т.е. обе группы обучились одинаково. Следовательно, семакс не оказал в данном тесте положительного действия на способность к обучению.

По результатам проведенной серии экспериментов, можно заключить, что при интраназальном введении препарата семакс в 1-14 дни жизни в дозе 0,05 мг/кг на фоне пренатального воздействия вальпроевой кислоты зарегистрированы: снижение уровня депрессивности крысят, нормализация ноцицепции и улучшение социального взаимодействия. Таким образом, гептапептид, в дополнение к уже известным свойствам, способен частично корректировать проявления мозговой дисфункции, которая вызвана пренатальным воздействием ВПК (фетальный вальпроатный синдром).

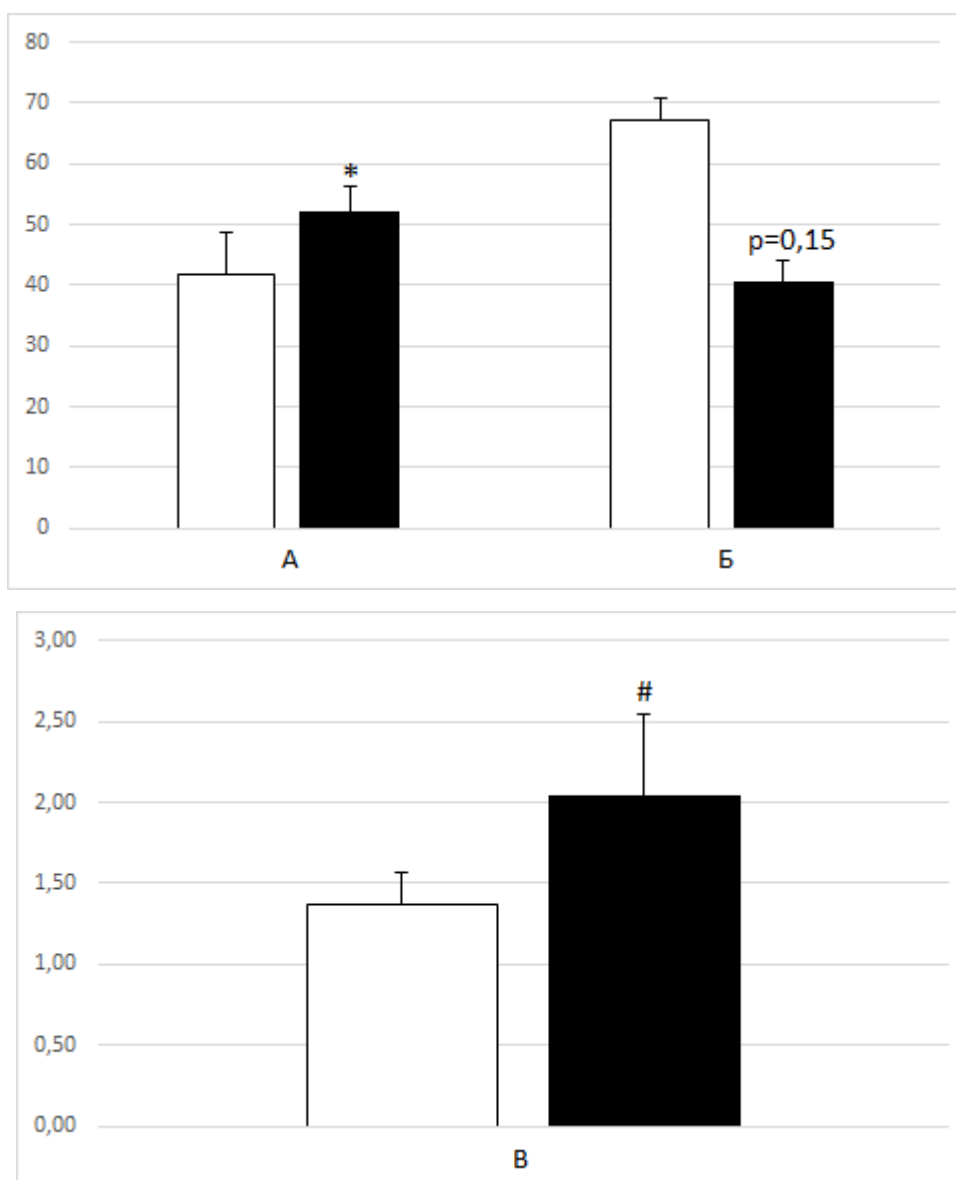


Рис. 9. Параметры зоосоциального взаимодействия в тесте «социальное поведение с мамой» при изучении влияния пептида семакс. А – время в отсеке рядом с чужой самкой; Б – время в отсеке рядом с матерью; В – социальная новизна. По оси ординат: А и Б – время, с.; В – усл. ед. Возраст 29 дней.

Условные обозначения: белый цвет – группа «плацебо» (n=28), черный цвет – группа «семакс» (n=29). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

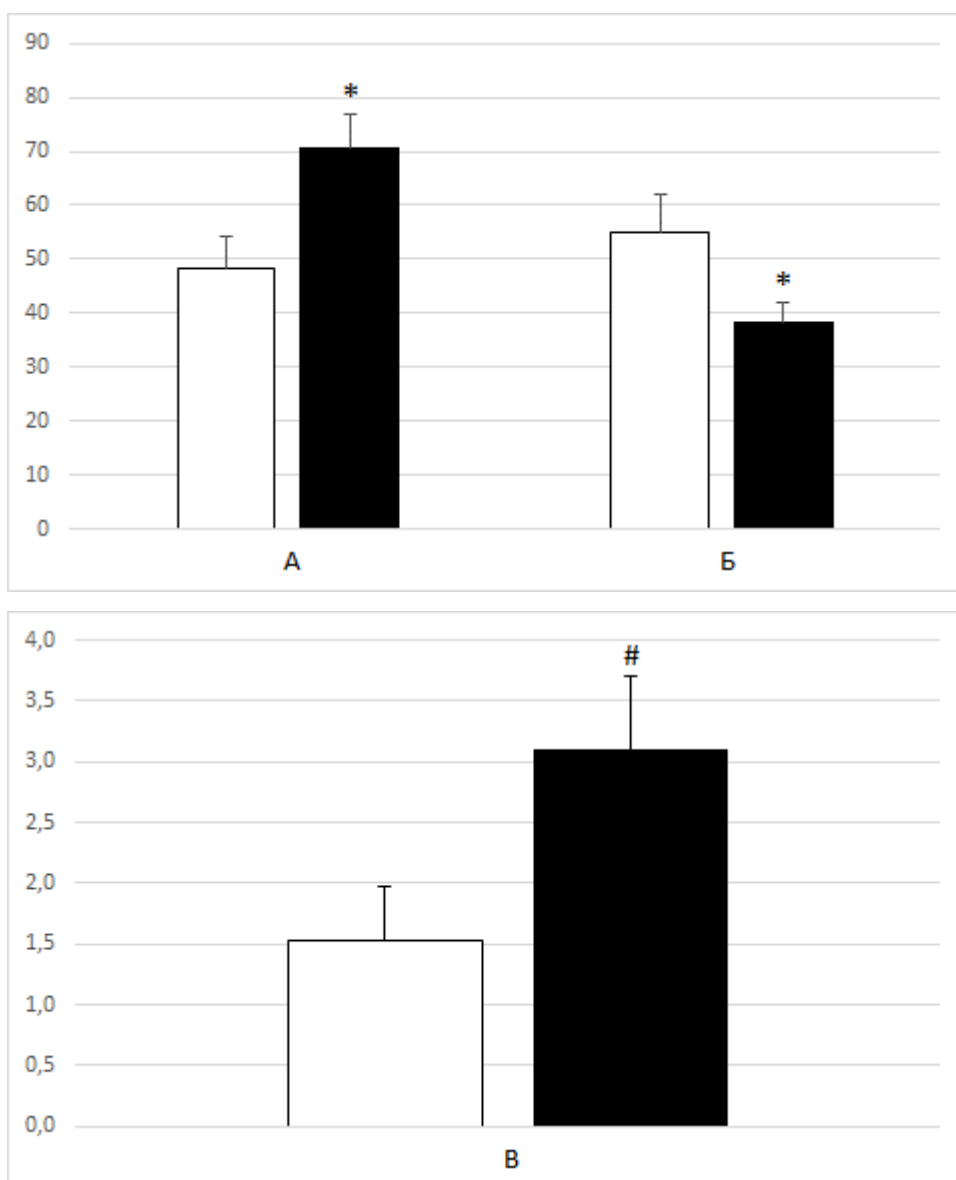


Рис. 10. Параметры зоосоциального взаимодействия в тесте «социальное поведение с сибсом» при изучении влияния пептида семакс. По оси абсцисс: А – время в отсеке рядом с детенышем из чужого выводка; Б – время в отсеке рядом с сибсом; В – социальная новизна. По оси ординат: А и Б – время, с.; В – усл. ед. Возраст 36 дней.

Условные обозначения: белый цвет – группа «плацебо» (n=28), черный цвет – группа «семакс» (n=29). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 9. Результаты теста «Принудительное плавание» при изучении влияния пептида семакс. Возраст 38 дней. Условные обозначения: «Плацебо» – отрицательный контроль (белые крысы, получавшие и/н растворитель), «Семакс» – опытная группа (белые крысы, получавшие и/н семакс). АМ – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Параметр	Плацебо (n=28), АМ±SEM	Семакс (n=29), АМ±SEM	P, Стьюдент
Латентный период 1го эпизода активного плавания, с	1,5 ± 0,5	0,9 ± 0,3	0,24
Длительность 1го эпизода активного плавания, с	71,9 ± 5,9	94,4 ± 6,7	0,01*
Среднее время активного плавания, с	44,9 ± 5,8	56,4 ± 8,2	0,26
Суммарная длительность активного плавания, с	126,3 ± 7,5	135,9 ± 6,9	0,35
Латентный период иммобилизации, с	76,0 ± 5,7	103,0 ± 6,9	0,004**
Среднее время иммобилизации, с	43,6 ± 4,1	43,0 ± 5,5	0,93
Суммарное время иммобилизации, с	146,0 ± 6,9	124,2 ± 8,1	0,09#
Время пассивного плавания, с	25,7 ± 7,1	38,5 ± 7,5	0,22
Число ныряний	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,92

Таблица 10. Результаты теста «Горячая пластина» при изучении влияния пептида семакс. Измерения в с. Возраст 42 дня. Условные обозначения как в табл. 9

Параметр	Плацебо (n=28), АМ±SEM	Семакс(n=29), АМ±SEM	P, Стьюдент
Латентный период при 1м измерении	14,6 ± 0,6	11,5 ± 1,4	0,17
Латентный период при 2м измерении	11,3 ± 1,3	8,9 ± 1,0	0,14
Латентный период при 3м измерении	10,0 ± 1,1	6,9 ± 0,7	0,03*
Латентный период при 4м измерении	9,2 ± 1,0	5,6 ± 0,7	0,01*
Средний латентный период облизывания лапы	11,3 ± 1,2	8,2 ± 0,9	0,046*
Минимальный латентный период	7,7 ± 1,1	5,3 ± 0,7	0,07
Максимальный латентный период	15,7 ± 1,5	11,9 ± 1,4	0,08

5.4. Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов на проявления ФВС. Гептапептид бета-казоморфин-7 (БКМ-7).

В данной серии экспериментов оценивалось возможное корректирующее влияние опиоидного пептида грудного молока бета-казоморфина-7 человека на проявления фетального вальпроатного синдрома. Экспериментальные группы: «ВПК+БКМ-7» – в/б введение БКМ-7 в дозе 1 мг/кг с 1-го по 14-й день жизни; а «ВПК+Н₂O» – отрицательный контроль с в/б введением растворителя. Также в данной серии оценивалось влияние пептида на здоровых животных без ФВС. Экспериментальные группы получали: «Н₂O+БКМ-7» – БКМ-7 в/б в дозе 1 мг/кг с 1-го по 14-й день жизни; «Н₂O+Н₂O» – в/б инъекции растворителя.

В отличие от семакса, который уже продолжительное время используется в клинической практике и терапевтические эффекты которого не вызывают сомнений, БКМ-7 является экспериментальным препаратом, как и фрагменты АВП, речь о которых пойдет в следующей главе. Именно поэтому нам было важно оценить эффекты этих пептидов на контрольной выборке крыс. Мы также стремились обнаружить их корректирующее действие, т.е. эффекты, которые проявлялись на животных ФВС и возвращали значения поведенческих показателей к нормальному уровню, но при этом не затрагивали функционирование мозга здоровых животных.

При проведении «ранних» тестов и анализе темпов психомоторного развития крысят значимого эффекта БКМ-7 на крыс с ФВС выявлено не было. В тестах «рефлекс переворота со спины на лапы», «двигательная активность», «отрицательный геотаксис», а также по темпам открытия глаз и чувствительности к тактильному воздействию между группами «ВПК+БКМ-7» и «ВПК+Н₂O» достоверных различий не обнаружено. Существенного воздействия БКМ-7 не оказал и на здоровых детенышей. Различия между группами были зарегистрированы только при оценке чувствительности к тактильной стимуляции. Крысята группы «Н₂O+БКМ-7» реагировали спокойнее на предъявление тактильной стимуляции (64,7% крысят под влиянием пептида были спокойнее, в контроле же доля «спокойных» крыс составила - 37,5% $p < 0,05$ по критерию хи-квадрат). Таким образом, БКМ-7, как и семакс, не оказал существенного влияния на рефлексы в раннем постнатальном периоде.

Изучение двигательной активности, а также баланса ориентировочно-исследовательских реакций и тревожности проводилась в тестах ОП и КПЛ. Ранее мы указывали, что крысы с ФВС более тревожны, чем контрольные, и пептид семакс не влиял на данный параметр. В описываемой серии зарегистрирован слабый анксиолитический эффект БКМ-7 без подавления двигательной активности. Значимое отличие в тесте ОП между группами «ВПК+БКМ-7» и «ВПК+Н₂О» было найдено в количестве обследованных норок на 4-й минуте измерений (при красном свете): в опытной группе, с введением пептида, величина показателя составила $1,4 \pm 0,3$, в контроле – $0,7 \pm 0,2$ ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). Значимое отличие в тесте КПЛ между группами «ВПК+БКМ-7» и «ВПК+Н₂О» зарегистрировано по числу выходов на открытые рукава лабиринта: в опытной группе 6 крыс совершили более одного выхода, тогда как в контроле такое животное было всего 1 ($p < 0,05$ по критерию хи-квадрат). На уровне тенденции у крыс, получавших БКМ-7, увеличилось время, проведенное в центре лабиринта: в опыте этот показатель составил $14,1 \pm 4,6$ с, в контроле – $6,3 \pm 1,5$ с ($p = 0,08$ по t-критерию Стьюдента). При этом стоит отметить, что на здоровых животных БКМ-7 не оказал никакого влияния. Между группами «Н₂О+БКМ-7» и «Н₂О+Н₂О» достоверных различий в тестах ОП и ПКЛ выявлено не было. Таким образом, можно судить об именно корректирующем влиянии пептида на баланс ОИР и тревожности. Важно отметить, что в предыдущих работах нашей научной группы были продемонстрировано анксиолитическое влияние БКМ-7 из состава коровьего молока, т.е. аналог пептида из состава женского молока действует «мягче», что может быть важно для клинического применения.

При оценке зоосоциального взаимодействия крыс, получавших БКМ-7, удалось выявить только тенденцию к усилению мотивации к новым социальным контактам. У крыс группы «ВПК+БКМ-7» снижено на 43% число подходов к маме относительно отрицательного контроля ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента, рис. 11). Однако, влияния на интегративный параметр «социальная новизна» БКМ-7 не оказал. Также не было выявлено достоверных различий при тестировании в ситуации выбора между сибсом и крысенком из другого выводка. Влияния БКМ-7 на параметры социального поведения у здоровых животных также не обнаружено. Следовательно, БКМ-7 человека оказал лишь слабое корректирующее влияние на

проявления ФВС в тестах на социальное взаимодействие (особенно в сравнении с семаксом).

Влияние постнатального введения БКМ-7 на поведение крысят оценивали в тесте «принудительное плавание». Ранее было показано, что у крыс на модели РАС повышен уровень депрессивности, и данное нарушение возможно скорректировать семаксом. Значимое отличие между группами «ВПК+БКМ-7» и «ВПК+H₂O» выявлено в количестве эпизодов иммобилизации: в опытной группе значение показателя составило $3,6 \pm 0,4$, а в отрицательном контроле – $5,0 \pm 0,5$ ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). Также среди крыс, получавших БКМ-7, не было ни одной особи, длительность 1-го эпизода активного плавания которой составила бы менее 40 с, а в контроле таких животных было 4 ($p < 0,05$ по критерию хи-квадрат). Результаты теста представлены на рис 12. Также было зарегистрировано достоверное различие между здоровыми крысами, получавшими БКМ-7 или воду. Под влиянием пептида длительность первого периода иммобилизации уменьшилась на 64% (см. рис. 12). Таким образом, по результатам теста «принудительное плавание» можно заключить, что БКМ-7 человека обладает некоторым антидепрессантным действием. Причем пептид оказывает влияние как на здоровых животных, так и на животных с ФВС. При этом действие препарата затронуло разные поведенческие показатели.

Болевую чувствительность крысят оценивали на 42 день жизни в тесте «горячая пластина». Ранее показано, что у крыс с ФВС повышен ЛП рефлекса облизывания лапы и, следовательно, понижена болевая чувствительность. Семакс положительно повлиял на данный параметр. Аналогичное корректирующее действие оказал БКМ-7. После введения пептида в 1-14 дни жизни у крыс группы «ВПК+БКМ-7» латентный период рефлекса в первой посадке снизился на 39%, средний по 4-м посадкам ЛП – на 32%, а также максимальный из 4-х проб ЛП – на 34% относительно группы «ВПК+H₂O». Результаты представлены в таблице 11. В этом тесте не наблюдалось отличий между группами крысят, подвергнутых воздействию H₂O в пренатальный период и получавших затем на протяжении 1-14 дней жизни в/б инъекции воды или бета-казоморфина-7 в дозе 1 мг/кг. Таким образом, БКМ-7 способен оказывать истинно корректирующее влияние на болевую чувствительность экспериментальных животных и сходен в этом с семаксом.

Изучение влияния БКМ-7 на выработку условного рефлекса с отрицательным подкреплением выявило положительное влияние пептида на способность к обучению вне зависимости от введения ВПК. Исходный латентный период захода в темный отсек в день обучения во всех 4-х группах был примерно одинаков, причем сравнение ЛП в разные дни показывает, что все животные обучились навыку. В день проверки выработки навыка у крыс группы «ВПК+БКМ-7» латентный период достоверно увеличился на 45% относительно группы «ВПК+Н₂O», а у крыс группы «Н₂O+БКМ-7» – на 54% относительно группы «Н₂O+Н₂O». Результаты представлены на рисунке 13. Также значимо увеличилась разница между ЛП входа в темный отсек при обучении и проверке (дельта ЛП): в группе «ВПК+БКМ-7» этот показатель составил $111,1 \pm 18,7$ с, в группе «ВПК+Н₂O» – $50,5 \pm 18,7$ с ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента), в группе «Н₂O+БКМ-7» – $56,5 \pm 15,8$ с, а в группе «Н₂O+Н₂O» – $13,2 \pm 11,9$ с ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

Таким образом, БКМ-7 человека оказал улучшающее обучение действие как на интактных животных, так и на крыс с ФВС. При этом, с одной стороны, о способности бета-казоморфинов коровы улучшать обучение с отрицательным подкреплением ранее не сообщалось, с другой стороны, клинический ноотроп семакс не повлиял на данный вид обучения на модели РАС. Данные факты делают полученный результат особенно интересным.

Таким образом, при внутрибрюшинном введении гептапептида бета-казоморфина-7 в 1-14 дни жизни в дозе 1 мг/кг на фоне предварительного пренатального воздействия вальпроевой кислоты были зарегистрированы следующие эффекты: некоторое смещение баланса между тревожностью и ориентировочно-исследовательской активностью в сторону последней; снижение поведенческих проявлений депрессивности; нормализация ноцицепции; улучшение обучения с отрицательным подкреплением.

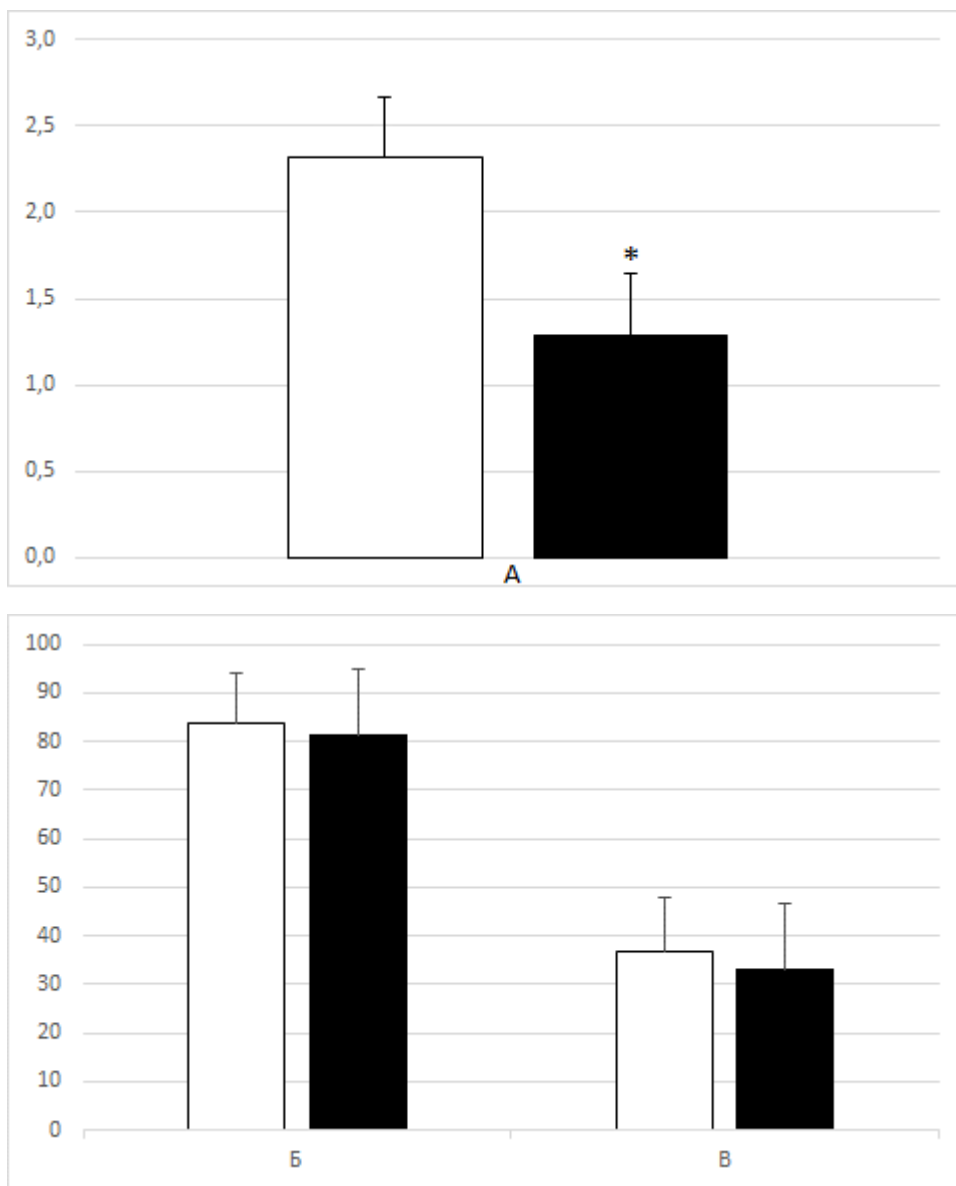


Рис. 11. Параметры зоосоциального взаимодействия в тесте «социальное поведение с мамой» при изучении влияния пептида бета-казоморфин-7. А – число подходов к отсеку с матерью; Б – время в отсеке рядом с чужой самкой; В – время в отсеке рядом с матерью. По оси ординат: А – усл. ед.; Б и В – время, с. Возраст 29 дней.

Условные обозначения: белый цвет – группа «ВПК+Н₂О» (n=16), черный цвет – группа «ВПК+БКМ-7» (n=14). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

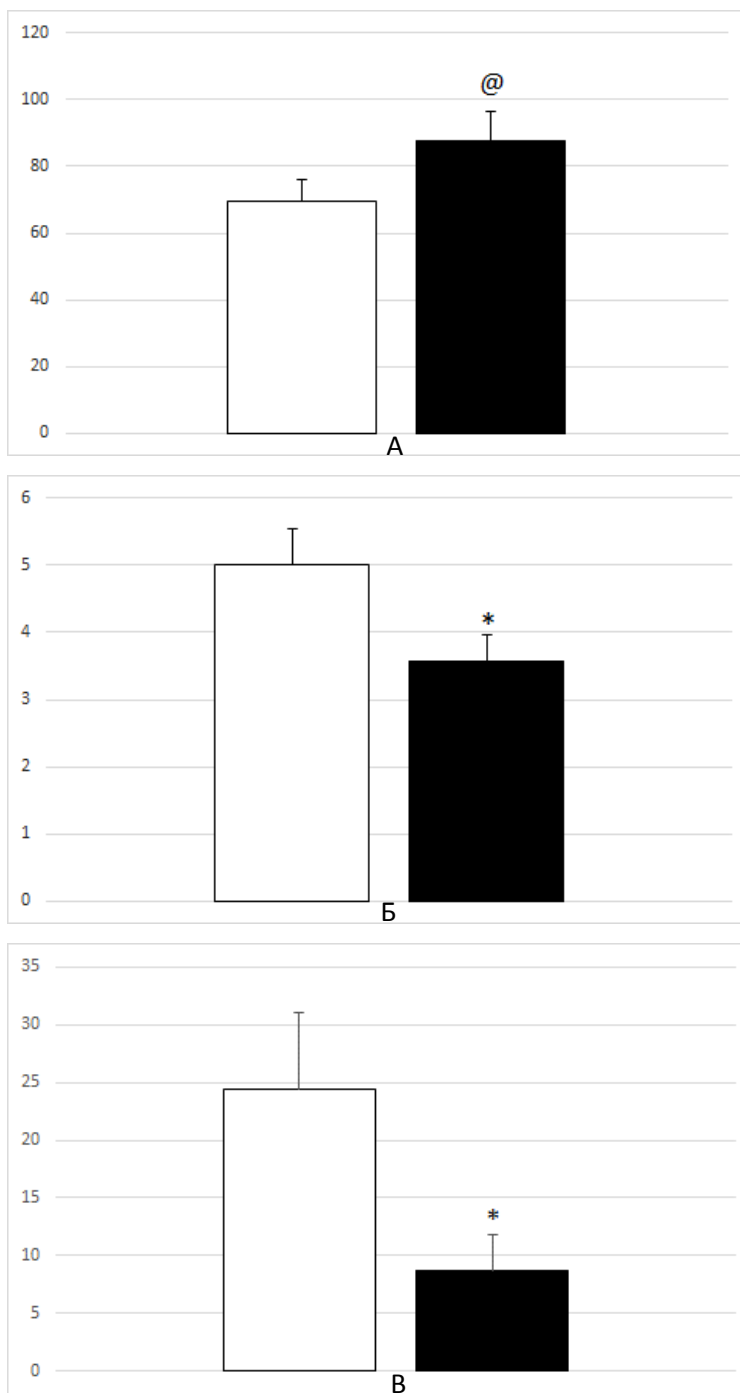


Рис. 12. Результаты теста «Принудительное плавание» при изучении влияния пептида бета-казоморфин-7 на крыс с ФВС (А и Б) здоровых животных (В). А – длительность 1-го эпизода активного плавания; Б – число эпизодов иммобилизации; В – длительность 1-го эпизода иммобилизации. По оси ординат: А и В – время, с. Возраст 38 дней.

Условные обозначения: белый цвет – группа «H₂O+H₂O» (n=14), черный цвет – группа «H₂O+БКМ-7» (n=16). * - отличие от контрольной группы с p<0,05 по t-критерию Стьюдента. @- отличие от контрольной группы с p<0,05 по точному критерию Фишера. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 11. Результаты теста «Горячая пластина» при изучении влияния бета-казоморфина-7. Показатель измеряется в с. Возраст 42 дня.

Условные обозначения: «ВПК+Н₂О» – отрицательный контроль (белые крысы, получавшие в/б растворитель), «ВПК+БКМ-7» – опытная группа (белые крысы, получавшие в/б БКМ-7). АМ – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента.

Параметр	ВПК+Н ₂ О (n=16), АМ±SEM	ВПК+БКМ-7 (n=14), АМ±SEM	P, Стьюдент
Латентный период при 1м измерении	17,5 ± 2,0	10,7 ± 1,2	0,008**
Латентный период при 2м измерении	8,7 ± 1,8	7,1 ± 0,6	0,42
Латентный период при 3м измерении	12,2 ± 2,1	7,4 ± 1,1	0,06
Латентный период при 4м измерении	10,5 ± 2,1	8,1 ± 1,3	0,35
Средний латентный период облизывания лапы	12,2 ± 1,7	8,3 ± 0,7	0,049*
Минимальный латентный период	7,5 ± 1,8	5,5 ± 0,5	0,31
Максимальный латентный период	18,9 ± 1,9	12,4 ± 1,3	0,009**

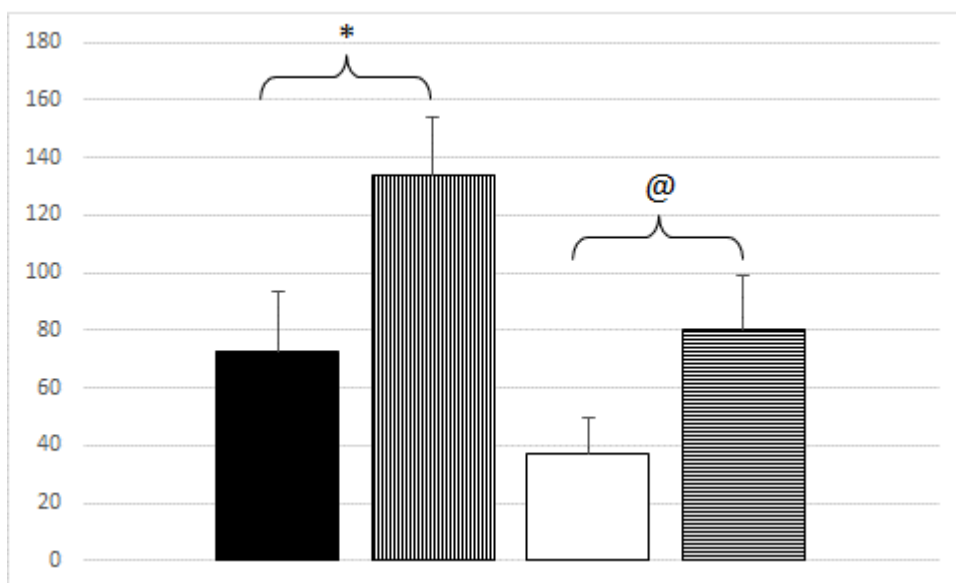


Рис. 13. Результаты выработки условной реакции пассивного избегания при изучении влияния пептида бета-казоморфин-7 на крыс с ФВС и здоровых животных. По оси ординат: время, с. Возраст 48-50 дней.

Условные обозначения: черный цвет – группа «ВПК+H₂O» (n=15), вертикальный штрих – группа «ВПК+БКМ-7» (n=14), белый цвет – группа «H₂O+H₂O» (n=14), горизонтальный штрих – группа «H₂O+БКМ-7» (n=16). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. @ - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Фишера. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

5.5. Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов на проявления ФВС. Аналог фрагмента АВП(6-9) тетрапептид Ас-D-MPRG

В данной серии экспериментов оценивалось корректирующее влияние модифицированного фрагмента молекулы аргинин-вазопрессина тетрапептида Ас-D-MPRG на проявления фетального вальпроатного синдрома. Экспериментальные группы: «ВПК+Ас-D-MPRG» – опытная группы с и/н введением Ас-D-MPRG в дозе 0,01 мг/кг с 1-го по 14-й день жизни; «ВПК+H₂O» – отрицательный контроль с и/н введением растворителя. Также в данной серии оценивалось влияние пептида на здоровых животных без ФВС. Экспериментальные группы: «H₂O+Ас-D-MPRG» – получали Ас-D-MPRG и/н в дозе 0,01 мг/кг с 1-го по 14-й день жизни; «H₂O+H₂O» – получали и/н введение растворителя.

Как было сказано выше, в отличие от семакса, фрагменты АВП являются экспериментальными препаратами. Для них ранее уже был показан ряд позитивных влияний на ЦНС новорожденных млекопитающих, в связи с чем появилась гипотеза о возможной терапевтической активности в случае модели РАС (Воскресенская с соавт., 2007).

По результатам «ранних» тестов можно заключить, что Ас-D-MPRG не оказывает корректирующего влияния на темпы психомоторного развития крысят с ФВС. В тестах «рефлекс переворота со спины на лапы», «двигательная активность», «отрицательный геотаксис», а также по темпам открытия глаз и чувствительности к тактильному воздействию между группами «ВПК+Ас-D-MPRG» и «ВПК+H₂O» достоверных различий не было выявлено. В то же время Ас-D-MPRG оказал влияние на контрольных животных. В тесте «детская двигательная активность» наблюдалось значимое снижение латентного периода выхода из круга, т.е. позитивное влияние пептида на двигательную активность: в группе «H₂O+Ас-D-MPRG» значение параметра составило $46,5 \pm 6,9$ с, в контрольной группе – $64,3 \pm 7,8$ с ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни). Также различия обнаружены в тесте «отрицательный геотаксис». В группе «H₂O+Ас-D-MPRG» время поворота на 20° наклоне составило $16,6 \pm 3,4$ с, тогда как в группе «H₂O+H₂O» – $28,7 \pm 4,9$ с ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни). Полученные результаты свидетельствуют о лучшем созревании двигательных и вестибулярных навыков под воздействием фрагмента

АВП, что хорошо коррелирует с уже имеющейся информацией (Воскресенская с соавт., 2007).

Изучение двигательной, ориентировочно-исследовательской активности и тревожности крысят с фетальным вальпроатным синдромом проводилось в тестах ОП и КПЛ. По результатам проведенных тестов, можно заключить, что Ас-D-MPRG не оказал значимого влияния на данные поведенческие параметры. Достоверных различий в реакциях под влиянием пептида не было выявлено ни у крыс с ФВС, ни у здоровых животных. Таким образом, из трех протестированных пептидов, только БКМ-7 оказал определенное корректирующее влияние на баланс ОИР и тревожности.

Также не было выявлено позитивных эффектов Ас-D-MPRG в тесте «социальное поведение с мамой». Результаты показывают, что пептид не влияет на стремление к социальной новизне ни у модельных крыс, ни у здоровых.

Тем интереснее эффекты, наблюдавшиеся в тесте «социальное поведение с сибсом». У крысят группы «ВПК+Ас-D-MPRG» оказался повышен ряд поведенческих параметров в отсеке Т-камеры рядом с детенышем из чужого выводка. При объединении этих показателей в один интегральный было обнаружено достоверное различие: детеныши опытной группы вели себя активнее на 21% (данный показатель вычислялся как сумма таких поведенческих реакций, как обнюхивания, залезания, подходы и стойки в отсеке рядом с чужаком, см. рис. 14). Данный показатель косвенно характеризует повышение стремления к социальной новизне среди ВПК-крыс, получавших инъекции пептида. На здоровых крысах подобного эффекта обнаружено не было. Тот факт, что Ас-D-MPRG и БКМ-7 оказали корректирующее влияние на различные компоненты социального поведения представляет отдельный интерес и является темой для обсуждения.

Для изучения уровня депрессивности животных, как и в других сериях, использовался тест «принудительное плавание». Ранее было показано, что пренатальное введение ВПК усиливает поведенческие проявления депрессивности, в то время как семакс и БКМ-7 обладают корректирующим действием. Ас-D-MPRG также оказал корректирующее влияние на депрессивность животных. Под влиянием пептида в группе «ВПК+Ас-D-MPRG» наблюдалось увеличение количества эпизодов активного плавания на 20% и снижение среднего времени

иммобилизации 26% по сравнению с группой «ВПК+H₂O». Результаты представлены в таблице 12. Достоверных отличий между здоровыми крысами, получавшими воду или Ас-D-MPRG, зарегистрировано не было.

Ас-D-MPRG, также как и другие два пептида, оказал корректирующее влияние на болевую чувствительность подопытных животных. В тесте «горячая пластина» у крыс опытной группы было зарегистрировано снижение ЛП рефлекса в 1-ой посадке на 25%, снижение среднего из 4-х посадок ЛП на 11% и снижение минимального ЛП рефлекса на 12% относительно контрольной группы. Результаты теста представлены в таблице 13. Достоверных отличий между здоровыми крысами, получавшими воду или Ас-D-MPRG, зарегистрировано не было, так что в данном случае, как и в случае с «принудительным плаванием», можно говорить об истинно корректирующем влиянии аналога фрагмента АВП.

При выработке условной реакции пассивного избегания положительного эффекта Ас-D-MPRG выявлено не было. Пептид не оказал улучшающего обучение действия ни на ВПК-крыс, ни на здоровых животных. Таким образом, из 3-х пептидов только БКМ-7 улучшил обучение с отрицательным подкреплением у модельных крыс с РАС.

Таким образом, подводя итог данной части работы, можно заключить, что при интраназальном введении тетрапептида Ас-D-MPRG в 1-14 дни жизни в дозе 0,01 мг/кг на фоне предварительного пренатального воздействия вальпроевой кислоты были зарегистрированы следующие положительные эффекты: параметры зоосоциального взаимодействия смещаются от большей привязанности к сибсу в сторону взаимодействия с чужим детенышем; снижаются поведенческие проявления депрессивности; происходит нормализация ноцицепции.

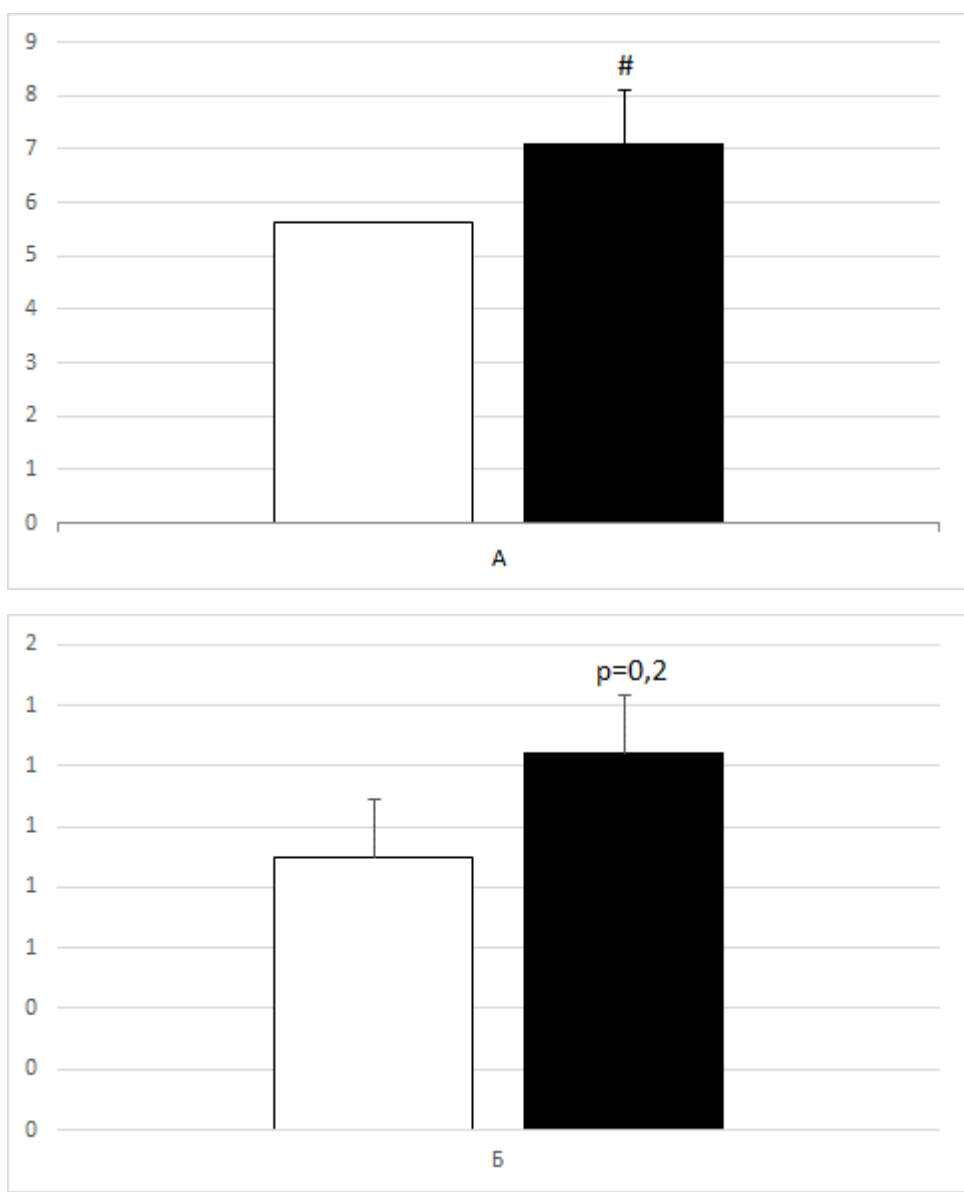


Рис. 14. Результаты теста «Социальное поведение с сибсом» при изучении влияния пептида Ac-D-MPRG на крыс с ФВС. А – активность в отсеке с детенышем из чужого выводка; Б – социальная новизна. По оси ординат: усл. ед. Возраст 36 дней.

Условные обозначения: белый цвет – группа «ВПК+H₂O» (n=21), черный цвет – группа «ВПК+Ac-D-MPRG» (n=21). # - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 12. Результаты теста «Принудительное плавание» при изучении влияния пептида Ас-D-MPRG. Возраст 38 дней. Условные обозначения: «ВПК+H₂O» – отрицательный контроль (белые крысы, получавшие и/н растворитель), «ВПК+Ас-D-MPRG» – опытная группа (белые крысы, получавшие и/н Ас-D-MPRG). АМ – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с p<0,05 по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с p<0,05 по критерию Манна-Уитни.

Параметр	ВПК+H ₂ O (n=21), АМ±SEM	ВПК+Ас-D- MPRG (n=21), АМ±SEM	P, Стьюдент
ЛП первого периода активного плавания, с	10,5 ± 1,2	8,6 ± 1,3	0,75
Длительность первого периода активного плавания, с	57,6 ± 4,9	52,1 ± 4,4	0,41
Суммарное время активного плавания, с	111,0 ± 9,1	122,0 ± 9,9	0,42
Количество эпизодов активного плавания	4,3 ± 0,5	5,4 ± 0,3	0,08#
Среднее время активного плавания, с	29,5 ± 2,8	24,4 ± 2,4	0,17
Суммарное время эпизодов пассивного плавания, с	89,7 ± 8,5	94,7 ± 9,9	0,71
ЛП первого периода иммобилизации, с	79,9 ± 7,0	72,2 ± 7,1	0,45
Суммарное время иммобилизации, с	99,3 ± 9,6	82,3 ± 10,1	0,23
Среднее время иммобилизации, с	16,5 ± 1,7	12,2 ± 1,1	0,04*

Таблица 13. Результаты теста «Горячая пластина» при изучении влияния пептида Ас-D-MPRG. Измерения в с. Возраст 42 дня. Условные обозначения как в таблице 12.

Параметр	ВПК+H ₂ O (n=21), АМ±SEM	ВПК+Ас-D- MPRG (n=21), АМ±SEM	P, Стьюдент
Латентный период 1го эпизода	10,6 ± 1,3	7,9 ± 0,4	0,08#
Латентный период 2го эпизода	8,6 ± 0,5	8,7 ± 1,2	0,91
Латентный период 3го эпизода	7,9 ± 0,6	7,3 ± 0,6	0,52
Латентный период 4го эпизода	7,4 ± 0,4	6,5 ± 0,4	0,14
Средний латентный период облизывания лапы	8,6 ± 0,4	7,6 ± 0,3	0,09#
Минимальный латентный период	6,8 ± 0,3	6,0 ± 0,3	0,07#
Максимальный латентный период	11,8 ± 1,3	10,3 ± 1,1	0,40

5.5. Изучение особенностей поведения крыс линии WAG/Rij в раннем возрасте (1-2 месяца жизни)

Известно, что крысы линии WAG/Rij (WR) являются уникальным модельным объектом двойной патологии – абсанс-эпилепсии и депрессии (Sarkisova, 2011). Характерная пик-волновая активность в мозге развивается у них к 5-6 месяцу жизни и, традиционно, проявление депрессивноподобного поведения также связывают с этим этапом онтогенеза. Однако про поведенческие особенности и наличие патологических изменений в раннем возрасте у крыс WR известно мало. Нашей задачей стало охарактеризовать поведение крыс этой линии в период от рождения до 2-х месяцев, используя ту же батарею тестов, что и при тестировании животных после пренатальной инъекции ВПК. Особый интерес представляет сравнение линии WR и крыс с ФВС, а также показатели зависимого от матери («детского») поведения детенышей линии WR.

С 6 по 16 дни жизни были проведены тесты, описывающие развитие нервной системы. В данной серии в качестве контрольной группы был использован детеныши крыс линии Wistar, которые считаются «нормальными» и часто используются в качестве поведенческого контроля.

В тесте «рефлекс переворота со спины на лапы» показано, что у крыс WR достоверно увеличено время реакции: в опытной группе оно составило $4,3 \pm 1,0$ с, в контроле – $1,8 \pm 0,2$ с ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). На 12 день проводилась оценка развития нервной системы и вестибулярного навыка в тесте «отрицательный геотаксис» на наклонной плоскости под углом 45° . Оказалось, что данная ситуация представляет значительные трудности для крыс линии WR: только 4 особи из 84 справились с предъявленной задачей, в контроле соответствующий показатель составил 20 из 56 крысят ($p < 0,01$ по точному критерию Фишера). Результаты теста «тактильная стимуляция» указывает на гиперреактивность крыс линии WR. Напомним, что в данном тесте используется балльная оценка поведения: «0» соответствует спокойной реакции на тактильное раздражение, «2» – активному избеганию стимула (трактруется как ранний признак повышенного уровня тревожности). По полученным данным 54 крысы линии WR (более 60% особей) получили оценку «2», т.е. излишне тревожно реагировали на стимуляцию, в то время как среди крыс Wistar таких особей было всего 13 (23% крысят) ($p < 0,05$

по точному критерию Фишера). В таких тестах, как «двигательная активность» и «ольфакторная дискриминация», а также по скорости открытия глаз и приросту массы различий между группами обнаружено не было. Таким образом, результаты проведенных тестов указывают на раннее проявление патологического процесса у крыс линии WAG/Rij и, очень вероятно, его генетическую обусловленность.

Далее проводились тесты, характеризующие ориентировочно-исследовательскую активность: «открытое поле со сменой освещенности» (21 день) и «приподнятый крестообразный лабиринт» (26 дней). В тесте ОП между группами крыс WR и Wistar зарегистрировано большое количество различий. Основные из них представлены на рис. 15. Стоит отметить, что при одинаковом уровне двигательной активности (суммарный пробег в опыте составил $46,4 \pm 2,2$ секторов, в контроле – $44,4 \pm 2,2$ секторов) у крыс линии WR достоверно снижены показатели, характеризующие уровень исследовательской активности. Число стоек у них уменьшено на 18%, число обследованных норок на 30%, а число отходов от стенок арены на 60% относительно контроля. Комплекс зарегистрированных изменений, свидетельствует о смещении баланса ОИР и тревожности в сторону последней.

На 26 день жизни крысят проводилась оценка ориентировочно-исследовательской активности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Показано, что у крыс линии WR по сравнению с контролем достоверно изменено большинство поведенческих параметров, регистрируемых в ПКЛ (таблица 14). Результаты данного теста указывают на существенное повышение тревожности у детенышей WR; наблюдаются достоверные изменения практически по всем параметрам «поведения риска». В частности, в опытной группе относительно контроля на 25% увеличилось время в закрытых рукавах лабиринта, на 78% снизилось время на открытых лучах лабиринта, на 77% – число выходов на светлые рукава, на 68% – количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта. Данные, полученные в тесте ПКЛ полностью согласуются с результатами ОП, и характеризуют изменение баланса тревожности и ориентировочно-исследовательской мотивации у крыс линии WAG/Rij.

На следующем этапе с крысами линии WAG/Rij были проведены тесты на социальное взаимодействие в ситуациях выбора «мама-чужая самка» и «сибс-

чужак», позволяющие оценить стремление крысят к социальной новизне. В первом тесте были получены значимые результаты, схожие с аналогичными в случае ВПК-крыс. В частности, у крыс линии WR по сравнению с крысами Wistar на 26% снижено время в отсеке рядом с чужой самкой и на 53% увеличено время в отсеке рядом с мамой, интегральный показатель социальной новизны при этом снижен у крыс WR более, чем в 2 раза (см. рис. 16). Полученные результаты позволяют проводить аналогии между мозговыми дисфункциями ВПК-крыс и животных линии WAG/Rij. Коморбидность депрессивных и аутистических расстройств представляет особый интерес и является отдельной темой для обсуждения.

При оценке социально взаимодействия в тесте с сибсом значимых различий между опытом и контролем по интегральному параметру «социальная новизна» выявить не удалось: у крыс WR он равнялся $2,6 \pm 0,62$, а у крыс Wistar – $5,3 \pm 3,2$ ($p=0,33$); изменения у крыс линии WR касаются косвенных показателей. Например, у них на 32% увеличено время в отсеке рядом с сибсом и на 37% снижено время в центральной части T-камеры относительно контроля. Эти эффекты являются достоверными и представлены на рис. 17. В целом обнаруженные изменения, с одной стороны, подтверждают гипотезу о повышенном уровне тревожности у крыс линии WR (см. результаты тестов ОП и ПКЛ), с другой стороны, косвенно свидетельствуют об изменениях в социальных предпочтениях и позволяют сравнивать крыс линии WR с крысами с фетальным вальпроатным синдромом.

Нами было показано, что у ВПК-крыс повышен уровень депрессивности, и данное нарушение возможно скорректировать при помощи пептидных биорегуляторов. Нарушения, регистрируемые в тесте «принудительное плавание», являются классическими характеристиками депрессивноподобного поведения. Хорошо известно, что они присутствуют у крыс линии WAG/Rij на 5-6 месяце жизни (Sarkisova et al., 2011). Нам удалось продемонстрировать, что они присутствуют гораздо раньше, уже в первые недели постнатального развития. Данный факт также объединяет мозговые дисфункции крыс линии WR и ВПК-животных. Было выявлено, что в опытной группе на 28% меньше длительность активного плавания и на 48% выше длительность иммобилизации ($p<0,01$ по t-критерию Стьюдента). Остальные результаты представлены в таблице 15.

Выше было продемонстрировано изменение болевой чувствительности после пренатального воздействия вальпроевой кислоты: у ВПК-крыс увеличивался латентный период облизывания задней лапы в тесте «горячая пластина», что свидетельствует о снижении болевой чувствительности. Данное отклонение снималось введением регуляторных пептидов. При тестировании крыс линии WR нами было выявлено также достоверное повышение ЛП реакции: в опытной группе средний ЛП рефлекса на 41% превышал контрольное значение (таблица 16). Таким образом, у крыс линии WR происходит снижение болевой чувствительности или гипоальгезия.

При выработке условной реакции пассивного избегания было зарегистрировано нарушение обучения с отрицательным подкреплением у крыс линии WAG/Rij. Латентный период захода в темный отсек в группе крыс линии WR в день обучения составил $14,4 \pm 1,4$ с, а в контроле – $19,8 \pm 1,9$ с ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Данные результат свидетельствует об исходно повышенном уровне тревожности у крыс линии WR, что подтверждается результатами других тестов. При проверки выработки навыка ЛП в опытной группе составил $23,1 \pm 4,0$ с, тогда как в контроле – $146 \pm 9,6$ с ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Полученные данные явно указывают недостаток в способности к обучению с отрицательным подкреплением у крыс линии WR. В одной из следующих серий экспериментов будет также рассмотрено обучение крыс линии WR с положительным пищевым обучением.

Таким образом, у крыс линии WAG/Rij по сравнению с животными Wistar замедлено психомоторное и физическое развитие, повышены тревожность и депрессивность, снижена ориентировочно-исследовательская активность, изменено социальное взаимодействие. Также у крыс линии WAG/Rij нарушена ноцицепция и ухудшено обучение с отрицательным подкреплением. Полученные при тестировании результаты подтверждают наличие ранних нарушений в функционировании нервной системы детенышей, по многим признакам сходных с PAC и последствиями пренатального введения высокой дозы ВПК.

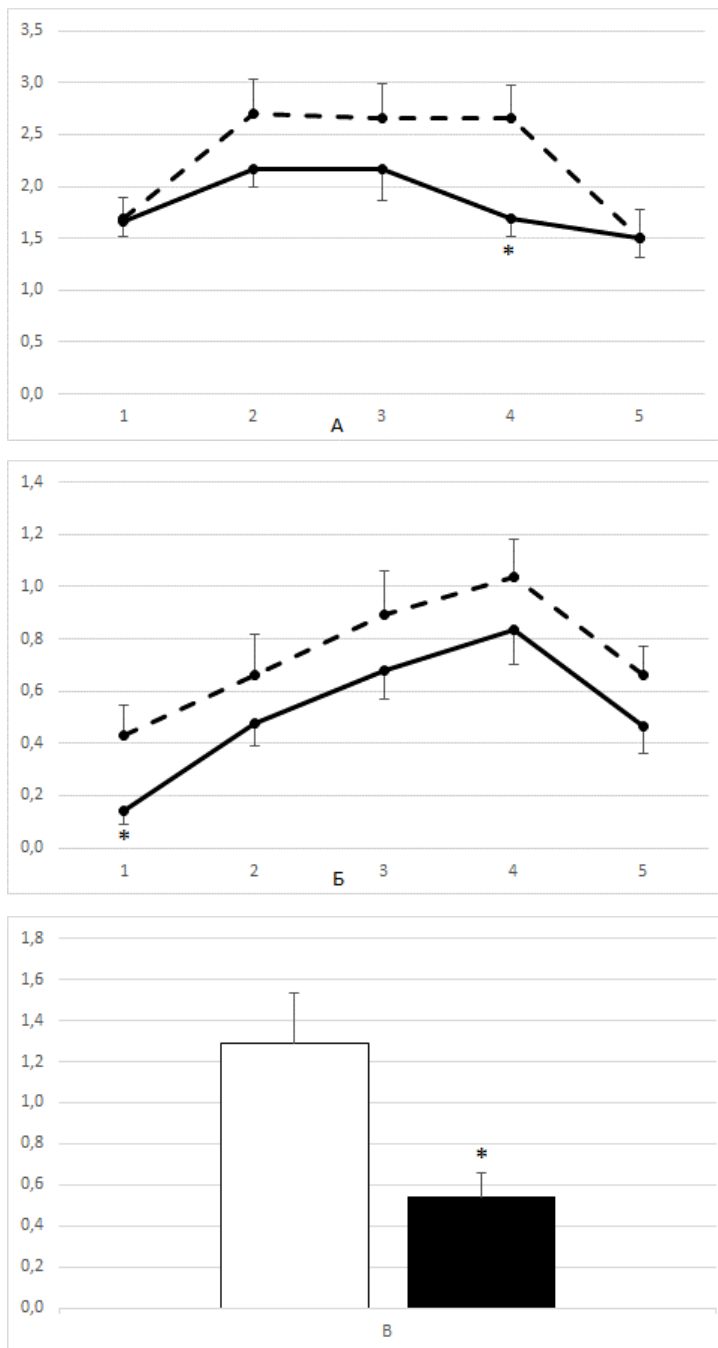


Рис. 15. Результаты теста «Открытое поле со сменой освещенности» при изучении поведения крыс линии WAG/Rij и Wistar. А – количество стоек по минутам; Б – количество обследованных норок по минутам; В – количество отходов от стенок суммарно за 5 мин теста. Возраст 21 день.

Условные обозначения: А и Б: пунктирная линия – группа «Wistar» (n=56), сплошная линия – группа «WAG/Rij» (n=84). В: белый цвет – группа «Wistar» (n=56), черный цвет – группа «WAG/Rij» (n=84). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 14. Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» при изучении поведения крыс линии WAG/Rij и Wistar. Возраст 26 дней.

Условные обозначения: «Wistar» – контрольная группа, «WAG/Rij» – опытная группа. AM – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента.

Параметры	Wistar (n=56), AM±SEM	WAG/Rij (n=84), AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период	7,4 ± 2,5	2,9 ± 0,53	0,04*
Время в закрытом рукаве	134,2 ± 3,9	168,7 ± 1,97	0,001**
Время в центре	12,6 ± 1,2	3,9 ± 1,18	0,001**
Время в открытом рукаве	32,6 ± 3,4	7,3 ± 1,42	0,001**
Выходы в центр	1,7 ± 0,2	0,4 ± 0,10	0,001**
Выход в первую половину открытого рукава	2,5 ± 0,2	0,7 ± 0,11	0,001**
Выход во вторую половину открытого рукава	0,9 ± 0,1	0,1 ± 0,04	0,001**
Суммарный выход	5,2 ± 0,5	1,2 ± 0,19	0,001**
Стойки в закрытом рукаве	7,5 ± 0,6	7,7 ± 0,49	0,75
Стойки в открытом рукаве	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,02	0,50
Стойки в центре	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,02	0,30
Стойки суммарные	7,6 ± 0,6	7,8 ± 0,49	0,83
Груминг суммарный	5,1 ± 0,4	5,4 ± 0,34	0,56
Свешивания в центре	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,06	0,001**
Свешивания в открытом рукаве	3,7 ± 0,4	1,2 ± 0,20	0,001**
Свешивания суммарные	4,5 ± 0,5	1,4 ± 0,23	0,001**
Выглядывания	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,10	0,001**
Переходы из закрытого в закрытый отсек	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,08	0,001**
Переходы из открытого в открытой отсек	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,04	0,001**

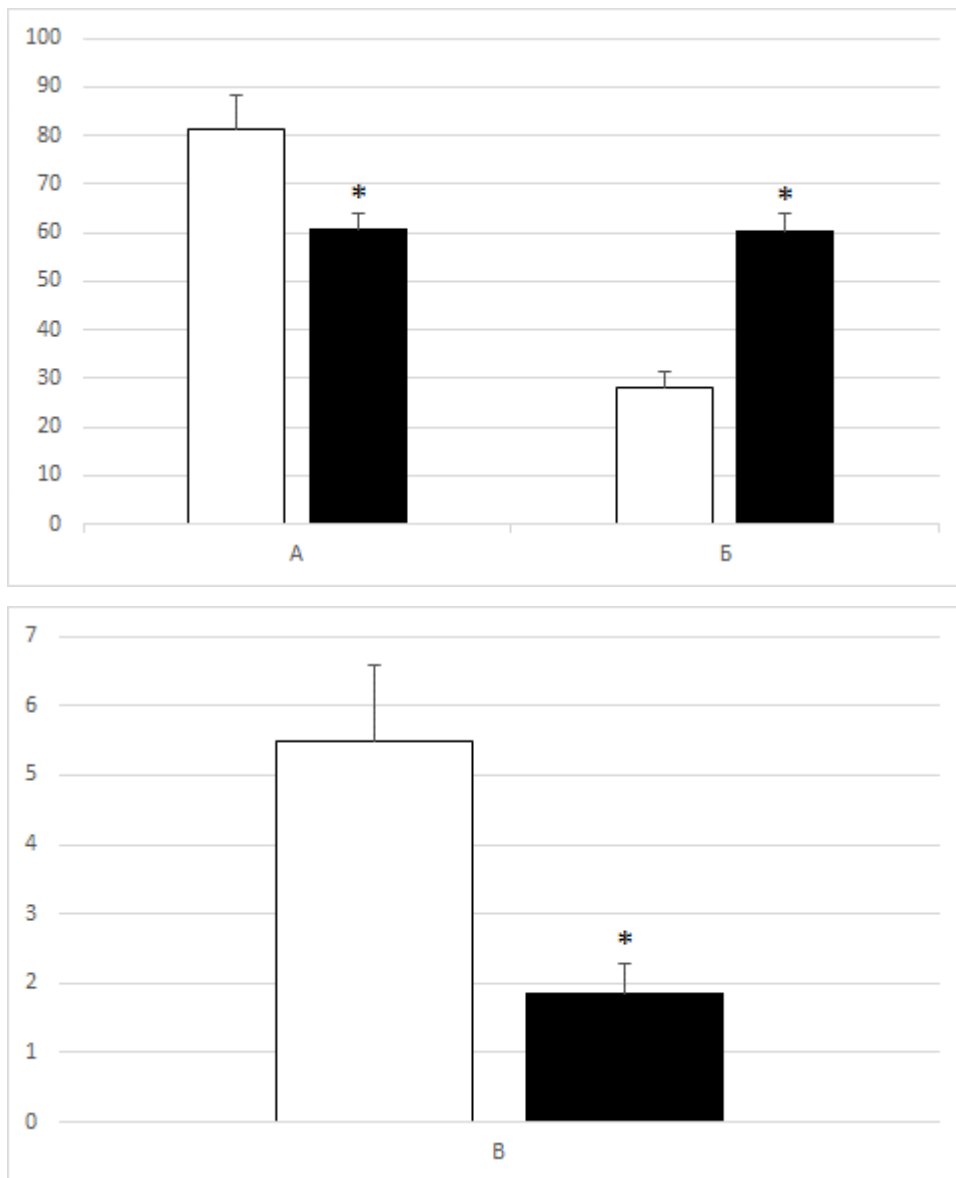


Рис. 16. Параметры зоосоциального взаимодействия в тесте «социальное поведение с мамой» при изучении поведения крыс линии WAG/Rij и Wistar. А – время в отсеке рядом с чужой самокй; Б – время в отсеке рядом с мамой; В – социальная новизна. По оси ординат: А и Б – время, с.; В – усл. ед.

Условные обозначения: белый цвет – группа «Wistar» (n=56), черный цвет – группа «WAG/Rij» (n=84). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

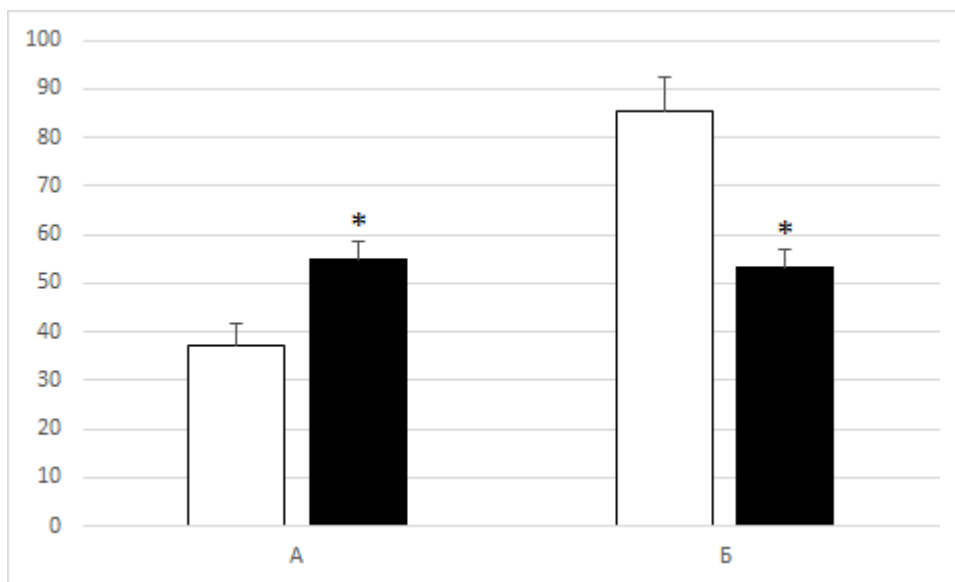


Рис. 17. Параметры зоосоциального взаимодействия в тесте «социальное поведение с сибсом» при изучении поведения крыс линии WAG/Rij и Wistar. По оси абсцисс: А – время в отсеке рядом с сибсом; Б – время в свободном отсеке Т-камеры. По оси ординат: А и Б – время, с.

Условные обозначения: белый цвет – группа «Wistar» (n=56), черный цвет – группа «WAG/Rij» (n=84). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 15. Результаты теста «Принудительное плавание» при изучении поведения крыс линии WAG/Rij и Wistar. Возраст 38 дней. Условные обозначения как в таблице 14.

Параметр	Wistar (n=56), AM±SEM	WAG/Rij (n=83), AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период 1го эпизода активного плавания, с	2,6 ± 0,6	17,8 ± 4,3	0,001**
Длительность 1го эпизода активного плавания, с	79,4 ± 4,2	47,0 ± 3,1	0,001**
Суммарная длительность активного плавания, с	135,0 ± 4,5	96,3 ± 4,4	0,001**
Среднее время активного плавания, с	44,9 ± 3,2	33,3 ± 1,9	0,001**
Латентный период иммобилизации, с	94,8 ± 5,7	78,5 ± 4,2	0,02*
Суммарное время иммобилизации, с	97,7 ± 4,9	145,6 ± 5,0	0,001**
Среднее время иммобилизации, с	26,4 ± 1,8	44,1 ± 2,5	0,001**

Таблица 16. Результаты теста «Горячая пластина» при изучении поведения крыс линии WAG/Rij. Возраст 42 дня. Измерение в с. Условные обозначения как в таблице 14.

Параметр	Wistar (n=56), AM±SEM	WAG/Rij (n=83), AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период при 1м измерении	9,1 ± 0,8	15,2 ± 0,9	0,001**
Латентный период при 2м измерении	9,5 ± 0,7	16,4 ± 0,9	0,001**
Латентный период при 3м измерении	9,2 ± 0,9	16,0 ± 0,9	0,001**
Латентный период при 4м измерении	9,1 ± 0,8	15,6 ± 1,0	0,001**
Средний латентный период рефлекса облизывания лапы	9,2 ± 0,7	15,8 ± 0,8	0,001**
Минимальный латентный период рефлекса облизывания лапы	6,7 ± 0,6	10,7 ± 0,7	0,001**
Максимальный латентный период рефлекса облизывания лапы	12,4 ± 0,8	20,0 ± 0,9	0,001**

5.6. Изучение зависимого от матери («детского») поведения крыс линии WAG/Rij

Как было сказано выше, измененная поведенческая активность крыс линии WAG/Rij традиционно обсуждается в свете возрастных изменений и проявлений пик-волновой активности в мозге. Предполагается, что в основе их депрессивноподобного статуса лежит разбалансировка серотонинергической, норадренергической и дофаминергической систем мозга. Вопросы, связанные с реакциями крысят, ориентированными на мать, раньше не рассматривались. Тем не менее, очевидно, что специфика детского поведения может не только подробнее охарактеризовать состояние ЦНС крыс линии WR, но и являться одним из факторов, обуславливающим становление патологических изменений, поскольку реципрокность отношений «мать-дитя» крайне важна для здорового развития детенышей млекопитающих. Выше показано, что «детское» поведение нарушено у ВПК-крыс, в свете чего было интересно выполнить аналогичное исследование с детенышами крыс линии WR (в том числе серию с острой инъекцией D2-блокатора клебоприда).

В данной серии экспериментов во вспомогательных тестах «детская двигательная активность» и «малое открытое поле» не было выявлено существенных различий между экспериментальной и контрольной группами крыс. Так, в первом из тестов ЛП выхода из центра круга у детенышей WR составил $72,8 \pm 4,3$ с, в контроле – $63,0 \pm 4,2$ с, ($p > 0,05$ по t-критерию Стьюдента); в малом ОП число пересеченных секторов составило $5,2 \pm 0,7$ и соответственно $4,0 \pm 0,5$ ($p > 0,05$ по t-критерию Стьюдента).

При тестировании ориентированного на мать поведения на 10-й день жизни крысят (см. таблицу 17) установлено, что у детенышей WR относительно контрольных животных меньше латентный период присасывания к соску. Среди группы WR 31 крысенок из 75 присосался к соску, среди группы Wistar – 15 из 58. При этом у потомства «депрессивных» крыс WR по сравнению с потомством Wistar на 73% меньше время контакта с матерью, на 52% – число стоек, на 45% – число актов груминга.

При тестировании ориентированного на мать поведения на 15-й день жизни крысят (таблица 18) обнаружено, что у потомства крыс линии WAG/Rij

относительно контрольных животных по-прежнему достоверно меньше латентный период присасывания к соску. При этом лишь 1 из 74 крыс из группы WR провела рядом с матерью более 40 с, в то время как в контроле таких крыс было 9 из 58 ($p < 0,01$ точный критерий Фишера). Кроме того, ни одно животное из экспериментальной группы не выполнило более 7 подталкиваний матери, тогда как в контроле таких крыс было 3 из 58 ($0,05 < p < 0,10$, тенденция по точному критерию Фишера). Наконец потомство крыс линии WAG/Rij совершило на 35% меньше стоек.

При введении в возрасте 15 дней клебоприда в дозе 0,1 мг/кг за 20 мин до тестирования «детского» поведения (таблица 19) было установлено, что у детенышей WAG/Rij, получавших препарат, по сравнению с крысятами WAG/Rij, получавших растворитель, происходит ряд значимых изменений. Показано, что после инъекции D2-антагониста становится больше латентный период полуобхода тела матери (на 32%), латентный период присасывания к соску матери (на 14%) и число актов груминга (на 50%), а также меньше число подталкиваний (на 40%).

Интересно, что на ЛП полуобхода и ЛП присасывания потомства «нормальных» крыс Wistar клебоприд в использованной дозе практически не повлиял. Результаты представлены на рисунке 18. Другими словами, клебоприд оказывает более сильное подавляющее влияние на поведенческие показатели, характеризующие «детскую привязанность» (стремление находиться в контакте с матерью) у детенышей «депрессивных» крыс линии WAG/Rij.

По результатам данной серии экспериментов можно заключить, что у крыс WR относительно животных линии Wistar на фоне равной базовой двигательной активности снижена мотивация находиться в контакте с матерью. Вероятно, это свидетельствует о раннем наличии патологического состояния; учтем также, что сама по себе сниженная детская мотивация может являться фактором дальнейшего развития негативных процессов. Отдельный интерес для обсуждения представляет сравнение между собой показателей детского поведения ВПК-крыс и крыс линии WR.

Таблица 17. Результаты теста «Детско-материнское взаимодействие» на 10-й день жизни при изучении поведения крыс линии WAG/Rij.

Условные обозначения: «Wistar» – контрольная группа, «WAG/Rij» – опытная группа. AM – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. \$ - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по точному критерию Фишера.

Поведенческие показатели	Wistar (n=58) AM±SEM	WAG/Rij (n=75) AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период полуобхода тела матери в среднем за 3 мин	46,4 ± 2,2	45,7 ± 1,6	0,79
Латентный период присасывания к соску на 1-й мин	59,2 ± 0,5	56,5 ± 1,1	0,051
Латентный период присасывания к соску на 2-й мин	59,3 ± 0,5	51,2 ± 1,6	0,001\$
Латентный период присасывания к соску на 3-й мин	56,0 ± 1,2	51,9 ± 1,1	0,07
Латентный период присасывания к соску в среднем за 3 мин	58,1 ± 0,5	53,2 ± 0,7	0,001\$
Латентный период перелезания через тело матери в среднем за 3 мин	57,4 ± 0,7	57,2 ± 0,3	0,90
Время контакта с матерью на 1-й мин	2,4 ± 0,8	0,6 ± 0,6	0,01*
Время контакта с матерью на 2-й мин	3,0 ± 0,9	1,3 ± 0,2	0,11
Время контакта с матерью на 3-й мин	4,3 ± 1,3	0,7 ± 0,7	0,001**
Время контакта с матерью суммарно за 3 мин	9,8 ± 2,3	2,6 ± 1,2	0,001**
Время отхода от матери суммарно за 3 мин	7,8 ± 2,0	12,3 ± 0,1	0,14
Число подталкиваний суммарно за 3 мин	4,0 ± 0,4	3,6 ± 0,1	0,36
Число стоек суммарно за 3 мин	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,001**
Число актов груминга суммарно за 3 мин	3,3 ± 0,4	1,8 ± 0,3	0,001**

Таблица 18. Результаты теста «Детско-материнское взаимодействие» на 15-й день жизни при изучении поведения крыс линии WAG/Rij.

Условные обозначения: «Wistar» – контрольная группа, «WAG/Rij» – опытная группа. AM – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. \$\$ - $p < 0,05$ по критерию Фишера. \$ - $0,05 < p < 0,10$, тенденция по точному критерию Фишера.

Поведенческие показатели	Wistar (n=58) AM±SEM	WAG/Rij (n=75) AM±SEM	P, Стьюдент
Латентный период полуобхода тела матери в среднем за 3 мин	32,3 ± 2,3	30,4 ± 1,8	0,50
Латентный период присасывания к соску на 1-й мин	57,5 ± 1,2	56,4 ± 1,0	0,46
Латентный период присасывания к соску на 2-й мин	55,1 ± 1,7	51,9 ± 1,6	0,17
Латентный период присасывания к соску на 3-й мин	56,7 ± 1,2	47,6 ± 2,0	0,001**
Латентный период присасывания к соску в среднем за 3 мин	56,4 ± 1,2	52,0 ± 1,1	0,01*
Латентный период перелезания через тело матери в среднем за 3 мин	56,6 ± 0,8	57,4 ± 0,8	0,49
Время контакта с матерью суммарно за 3 мин	13,7 ± 3,2	6,8 ± 2,2	0,07\$\$
Время отхода от матери суммарно за 3 мин	23,8 ± 4,2	22,2 ± 3,1	0,76
Число подталкиваний на 1-й мин	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,56
Число подталкиваний на 2-й мин	0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,01*
Число подталкиваний на 3-й мин	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,28
Число подталкиваний суммарно за 3 мин	2,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,06\$
Число стоек суммарно за 3 мин	2,3 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,02*
Число актов груминга суммарно за 3 мин	1,4 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,29

Таблица 19. Результаты теста «Детско-материнское взаимодействие» на 15-й день жизни при изучении поведения крыс линии WAG/Rij с введением D2-блокатора клебоприда.

Условные обозначения: «WR+P» – контрольная подгруппа крыс линии WAG/Rij, получавшая инъекцию растворителя. «WR+K» – опытная подгруппа крыс линии WAG/Rij, получавшая в/б инъекцию клебоприда в дозе 0,01 мгк/кг. AM – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента.

Поведенческие показатели	WR+P (n=58) AM±SEM	WR+K (n=75) AM±SEM	P Стьюдент
Латентный период полуобхода тела матери на 1-й мин	27,4 ± 4,3	29,8 ± 4,2	0,69
Латентный период полуобхода тела матери на 2-й мин	31,2 ± 4,2	41,3 ± 4,0	0,08
Латентный период полуобхода тела матери на 3-й мин	29,6 ± 4,2	45,6 ± 3,8	0,001**
Латентный период полуобхода тела матери в среднем за 3 мин	29,4 ± 3,1	38,9 ± 2,8	0,02*
Латентный период присасывания к соску на 1-й мин	48,6 ± 2,8	52,1 ± 2,5	0,36
Латентный период присасывания к соску на 2-й мин	49,9 ± 2,8	57,4 ± 1,4	0,02*
Латентный период присасывания к соску на 3-й мин	47,0 ± 3,3	55,7 ± 1,9	0,02*
Латентный период присасывания к соску в среднем за 3 мин	48,5 ± 1,9	55,1 ± 1,6	0,01*
Латентный период перелезания через тело матери в среднем за 3 мин	56,8 ± 1,4	57,3 ± 1,0	0,75
Время контакта с матерью суммарно за 3 мин	5,0 ± 2,1	7,2 ± 2,3	0,47
Время отхода от матери суммарно за 3 мин	12,9 ± 3,3	18,9 ± 4,1	0,27
Число подталкиваний суммарно за 3 мин	2,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2	0,03*
Число стоек суммарно за 3 мин	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,16
Число актов груминга суммарно за 3 мин	1,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4	0,01*

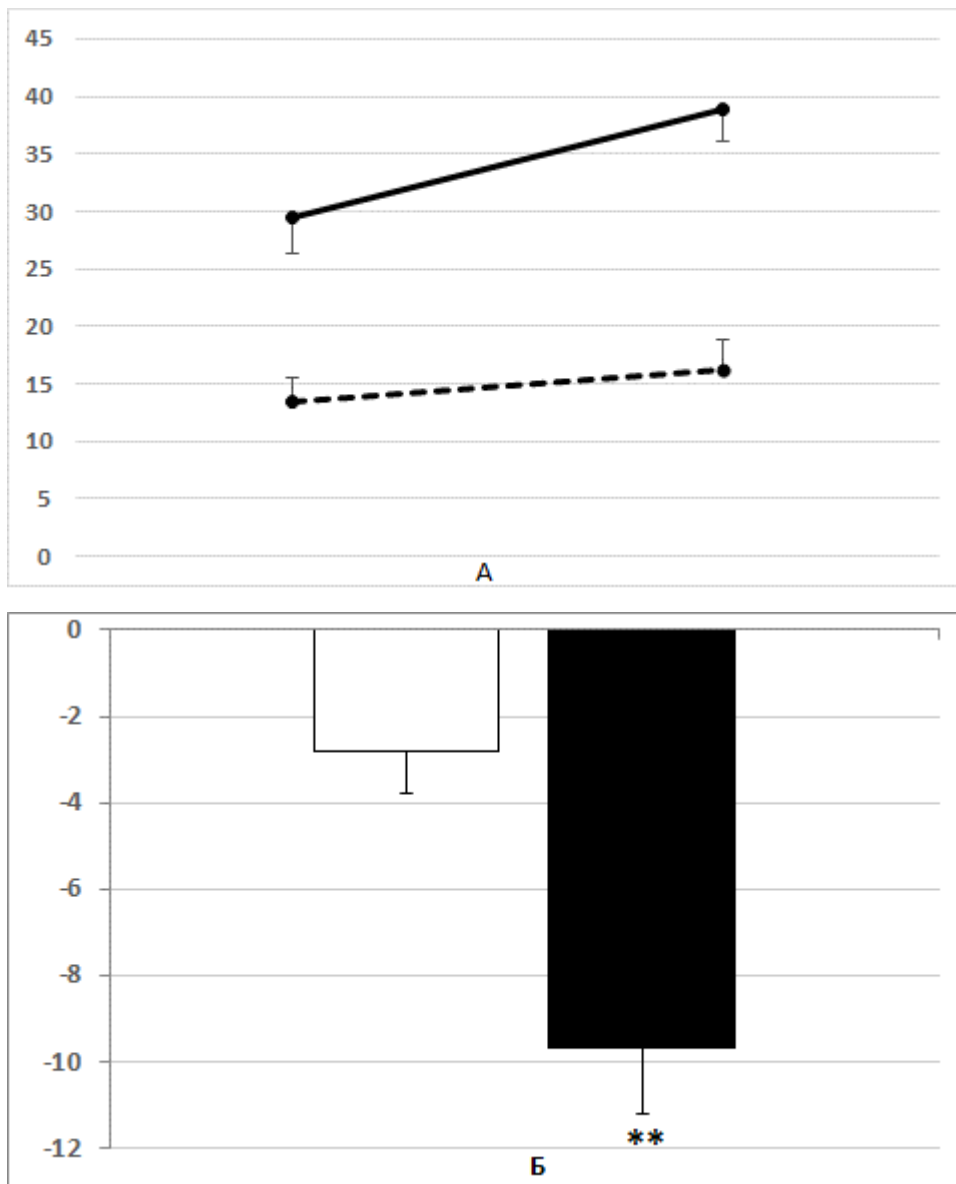


Рис. 18. Средний латентный период полуобхода тела матери в тесте «Детско-материнское взаимодействие» на 15-й день жизни. А – абсолютные значения до и после введения клебоприда (0,1 мг/кг). Б – дельта «до-после» введения препарата. По оси ординат – время, с.

Условные обозначения: пунктирная линия и белый цвет – подгруппа контрольных животных, получавших клебоприд (n=35); сплошная линия и черный цвет – подгруппа крыс линии WAG/Rij, получавших клебоприд (n=39). ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

5.7. Изучение когнитивных функций у крыс линии WAG/Rij

Целью данной экспериментальной серии стало исследование способности взрослых крыс линии WAG/Rij к обучению. Коморбидность депрессии и когнитивных расстройств часто наблюдается в клинической практике, но экспериментальных работ по изучению способности к обучению в «сложном лабиринте» с крысами линии WR еще не проводилось.

В первую очередь нами был проведен тест «открытое поле со сменой освещенности». В целом, крысы WAG/Rij вели себя активнее в условиях новой, стрессогенной обстановки по сравнению с крысами Wistar. У них значимо меньше латентный период выхода из центра: в группе крыс WAG/Rij он составил $2,3 \pm 0,3$ с, в группе крыс Wistar – $14,4 \pm 2,6$ с ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Также у крыс линии WAG/Rij больше горизонтальная двигательная активность: пробег у стенок арены составил $101,3 \pm 3,9$ секторов против $59,9 \pm 8,1$ в контроле ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Однако при этом значимых отличий по пробегу в центре арены не обнаружено. С другой стороны, по параметрам, свидетельствующим об уровне исследовательской активности (число стоек, отходов от стенок арены и выходов в центр) достоверных различий обнаружено не было. Особое внимание на себя обращают показатели начального этапа тестирования. На 1-й минуте у крыс линии WAG/Rij достоверно увеличены пробег у стенок арены, пробег в центре арены, число стоек и число отходов от стенок по сравнению с крысами Wistar (см. рис. 19). Таким образом, крысы линии WAG/Rij гораздо интенсивнее реагируют на помещение в стрессогенную обстановку по сравнению с крысами Wistar. Также интересна динамика изменения горизонтальной активности у стенок арены по минутам тестирования. В течение первых 3-х минут крысы линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar пробежали значимо больше секторов ($p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента). Вместе с тем, на 4-й минуте, когда освещение менялось с яркого света на красный, менее стрессогенный, значение пробега выравнивалось (см. рис. 20). Мы предполагаем, что полученные результаты скорее указывают на повышенный уровень тревожности у крыс линии WR, нежели повышенную исследовательскую активность.

Затем проводилось тестирование в «сложном пищевом лабиринте» (СПЛ), которое включало себя выполнение прямой (обучение) и обратной (переучивание)

задач. Выполнение прямой задачи ассоциировано с пространственной памятью и функционированием гиппокампа, выполнение обратной задачи – с деятельностью префронтальной коры. Также очень важным показателем для успешного выполнения теста является уровень пищевой мотивации экспериментальных животных, их эмоциональное состояние. Обучение и переучивание проводилось вплоть до достижения животными критерия обученности, который составил не менее 4-х реакций из 5-ти посадок в день в течение 2-х дней подряд. Суммарное время тестирования составило 12 дней, в табл. 20 и 21 приводятся показатели в день достижения критерия обученности. Полученные данные при выполнении прямой задачи в СПЛ представлены в таблице 20. Необходимо отметить, что скорость достижения критерия была разной у крыс разных групп. 100% крыс Wistar обучились к 5-му дню тестирования, в группе WAG/Rij таких животных не было. В среднем крысы WAG/Rij достигли критерия обученности при выполнении прямой задачи на 7-8 день. 4 крысы WAG/Rij так и не достигли критерия обученности и были исключены из эксперимента при проведении переучивания. К тому же средняя величина латентного периода выхода из 1-го отсека в опыте была увеличена на 56%, а время выполнения реакции – на 58% относительно контроля. При этом у крыс линии WAG/Rij было значимо увеличено число стоек и ошибок, что, по всей видимости, связано с тем, что в лабиринте они проводили гораздо больше времени, чем крысы Wistar. В таблице 21 представлены результаты, полученные при проведении переучивания. Необходимо отметить, что с выполнением обратной задачи животные WAG/Rij справились лучше, чем с выполнением прямой: 16 из 19 крыс переучились на 2й день. Все 11 крыс Wistar также справились с задачей на 2й день тестирования. При этом величина латентного периода выхода из 1го отсека в группе WAG/Rij была повышена на 67%, а время реакции – на 65% относительно контроля ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Число стоек и ошибок у крыс линии WAG/Rij при переучивании оказалось больше, чем у Wistar, как и при обучении. Скорее всего, это вновь связано с количеством времени, проведенного в лабиринте.

После завершения обучения в «сложном лабиринте» проводили тест на конфликт пищевой и оборонительной мотивации – тест «novelty suppressed feeding». Величина латентного периода нахождения пищи в новой обстановке

среди крыс линии WAG/Rij составила в среднем $92,3 \pm 8,2$ с, тогда как в контроле она равнялась $49,5 \pm 4,9$ с ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). Кроме того у крыс линии WAG/Rij было снижено потребление корма в условиях домашней клетки: в опыте данная величина составила в среднем $2,3 \pm 0,3$ г корма, в контроле – $4,3 \pm 0,4$ г ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента).

Следующим тестом в рамках данной экспериментальной серии был тест Порсолта («принудительное плавание»). Из полученных данных видно, что крысы линии WAG/Rij демонстрируют все типичные признаки депрессивноподобных нарушений в поведении. У них увеличен латентный период 1-го эпизода активного плавания: в опыте он равен $8,7 \pm 1,3$ с, в контроле – $1,4 \pm 0,2$ с ($p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента). При этом сам 1-й эпизод активного плавания был значимо короче: у крыс линии WAG/Rij он уменьшен на 64% по сравнению с крысами Wistar. Очень характерным было увеличение времени иммобилизации: у крыс линии WAG/Rij этот показатель на 22% превысил контрольное значение. Также нами было обнаружено, что среди крыс Wistar было 5 животных, время пассивного плавания которых составило более 100 секунд, тогда как в опытной группе ни одной такой особи не было ($p < 0,01$ по критерию хи-квадрат). Результаты представлены на рисунке 21.

Заключительным в данной серии экспериментов стал тест «горячая пластина», позволяющий определить болевые пороги экспериментальных животных. Достоверных, и даже каких-либо заметных, различий между опытной и контрольной группами обнаружено не было.

Таким образом, нами были выявлены характерные депрессивноподобные нарушения в поведении линейных крыс WAG/Rij, такие как повышенное время иммобилизации, укороченный 1-й эпизод активного плавания, а также сниженное число актов груминга, что соответствует таким симптомам депрессивных больных, как подавленное настроение и ангедония. На фоне подобных изменений был выполнен тест на обучение и переучивание с положительным пищевым подкреплением, по результатам которого обнаружены когнитивные нарушения у крыс WAG/Rij, коморбидные с депрессивными нарушениями. Основываясь на литературных данных эти нарушения можно связать с уровнем дофамина в мозге животных (см. раздел «Обсуждение результатов»).

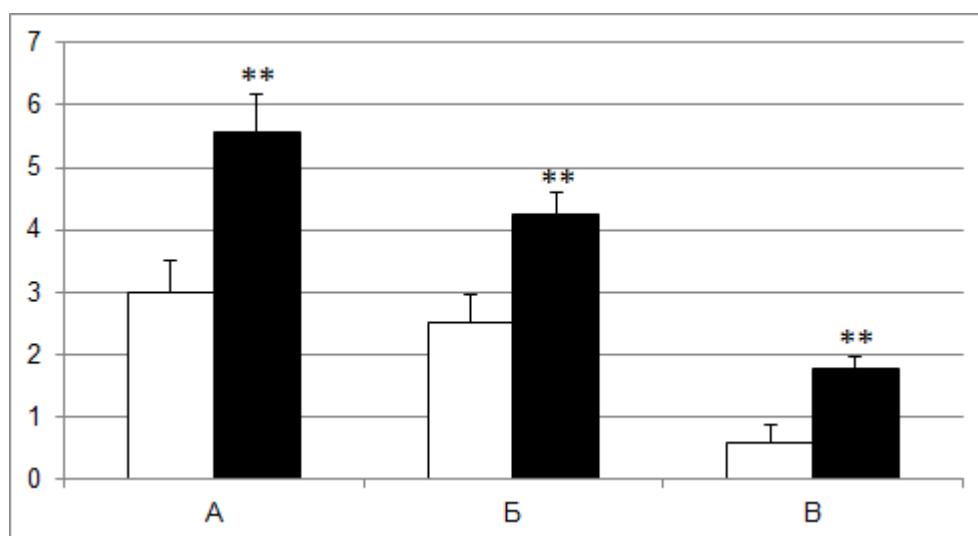


Рис. 19. Ряд параметров поведенческой активности в тесте «открытое поле со сменой освещенности» на 1-й минуте тестирования у крыс линии WAG/Rij и Wistar А – пробег в центре арены, Б – число стоек, В – отходы от стенок арены.

Условные обозначения: белый цвет – группа контрольных крыс линии Wistar (n=10), черный цвет – группа опытных крыс линии WAG/Rij (n=23). ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

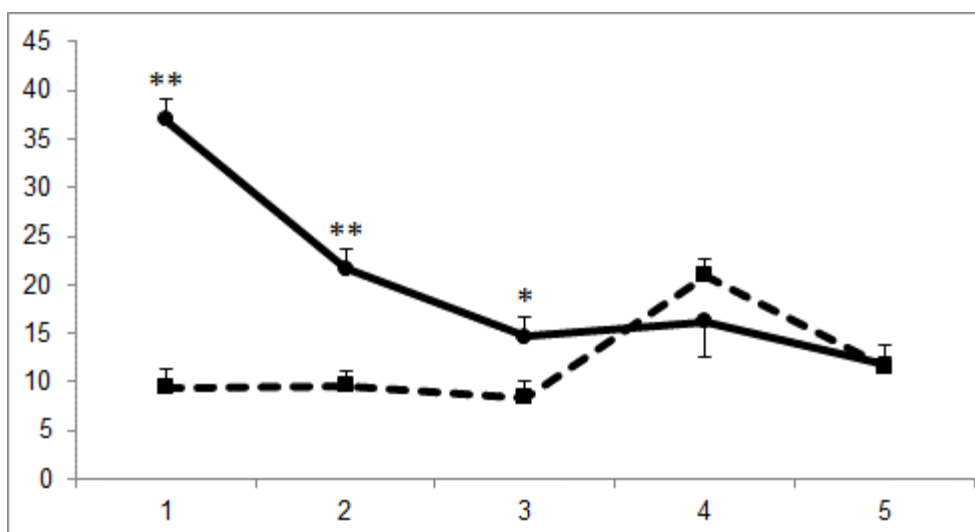


Рис. 20. Пробег у стенок арены «открытого поля» по минутам тестирования у крыс линии WAG/Rij и Wistar. По оси абсцисс – минуты тестирования.

Условные обозначения: пунктирная линия – группа контрольных крыс линии Wistar (n=10), сплошная линия – группа опытных крыс линии WAG/Rij (n=23). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

Таблица 20. Обучение самцов крыс в «сложном пищевом лабиринте».

Условные обозначения: «Wistar» – контрольная группа, «WAG/Rij» – опытная группа. AM – средняя величина показателя; SEM – стандартная ошибка среднего. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по критерию хи-квадрат.

Параметр	Wistar (n=11), AM± SEM	WAG/Rij (n=19), AM± SEM	P, Стьюдент
День достижения критерия обученности	5,0 ± 0,0	7,6 ± 0,3	0,001#
Латентный период	13,2 ± 3,5	30,3 ± 4,4	0,01*
Время реакции	32,4 ± 7,3	76,3 ± 8,5	0,001**
Стойки	1,9 ± 0,5	4,7 ± 0,7	0,01*
Ошибки	2,1 ± 0,3	4,3 ± 0,3	0,001**
Грумминг	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,64
Количество выполненных реакций	4,9 ± 0,1	4,6 ± 0,1	0,10

Таблица 21. Переучивание самцов крыс в «сложном лабиринте». Условные обозначения как в таблице 20.

Параметр	Wistar (n=11), AM± SEM	WAG/Rij (n=19), AM± SEM	P, Стьюдент
День достижения критерия обученности	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,09	0,17
Латентный период	7,9 ± 1,7	23,8 ± 2,8	0,001**
Время реакции	19,5 ± 3,9	56,9 ± 6,2	0,001**
Стойки	1,2 ± 0,4	4,0 ± 0,5	0,001**
Ошибки	2,0 ± 0,4	4,2 ± 0,6	0,02*
Грумминг	0,1 ± 0,03	0,6 ± 0,1	0,02*
Количество выполненных реакций	5,0 ± 0,0	4,9 ± 0,07	0,28

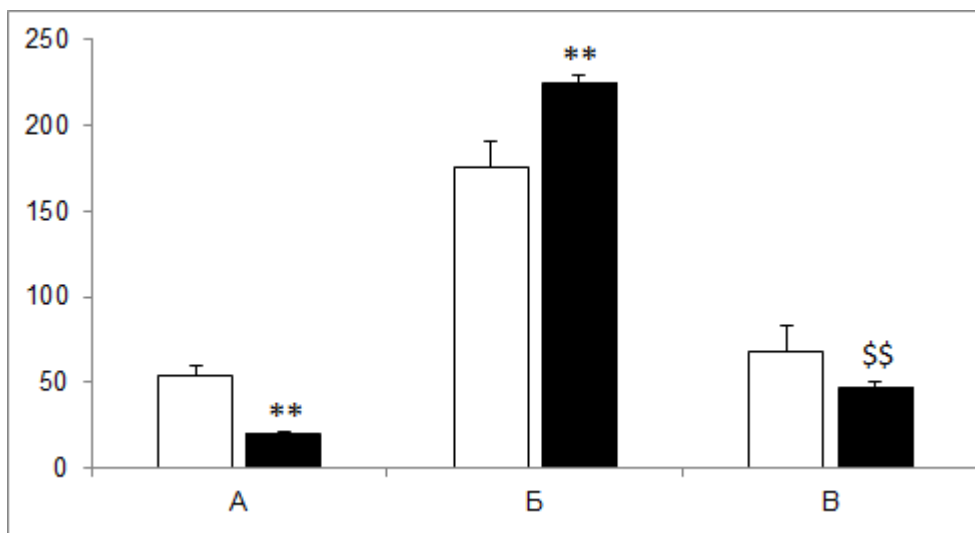


Рис. 21. Ряд показателей поведения в тесте Порсолта у крыс линии WAG/Rij и Wistar. А – длительность 1-го эпизода активного плавания, Б – суммарное время иммобилизации, В – суммарное время пассивного плавания. По оси ординат – время, с.

Условные обозначения: белый цвет – группа контрольных крыс линии Wistar (n=10), черный цвет – группа опытных крыс линии WAG/Rij (n=23). ** - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по t-критерию Стьюдента. \$\$ - отличие от контрольной группы с $p < 0,01$ по критерию хи-квадрат. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM).

5.8. Модель депрессивноподобного состояния с использованием хронического введения клебоприда в дозе 0,4 мг/кг

Данные, полученные в экспериментах с крысами линии WAG/Rij, а также некоторые литературные данные, указывают на вовлеченность дофаминергической системы мозга в формировании патологического депрессивноподобного состояния. Несмотря на то, что в формировании депрессии ключевую роль отводят системе серотонина, использование фармакологического подхода для экспериментальной проверки вклада других нейромедиаторных систем представляет отдельный интерес. Нами была предпринята попытка достаточно специфического воздействия на систему дофамина с использованием хронического в/б введения селективного D2-антагониста клебоприда.

Был проведен тест на потребление раствора сахарозы, который позволяет оценить гедонический статус крыс и выявить таким симптом депрессивных изменений, как ангедонию. Достоверные различия появляются после 6-й инъекции клебоприда, т.е. на 7-й день проведения сахарозного теста: в опытной группе было 7 животных, которые выпили не более 3,6 г раствора сахарозы, в то время как в контроле таких животных было только 2 ($p=0,03$ по критерию хи-квадрат). На 9-й день тестирования в опытной группе остается 6 животных, которые потребляют не более 20% среднего уровня потребления раствора сахарозы в контроле, тогда как среди контрольных животных таких уже нет ($p=0,01$ по критерию хи-квадрат). На следующий день среднее потребление раствора сахарозы среди животных опытной группы было в 2 раза ниже по сравнению с контролем. Аналогичные различия были зарегистрированы на 12-й день: потребление сахарозы опытными животными равнялось было ниже на 43%. При этом значимых различий по изменению массы тела животных между контролем и опытом не было обнаружено.

По результатам теста «принудительное плавание» у крыс, получавших инъекции блокатора, время иммобилизации составило $61,1 \pm 9,2$ с, а в контроле – $37,9 \pm 8,1$ с ($p=0,09$). Различий в тесте «novelty suppressed feeding» обнаружено не было: опытные животные потребляли $2,4 \pm 0,2$ г корма, а контрольные – $2,6 \pm 0,3$. В динамике изменения массы тела животных нами был обнаружен некоторый продепрессантный эффект. Достоверные различия проявились на 7-й день серии, т.е. после 6-го укола препарата, и сохранялись, практически, до конца

экспериментов. На протяжении этого периода в контрольной группе было 5 крыс, которые весили не менее 290 гр., тогда как в опыте таких животных не было.

Полученные данные подтверждают принципиальную возможность моделирования депрессивноподобного поведения при помощи антагонистов клебоприда, но, безусловно, необходимо дальнейшее изучение этого вопроса.

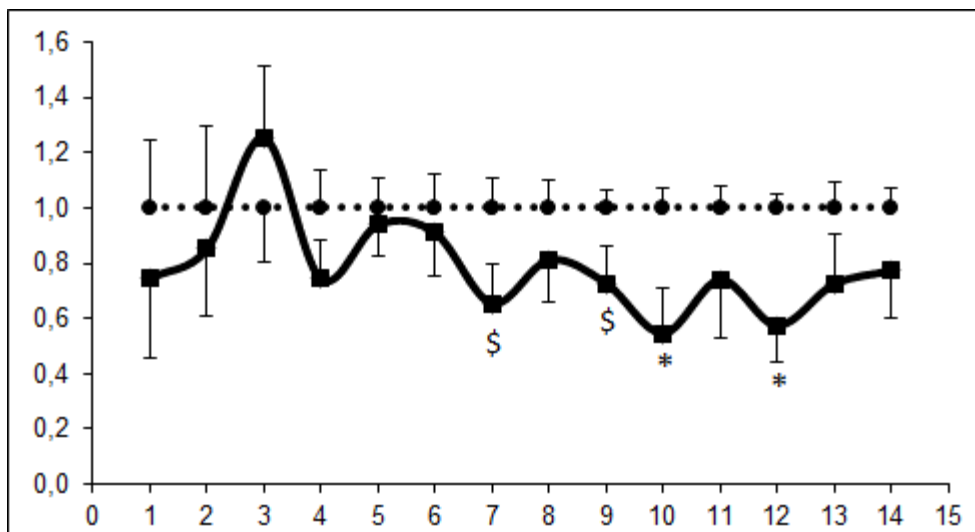


Рис. 22. Динамика потребления раствора сахарозы. По оси абсцисс: дни проведения теста. По оси ординат – вес выпитого раствора сахарозы, г.

Условные обозначения: пунктирная линия – группа контрольных крыс линии Wistar (n=11), сплошная линия – группа опытных крыс линии Wistar, получавших инъекции клебоприда (n=23). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. \$ - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию хи-квадрат. Планки погрешностей – стандартная ошибка среднего (SEM). Значения в контрольной группе нормированы.

6. Обсуждение результатов

6.1. Оценка поведения белых крыс в модели фетального вальпроатного синдрома

Экспериментальная модель фетального вальпроатного синдрома на грызунах, в которой используется введение высоких доз солей вальпроевой кислоты в пренатальном периоде, на данный момент признана учеными и клиническими специалистами во всем мире и считается одной из самых адекватных моделей расстройств аутистического спектра (Christensen et al., 2013; Chomiak et al., 2013). Большое количество нейробиологических работ позволяют сформулировать весьма точный критерий определения РАС на данной модели и целый список изменений состояния ЦНС, выражающихся на морфологическом, нейромедиаторном и поведенческом уровнях. Сразу стоит отметить, что результаты, полученные в нашей исследовании и представленные в разделе 5.1, подтверждают способность высокой дозы ВПК вызывать развитие фетального вальпроатного синдрома у потомства, а также дополняют и расширяют данные о нарушениях в работе мозга. Сравним известные из литературы данные, подробно изложенные в одной из последних обзорных статей (Gottfried et al., 2013), с результатами, полученными нами.

1. Традиционно и с учетом клинической картины основным критерием РАС являются изменения в социальном взаимодействии. Было известно, что у потомства крыс с ФВС снижается «игровое» зоосоциальное поведение (Schneider et al., 2005). Нами была использована методика, позволяющая оценить другой компонент социальных реакций – стремление к социальной новизне. Подчеркнем, что, в сравнении с работой Schneider с соавторами, которые изучали игровые реакции и оценивали взаимодействие крысят одного выводка, использованная нами методика направлена на анализ существенно иного компонента внутривидового поведения – стремления к расширению социальной активности, к новым контактам, выходящим за рамки «своей семьи». Снижение данной мотивации было выявлено нами у крысят как в ситуации выбора между матерью и незнакомой самкой, так и между сибсом и чужаком.

2. Также у крыс с ФВС ранее было выявлено повышение повторяющегося, стереотипичного движения и гипердвижение в новой, стрессогенной обстановке (Narita et al., 2010). Подобную реакцию связывают с анксиогенными эффектами ВПК. Результаты наших экспериментов подтверждают это предположение и указывают на значительное повышение уровня тревожности экспериментальных животных. Под влиянием ВПК происходит смещение баланса мотиваций от исследовательской компоненты в сторону роста уровня тревожности. Полученные нами результаты согласуются с последними данными литературы, указывающими, что ВПК-крысы демонстрируют значительное уменьшение интенсивности исследовательской активности и повышенную скорость привыкания к окружающей обстановке, что является еще одним характерным нарушением работы ЦНС (Olexova et al., 2013).

3. В упомянутых выше обзорах (Christensen et al., 2013; Gottfried et al., 2013) указывается на то, что у крыс после пренатального введения ВПК усиливается генерализация страха и снижается способность к обучению в радиальном лабиринте. Нами было продемонстрировано, что при обучении с отрицательным (болевым) подкреплением, консолидация навыка пассивного избегания у крыс с ФВС не затруднена относительно здоровых животных. Вероятно, из-за высокого базового уровня тревожности нарушения в способности к обучению при болевом подкреплении не проявляются. В литературе широко обсуждается вовлеченность миндалины в характерные поведенческие нарушения при ВПК-модели. Предполагается, что именно изменения в работе миндалины обуславливают аномальную реакцию страха, повышенную тревожность и отклонения в социальном взаимодействии при РАС. По всей видимости, молекулярные механизмы перечисленных событий связаны с функционированием, прежде всего, серотонинергической системы мозга. Серотонинергические проекции в миндалине могут играть важную роль в развитии РАС (Wang et al., 2013). Результаты недавних исследований также показывают, что при пренатальном воздействии ВПК усиливается долговременная потенция, связанная с краткосрочной и долгосрочной синаптической пластичностью. Предполагается, что одним из механизмов, лежащих в основе симптомов аутизма,

может быть рост синаптической пластичности в медиальной префронтальной коре (Sui et al., 2012).

4. Также полученные нами результаты подтверждают имеющиеся в литературе сообщения об изменении болевой чувствительности животных на модели РАС. Вальпроевая кислота вызывает снижение болевой чувствительности, т.н. гипоальгезию. Необходимо отметить, что специальный контроль температуры тела животных нами не проводился, но в литературе нам не удалось обнаружить сообщений об изменениях терморегуляции у крыс с ФВС. В работе Kerr с соавторами (2013) показано, что в данной модели аутизма происходит существенное изменение функционирования эндоканнабиноидной системы. Так, наблюдается снижение экспрессии мРНК одного из ферментов синтеза каннабиноидов диацилглицерол-липазы α , которое может обуславливать гипоальгезию.

5. Одним из критерием модели РАС является замедленное созревание и развитие ЦНС у потомства. Потомство самок крыс, подвергнутых воздействию ВПК, имело меньшую массу мозга в 1 и 14 дни постнатального развития, а также аномальную реакцию поиска гнезда в тесте на ольфакторную дискриминацию на 10-й день жизни. Также отмечается, повышенный процент крысят с физическими уродствами и приростом массы тела (Favre et al., 2013). По результатам нашей работы можно заключить, что инъекция высокой дозы ВПК вызывает нарушения психомоторного развития у потомства: замедление созревания рефлекса переворота со спины на лапы, более позднее открытие глаз, пониженную реактивность к тактильным стимулам, но не затрагивает при этом развитие моторных навыков.

6. Относительно новыми обнаруженными эффектами являются депрессивноподобные изменения в поведении у крыс после инъекции ВПК. Снижение активной поведенческой компоненты и повышение пассивной в тесте «принудительное плавание» является классическим критерием депрессивных расстройств.

7. Также интересным наблюдением является тот факт, что практически во всех тестах у животных опытной группы снижено число актов груминга и

вертикальная двигательная активность. Это еще раз свидетельствует о повышении уровня тревожности, а также об измененном эмоциональном состоянии.

Таким образом, исходя из полученных данных и сравнения с литературой, можно заключить, что на первом этапе работы нам удалось успешно повторить и адаптировать ВПК-модель. Мы зарегистрировали большинство известных эффектов, по которым эта модель была охарактеризована, как модель аутизма на крысах. У детенышей крыс отмечены нарушения психомоторного развития и задержка развития нервной системы уже в раннем постнатальном периоде. Также наблюдается снижение ориентировочно-исследовательской активности и рост уровня тревожности, изменения в зоосоциальном взаимодействии, повышение уровня депрессивности, изменение болевой чувствительности. Изменения данных параметров поведения может свидетельствовать о нарушении таких отделов мозга, как средний мозг, мозжечок, задний мозг, таламус и лимбическая система, а также об изменениях в ряде нейромедиаторных систем. Наблюдаемый комплекс поведенческих изменений позволяет отнести моделируемый фетальный вальпроатный синдром к расстройствам аутистического спектра и подтверждает состоятельность гипотезы о том, что введение высокой дозы ВПК в пренатальном периоде является экспериментальной моделью РАС.

ВПК, по данным литературы, помимо негативного влияния на поведенческие особенности животных и человека обладает целым рядом тератогенных эффектов (Markram et al., 2007; Zaki et al., 2010; Christensen et al., 2013). В их числе дефекты сердечно-сосудистой системы; аномалии скелетных конечностей; дефекты мочеполовой системы; аномалии респираторного тракта; кожные аномалии; изменение черт лица; глазные аномалии. К дефектам в развитии ЦНС часто относят незакрытие нервной трубки, анэнцефалию, гидранэнцефалию, арахноидальную кисту, церебральную атрофию, синдром Дэнди-Уокера.

Множественность эффектов вальпроевой кислоты может быть связана с целой совокупностью механизмов ее тератогенного воздействия. Во-первых, ВПК способна влиять на процессы транскрипции различных генов, т.к. напрямую ингибирует гистондеацетилазы (Chen et al., 2007). Активность процесса транскрипции зависит от того, в какой форме существует хроматин на данном участке цепи: как гетерохроматин (конденсированная неактивная форма) или как

эухроматин. Переходы между этими состояниями зависят от гистон-ацетилтрансфераз (НАТs), действие которых приводит к релаксации нуклеосомной структуры и активации транскрипции генов, и от гистондеацетилаз (HDACs), приводящих к противоположным эффектам. Таким образом, ВПК, ингибируя гистондеацетилазы, приводит к гиперацетилированию гистонов и усилению экспрессии генов. Показано, что вальпроевая кислота действует именно на те ферменты, для которых характерны нейрональные функции, что может объяснять эффекты ВПК, связанные с мозговыми патологиями. Также предполагается, что ВПК способна изменять процессы метилирования - деметилирования ДНК и уменьшает экспрессию белков, ассоциированных с хроматином, например, SMCs 1-6, DNMT1, HP1. Эффектом подобного влияния является деконденсация хроматина (Lunke et al., 2009).

Среди предполагаемых генов-мишеней и их продуктов, которые могут быть подвержены модулирующему воздействию ВПК, называют следующие (Iacomino et al., 2008; Gurpur et al., 2009; Rouillet et al., 2010; Stodgell et al., 2006):

- белки теплового шока HSP90 и HSP70, экспрессия которых связана с выживаемостью клеток;
- p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл;
- BDNF – важнейший фактор роста для созревания мозга;
- bcl-2, который в норме подавляет апоптоз за счет изменения проницаемости мембран митохондрий;
- система MAP-киназ;
- ген Noxa1, контролирующий развитие мозга эмбриона (по клиническим данным его нарушения могут приводить к РАС);
- неурелигин-3, отвечающий за построение синапсов в ЦНС и также являющийся кандидатом в «виновники» развития аутизма;
- проэнкефалин;
- Akt – клеточный фактор выживания.

Ряд негативных воздействий ВПК на геном млекопитающих указывает на то, что в выраженности патологических изменений большую роль может играть именно генетическая компонента, а также генетическая предрасположенность.

Например, в работах на мышах показано, что они делятся на ВПК-чувствительную и ВПК-устойчивую субпопуляции животных (Finnell et al., 1997).

Во-вторых, вальпроевая кислота при пренатальном введении способна вызывать морфо-функциональные перестройки головного мозга. В частности, изменять распределение 5-НТ нейронов в ядрах шва (Miyazaki et al., 2005); уменьшать количество моторных нейронов в ядрах подъязычного и глазодвигательного нервов (Rodier et al., 1996); сокращать число синаптических контактов между пирамидальными нейронами 5 слоя (Rinaldi, 2008); задерживать пролиферацию нейрональных клеток-предшественников в эмбриональном периоде (Go et al., 2012); уменьшать количество клеток Пуркинье и общий объем мозжечка, а также вызывать дегенерацию нервной ткани (Sandhya et al., 2012).

Наблюдения за пациентами с РАС показывают наличие у них макроцефалии и повышенной плотности нейронов. Механизмом на молекулярном уровне, согласно одной из работ, может являться избыточная активация пути GSK-3 β / β -катенин. Также показано, что ингибирование этого пути ослабляет негативные эффекты, вызываемые введением ВПК (Go et al., 2012).

Несмотря на то, что коммуникационные проблемы у людей с аутизмом не вызывают сомнений, клеточные механизмы этих нарушений до сих пор изучены мало. С использованием ВПК-модели на крысах было показано, что нарушения в обработке слуховых стимулов в головном мозге могут быть одним из механизмов проблем в общении. Пренатальное введение ВПК значительно ухудшает точные пространственно-временные паттерны, вызываемые звуком, во вторичной, но не первичной слуховой коре. Эти результаты подтверждают наблюдения за людьми с аутизмом и тот факт, что именно вторичные слуховые поля более чувствительны к факторам внешней среды при коммуникативных дефицитах при РАС (Engineer et al., 2014).

К дополнительным поведенческим особенностям при РАС относят сенсорные и моторные нарушения, которые обнаруживаются у 70% пациентов. На модели с постнатальным введением ВПК было показано, что у крыс также проявляются сенсорные и моторные нарушения: снижается чувствительность к слуховым стимулам, реакция на звуковые раздражители, скорость и точность движений. Таким образом, у крыс с постнатальным введением ВПК обнаружена

гипочувствительность, тогда как у крыс с пренатальным введением ВПК наблюдается гиперчувствительность. Выбор срока тератогенного воздействия очень важен при исследовании нейробиологических основ PAC (Reynolds et al., 2012).

Недавно обнаружено, что пренатальное введение умеренных доз ВПК (350 мг/кг) вызывает поведенческие изменения, которые существенно отличаются от результатов при введении высоких доз. У экспериментальных животных наблюдается улучшение в социальном взаимодействии, в частности, в игровом поведении. У животных были обнаружены отклонения от контроля в трех областях мозга: в передней миндалине, черве мозжечка и орбитофронтальной коре. Общей чертой среди белков, кодируемых нарушенными генами, была их зависимость от ацетилирования. Вероятно, подобные посттрансляционные модификации также очень важны при анализе ВПК-модели (Cohen et al., 2013). Также в последних исследованиях показано, что введение блокаторов гистоновых деацетилаз в небольших дозах в 1-ю неделю жизни мышей приводит к улучшению обучения (Буренкова с соавт., 2013).

В-третьих, вальпроевая кислота способна изменять работу систем нейромедиаторов и вторичных мессенджеров. Например, ВПК увеличивает продукцию NO в мозге крыс, что может приводить к нарушениям в синаптических связях и в нейроразвитии (Calabrese et al., 2007).

В качестве одной из основных медиаторных систем, на которую влияет ВПК называется ГАМКергическая система. Общеизвестно, что при остром введении, ВПК способна увеличивать тормозную активность ГАМК двумя способами. Во-первых, за счет активации ее синтеза путем превращения из глутамата с участием фермента глутаматдекарбоксилазы; во-вторых, за счет снижения ее деградации путем ингибирования фермента ГАМК-трансаминазы (Keros et al., 2005). Однако у крыс с ФВС пре- и пост-синаптическое ГАМК-торможение нарушено. Предполагается, что ухудшение в системе ГАМКергической передачи критически способствует увеличению коэффициента между возбуждением и торможением. Подобный дисбаланс может влиять на корковых связи, отвечающие за эмоциональные и социальные функции (Banerjee et al., 2013).

Используя культуры кортикальных нейронов крыс, получавших ВПК, удалось показать нарушения в созревании ГАМКергических синапсов. Показано, что значительно уменьшается экспрессия везикулярного транспортера ГАМК (VGAT). Причиной является ингибирующее воздействие ВПК на гистондеацетилазы (HDACs), о котором было сказано выше. Иммуноцитохимический анализ показывает, что введение ВПК приводит к задержке роста аксонов ГАМКергических нейронов и снижению количества ГАМКергических синапсов. Очевидно, что такие сведения открывают еще один механизм патогенеза заболеваний ЦНС, ассоциированных с введением ВПК (Kumamaru et al., 2014).

В самое последнее время показано, что у ВПК-крыс гиппокампальные нейроны характеризуются повышенным уровнем внутриклеточного хлорида, атипичным возбуждающим действием ГАМК и повышенной активностью глутаматергической системы. В свою очередь, хронический дефицит регулирования уровня хлоридов связан с нарушениями окситоцин-опосредованного ГАМКергического торможения. По-видимому, данный новый механизм крайне важен для нормального развития нервной системы (Tuzio et al., 2014). Также опубликована информация, подчеркивающая, что в астроцитах назначение глутамата в синаптической щели может быть изменено при аутизме, и указывающая на важные аспекты, которые необходимо учитывать при патофизиологических и фармакологических подходах к РАС (Silvestrin et al., 2013).

Наряду с фетальным вальпроатным синдромом характерные аутистическоподобные поведенческие и нейрохимические нарушения обнаружены при синдроме хрупкой X-хромосомы, для которого также разработана животная модель. На данной модели также выявлены нарушения в структуре и/или функциях ионотропных ГАМК_A и метаботропных ГАМК_B рецепторов (Hampson et al., 2011, Coghlan et al., 2012).

Недавние исследования подчеркивают общность организации глутаматергической системы и вовлеченность одних и тех же генов как в патогенез РАС, так и в патогенез некоторых схожих моногенных заболеваний, например, синдрома Ангельмана и синдрома хрупкой X-хромосомы (Peca et al., 2012). Исследования на животной модели синдрома хрупкой X-хромосомы указывают на

важную роль метаботропного глутаматного рецептора 5 типа (mGluR5). Анализ других экспериментальных моделей РАС указывает также на каинатные, NMDA и AMPA рецепторы (Carlson et al., 2012). Вероятно, в ближайшее время именно глутаматергическая система станет новой мишенью для создания лекарственных препаратов. В частности, ингибиторы mGluR5 рассматриваются в качестве нового и перспективного пути лечения аутизма (Spooren et al., 2012).

Помимо участия систем ГАМК и глутамата на крысиной ВПК-модели не раз была продемонстрирована важная роль серотонинергической системы при РАС. В частности, показано, что экспрессия *sonic hedgehog*, одного из ранних индукторов 5-НТ нейронов, снижена в экспериментальной группе (Oyabu et al., 2013). Развитие серотонинергической системы мозга начинается одним из первых в эмбриогенезе. Ранние изменения уровня серотонина могут оказать большое влияние на правильное формирование конкретных областей мозга. Дисрегуляция серотонина ассоциирована с тревожными симптомами, изменениями в социальном поведении, а также морфологическими изменениями коркового серого и белого вещества. Одной из причин дисрегуляции является полиморфизм гена транспортера серотонина. Подобные полиморфизмы зарегистрированы у лиц с РАС и могут также быть связаны с неблагоприятным воздействием окружающей среды (Kinast et al., 2013).

ВПК влияет на рецепторы эстрогена, однако половые различия не могут быть объяснены этим эффектом, поскольку до 16 дня гестации на экспериментальных моделях не найдено системы этих рецепторов (Fortunati et al., 2008). Как было сказано в обзоре литературы, эпидемиологические данные указывают на то, что РАС более распространены среди лиц мужского пола. Недавние исследования на ВПК-модели показывают, что нарушения в социальном взаимодействии у крыс-самцов были сильнее, чем у крыс-самок из тех же пометов. И у самцов, и у самок было обнаружено снижение активности ГАМКергической системы, но только в группе самцов было показано усиление глутаматергической передачи. Вероятно, одним из механизмов некоторой гендерной зависимости при РАС является увеличение глутаматергических синапсов у самцов (Kim et al., 2013). При этом в нашем эксперименте не было выявлено явных поведенческих изменений, зависящих от пола.

Помимо модели на грызунах большой популярностью пользуется модель с использованием мальков *Danio rerio* (зебрафиш). В рамках представленного исследования совместно с сотрудниками факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова была проведена дополнительная серия экспериментов по разработке и адаптации данной модели. В использованной методике мальки рыб находились в чашках Петри диаметром 9,4 см, содержащих 30 мл подготовленной воды (Egg Water: 60 мг/л морской соли, 50 мкл/л метиленового синего, обратнoосмотически очищенная вода). Температура воды в чашках поддерживалась на уровне 28,5 С°. ВПК использовалась в дозах 125µМ и 150 µМ. В ходе экспериментов оценивалась выживаемость мальков рыб, а также тератогенные эффекты ВПК после суточной инкубации рыб в растворе вальпроевой кислоты. Было показано, что 10-12% мальков в каждой опытной группе погибали после инкубации в ВПК, в контроле все 100% оставались живы ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни). Тератогенный эффект при измерении длины тела обнаружен не был, зато у мальков опытной группы развивается осевая аномалия изгиба тела (см. рис. 23). Также после суточной инкубации икры в растворе ВПК у мальков опытной группы достоверно регистрируется отек желточного мешка, его объем увеличивается на 11% относительно контроля (см. рис. 23). К тому же после инкубации в растворе ВПК в дозах 150µМ и 125µМ, у мальков опытной группы отсутствует плавательный пузырь в 76% и 80% случаев соответственно, а также снижается на 5% частота сердечных сокращений.



Рис. 23. Измерение морфологических параметров мальков *Danio rerio*, при помощи которых возможно выявить тератогенный эффект ВПК. А) – контрольный малек; Б) – искривление оси тела; В) – отек сердца и желточного мешка, отсутствие плавательного пузыря.

Описанная экспериментальная модель вальпроатного синдрома у мальков *Danio rerio* может быть признана успешной и использоваться в дальнейшем для тестирования потенциальных лекарственных препаратов, направленных на лечение данной патологии.

По литературным данным, с помощью модели ФВС на зебрафишах подтверждено изменение серотонинергической регуляции при РАС. Инъекции ВПК вызвали серьезные нарушения в экспрессии серотонина в головном мозге рыб. По всей видимости, эффект связан с изменением экспрессии генов, в частности гена *asc11b*, за счет влияния ВПК на HDAC. Полученные данные позволяют выделить эпигенетический механизм взаимодействия генома и окружающей среды при РАС (Jacob et al., 2014).

6.2. Изучение зависимо от матери («детского») поведения детенышей крыс на модели фетального вальпроатного синдрома.

Крысы относятся к незрелорождающимся животным: у них отсутствует зрительная ориентация, они не способны самостоятельно поддерживать температуру тела, эффективно передвигаться и питаться. Эти характеристики находятся в явной зависимости от материнской заботы. Поведенческий репертуар новорожденного ограничен поддержанием контакта с телом матери и нахождения материнского соска по тепловым, тактильным, обонятельным признакам. Именно эти реакции составляют в раннем постнатальном периоде основу зависимо от матери, «детского» поведения. Система соответствующей привязанности и ее поведенческие проявления рассматриваются как направленные на контакт, цель которого – обеспечение максимальной физической и психологической безопасности детеныша (Feeney et al., 2008). Подвижность новорожденных пока что ограничена пределами гнезда и, следовательно, самка является для них главным источником информации об окружающей среде.

В сравнении с тревожностью, депрессивностью, способностью к формированию навыков, «детские» реакции изучены хуже, и вовлеченные в них нервные структуры четко не идентифицированы. Особая роль, по всей видимости, принадлежит обонятельной системе и центрам, обеспечивающим обонятельное обучение. Нейрохимическую основу реакции детенышей на мать обеспечивают катехоламины, эндогенные опиоидные пептиды, серотонин и дофамин (Стоволосов с соавт., 2010).

Ранее оценка зависимого от матери поведения на ВПК-модели не проводилась и не была описана в литературе и, следовательно, полученные в представленном исследовании данные являются совершенно новыми. По результатам, описанным в разделе 5.2, можно заключить, что различий в двигательной активности, а также в выраженности детских реакций на 10-й день постнатального развития между контрольными и ВПК-крысами зарегистрировано не было. При этом на 15 день жизни происходит существенная активация детского поведения и значительное повышение детской привязанности у ВПК-крысят. Также стоит отметить, что параметры, которые характеризуют ориентировочно-исследовательскую реакцию (например, время отхода от тела матери с целью изучения экспериментальной камеры) у «здоровых» и «больных» новорожденных не различаются, то есть поведенческие изменения связаны именно с мотивационной компонентой привязанности к матери.

Вероятно, сочетание описанных выше нарушений ЦНС при фетальном вальпроатном синдроме приводит к компенсаторному усилению привязанности к матери. В основе наблюдаемых изменений, скорее всего, лежит функциональная стресс-активация дофаминергической системы мозга. Детское поведение находится в сильной зависимости от центров подкрепления головного мозга. Известно, что дофаминергическая система играет важнейшую роль в реализации зависимых от матери реакций. Мезолимбические дофаминергические пути, участвующие в формировании подкрепления, идут от нейронов вентральной тегментальной области и иннервируют вентральный стриатум и обонятельные луковицы. Связь с nucleus accumbens является особенно важной, поскольку прилежащее ядро тесно контактирует с другими структурами лимбической системы; получает афференты от миндалины, гиппокампа, энторинальной и височной коры, поясной извилины

(Papaioannou et al., 2002). D2-антагонист клебоприд в дозах, не влияющих на двигательную активность ослабляет «детские» реакции, а D1-антагонист SCH23390 – усиливает (Стоволосов, 2010). Вероятно, в ситуации агрессивного внешнего воздействия и общего ухудшения состояния ЦНС становится критически важным сохранять контакт с матерью, т.к. это основной способ поддержания жизнедеятельности крысенка. Можно предположить, что на фоне фетального вальпроатного синдрома происходит компенсаторное усиление активности дофаминергической системы, которое приводит к гиперактивации детской мотивации.

Эндорфины также являются важнейшей нейрохимической системой, вовлеченной в становление процессов внутривидового взаимодействия. Опиоидные агонисты обладают подкрепляющим действием как сами по себе, так и за счет модуляции активности мезолимбической части дофаминергической системы. Данные, полученные путем микродиализа *in vivo*, показывают, что однократное системное введение μ - или δ -агонистов повышает выброс дофамина в *nucleus accumbens*, что обусловлено снятием ингибирующего воздействия ГАМК-интернейронов в VTA. Растормаживающее влияние опиоидных агонистов ограничено пределами VTA, поскольку введение препаратов непосредственно в *nucleus accumbens* не вызывает повышения уровня дофамина в этой структуре (Spanagel et al., 1992). Исходя из сказанного можно предположить, что позитивное влияние на состояние ВПК-крысят смогут оказать нейротрофические и подкрепляющие агенты, например, опиоидные пептиды.

Также важнейшей подкрепляющей системой является система серотонина. По данным Ristine с соавторами, системное введение антагонистов рецепторов серотонина (в частности, метерголина) оказывает угнетающее влияние на сосательное поведение детенышей крыс на 3-4 и 7-8 дни жизни (Ristine et al., 1984). Вероятно, нарушения, наблюдаемые у ВПК-крысят, также могут быть связаны с недостаточностью опиоидергической и/или серотонинергической систем мозга.

Многие исследователи отмечают, что поведение новорожденных крыс не может быть описано по классическим схемам, обнаруженным в случае взрослых животных (Moriceau et al., 2005). Это связано с тем, что области мозга, известные своим важным участием в процессах обучения у взрослых, могут еще не

функционировать в полной мере в ранний постнатальный период (например, миндалины, гиппокамп, фронтальная кора) (Stanton et al., 2000). Тем не менее полученные нами данные об избыточной привязанности крысят к матери после введения им вальпроевой кислоты согласуются с описанной в литературе оценкой их зоосоциального взаимодействия в более позднем, «подростковом» возрасте. Напомним, что у ВПК-крыс было значимо снижено стремление к социальной новизне, т.е. повышена привязанность к матери на 21-й день жизни. Вероятно, полученный на 15-й день жизни результат также можно трактовать в терминах стремления к социальной новизне.

С целью установления вовлеченности дофаминергической системы мозга в изменения детского поведения у ВПК-крыс нами был проведен фармакологический тест с введением D2-антагониста клебоприда. Ранее в литературе было показано, что введение D2-агониста квинпиrolа увеличивает количество попыток присасывания новорожденного к искусственному соску (Shair et al., 2009), а в случае пренатальной блокады дофаминовых рецепторов (введение галоперидола с 4 по 15 дни беременности в дозе 0,5 мг/кг) у крысят снижен уровень ультразвуковой вокализации во время депривации от матери (Cagiano et al., 1988).

В предыдущих работах нашей научной группы показано, что «пороговой» (влияющей только на детские реакции и не затрагивающей двигательную активность детенышей) дозой клебоприда при в/б введении на 15 день жизни является доза 0,1 мг/кг. В представленном исследовании с использованием указанной дозы найдено, что при сравнении параметров детского поведения контрольных крыс отмечается существенное ухудшение детской мотивации той половины группы, которая получала клебоприд. Полученные данные подтверждают представление о важном вкладе именно системы дофамина в организацию зоосоциального взаимодействия уже в раннем возрасте.

При этом введение клебоприда не оказало никакого влияния на крыс, подвергнутых пренатальному воздействию ВПК. Клебоприд, снизив детскую мотивацию «здоровых» животных, не повлиял на «больных» и увеличил исходную разницу еще сильнее. Из этого следует, что функционирование дофаминергической системы действительно нарушается при пренатальной инъекции ВПК. Полученные

данные также могут объясняться стресс-активацией дофаминовой системы. В таком случае, избыточное количество дофамина в мозге может приводить либо к тому, что доза клебоприда оказывается просто недостаточной для проявления его действия, либо эффект может быть связан со снижением чувствительности рецепторной составляющей дофаминовой системы.

По литературным данным известно, что в различных отделах мозга плотность всех типов рецепторов дофамина равномерно нарастает с рождения до максимального значения в 28 дней жизни (Tarazi et al., 2000). Кроме того, в недавнем исследовании Li с соавторами указывается, что гиперпродукция дофамина в стриатуме вызывает в итоге значительное снижение чувствительности рецепторов нейронов префронтальной коры (Li et al., 2011). Префронтальная кора тесно связана с лимбической системой и обонятельными структурами, которые участвуют в раннем формировании социального поведения. Учитывая это, можно предположить, что гиперактивация дофаминергической системы, вызванная пренатальной инъекцией ВПК, может вызывать снижение чувствительности к дофамину структур, ответственных за формирование социального поведения, к моменту окончательного созревания рецепторной составляющей. Вероятно, это может привести к наблюдаемым изменениям в зоосоциальном взаимодействии в более позднем возрасте.

Важно также учитывать, что привязанность новорожденного является составляющей более сложной системы реципрокных детско-родительских взаимоотношений. В совместной работе с Танаевой К.К. мы впервые предположили, что после пренатального введения высокой дозы ВПК у выросшего потомства могут возникнуть также нарушения поведения по отношению к собственному потомству. Была проведена экспериментальная серия, посвященная оценке выраженности материнской мотивации у животных с ФВС. В результате было показано, что при неизменном уровне двигательной активности у самок опытной группы оказались нарушены как активные (переносы новорожденных), так и пассивные (подходы к крысятам) проявления материнской мотивации.

6.3. Изучение корректирующего воздействия регуляторных пептидов. Гептапептид Семакс, гептапептид бета-казоморфин-7 (БКМ-7) и аналог фрагмента АВП тетрапептид Ас-D-MPRG.

Традиционно в клинической практике для лечения расстройств аутистического спектра применяются психотропные препараты таких групп, как нейролептики, антидепрессанты и транквилизаторы. Но фармакотерапия показывает лишь частичную эффективность всего в 25% случаев и обладает рядом побочных эффектов. Короткие пептиды – относительно молодая, но перспективная группа веществ для создания фармацевтических препаратов. Сейчас эти соединения успешно используются в клинике для лечения множества заболеваний – панкреатита, сахарного диабета, дистрофии сетчатки, бронхиальной астмы. Существующие экспериментальные и клинические данные указывают на то, что пептиды также обладают высокоспецифичным положительным влиянием на состояние и созревание ЦНС.

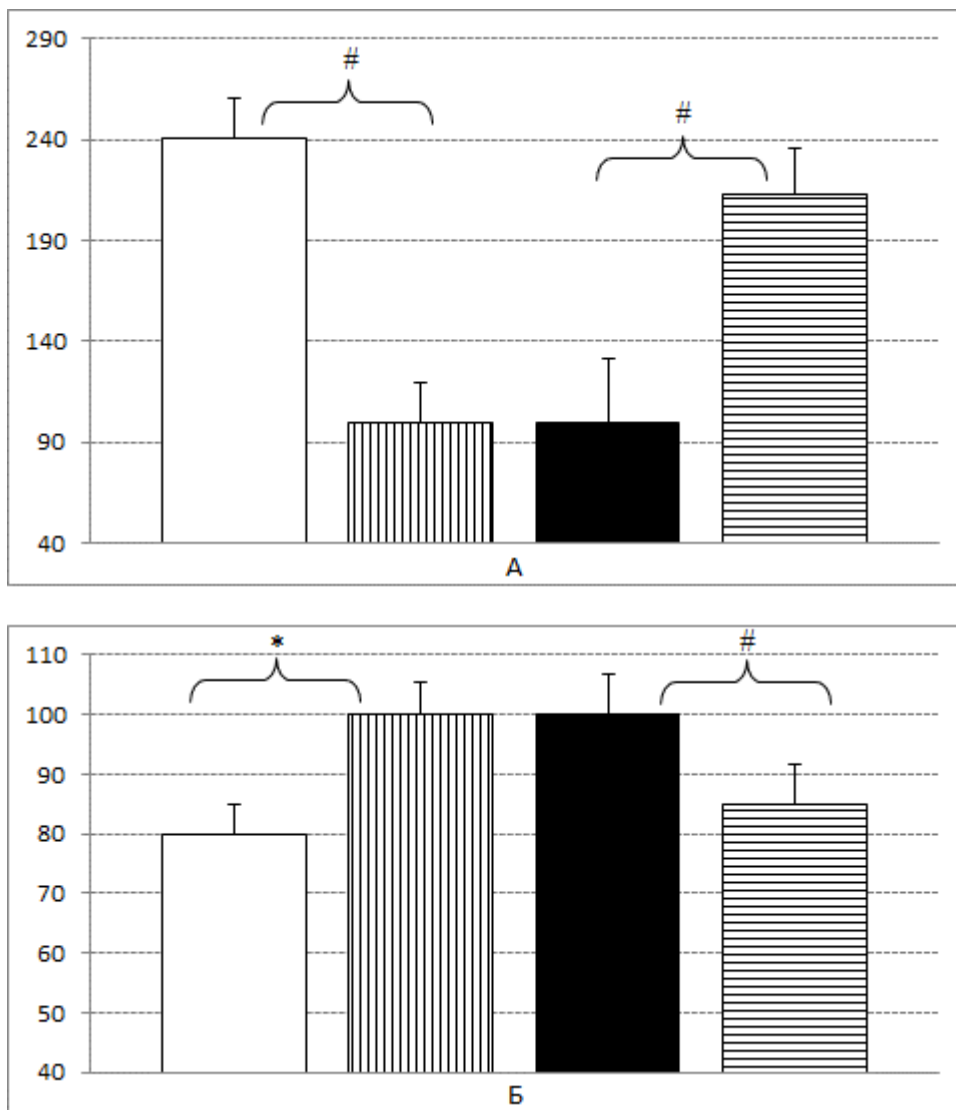
С целью попытки коррекции аутистических расстройств мы использовали фрагмент адренкортикотропного гормона (пептид семакс); опиоидный пептид материнского молока (бета-казоморфин-7); аналог фрагмента аргинин-вазопрессина (Ас-D-MPRG).

Среди существующих пептидных препаратов широко известен семакс, который сейчас используется в клинике для уменьшения повреждений ЦНС при инсультах, а также является ноотропом. Клинические испытания, показавшие эффективность и безопасность семакса, позволили нам выбрать его в качестве первого вещества для исследований на модели РАС и не изучать его влияние на контрольных животных.

По результатам проведенного исследования, описанным в разделе 5.3, при интраназальном введении препарата семакс в 1-14 дни жизни в дозе 0,05 мг/кг на фоне предварительного пренатального воздействия ВПК были зарегистрированы:

- 1) Частичная нормализация психомоторного развития крысят.
- 2) Повышение стремления к социальной новизне.
- 3) Снижение уровня их депрессивности.
- 4) Нормализация ноцицепции.

С целью более наглядного сравнения состояния «больных» животных, получавших инъекцию ВПК, и «леченых» животных, получавших семакс после ВПК, мы приводим рисунок 24.



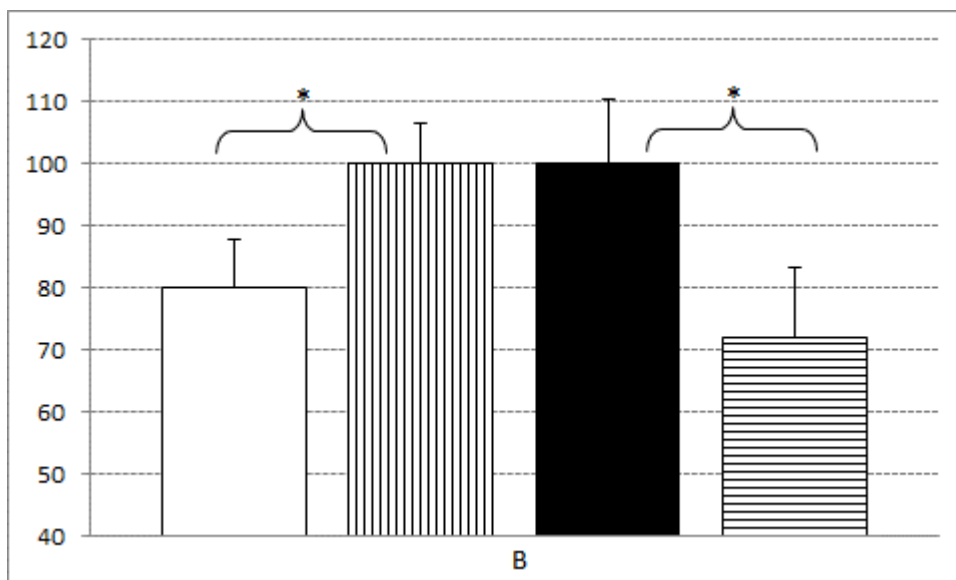


Рис. 24. Влияние пренатального воздействия высокой дозы ВПК (сравнение с интактным контролем, слева) и интраназального введения препарата семакс в 1-14 дни жизни в дозе 0,05 мг/кг на фоне ВПК (сравнение с группой «плацебо», справа). А – суммарное время иммобилизации в тесте «принудительное плавание»; Б – латентный период рефлекса облилизывания задней лапы в тесте «горячая пластина»; В – коэффициент социальной новизны в ситуации выбора между матерью и некормлящей самкой. По оси ординат – величина параметра в процентах от интактного контроля (два левых столбца) или группы «плацебо» (два правых столбца) ($AM \pm SEM$).

Условные обозначения: белый цвет – группа интактного контроля; вертикальный штрих – группа животных, получавших пренатальную инъекцию ВПК; черный цвет – группа животных, получавших пренатальную инъекцию ВПК и и/н растворитель с 1 по 14 дни жизни; горизонтальный штрих – группа животных, получавших пренатальную инъекцию ВПК и и/н семакс с 1 по 14 дни жизни. В каждой экспериментальной группе не менее 25 животных. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Таким образом, в нашей работе показано, что гептапептид семакс, в дополнение к уже известным свойствам, способен корректировать проявления мозговой дисфункции, которая вызвана пренатальным воздействием ВПК

(фетальный вальпроатный синдром) и относится к нарушениям аутистического спектра.

Нейротрофические и нейропротекторные эффекты АКТГ/МСГ-подобных пептидов, к которым относится семакс, были продемонстрированы во многих экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Данные пептиды способны оказывать положительное действие на восстановление функций организма при повреждениях центральной нервной системы, вызванных как перерезками в различных регионах мозга, так и введением нейротоксинов (Antonawich et al., 1994). Исследования на людях показали, что хроническое введение АКТГ₄₋₁₀ пациентам пожилого возраста в депрессивном состоянии приводит к снижению уровня тревожности и депрессивности (Chaki et al., 2003). Введение АКТГ/МСГ-подобных пептидов животным в раннем онтогенезе, когда структуры мозга и нейрональные проекции еще развиваются, приводит к ускорению созревания нервно-мышечной системы и влияет на развитие центральной нервной системы (Strand et al., 1989).

Корректирующие эффекты семакса на модели РАС могут быть связаны с его влиянием на систему нейротрофических факторов. Из литературы известно, что семакс влияет на меланокортиновые рецепторы. Активируя их, гептапептид повышает уровень экспрессии нейротрофических факторов, в частности BDNF (Dolotov et al, 2006). С большой вероятностью именно влияние семакса на содержание нейротрофинов в мозге может лежать в основе его протекторных эффектов. Нейротрофические факторы участвуют также в регуляции состояний, связанных со стрессом, тревожностью, страхом, депрессией (Duman et al, 2006). Также в последних работах указывается на непосредственную связь синаптической пластичности и уровня BDNF с аутизмом (Wondolowski et al., 2013).

Также позитивное воздействие семакса может опосредоваться системой биогенных аминов. Введение данного пептида приводит к увеличению содержания серотонина и его метаболита в мозге. Полученные данные свидетельствуют об ускорении оборота этого медиатора, отражающем увеличение функциональной активности серотонинергической системы мозга (Eremin et al., 2005). Повышение активности системы серотонина может обеспечивать улучшение внимания, стимулировать социальное поведение и улучшать эмоциональное состояние животных.

Также результатом неонатальных инъекций фрагментов АККГ является повышение синтеза катехоламинов. Происходит рост уровней дофамина, норадреналина и их метаболитов в гиппокампе и стволе мозга (Шилова и др., 1996). Исследования возможного протекторного действия семакса на фоне нарушения дофаминергической системы показали, что введение пептида ежедневно в течение 4-х дней после применения нейротоксина МФТП в значительной степени нормализует поведение животных (Левицкая и др., 2002). В целом можно заключить, что введение семакса оказывает позитивное модулирующее и защитное воздействие на развивающийся мозг, в том числе на фоне неонатально спровоцированных дисфункций.

В отличие от препарата «Семакс», который уже продолжительное время используется в клинической практике и терапевтические эффекты которого не вызывают сомнений, БКМ-7 и фрагменты АВП являются пептидами на стадии преклинических исследований. Именно поэтому нам было важно оценить эффекты этих пептидов на контрольной выборке животных. Учитывая, что поведенческие отклонения на модели РАС нами были подробно описаны ранее, особый интерес представляло выявление корректирующего действия пептидов, т.е. эффектов, которые проявлялись на животных с ФВС и возвращали значения поведенческих показателей к нормальному уровню, но при этом не затрагивали функционирование ЦНС здоровых животных.

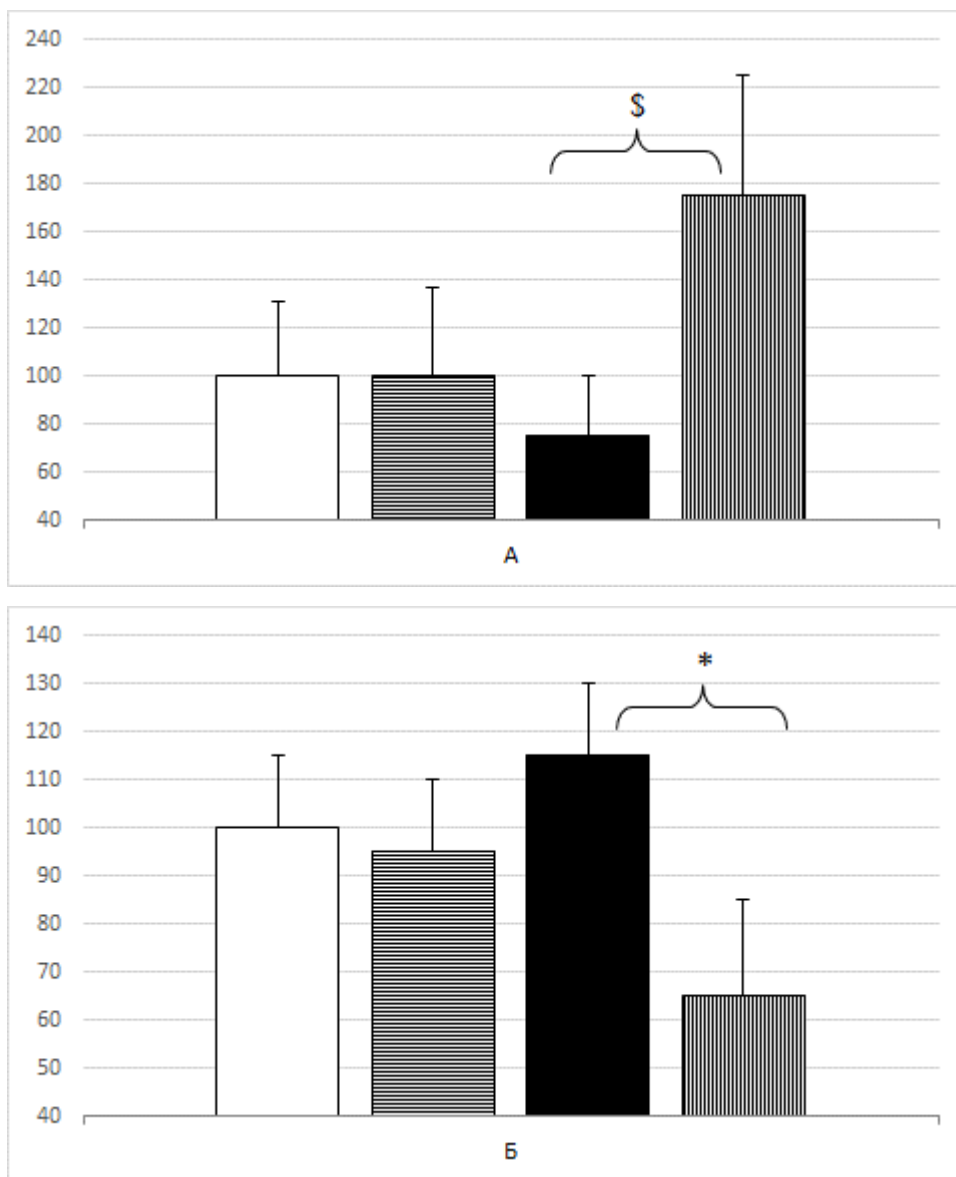
Ранее в нашей лаборатории была доказана способность бета-казоморфинов (и, в первую очередь, бета-казоморфина-7 молока коровы) влиять на созревание нервной системы новорожденных, вызывать отставленные, сохраняющиеся у взрослых особей изменения поведения. Эти изменения имели анксиолитическую направленность. Также БКМ-7 способен вызывать усиление зависимых от матери реакций детенышей крыс в 10 и 15 дни жизни (Дубынин с соавт., 2007).

В представленном исследовании при внутрибрюшинном введении пептида бета-казоморфина-7 человеческого молока в 1-14 дни жизни в дозе 1 мг/кг на фоне предварительного пренатального воздействия вальпроевой кислоты были зарегистрированы следующие положительные эффекты:

- 1) Смещение баланса между тревожностью и ориентировочно-исследовательской активностью в сторону последней.

- 2) Снижение поведенческих проявлений депрессивности.
- 3) Нормализация ноцицепции.
- 4) Улучшение обучения с отрицательным подкреплением.

Сравнение с контрольными группами представлено на рисунке 25.



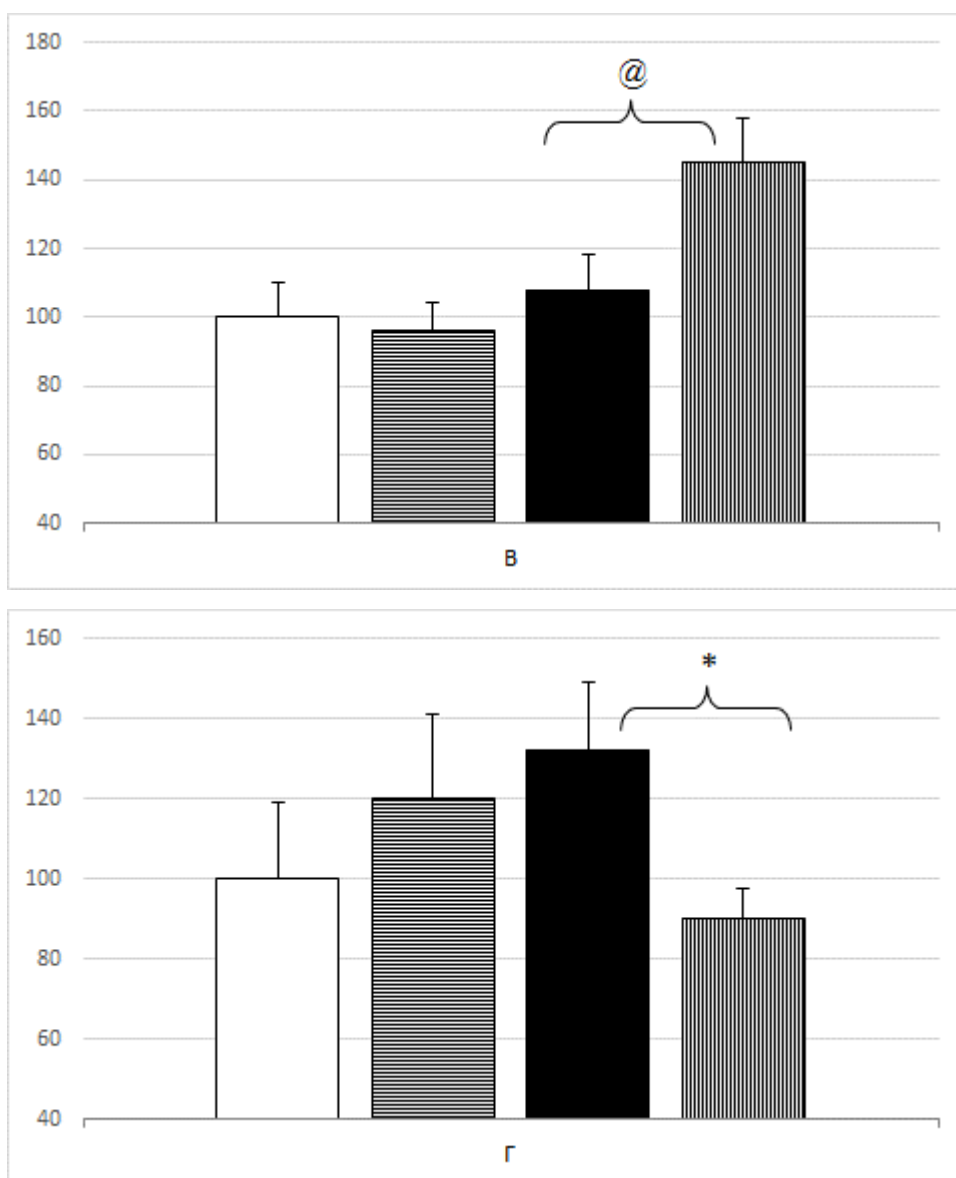


Рис. 25. Влияние внутрибрюшинного введения пептида бета-казоморфина-7 молока человека в 1-14 дни жизни в дозе 1 мг/кг на здоровых животных и на фоне пренатального воздействия ВПК. А – количество выходов на светлые рукава в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»; Б – активность в отсеке с мамой в тесте «социальное взаимодействие»; В – длительность первого эпизода активного плавания в тесте «принудительное плавание»; Г – латентный период рефлекса облизывания задней лапы в тесте «горячая пластина». По оси ординат – величина параметра в процентах от интактного контроля ($AM \pm SEM$).

Условные обозначения: белый цвет – группа интактного контроля; вертикальный штрих – группа животных, получавших в/б инъекцию БКМ-7; черный цвет – группа животных, подвергшихся пренатальному воздействию ВПК;

горизонтальный штрих – группа животных, получавших пренатально ВПК и в/б БКМ-7 с 1 по 14 дни жизни. В каждой экспериментальной группе не менее 15 животных. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. \$ - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию хи-квадрат. @ - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по точному критерию Фишера.

БКМ-7 – опиоидный пептид пищевого происхождения, представитель группы экзорфинов. Он является преимущественным μ -агонистом за счет наличия N-концевого тирозина, присутствия гидрофобного «хвоста» из 3-10 аминокислот и устойчивости к действию протеолитических ферментов. Последний критерий имеет особую важность, поскольку лишь при его выполнении пептид может существовать в организме в течение времени, достаточного для переноса от места введения к рецептору.

Следует отметить, что бета-казоморфины не являются высоко активными опиоидными соединениями. Константы связывания казоморфинов с μ - и δ -опиоидными рецепторами головного мозга располагаются в микромолярном диапазоне концентраций. Этот факт подтвержден и в экспериментах *in vivo*. Так, анальгетически эффективная при внутрибрюшинной инъекции крысам доза бета-казоморфина-7 молока коровы составляет 20 мг/кг, что на порядок выше, чем в случае морфина. Обнаруженное в целом ряде экспериментов анксиолитическое и антидепрессантное влияние системно вводимого β -казоморфина-7 типично для преимущественных μ -агонистов. Кроме того, на фоне применения гептапептида любая экспериментальная ситуация воспринимается как менее стрессогенная, что приводит к улучшению обучения с положительным подкреплением (Дубынин, 2010). При хроническом введении казоморфинов у животных опытных групп наблюдается снижение тревожности, рост исследовательской активности, ускорение выработки пищедобывательных навыков. Эффекты пептидов не ослабевают в течение длительного периода наблюдений (несколько недель и месяцев после последней инъекции), что служит доказательством воздействия бета-казоморфинов на процессы созревания нервной системы новорожденных. Полученные в данной работе результаты по корректирующему эффекту БКМ-7

подтверждают и дополняют представление о возможном терапевтическом значении бета-казоморфинов.

Наиболее вероятные механизмы такого влияния, по-видимому, носят нейротрофический характер. При этом описано прямое действие бета-казоморфинов (как факторов роста) на становление различных нейромедиаторных систем (Zagon, 2000; Lutz et al., 2013). Судя по всему, наиболее чувствительным к хроническому действию опиоидов является онтогенез моноаминергических систем мозга (Robinson, 1997). Установлено также влияние казоморфинов на серотониновую систему. Показано увеличение плотности серотонинергических проекций в коре больших полушарий в результате повторных инъекциях бета-казоморфина-7 (Зозуля с соавт., 2009). Отметим, кроме того, что бета-казоморфины характерны для молока «выводковых» млекопитающих, рождающих детенышей с открытыми глазами, развитым слухом, относительно зрелыми двигательными системами (копытные, морские свинки, человек). В случае таких детенышей адаптивный смысл смягчения стрессогенного влияния окружающей среды, настройки нервной системы на более «экстравертный» уровень функционирования совершенно очевидны.

Разнообразие эффектов опиоидов на разных этапах онтогенеза связано с целым рядом факторов. В первую очередь, динамика эффектов зависит от становления опиоидной системы мозга, прорастания аксонов и формирования синапсов, от созревания рецепторной составляющей и внутриклеточных эффекторов. Другим важнейшим фактором, обуславливающим разнообразие эффектов опиоидов, является развитие систем транспорта. Данное понятие включает в себя созревание ГЭБ (на клеточном уровне), а также созревание специфических транспортеров. По литературным данным (Landymore et al., 1990) формирование ГЭБ завершается только к 30 дню жизни. Предполагается, что транспорт пептидов через ГЭБ в более поздние сроки может осуществляться через исходно описанную для Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂) пептидную транспортную систему – PTS1. Ее функции, по мере проведения исследований, авторы распространили на все содержащие N-концевой тирозин короткие пептиды.

Таким образом, к возможным механизмам эффектов корректирующего влияния БКМ-7 на модели PAC можно отнести:

1. Хроническое воздействие на рецепторы и внутриклеточные эффекторы (например, процессы десенситизации и интернализации рецепторов).
2. Влияние на нейротрофические факторы, в частности, активация экспрессии мРНК BDNF через MAP-киназный путь.
3. Собственное подкрепляющее действие и модуляция активности мезолимбической части дофаминергической системы и системы моноаминов в целом.

Суммируя все вышесказанное, можно с большой уверенностью предполагать позитивное влияние казоморфинов на развитие ЦНС в раннем возрасте. Включение данных пептидов в рацион детей является перспективным подходом для профилактики развития патологий центральной нервной системы. Их биологическое значение представляется весьма важным, особенно в ранний постнатальный период, когда специфика питания новорожденного может определять не только его текущие реакции, но и процессы созревания ЦНС.

Среди симптомов РАС есть и метаболические, например, непереносимость глютена. Показано, что вскармливание натуральным молоком и молозивом оказывает позитивное влияние на функциональное созревание дуоденальных ворсинок у ВПК-крыс с целиакией. Таким образом, полноценное грудное вскармливание может ограничить или предотвратить риск развития целиакии, ассоциированной с аутизмом. Вероятно, свою позитивную роль здесь играют и пептиды пищевого происхождения (Selim et al., 2013).

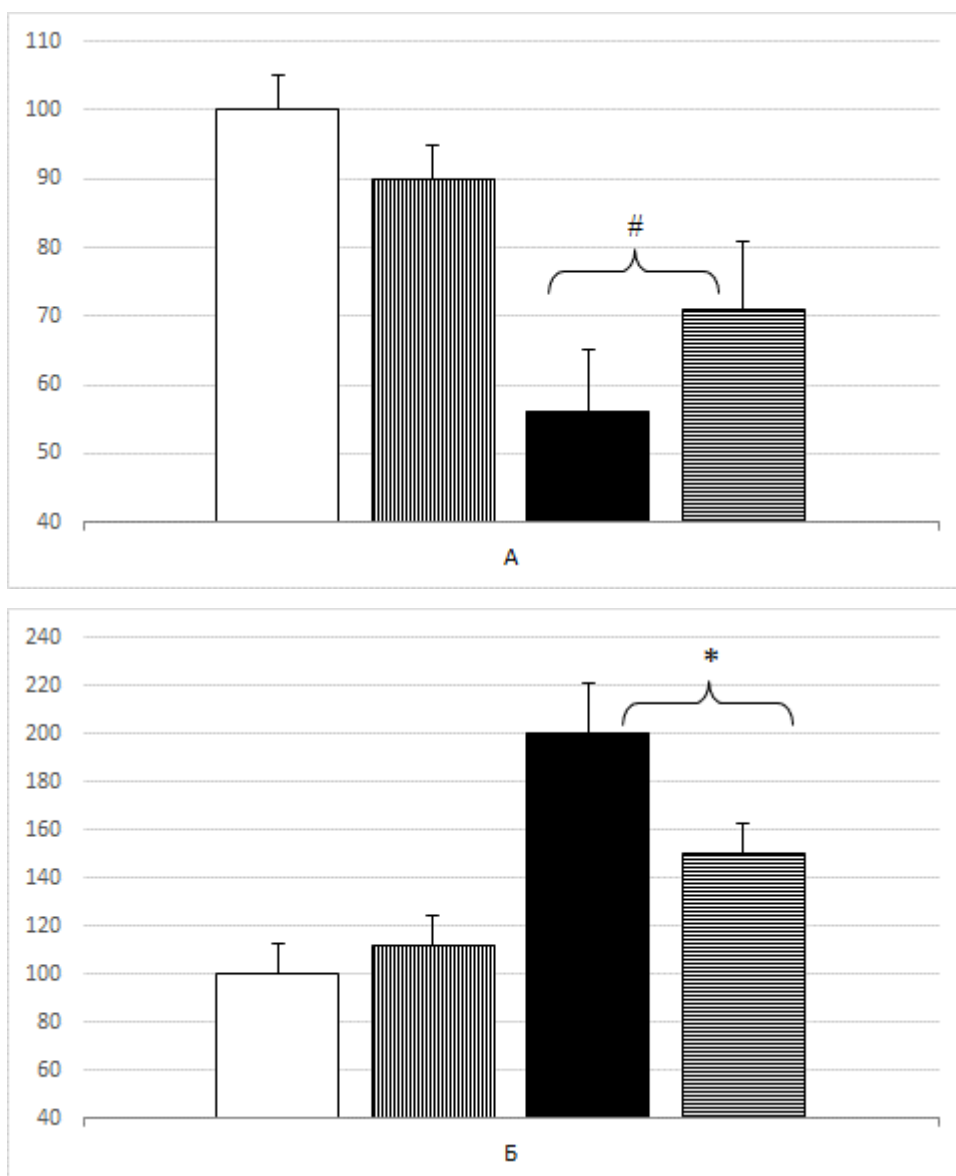
Третьим рассмотренным пептидом стал аналог фрагмента аргинин-вазопрессина тетрапептид Ac-D-MPRG. Вазопрессин является не только регулятором вегетативных функций (водно-солевой обмен, тонус кровеносных сосудов), но также участвует в процессах, происходящих в нервной системе. По литературным данным известно, что вазопрессинергическая система может участвовать в генезе различных заболеваний ЦНС человека (в частности, развитие аутизма и нарушения социального поведения при различных формах депрессии) (Kim et al., 2002). Социальное поведение однозначно зависит от содержания в головном мозге АВП (Young et al., 2004). Используемый в нашей работе пептидный аналог характеризуется заменой Cys на D-Met в C-концевом фрагменте

аргинин-вазопрессина. По ранее полученным данным он оказывает ноотропное влияние при интраназальном введении (Воскресенская с соавт., 2007).

В ходе представленного исследования было установлено, что при интраназальном введении тетрапептида Ас-D-MPRG в 1-14 дни жизни в дозе 0,01 мг/кг на фоне предварительного пренатального воздействия нейротоксина можно зарегистрировать следующие положительные эффекты:

- 1) Параметры зоосоциального взаимодействия сдвигаются от привязанности к sibсу в сторону взаимодействия с чужим детенышем.
- 2) Снижение поведенческих проявлений депрессивности.
- 3) Нормализация ноцицепции.

Данные представлены на рисунке 26.



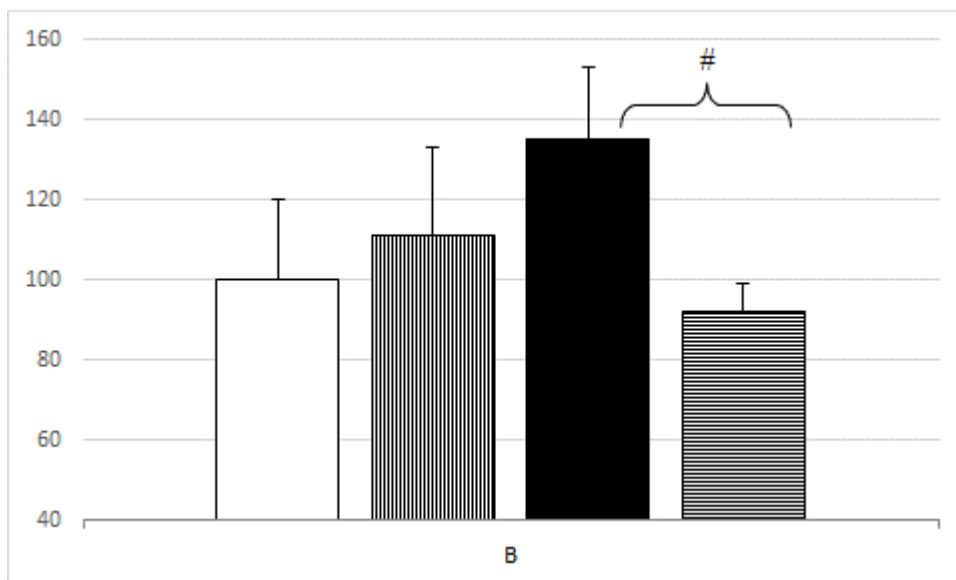


Рис. 26. Влияние и/н введения пептида Ac-D-MPRG в 1-14 дни жизни в дозе 0,01 мг/кг на здоровых животных и на фоне пренатального применения ВПК. А – активность в отсеке рядом с крысенком из другого выводка в тесте «социальное взаимодействие»; Б – среднее время иммобилизации в тесте «принудительное плавание»; В – латентный период рефлекса облизывания задней лапы в тесте «горячая пластина». По оси ординат – величина параметра в процентах от интактного контроля (AM±SEM).

Условные обозначения: белый цвет – группа интактного контроля; вертикальный штрих – группа животных, получавших и/н инъекцию Ac-D-MPRG; черный цвет – группа животных, получавших пренатальную инъекцию ВПК; горизонтальный штрих – группа животных, получавших пренатально ВПК и и/н Ac-D-MPRG с 1 по 14 дни жизни. В каждой экспериментальной группе не менее 20 животных. * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Таким образом, было показано, что пептид Ac-D-MPRG способен оказывать корректирующее действие на модели PAC. Впервые позитивное нейротропное влияние ABП и его фрагментов на поведение было отмечено в ранней работе De Wied (De Wied, 1977). Было продемонстрировано, что этот эффект не зависит от гормональных свойств ABП, а является результатом прямого действия на центральную нервную систему. Возможно, это связано с тем, что существуют две

внутри мозговые системы синтеза вазопрессина: первая, локализованная в крупноклеточных ядрах гипоталамуса и вторая (экстрагипоталамическая), локализованная в ядрах основания концевой пластинки (De Vries et al., 1998).

По данным О.Г. Воскресенской с соавт. (2007) фрагменты АВП также принимают активное участие в регуляции эмоциональных реакций. Литературные данные указывают на то, что после воздействия стрессогенного фактора уровень экспрессии мРНК АВП в паравентрикулярном ядре повышается. Введение экспериментальным животным антагониста V1a-рецепторов приводит к снижению у них уровня тревожности и значительным изменениям в выборе стратегии избавления от стрессора – наблюдается переход от пассивной (страха) к агрессивной реакции (Wigger et al., 2004).

Хотелось бы предположить механизм корректирующего действия использованного нами аналога, однако говорить об отношении данного пептида к классу агонистов или антагонистов какого-либо из рецепторов АВП пока рано. При создании аналога Ac-D-MPRG профессор В.П. Голубович преследовал две цели:

- повышение устойчивости к деградации (введение D-аминокислоты);
- конформационную близость к циклической структуре прототипа (собственно АВП), с этой целью цистеин в молекуле АВП был заменен на метионин.

Участие разных типов рецепторов АВП в генезе тревожных и депрессивных состояний не до конца изучено. Как уже было сказано, известно, что сам АВП, а также селективные V1-антагонисты способны снижать депрессивность у животных (Kormos et al., 2013). Таким образом, действие аналога может быть связано с непосредственным влиянием на рецепторы АВП. С другой стороны, известно, что вазопрессинергическая система подвержена сложной нервной и гормональной регуляции, в том числе со стороны норадреналина. Так, существуют многочисленные сведения об облегчающем влиянии норадреналина на секрецию гормонов задней доли гипофиза (Knigge et al., 1999). Известно, что при стрессе секрецию вазопрессина активирует норадреналин. Также введение вазопрессина ведет к накоплению норадреналина в гипоталамусе, таламусе и продолговатом мозге вследствие пресинаптического торможения выброса норадреналина (Чернышева, 1996). Иммуноцитохимические и функциональные исследования

свидетельствуют в пользу тесного взаимодействия нейрогипофизарных гормонов и катехоламинергической системы в регуляции вегетативных и поведенческих реакций. Поскольку катехоламины участвуют в регуляции неспецифических механизмов памяти, реакции активации, оценки значимости стимула и силы подкрепления (Brandl et al., 2014), логично, что активация катехоламинергической системы может оказывать влияние на модификацию процессов ЦНС под действием АВП и его аналогов. Вазопрессинергическая система и система биогенных аминов являются самостоятельными, взаимодополняющими регуляторами центральных процессов, вовлекаемых в реализацию приобретенных форм поведения. Не исключено, что пренатальное воздействие приводит к активации системы биогенных аминов, влияние которой в дальнейшем потенцирует вазопрессинергическую систему. В свою очередь, введение экзогенных пептидов может изменять состояние обеих систем, приводя к соответствующим эффектам.

Надо отметить, что все исследованные пептиды обладают сходным паттерном активности и влияют на схожие, но не полностью совпадающие, параметры поведения. Вероятно, их сочетанное использование может иметь синергетический эффект. Все использованные пептиды влияют на эмоциональные реакции и болевую чувствительность животных. Для БКМ-7 и семакса продемонстрировано анксиолитическое, антидепрессантное и ноотропное действие; Ас-D-MPRG по результатам нашей работы нормализует ноцицепцию и оказывает антидепрессантный эффект.

Несколько различается влияние пептидов на параметры социального взаимодействия. Для БКМ-7 пока не было выявлено четкого воздействия на параметры взаимодействия крысят в ситуации выбора мать/чужая самка и сибс/чужак. При этом знания, накопленные при изучении казоморфинов, указывают на то, что данный класс экзорфинов играет важную роль в детском-материнском взаимодействии, имеет собственное подкрепляющее значение, а также положительно влияет на развитие нервной системы. Работа в этом направлении будет продолжена.

Относительно Ас-D-MPRG можно заключить, что он оказывает влияние на такую важную характеристику как стремление к социальной новизне. Особенно это проявилось в ситуации выбора сибс/чужак. Данный факт согласуется с данными

литературы о вовлеченности вазопрессинергической системы в регуляцию социального поведения. Более подробное изучение данного вопроса также станет одним из направлений будущих работ.

Из протестированных нами соединений наиболее выраженное воздействие на стремление к социальной новизне оказал гептапептид семакс, который уже используется в клинике (в том числе, в педиатрии) для коррекции задержек в развитии. По результатам проведенного исследования можно рекомендовать расширение применения по терапевтическому эффекту семакса на область расстройств аутистического спектра.

Ноотроп семакс и аналог фрагмента АВП не оказали влияния на обучение с отрицательным подкреплением, тогда как БКМ-7 продемонстрировал достоверный эффект. Данный результат является новым и интересным, т.к. ранее было показано позитивное действие казоморфинов только на обучение с положительным пищевым подкреплением.

Сравнительный анализ активности регуляторных пептидов различных групп позволяет задуматься об их совместном применении. Кажется крайне перспективным тестирование смеси описанных выше пептидов для коррекции мозговых дисфункций различного генеза. Вероятно, объединяющим механизмом эффектов пептидов различных групп является их нейротрофическое воздействие и способность потенцировать развитие систем биогенных аминов и мозговых факторов роста. Наша гипотеза находит подтверждение в литературе. Исследования показывают, что при пренатальном введении ВПК на 12,5 день беременности у мышей значительно снижается уровень как мРНК BDNF, так и самого BDNF в головном мозге плода (Almeida et al., 2014). В свете хорошо известной роли BDNF в регулировании нейрогенеза развивающегося мозга, нормализация экспрессии BDNF в головном мозге плода может способствовать коррекции ВПК-ассоциированных когнитивных расстройств.

В последнее время в литературе уделяется все больше внимания попыткам коррекции РАС с использованием новых подходов. Появились работы, которые показывают, что природный алкалоид пиперин, содержащийся в перце, способен купировать аутистическиподобные нарушения у мышей линии BALB/c. Улучшаются такие поведенческие показатели, как обучение моторным навыкам,

ноцицепция, локомоция, снижается уровень тревожности. Также пиперин снизил уровень маркеров окислительного стресса и восстановил гистологическую структуру мозжечка. Предполагается, что корректирующий эффект вещества связан с его антиоксидантной и нейропротекторной активностью (Pragnya et al., 2014). Результаты последних исследований показывают, что физические упражнения на беговой дорожке у ВПК-крыс снижают агрессивность и ускоряют принятие правильного решения в пространственном обучении. Упражнения на беговой дорожке увеличивают нейрогенез и концентрацию рилина (гликопротеина, ответственного за миграцию нейронов и развитие мозга) в гиппокампе крыс, страдающих аутизмом (Seo et al., 2013).

Недавно показано, что дефицит в социальном взаимодействии, наблюдаемый в ВПК-модели, может быть скорректирован хроническим введением ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC), например, аналога вальпроевой кислоты пентил-4-ун-ВПК. Хроническое введение ингибиторов гистондеацетилазы вызывает модификации самих гистонов, что, в свою очередь, влияет на экспрессию генов (Foley et al., 2014).

Нормализация ноцицепции может быть связана с аллостерической модуляцией эндоканнабиноидной системы. О вовлеченности эндоканнабиноидной системы при РАС известно пока не очень много, несмотря на то, что она играет важную роль в регуляции эмоциональных реакций и социального поведения в норме. Недавние исследования показывают, что поведенческие нарушения у ВПК-крыс могут быть связаны с дисфункцией именно эндоканнабиноидной системы, в частности с изменением концентраций анандамида и 2-арахидонглицерола в гиппокампе, фронтальной коре и мозжечке (Kerr et al., 2013). Исходя из этого, может быть предложено изучение эффектов анандамид-подобных соединений на модели РАС.

6.4. Магнитно-резонансная томография (МРТ)

С целью более детального описания моделируемой патологии при введении ВПК и корректирующего эффекта пептидов нами была проведена дополнительная серия экспериментов по исследованию структур головного мозга с помощью магнитно-резонансной томографии. Измерения проводились в томографе для

малых животных Bruker BioSpec 70/30 (Bruker, Германия) с программным обеспечением ParaVision 5.0. Исследовались крысы в возрасте 2-х месяцев после окончания поведенческих экспериментов.

Для анализа были выбраны следующие области: зоны гиппокампа CA1 и CA3, таламус (thalamus), стриатум (caudate putamen), латеральная часть бледного шара (lateral globus pallidus), миндалина (amygdalohippocampal area).

1) T2-карты.

Тестирование проводилось с контрольными животными и с животными после пренатальной инъекции ВПК. Анализ T2-карт позволяет выявить отличия в структуре мозговой ткани между контролем и опытом. Было показано, что в опытной группе происходит усиление T2-сигнала на 19,5% в таламусе, на 10% в миндалине, на 12% в стриатуме и на 10,5% в бледном шаре. Результаты представлены на рисунке 27. Повышение уровня T2-сигнала свидетельствует о негативном действии ВПК. Усиление T2-сигнала обычно связывают с различными нейродегенеративными процессами, гибелью нейронов и обводнением мозговой ткани. Вызвать усиление T2-сигналов может глиоз, апоптоз или некроз структур, но для точного определения необходимо провести дополнительное гистохимическое исследование. Нейродегенеративные свойства ВПК могут быть связаны с деконденсацией хроматина и активацией экспрессии проапоптотических факторов (bcl-2, bax, c-myc, c-fos). Многие патофизиологические исследования также показывают, что РАС часто связаны с изменениями структуры серого и белого вещества головного мозга, в частности, с отклонениями от нормального созревания корковой ткани. Например, в раннем послеродовом периоде отмечено избирательное разрастание ткани в височной и лобной областях, участвующих в реализации эмоциональных, социальных и коммуникационных функций (Chomiak et al., 2013). Исследования, посвященные изучению анатомии и морфологии мозга ВПК-животных показывают, что у крыс отмечается снижение размера и веса головного мозга, а также уменьшение толщины коры головного мозга, наряду с ослаблением дендритной сети в орбитофронтальной коре, медиальной префронтальной коре и мозжечке (Mychasiuk et al., 2012).

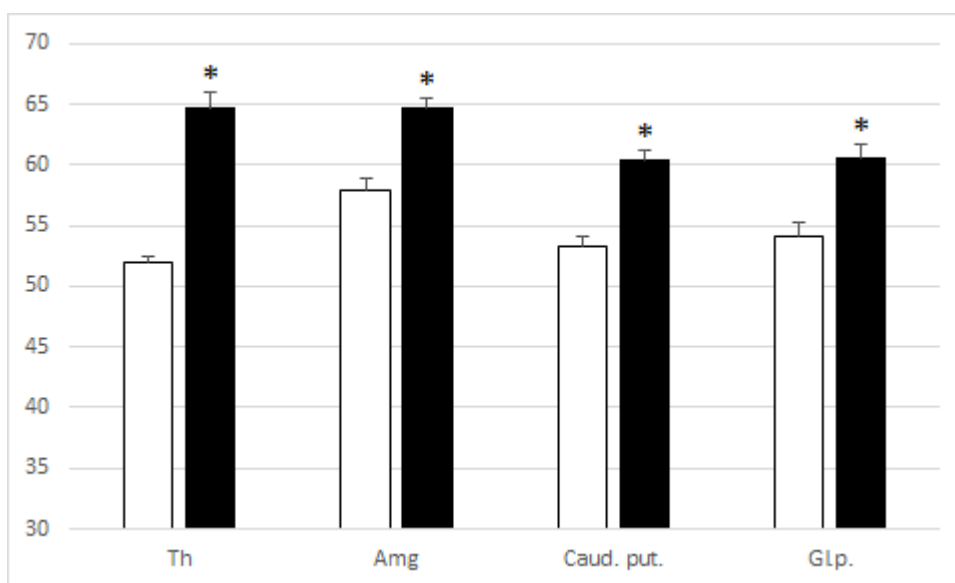


Рис. 27. Измерение величины T2-сигналов в различных отделах мозга при МРТ-исследовании. Th – таламус; Amg – миндалина; Caud. put. – стриатум; Gl.p. – бледный шар. По оси ординат: мс. Представлены усредненные по двум полушариям данные в виде $AM \pm SEM$.

Условные обозначения: белый цвет – группа контрольных животных (n=9), черный цвет – группа опытных животных, получавших пренатальную инъекцию ВПК (n=8). * - отличие от контрольной группы с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента.

2) Измерение объема гиппокампа.

Тестирование проводилось с контрольными животными, с животными после пренатальной инъекции ВПК, а также в сериях с введением ВПК-крысам пептидов БКМ-7 и Ac-D-MPRG. Результаты представлены на рисунке 28. Полученные данные указывают на то, что пренатальное введение ВПК вызывает у крыс редукцию гиппокампа на 19% в среднем по сравнению с контролем.

У человека уменьшение объема гиппокампа связано с различными морфологическими нарушениями (например, склерозом, гибелью нейронов) и может привести к дефициту рабочей памяти, измененному объективному и субъективному представлению о мире через обработку внешних сигналов, уменьшению вербальной коммуникации, изменениями в эмоциональном развитии. Подобные нарушения часто рассматриваются как диагностические признаки РАС.

Вероятно, в основе описанных изменений лежат уже упоминавшиеся механизмы: деконденсирование хроматина через изменение процессов

ацетилирования и метилирования ДНК и гистонов; изменение экспрессии факторов, участвующих в патогенезе аутизма (например, генов Noxa1 и неурегулин-3). Нейрональные исследования показывают гипер-перцепцию, повышенное внимание и ухудшенную память на моделях с введением ВПК. С использованием водного лабиринта Морриса у ВПК-крыс показано изменение пространственной памяти, а также рост нейрональной плотности в 5 областях гиппокампа (Edalatmanesh et al., 2013).

Также методика МРТ позволила нам выявить нейропротекторное действие БКМ-7 и Ас-D-MPRG на фоне развития фетального вальпроатного синдрома. У крыс, получавших БКМ-7, отмечается увеличение объема левого гиппокампа на 10,5% и правого гиппокампа на 9% относительно негативного контроля; у крыс, получавших Ас-D-MPRG, произошло увеличение объема левого гиппокампа на 20% и правого гиппокампа на 19% относительно негативного контроля. Под влиянием пептидов происходит возврат объема гиппокампа к норме. Таким образом, данные, полученные в МРТ-исследовании, подтверждают нашу гипотезу о корректирующем влиянии гептапептида БКМ-7 и тетрапептида Ас-D-MPRG на дисфункции ЦНС. Нормализация объема гиппокампа является очень позитивным результатом, т.к. эта область головного связана с формированием памяти, эмоций, социальной мотивации и пространственной ориентации.

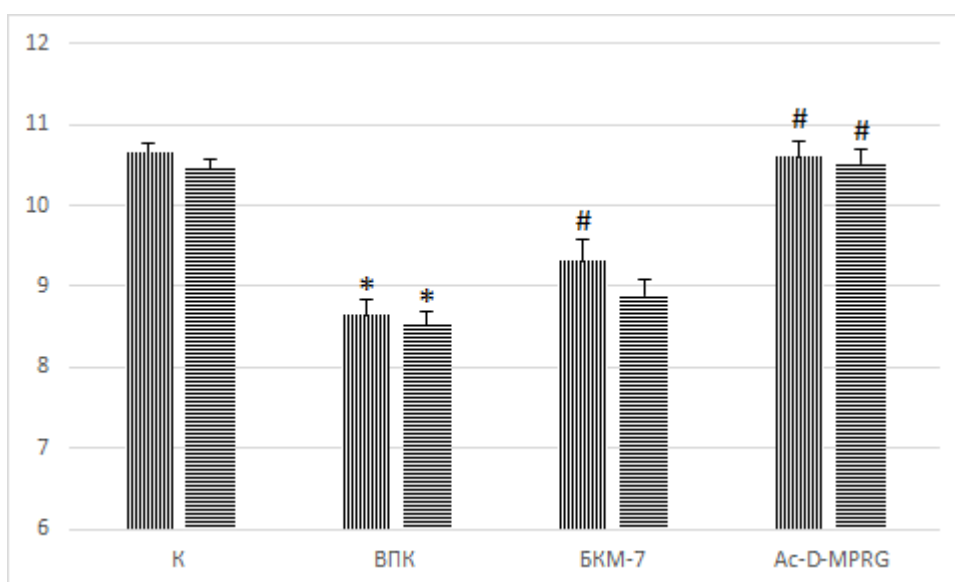


Рис. 28. Измерение объема гиппокампа при МРТ-исследовании. К – здоровый контроль (n=20); ВПК – крысы, подвергшиеся пренатальному воздействию ВПК (n=17); БКМ-7 – крысы, получившие пренатально ВПК и в/б

инъекции пептида бета-казоморфина-7 в 1-14 дни жизни (n=6); Ac-D-MPRG – крысы, получившие пренатально ВПК и и/н инъекции аналога фрагмента АВП в 1-14 дни жизни (n=5). По оси ординат – объем, см³. Представлены усредненные данные в виде AM±SEM.

Условные обозначения: вертикальный штрих – объем левого гиппокампа; горизонтальный штрих – объем правого гиппокампа. * - отличие от контроля с $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента. # - отличие от группы ВПК с $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

6.5. Изучение особенностей поведения крыс линии WAG/Rij в раннем возрасте (1-2 месяца жизни)

В клинической практике давно обсуждается взаимосвязь расстройств аутистического спектра с такими состояниями, как эмоциональные нарушения, депрессия, психотические реакции, агрессия, гиперактивность и поведенческие расстройства (Trimble, 1991; Болдырев, 2000). К сожалению, данных о коморбидности РАС и депрессии по экспериментальным моделям не так много. Именно поэтому мы использовали крыс линии WAG/Rij, которые являются модельным объектом не только абсанс-эпилепсии, но и депрессии, и ту же батарею тестов, что и в случае крыс с ФВС. Про поведенческие особенности и наличие патологических изменений в раннем возрасте у крыс WR известно мало, поэтому представляет интерес как сама по себе характеристика крыс WR в возрасте от рождения до 2 месяцев, так и сравнение с ВПК-крысами. Крайне актуальными остаются вопросы о наличии и особенностях когнитивных расстройств при депрессиях, а также вовлеченность дофаминергической системы мозга в патогенез заболевания.

По результатам «ранних» тестов можно заключить, что у детенышей «депрессивных» крыс линии WAG/Rij по сравнению с детенышами «нормальных» крыс идентичного возраста снижены темпы психомоторного и физического развития. Схожие различия мы наблюдали у ВПК-крыс. У потомства крыс линии WAG/Rij увеличен латентный период рефлекторного переворачивания со спины на лапы, но при этом нет изменений в общей двигательной активности, что может свидетельствовать о задержке именно в созревании двигательных рефлексов,

снижении темпов психомоторного развития. Также у детенышей крыс WR обнаружено отставание в развитии вестибулярной функции и связанной с ней двигательной координации. Часть крысят не успевала выполнить реакцию в тесте «отрицательные геотаксис», что может, видимо, свидетельствовать о снижении уровня двигательной мотивации и/или ориентировочно-исследовательской активности.

У потомства крыс линии WAG/Rij выявлена повышенная чувствительность к тактильному стимулу: на обычный тактильный стимул они отвечают гиперреакцией, активно его избегая. Известно, что самки линии WAG/Rij при заботе о потомстве нормально выполняют функцию кормления, но при этом у них значимо снижены такие параметры, характеризующие материнскую заботу, как число переносов и число контактов с детенышами, не связанных с их кормлением (Танаева с соавт., 2013). Таким образом, повышенная чувствительность к тактильному стимулу у потомства крыс WR может быть связана с недостаточностью тактильной стимуляции, получаемой в раннем онтогенезе от матери. С другой стороны, повышенная чувствительность к тактильному воздействию у детенышей WR может также свидетельствовать о повышенной стресс-реактивности, являясь ранним проявлением повышенной тревожности. Известно, что недостаточная материнская забота приводит к повышению уровня кортикостерона и к гипер-реактивности на стресс у детенышей (Raineli et al., 2013). Мать посредством своей заботы «программирует» стресс-реактивность у потомства (Meaney, 2001), а, следовательно, и предрасположенность к стресс-провоцируемой психопатологии, в том числе к депрессии.

Таким образом, результаты тестов указывают на раннее развитие патологического процесса у крыс линии WAG/Rij и, возможно, генетическую обусловленность депрессивноподобного поведения.

В более старшем возрасте практически во всех тестах видны нарушения, и они во многом сходны с поведенческими изменениями ВПК-крыс:

1. Данные, полученные в тестах ОП и ПКЛ описывают рост уровня тревожности у крыс линии WAG/Rij за счет снижения ориентировочно-исследовательской мотивации. Аналогичные изменения наблюдались на модели РАС.

2. У крыс линии WAG/Rij изменено социальное взаимодействие, зарегистрировано существенное снижение стремления к социальной новизне. Данный результат указывает на аналогию между мозговыми дисфункциями ВПК-крыс и крыс линии WAG/Rij. Вероятно, в раннем возрасте, нарушения деятельности ЦНС еще не имеют ярко выраженного специфического характера.

3. Также у крыс WR были зарегистрированы классические поведенческие проявления повышенной депрессивности по результатам теста «принудительное плавание». Ранее показано, что у ВПК-крыс также повышен уровень депрессивности, и данное нарушение возможно скорректировать при помощи пептидных биорегуляторов.

4. Были обнаружены нарушения в ноцицепции у крыс WR: происходит значимое повышение латентных периодов рефлекса облизывания задней лапы и, следовательно, снижение болевой чувствительности или гипоальгезия. Напомним, что у ВПК-животных была выявлена гипоальгезия, и есть данные по связи этого отклонения с эндоканнабиноидной системой. В данной серии специальный контроль температуры тела животных также не проводился, но в литературе нам не удалось обнаружить сообщений об изменениях терморегуляции у крыс линии WAG/Rij.

5. У крыс линии WAG/Rij при выработке условной реакции пассивного избегания было зарегистрировано нарушение обучения с отрицательным подкреплением, отличающее их от ВПК-крыс.

6. Также можно предполагать наличие некоторой стереотипии в поведении крыс WR по анализу изменений вертикальной двигательной активности и груминга в ряде тестов.

Таким образом, у крыс линии WAG/Rij наличие патологических изменений обнаруживается уже в течение первого месяца жизни. Зарегистрированная у детенышей крыс WR картина во многом сходна с нарушениями поведения в случае расстройств аутистического спектра. Если сравнивать с ВПК-крысами, то можно заключить, что у крыс WR мозговая дисфункция выражена даже ярче, хотя эти две патологические модели, во многом, сонаправлены. Вероятно, в основе сходных поведенческих изменений лежат и сходные механизмы. Например, в одной из недавних работ показано, что нарушение деацетилирования гистонов и связанные с

ним посттрансляционных модификаций, в частности ацетилирования, также обнаружены и на животных моделях депрессии (Liu et al., 2014).

Для дополнительного установления аналогии между ВПК-животными и крысами линии WR полезно провести отдельное поведенческое исследование, которое базируется на Павловском рефлексе моргания. В качестве безусловного раздражителя используется поток воздуха, направленный в глаз; условного – звуковой или световой сигнал. При этом пути, по которым реализуется условный рефлекс, точно известны: затронуты практически все структуры, страдающие у людей-аутистов, а также гиппокамп. У людей-аутистов и у ВПК-крыс регистрируются совершенно одинаковые изменения: обучение ускоряется, и при этом амплитуда реакции становится больше. Данный эффект объясняется специфическим изменением в круге «ствол-мозжечок». Если так же будет изменяться обучение крыс WR, то можно будет сделать заключение о единых механизмах развития РАС и депрессии в раннем возрасте.

Коморбидность аутизма, эпилепсии и депрессии, как мы уже отмечали, в последнее время вызывает большой интерес среди исследователей. Недавние работы выявили гетерозиготные точечные мутации в гене KCNJ10, который кодирует калиевые каналы, преимущественно в астроцитах. Полученные результаты подчеркивают роль калиевых каналов при РАС, а также явно указывают на взаимосвязь РАС и эпилепсии (D'Adamo et al., 2011). Клинические исследования показывают, что наличие депрессивных симптомов не связано с возрастом, но относительно сильно коррелирует с клиническим диагнозом РАС (Gotham et al., 2014; Matson et al., 2014). Также сообщается, что эпилепсия возникает у одной трети детей с РАС; исследования подчеркивают высокую степень коморбидности аутизма с моторными нарушениями, расстройствами сна и эпилепсией (Jeste, 2011).

С другой стороны, к настоящему времени накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о важной роли дофамина, прежде всего D2/D3 рецепторов, в патогенезе депрессивных нарушений у животных и человека (Drago et al., 2000), а также в опосредовании терапевтического эффекта антидепрессантов дофамином, независимо от непосредственных нейрохимических механизмов их действия (D'Aquila et al., 2000). Показано, что блокада D2/D3 рецепторов может

вызвать депрессивноподобное состояние и/или каталепсию у нормальных крыс и здоровых людей, а также привести к возобновлению депрессивной симптоматики после ее купирования с помощью антидепрессантной терапии у больных депрессией людей (Willner et al., 2005). Поскольку изменения в нейромедиаторных системах, и в частности в системе дофамина, также были показаны на моделях РАС и обсуждались нами ранее, то мы решили провести функциональное фармакологическое тестирование дофаминергической системы и у крыс линии WAG/Rij с помощью клебоприда.

6.6. Изучение зависимого от матери («детского») поведения крыс линии WAG/Rij

Разбалансировка серотонинергической, норадреналинергической и дофаминергической нейромедиаторных систем может оказать существенное влияние на детское поведение крыс линии WAG/Rij. Обычно эти вопросы в литературе не рассматриваются, т.к. поведенческие отклонения крыс WR традиционно связывают с возрастом 5-6 месяцев. Ранее было показано, что детское поведение нарушено у ВПК-крыс, поэтому, в свете изучения коморбидности РАС и депрессии, было бы интересно провести аналогичное исследование с детенышами крыс линии WR. Также уже было показано, что именно дофаминергическая система играет важную роль в поддержании мотивации находиться в контакте с матерью. Формирование детского поведения может не только подробнее охарактеризовать патологическое состояние ЦНС крыс линии WR, но и являться одним из факторов, обуславливающим дальнейшее развитие патологических изменений, т.к. реципрокность отношений «мать-дитя» крайне важна для здорового развития детенышей млекопитающих.

Полученные результаты, подробно описанные в разделе 5.6, указывают на снижение детской мотивации детенышей «депрессивных» крыс линии WAG/Rij. Так, хотя на 10-й и на 15-й день жизни у них меньше латентный период присасывания к соску матери, но также и достоверно меньше время контакта с матерью. Полученные результаты можно трактовать так, что крысята WR четко ассоциируют родное гнездо с пищей и безопасностью, но мотивация находиться в контакте с матерью, стремление именно к социальному взаимодействию с ней, у

них снижена. Пониженная привязанность к матери у детенышей крыс линии WAG/Rij, вероятно, может быть следствием материнской депрессии и связанной с ней пониженной материнской заботы. Кроме того, пониженная привязанность к матери у детенышей «депрессивных» крыс может быть ранним маркером депрессивной патологии, проявляющейся позже (Sarkisova et al., 2011). В пользу этого предположения свидетельствуют клинические данные о взаимосвязи материнской депрессии и пониженной привязанности к матери у детей, а также о связи между пониженной привязанностью к матери и тяжестью депрессивной патологии, развивающейся в юношеском возрасте (Bisaz et al., 2012).

Известно, что депрессивноподобная патология у взрослых крыс линии WAG/Rij во многом обусловлена гипофункцией дофаминергической системы мозга. Для того, чтобы оценить ее состояние у детенышей WR, мы провели тесты с введением антагониста D2-рецепторов клебоприда в дозе 0,1 мг/кг. Было показано, что введение клебоприда увеличивает латентный период полуобхода тела матери, увеличивает латентный период присасывания к соску, уменьшает число подталкиваний, т.е. оказывает всестороннее угнетающее влияние на зависимое от матери поведение. При сопоставлении поведенческих эффектов клебоприда у потомства «депрессивных» крыс и потомства «нормальных» крыс установлено, что клебоприд оказывает более сильное угнетающее влияние на поведение детенышей крыс линии WAG/Rij. Поскольку в возрасте 10-15 дней в мозге у крыс преобладает экспрессия D2-рецепторов дофамина над D1-рецепторами (Chen et al., 2010), а D2-рецепторы, в основном, представлены в виде постсинаптических рецепторов (Lin et al., 1994), мы полагаем, что угнетающее действие клебоприда связано с его блокирующим влиянием на постсинаптические D2-рецепторы. Используемый фармакологический метод оценки состояния медиаторных систем указывает на то, что дофаминергическая система мозга крысят линии WAG/Rij характеризуется повышенной чувствительностью ее рецепторной составляющей, что может быть обусловлено пониженной функциональной активностью дофаминергической системы мозга.

Известно, что выраженность материнской заботы у крыс (Champagne et al., 2004) и у людей (Strathearn, 2011) положительно коррелирует с уровнем дофамина в мезолимбической системе мозга. Пониженный уровень дофамина в мозге,

наблюдаемый при депрессивных расстройствах у животных и человека (Dunlop et al., 2007), приводит к снижению материнской заботы, а, следовательно, к уменьшению контакта детей с матерью. Уменьшение контакта с матерью, в свою очередь, вызывает снижение уровня дофамина в мозге у потомства как у крыс, так и у людей, а также повышенное высвобождение дофамина в ответ на стресс (Pruessner, 2004). Другими словами, депрессивное состояние матери, обусловленное дефицитом дофамина в ее мозге, через пониженную материнскую заботу (пониженный контакт с детьми) оказывает эпигенетическое влияние на функциональную активность дофаминергической системы мозга и ее стресс-реактивность у потомства.

Таким образом, у крыс линии WAG/Rij понижено стремление к контакту с матерью и введение клебоприда усиливает это отклонение. При этом у ВПК-крыс было показано значительное повышение детского поведения и отсутствие влияния D2-антагониста на этот процесс. По всей видимости, несмотря на сходство многих поведенческих реакций, не все механизмы развития патологического состояния у ВПК-крыс и крыс WR одинаковы, и это тоже важно и интересно. Некоторые различия были найдены и во «взрослых» тестах, в частности в способности к формированию навыков с отрицательным подкреплением.

6.7. Изучение когнитивных функций у крыс линии WAG/Rij

Ранее было показано, что у детенышей крыс WR обнаружены нарушения в обучении с отрицательным подкреплением. При этом в единичных исследованиях когнитивных функций у взрослых крыс линии WAG/Rij получены неоднозначные данные. Таким образом, перед нами стояла цель выяснить, имеются ли когнитивные нарушения при генетически обусловленных депрессивных расстройствах.

Для тестирования способности к обучению у крыс линии WAG/Rij нами была выбрана методика «сложного лабиринта» с положительным пищевым подкреплением. При выборе экспериментального подхода мы исходили из следующих положений. Во-первых, методики именно с положительным подкреплением являются наиболее адекватными для тестирования когнитивных функций на фоне депрессивных нарушений, т.к. результаты тестов с

использованием негативного подкрепления (электрошоковое раздражение лап) могут быть связаны не только с депрессией, но и с сопутствующим изменением порогов болевой чувствительности. Во-вторых, «сложный лабиринт» позволяет оценить пространственную, гиппокамп-зависимую память, а также функционирование префронтальной коры в задаче на переучивание. В экспериментах с участием людей показано, что реверсивное обучение является дофамин-зависимым (Cools et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о том, что использование реверсивного обучения с положительным подкреплением у крыс WR может позволить не только выявить когнитивные нарушения при депрессивноподобном состоянии, но и оценить вклад различных составляющих дофаминергической системы (мезолимбической, мезокортикальной, nigro-стриарной) в патогенез этих нарушений.

Полученные при проведении экспериментов в «сложном лабиринте» результаты подробно описаны в разделе 5.7. Данные свидетельствуют об ухудшении способности к обучению и выполнению обратной задачи у опытных животных. Принимая во внимание тот факт, что выбранная нами методика способна оценить функциональное состояние гиппокампа и префронтальной коры, о чем было сказано выше, можно заключить, что при генетически обусловленных патологических состояниях у крыс линии WAG/Rij функционирование данных отделов мозга нарушено.

Ухудшение выполнения прямой и обратной задач хорошо укладывается в существующие представления о недостаточности дофаминергической системы мозга у крыс линии WAG/Rij. С одной стороны, известно, что реверсивное обучение является дофамин-зависимым, с другой – что важный вклад в формирование депрессивноподобного состояния вносит дофаминергическая система мозга животных (Sarkisova et al., 2003). Биохимические исследования подтвердили ранее высказанное предположение о гипофункции дофаминергической системы мозга у крыс WR, основанное на фармакологическом анализе особенностей поведения крыс этой линии (Sarkisova et al., 2010). Установлено, что у этих животных по сравнению с крысами Wistar концентрация дофамина меньше в префронтальной коре, nucleus accumbens и стриатуме (Sarkisova et al., 2011). В настоящей работе нами впервые получены данные,

свидетельствующие о когнитивном дефиците у крыс WR при выполнении прямой и обратной задач в сложном лабиринте при положительном подкреплении. Ранее было показано, что у людей с исходно повышенным уровнем дофамина в стриатуме реверсивное обучение с положительным подкреплением лучше, чем у людей с исходно пониженным содержанием дофамина (Cools et al., 2009). Эти данные указывают на то, что пониженная способность крыс линии WAG/Rij к реверсивному обучению может быть связана с дофаминергической недостаточностью стриатума.

Важной составляющей успешности выполнения как прямой, так и обратной задач в «сложном лабиринте» является эмоциональное состояние животных и уровень их пищевой мотивации. Известно, что количество дофамина у крыс WAG/Rij кроме префронтальной коры и стриатума снижено также в прилежащем ядре (*nucleus accumbens*), которое, по всей видимости, играет ключевую роль в активации поведенческих программ, связанных с той или иной биологической потребностью, а также в развитии положительных эмоциональных состояний, обусловленных удовлетворением потребности, поощрением, подкреплением, «наградой».

Для проверки предположения о снижении мотивационного фона животных нами был проведен специальный тест на баланс оборонительной и пищевой мотивации – *novelty suppressed feeding test*. Установлено, что у крыс линии WAG/Rij снижено потребление корма в условиях домашней клетки. Данный показатель характеризует именно уровень пищевой мотивации. Таким образом, мы можем заключить, что данный параметр также снижается при депрессивноподобных нарушениях. Важность вклада уровня пищевой мотивации при выполнении задач в «сложном лабиринте» была выявлена при проведении статистического корреляционного анализа. Были обнаружены достоверные отрицательные корреляции между параметром среднего времени реакции при выполнении обратной задачи в день достижения критерия в «сложном лабиринте» и параметром количества потребляемой пищи в условиях домашней клетки в тесте «*novelty suppressed feeding*» у крыс линии WAG/Rij (по параметрическому критерию Пирсона коэффициент корреляции составил $-0,60$ с $p < 0,01$; по

непараметрическому критерию Спирмена коэффициент корреляции составил $-0,54$ с $p < 0,05$).

Другим показателем в тесте «novelty suppressed feeding» является латентный период нахождения пищи в условиях новой обстановки, который характеризует баланс оборонительной и пищевой мотивации животных. Нами получено, что данный параметр у крыс линии WAG/Rij значимо выше, чем у крыс Wistar, что еще раз подчеркивает снижение пищевой мотивации, а также свидетельствует о повышенном уровне тревожности. Интересно, что данный параметр положительно коррелирует с днем достижения критерия обученности при выполнении прямой задачи в «сложном лабиринте» (по критерию Пирсона коэффициент корреляции составил $+0,60$ с $p < 0,05$; по критерию Спирмана коэффициент корреляции составил $+0,67$ с $p < 0,01$). Таким образом, чем ниже уровень пищевой мотивации и выше уровень тревожности, тем хуже крысы обучаются в «сложном лабиринте», что еще раз подтверждает вышеприведенные рассуждения.

В тесте ОП у крыс линии WAG/Rij зарегистрировано увеличение уровня двигательной активности по сравнению с крысами Wistar: у них значимо повышен как пробег у стенок арены. При этом особое внимание на себя обращает тот факт, что параметры, характеризующие исследовательскую активность (например, число стоек и выходы в центр арены) у животных WR находятся на уровне Wistar. Таким образом, результаты теста свидетельствуют о росте у крыс WR двигательной активности, не ассоциированном с повышенной исследовательской мотивацией. При этом животные WR активнее реагировали на помещение в новую, стрессогенную обстановку – значимые отличия от группы Wistar обнаружены именно на 1-й минуте тестирования (снижение ЛП выхода из центра «поля», увеличение стоек, пробега в центре арены, числа отходов от стенок). Это именно реакция на стрессогенную обстановку, т.к. на 4-й минуте тестирования, когда освещение меняется с яркого света на красный, у крыс WR не происходит роста исследовательской и двигательной активности (значения параметров остаются на уровне, не превышающем таковой у Wistar). В целом, полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что крысы линии WAG/Rij более чувствительны к стрессу, и это, в свою очередь, может быть связано с нарушением серотонинергической системы.

В тесте Порсолта нами были обнаружены 2 типичных поведенческих нарушения у крыс линии WAG/Rij, клиническим аналогом которых является угнетенное, депрессивное настроение. Во-первых, у животных был достоверно увеличен латентный период 1-го эпизода активного плавания вместе со значимым уменьшением его длительности относительно нормы. Из литературы известно, что 1-й эпизод активного плавания является дофамин-зависимым компонентом поведения (Lucki et al., 1997). Во-вторых, у крыс WAG/Rij значимо увеличено время иммобилизации по сравнению с Wistar.

6.8. Модель депрессивноподобного состояния с использованием хронического введения клебоприда

Данные, полученные в экспериментах с использованием клебоприда на модели PAC и на крысах линии WAG/Rij, указывают на вовлеченность дофаминергической системы мозга в формирование патологического депрессивноподобного состояния. Основываясь на этом, была предпринята попытка моделирования такого состояния с использованием хронического в/б введения клебоприда взрослым беспородным крысам.

По результатам, представленным в разделе 5.8, можно оценить влияние хронического введения клебоприда в дозе 0,4 мг/кг на гедонический статус крыс в течение 2-х недель. Введение D2-антагониста вызвало продепрессантный эффект, однако он не вполне стабилен. Таким образом, с одной стороны, блокада D2-рецепторов способна привести к появлению симптомов депрессии, а с другой – необходима дальнейшая исследовательская работа по подбору оптимальной дозы и сроков введения D2-антагонистов. Поскольку введение клебоприда вызвало неустойчивые депрессивноподобные нарушения в поведении, можно заключить, что вклад в развитие патологии у генетических линий крыс (WAG/Rij, Flinders Sensitive и т.д.) вносит не только дофаминергическая система мозга. Полученные результаты носят предварительный характер, и в этом направлении планируется проведение дальнейших работ по подбору препаратов, доз и сроков введения.

7. Заключение

По данным ВОЗ на 2013 год более 7,6 миллионов людей страдало РАС по всему миру, а по данным американской организации CDC аутистические расстройства в 2011-2012 годах имелись в США у каждого 50-го школьника. В свете описанной взаимосвязи РАС с эпилептическими и депрессивными нарушениями представляется крайне актуальным и интересным сравнительный анализ животных моделей с пре- и постнатальным введением фармакологических препаратов, а также генетических линий животных с целью выявления коморбидности патологий.

Полученные нами результаты подтверждают способность высокой дозы ВПК вызывать развитие фетального вальпроатного синдрома у детенышей, а также дополняют и расширяют данные о нарушениях в работе мозга потомства. Особенно важно отметить новые данные о зоосоциальном взаимодействии экспериментальных животных. Во-первых, нами была использована методика, позволяющая оценить стремление к социальной новизне, т.е. стремление к расширению социальной активности, к новым контактам, выходящим за рамки «своей семьи». Снижение данной мотивации было выявлено нами у крысят как в ситуации выбора между матерью и незнакомой самкой, так и между сибсом и чужаком. Во-вторых, нами продемонстрированы нарушения зависимого от матери поведения крыс с ФВС. Вероятно, сочетание нарушений ЦНС при фетальном вальпроатном синдроме приводит к компенсаторному усилению привязанности к матери.

Также наше исследование расширяет представление о поведенческих особенностях крыс линии WAG/Rij в раннем возрасте и коморбидности РАС, эпилепсии и депрессии. Полученные результаты указывают, что развитие патологических процессов у крыс линии WAG/Rij начинается уже в течение первого месяца жизни. Показано, что у детенышей крыс линии WAG/Rij замедлено психомоторное развитие, повышены тревожность и депрессивность, изменено социальное взаимодействие, нарушена ноцицепция и ухудшено обучение с отрицательным подкреплением. При этом впервые показаны изменения зоосоциального поведения у крыс WAG/Rij, проявляющиеся как в стремлении к социальной новизне, так и в «детских», направленных на мать, реакциях.

Сравнение с ВПК-крысами показывает, что у крыс WAG/Rij мозговая дисфункция выражена еще ярче, хотя эти две патологические модели во многом сонаправлены. Вероятно, в основе соответствующих поведенческих изменений лежат (хотя бы отчасти) сходные механизмы. Например, в одной из недавних работ показано, что нарушения деацетилирования гистонов и посттрансляционных модификаций (в частности, ацетилирования) имеют место и в случае животных моделей депрессии (Liu et al., 2014).

Третьей исследованной моделью стало постнатальное фармакологическое воздействие хронически вводимого клебоприда. Инъекции D2-антагониста вызвали продепрессантный эффект. Ранее в нашей лаборатории было показано, что D2-антагонист, вводимый самкам после родов, увеличивает уровень тревожности потомства (Добрякова, 2009). Кроме того, происходит изменение привязанности к матери (Стоволосов, 2011). Следовательно, с одной стороны, блокада рецепторов к дофамину способна привести к появлению депрессивноподобных и тревожных расстройств, а с другой – необходима дальнейшая исследовательская работа по подбору оптимальной дозы и сроков введения соответствующих агонистов и антагонистов.

Описанные экспериментальные модели могут использоваться в дальнейшем для тестирования потенциальных фармацевтических препаратов, направленных на лечение нейропатологий. На текущем этапе нами исследовано влияние регуляторных пептидов разных групп на проявления ФВС. Можно отметить, что все исследованные пептиды обладают сходным паттерном активности и изменяют схожие, но не полностью совпадающие, комплексы параметров поведения. Все они влияют на эмоциональные реакции и болевую чувствительность животных. Для БКМ-7 и семакса продемонстрировано анксиолитическое, антидепрессантное и ноотропное действие; Ас-D-MPRG по результатам нашей работы нормализует ноцицепцию и оказывает антидепрессантный эффект. Представляется перспективным тестирование смеси изученных пептидов в целях коррекции мозговых дисфункций различного генеза. Вероятно, объединяющим механизмом эффектов пептидов различных групп является их нейтротрофическое воздействие и способность потенцировать развитие систем мозговых факторов роста и биогенных аминов.

8. Выводы

1. У детенышей крыс, получавших пренатальную инъекцию высокой дозы вальпроевой кислоты, отмечаются замедление психомоторного развития, снижение исследовательской активности, рост тревожности, нарушение зоосоциального взаимодействия, повышение уровня депрессивности, снижение болевой чувствительности. Наблюдаемый комплекс поведенческих изменений («фетальный вальпроатный синдром»; ФВС) позволяет отнести изучаемую ситуацию к экспериментальным моделям расстройств аутистического спектра.
2. Показано, что пептиды семакс, бета-казоморфин-7 и Ac-D-MPRG способны корректировать проявления ФВС и обладают сходным спектром активности, влияя на эмоциональные реакции и болевую чувствительность животных. Для бета-казоморфина-7 и семакса, кроме того, продемонстрировано анксиолитическое, антидепрессантное и ноотропное действие. Наиболее выраженное влияние на зоосоциальное взаимодействие оказал гептапептид семакс.
3. У детенышей крыс линии WAG/Rij замедлено психомоторное развитие, повышены тревожность и депрессивность, нарушены ноцицепция и социальное взаимодействие, ухудшено обучение с отрицательным подкреплением. При обучении и переучивании в «сложном лабиринте» с пищевым подкреплением обнаружены когнитивные нарушения у взрослых крыс WAG/Rij, что, вероятно, связано с депрессивноподобными изменениями их поведения.
4. Оценка зависимых от матери («детских») реакций показывает, что у крысят с ФВС (по сравнению с контролем) на 15-й день жизни значительно повышена привязанность к матери, тогда как у потомства крыс WAG/Rij установлено снижение стремления находиться в контакте с самкой. Инъекция D2-антагониста клебоприда не оказала влияния на крысят, подвергнутых пренатальному воздействию вальпроевой кислоты, и вызвала ухудшение «детского» поведения у потомства WAG/Rij.

5. Показано, что хроническое введение низкой дозы клебоприда взрослым белым крысам вызывает снижение потребления сахарозы, что можно расценить как продепрессантный эффект, проявляющийся в развитии ангедонии.
6. Сравнительный анализ нарушений поведения животных в случае ФВС и крыс линии WAG/Rij показывает, что эти патологические модели во многом сонаправлены. В обоих случаях обнаружены нарушения психомоторного развития, рост уровня тревожности и депрессивности, изменения в зоосоциальном взаимодействии (прежде всего, снижение стремления к социальной новизне). При этом отмечаются различия в ранних «детских» реакциях и способности к обучению.

9. Список литературы

1. Ашмарин И.П., Незавибатько В.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А., Гривенников И.А., Пономарева-Степная М.А., Андреева Л.А., Каплан А.Я., Кошелев В.Б., Рясина Т.В. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10-Семакс (15-летний опыт разработки и изучения). // Журнал ВНД. – 1997 – Т. 47(3). – С. 420-430.
2. Башина В.М. Аутизм в детстве // Изд. Медицина. – 1999 – С.2-37.
3. Болдырев А.И. Психические особенности больных эпилепсией. // М.: Медицина. – 2000 – С. 46-54.
4. Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое действие блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на обонятельное обучение мышей линии 129Sv в раннем постнатальном периоде. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013 – Т. 99(2). – С. 212-220.
5. Виленский Д.А., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние хронического введения семакса на исследовательскую активность и эмоциональное состояние белых крыс. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2007 – Т. 93(6). – С. 661-669.
6. Воскресенская О.Г., Ким П.А., Голубович В.П., Каменский А.А. Антидепрессантное действие аргинин-вазопрессина и его аналога C-концевого фрагмента – тетрапептида N-Ac-D-Met-Pro-Arg-Gly-NH₂. // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007 – Т. 7(1). – С. 1645-1646.
7. Добрякова Ю.В. Роль дофаминовой и опиоидной систем в регуляции материнской мотивации и поведения потомства. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Москва, 2010.
8. Дубынин В.А., Ивлева Ю.А., Стоволосов И.С. Влияние β-казоморфинов на зависимое от матери («детское») поведение белых крыс. // Доклады академии наук. – 2007 – Т. 412(2). – С. 279-282.
9. Дубынин В.А., Каменский А.А. Бета-казоморфины и их роль в регуляции поведения. // М.: КМК. – 2010. – С. 10-34.

10. Зозуля А.А., Кост Н.В., Мешавкин В.К., Соколов О.Ю. Блокируемое налоксоном подавление бета-казоморфинами-7 человека и быка поведенческих проявлений гиперфункции серотонинергической системы мышей в тесте «встряхивание головой». // Экспериментальная и клиническая фармакология. –2009 – Т. 72(2). – С. 3-5.
11. Иванова Д.М., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние семакса на болевую чувствительность животных в различных экспериментальных моделях. // Доклады Академии Наук. – 2003 – Т. 388(3). – С. 416-419.
12. Костенкова В.Н., Никольская К.А. Психо-эмоциональные проявления у гиппокампэктомизированных крыс. // Росс. Физиолог. Журн. – 2003 – Т. 89(7). – С. 868-878.
13. Левицкая Н.Г., Себенцова Е.А., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Нейропротекторные эффекты семакса на фоне МФТП-вызванных нарушений дофаминергической системы мозга. // Физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2002 – Т. 88(11). – С. 1369-1377.
14. Мамедов З.Г., Самедова Н.Ф. Моноаминергические механизмы реализации эмоционального стресса. // VI Международная междисциплинарная конференция по биологической психиатрии «Стресс и поведение». – 2002 – С. 57-68.
15. Саркисова К.Ю., Мидзяновская И.С., Куликов М.А. Депрессивноподобные изменения в поведении и экспрессия гена c-fos в дофаминергических структурах мозга у крыс линии WAG/Rij. // Журн. высш. нервн. деят. – 2002 – Т. 52(6). – С. 733-742.
16. Себенцова Е.А., Денисенко А.В., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Отставленные поведенческие эффекты хронического неонатального введения аналога АКТГ(4-10) семакса детенышам белых крыс. // Журн. высш. нервн. деят. – 2005 – Т. 55. – С.213-220.
17. Смулевич А.Б. Депрессии в общей медицине. // М.: Медицинское информационное агентство. – 2003 – С. 4-12.

18. Стоволосов И.С., Дубынин В.А., Каменский А.А. Новый метод изучения «детского» поведения (детско-материнского взаимодействия) новорожденных крыс. // Журн. высш. нервн. деят. – 2010 – Т. 60(2). – С. 247-254.
19. Стоволосов И.С., Дубынин В.А., Каменский А.А. Участие дофаминергической и опиоидной систем мозга в регуляции зависимого от матери поведения новорожденных белых крыс. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010 – Т. 150(9). – С. 248-252.
20. Стоволосов И.С. Влияние дофаминергической и опиоидной систем на зависимое от матери поведение детенышей белых крыс. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Москва, 2011.
21. Танаева К.К., Добрякова Ю.В., Саркисова К.Ю. Материнская забота и условная реакция предпочтения места, ассоциированного с детенышами, у депрессивных крыс линии WAG/Rij. // Тезисы докладов IX Международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии», Судак, Крым. – 2013 – С. 46-48.
22. Чернышева М.П. Гормоны животных. Введение в физиологическую эндокринологию. // СПб.: Глагол. – 1995 – С. 5-17.
23. Шилова О.Б., Полетаева И.И., Веретенников Н.А., Корочкин Л.И. Влияние неонатального введения АКТГ(4—10) на поведение и катехоламинергическую систему мозга взрослых мышей различных линий. // Доклады Академии Наук. – 1996 – Т. 348(5). – С. 715—718.
24. Abrahams B.S., Geschwind D.H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. // Nat. Rev. Genet. – 2008 – V. 9(5). – P. 341–355.
25. Almeida L.E., Roby C.D., Krueger B.K. Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. // Mol. Cell. Neurosci. – 2014 – V. 59. – P. 57-62.
26. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rats. // Anim. Behav. – 1975 – V. 23. – P. 896-920.
27. Altman J., Bayer S.A. Development of the brain stem in the rat. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the lower medulla. // J. Comp. Neurol. – 1980 – V. 194(1). – P. 1-35.

28. Amaral D.G., Schumann C.M., Nordahl C.W. Neuroanatomy of autism. // *Trends Neurosci.* – 2008 – V. 31(3). – P. 137-145.
29. American Psychiatric Association Diagnostic criteria for Autistic Disorder // *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th, text revision (DSM-IV-TR). – 2000 – P. 86-95.
30. Antonawich F.J., Azmitia E.C., Kramer H.K., Strand F.L. Specificity versus redundancy of melanocortins in nerve regeneration // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1994 – V. 739. – P. 60-73.
31. Arndt T.L., Stodgell C.J., Rodier P.M. The teratology of autism. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2005 – V. 23(3). – P. 189-199.
32. Avgustinovich D.F., Kovalenko I.L. Formation of behavioral pathology in female C57BL/6J mice exposed to prolonged negative psychoemotional conditions. // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2005 – V. 75(9). – P. 959-967.
33. Banerjee A., García-Oscos F., Roychowdhury S., Galindo L.C., Hall S., Kilgard M.P., Atzori M. Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2013 – V. 16(6). – P. 1309-1318.
34. Baird G., Cass H., Slonims V. Diagnosis of autism. // *BMJ.* – 2003 – V. 327(7413). –P. 488-493.
35. Beaudet A.L. Autism: highly heritable but not inherited. // *Nat. Med.* – 2007 – V. 13(5). – P. 534–536.
36. Bescoby Chambers N., Forster P., Bates G. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. // *Dev. Med. Child. Neurol.* – 2001 – V. 43 – P. 847.
37. Bessa J.M., Mesquita A.R., Oliveira M., Pego J.M., Cerqueira J.J., Palha J.A., Almeida O., Sousa N. A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression // *Behavioral. Neuroscience.* – 2009 – V. 3. – P. 1.
38. Bisaz R., Sullivan R.M. Developmental neurobiology of the rat attachment system and its modulation by stress. // *Behav. Sci.* – 2012 – V. 2. – P. 79-102.
39. Bodfish J.W., Symons F.J., Parker D.E., Lewis M.H. Varieties of repetitive behavior in autism: comparisons to mental retardation. // *J. Autism. Dev. Disord.* – 2000 – V. 30(3). – P. 237–243.

40. Bondi C., Rodriguez G., Gould G., Frazer A., Morilak D. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. // *Neuropsychopharmacology*. – 2008 – V. 33. – P. 320-331.
41. Brandl E.J., Kennedy J.L., Muller D.J. Pharmacogenetics of antipsychotics. // *Can. J. Psychiatry*. – 2014 – V. 59(2). – P. 76-88.
42. Branten A.J., Wetzels J.F., Weber A.M., Koene R.A. Hyponatremia due to sodium valproate. // *Ann. Neurol.* – 1998 – V. 43. – P. 256–257.
43. Bryson S.E., Smith I.M. Epidemiology of autism: prevalence, associated characteristics, and implications for research and service delivery. // *Ment. Retard. Dev. Dis. Res. Rev.* – 1998 – V. 4. – P. 97–103.
44. Buitelaar J.K. Why have drug treatments been so disappointing? // *Novartis Found Symp.* – 2003 – V. 251. – P. 235–244.
45. Cagiano R., Barfield R.J., White N.R., Pleim E.T., Weinstein M., Cuomo V. Subtle behavioural changes produced in rat pups by in utero exposure to haloperidol. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988 – V. 157(1). – P. 45-50.
46. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A., Stella A.M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007 – V. 8. – P. 766–775.
47. Cardemil E.V., O'Donnell E.H., Esposito-Smythers C., D'Eramo K.S., Derrick B.E., Spirito A., Grant K.E., Lambert S.F. Depressive Symptoms in Low-Income, Urban Adolescents: Cognitive and Contextual Factors. // *J. Prev. Interv. Community.* – 2014 – V. 42(3). – P. 183-195.
48. Carlson G.C. Glutamate receptor dysfunction and drug targets across models of autism spectrum disorders. // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* – 2012 – V. 100. – P. 850–854.
49. Caronna E.B., Milunsky J.M., Tager-Flusberg H. Autism spectrum disorders: clinical and research frontiers. // *Arch. Dis. Child.* – V. 93(6). – P. 518–523.
50. Casanova M.F. The neuropathology of autism. // *Brain. Pathol.* – 2007 – V. 17(4). – P. 422-433.
51. Chaki S., Hirota S., Funakoshi T., Suzuki Y., Suetake S., Okubo T., Ishi T., Nakazato A., Okuyama S. Anxiolytic-like and antidepressant-like activity of

- MCL0129, a novel and potent nonpeptide antagonist of the melanocortin-4 receptor. // *J. Pharmacol. Exper. Ther.* – 2003 – V. 304(2). – P. 818-826.
52. Champagne F.A., Chretien P., Stevenson C.W., Zhang T.Y., Gratton A., Neaney M.J. Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. // *J. Neurosci.* – 2004 – V. 24(17). – P. 4113-4123.
53. Chen P.S., Wang C.C., Bortner C.D., Peng G.S., Wu X., Pang H., Lu R.B., Gean P.W., Chuang D.M., Hong J.S. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. // *Neuroscience.* – 2007 – V. 149. – P. 203–212.
54. Chen Y.I., Choi J-K., Hu H., Ren J., Andersen S.L., Jenkins B.G. Pharmacologic neuroimaging of the ontogeny of dopamine receptor function. // *Dev. Neurosci.* – 2010 – V. 32(2). – P. 125-138.
55. Chomiak T., Hu B. Alterations of neocortical development and maturation in autism: insight from valproic acid exposure and animal models of autism. // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2013 – V. 36. – P. 57-66.
56. Chomiak T., Turner N., Hu B. What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. // *Pathology Research International.* – 2013 – V. 2013. – P. 1-8.
57. Christensen J. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. // *JAMA.* – 2013 – V. 309(16). – P. 1696-1703.
58. Coghilana S., Hordera J., Inksterb B., Mendeza M., Murphya D., Nuttc D. GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms. // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* – 2012 – V. 36. – P. 2044-2055.
59. Cohen O.S., Varlinskaya E.I., Wilson C.A., Glatt S.J., Mooney S.M. Acute prenatal exposure to a moderate dose of valproic acid increases social behavior and alters gene expression in rats. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2013 – V. 31(8). – P. 740-750.
60. Cools R., Frank M.J., Gibbs S.E., Miyakawa A., Jagust W., D'Esposito M. Striatal dopamine predicts outcome-specific reversal learning and its sensitivity to dopaminergic drug administration // *J. Neurosci.* – 2009 – V. 29(5). – P. 1538-1543.

61. Craik D.J., Fairlie D.P., Liras S., Price D. The future of peptide-based drugs. // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2013 – V. (1). – P. 136-147.
62. D'Adamo M., Moro F., Imbrici P., Martino D., Roscini M., Santorelli F., Sicca F., Pessia M. The emerging role of the inwardly rectifying K⁺ channels in autism spectrum disorders and epilepsy. // *Malta Medical Journal.* – 2011 – V. 23(03). – P. 1-8.
63. D'Aquila P.S., Collu M., Gessa G.L., Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000 – V. 405. – P. 365-373.
64. Dawson M., Mottron L., Gernsbacher M.A. Learning in autism. // *Academic Press.* – 2008 – V. 2. – P. 759–772.
65. De Vries G.J., Miller M.A. Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin system in the brain. // *Prod. Brain Res.* – 1998 – V. 119. – P. 3–20.
66. De Wied D., Gispen W.N. Behavioral effects of peptides. // *J. Peptides in Neurobiology.* – 1977 – V. 3. – P. 397 – 425.
67. Dekker G.A., Sibai B.M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1998 – V. 179. – P. 1359–1375.
68. Dolotov O.V., Karpenko E.A., Inozemtseva L.S., Seredenina T.S., Levitskaya N.G., Rozyczka J., Dubynina E.V., Novosadova E.V., Andreeva L.A., Alfeeva L.Yu., Kamensky A.A., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Engele J. Semax, an analog of ACTH(4-10) with cognitive effects, regulates BDNF and trkB expression in the rat hippocampus. // *Brain Res.* – 2006 – V. 1117(1). – P. 54-60.
69. Drago F., Arezzi A., Vitzl A. Effects of acute or chronic administration of substituted benzamides in experimental models of depression in rats // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2000 – V. 10(6). – P. 437-442.
70. Duman R.S., Monteggia L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. // *Biol. Psychiatry* – 2006 – V.59. – P. 1116–1127.
71. Dunlop B.W., Nemeroff C.B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression // *Arch. Gener. Psych.* – 2007. – V. 64. – P. 327-337;
72. Edalatmanesh M.A., Nikfarjam H., Vafae F., Moghadas M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. // *Brain Res.* – 2013 – V. 1526. – P. 15-25.

73. Elizalde N., Gil-Bea F.J., Ramirez M.J., Aisa B., Lasheras B., Del Rio J., Tordera R.M. Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. // *Psychopharmacology*. – 2008 – V. 199. – P. 1-14.
74. Elsayed R., Sayyah H. Subclinical Epileptiform Dysfunction in Children with Idiopathic Autism. // *Journal of American Science*. – 2012 – V. 8(8). – P. 398-401.
75. Engineer C.T., Centanni T.M., Im K.W., Borland M.S., Moreno N.A., Carraway R.S., Wilson L.G., Kilgard MP. Degraded auditory processing in a rat model of autism limits the speech representation in non-primary auditory cortex. // *Dev. Neurobiol.* – 2014 – V. 10. – P. 3-14.
76. Eremin K.O., Kudrin V.S., Saransaari P., Oja S.S., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Rayevsky K.S. Semax, an ACTH(4-10) analogue with nootropic properties, activates dopaminergic and serotonergic brain systems in rodents. // *Neurochem Res.* – 2005 – V. 30(12). – P. 1493-1500.
77. Falk N.H., Norris K., Quinn M.G. The Factors Predicting Stress, Anxiety and Depression in the Parents of Children with Autism. // *J. Autism. Dev. Disord.* – 2014 – V. 15. – P. 22-34.
78. Favre M.R., Barkat T.R., Lamendola D., Khazen G., Markram H., Markram K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. // *Front. Behav. Neurosci.* – 2013 – V.24. – P. 7-88.
79. Feeney B.C., Cassidy J., Ramos-Marcuse F. The generalization of attachment representations to new social situations: predicting behavior during initial interactions with strangers. // *J. Pers. Soc. Psychol.* – 2008 – V. 95(6). – P. 1481-1498.
80. Finnell R.H., Wlodarczyk B.C., Craig J.C., Piedrahita J.A., Bennett G.D. Strain-dependent alterations in the expression of folate pathway genes following teratogenic exposure to valproic acid in a mouse model. // *Am. J. Med. Genet.* – 1997 – V. 70. – P. 303-311.
81. Foley A.G., Cassidy A.W., Regan C.M. Pentyl-4-yn-VPA, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates deficits in social behavior and cognition in a rodent model of autism spectrum disorders. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014 – V. 15(727). – P. 80-86.

82. Fortunati N., Bertino S., Costantino L., Bosco O., Vercellinato I., Catalano M.G., Boccuzzi G. Valproic acid is a selective antiproliferative agent in estrogen-sensitive breast cancer cells. // *Cancer Lett.* – 2008 – V. 259. – P. 156–164.
83. Freitag C.M. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. // *Mol. Psychiatry.* – 2007 – V. 12(1). – P. 2–22.
84. Gal P., Oles K.S., Gilman J.T., Weaver R. Valproic acid efficacy, toxicity, and pharmacokinetics in neonates with intractable seizures. // *Neurology.* – 1988 – V. 38. – P. 467–471.
85. Gillies G.E., Virdee K., McArthur S., Dalley J.W. Sex-dependent diversity in ventral tegmental dopaminergic neurons and developmental programming: A molecular, cellular and behavioral analysis. // *Neuroscience.* – 2014 – V. 2. – P. 306-322.
86. Go H.S., Kim K.C., Choi C.S., Jeon S.J., Kwon K.J., Han S.H., Lee J., Cheong J.H., Ryu J.H., Kim C.H., Ko K.H., Shin C.Y. Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway. // *Neuropharmacology.* – 2012 – V. 63(6). – P. 1028-1041.
87. Goodwin G.M. Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression // *J. Psychopharmacol.* – 1997 – V. 11. – P. 115-122.
88. Goodwin D., Simerska, P., Toth, I. Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. // *Curr. Med. Chem.* – 2012 – V. 19 – P. 4451-4461.
89. Gotham K., Unruh K., Lord C. Depression and its measurement in verbal adolescents and adults with autism spectrum disorder. // *Autism.* – 2014 – V. 10. – P. 34-46.
90. Gottfried C., Bambini-Junior V., Baronio D., Zanatta G., Bristot Silvestrin R., Vaccaro T., Riesgo R. Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model, Recent Advances in Autism Spectrum Disorders. Prof. Michael Fitzgerald (Ed.). – 2014 – V. 1. – P. 35-40.
91. Gurpur P.B., Liu J., Burkin D., Kaufman S.J. Valproic acid activates the PI3K/Akt/mTOR pathway in muscle and ameliorates pathology in a mouse model

- of Duchenne muscular dystroph. *American Journal of Pathology*. – 2009 – V. 174(3) – P. 999–1008.
92. Hampson D.R., Adusei D.C., Pacey L. The neurochemical basis for the treatment of autism spectrum disorders and Fragile X Syndrome. // *Biochemical Pharmacology*. –2011 – V. 81. – P. 1078–1086.
93. Happe F. Understanding assets and deficits in autism: why success is more interesting than failure. // *Psychologist* – 1999 – V. 12(11). – P. 540-547.
94. Hashimoto R., Hough C., Nakazawa T., Yamamoto T., Chuang D.-M. Lithium protection against glutamate excitotoxicity in ratcerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. // *J. Neurochem*. – 2002 – V. 80. – P. 589–597.
95. Hegadoren K.M., O'Donnell T., Lanius R., Coupland N.J., Lacaze-Masmonteil N. The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. // *Neuropeptides*. –2009 – V. 43(5). – P. 341-353.
96. Hellings J.A., Nickel E.J., Weckbaugh M., McCarter K., Mosier M. The overt aggression scale for rating aggression in outpatient youth with autistic disorder: preliminary findings. // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci*. – 2005 – V. 17. – P. 29-35.
97. Hendriks R., Bos D., Allersma P., Malingre T.M., Koster A. Pharmacological Screening of Valerenal and some other Components of Essential Oil of *Valeriana officinalis*. // *Planta Med*. – 1981 – V. 42(5). – P. 62-68.
98. Herranz J.L., Arteaga R., Armijo J.A. Side-effects of sodium valproate in monotherapy controlled by plasma levels: a study in 88 pediatric patients. // *Epilepsia* – 1982 – V. 23. – P. 203–214.
99. Hughes J.R. A review of recent reports on autism: 1000 studies published in 2007. // *Epilepsy Behav*. – 2008 – V. 13(3). – P. 425–437.
100. Iacoboni M., Dapretto M. The mirror neuron system and the consequences of its dysfunction. // *Nat. Rev. Neurosci*. – 2006 – V. 7(12). – P. 942–951.
101. Iacomino G., Medici M.C., RussoG.L. Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to RAIL/Apo2Linduced apoptosis. // *Anticancer Research*. – 2008 – V. 28(2). – P. 855-864.

102. Ignacio Z.M., Reus G.Z., Abelaira H.M., Quevedo J. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: Insights in depression. // *Neuroscience*. – 2014 – V. 275. – P. 455-468.
103. Jacob J., Ribes V., Moore S., Constable S.C., Sasai N., Gerety S.S., Martin D.J., Sergeant C.P., Wilkinson D.G., Briscoe J. Valproic acid silencing of *ascl1b/Ascl1* results in the failure of serotonergic differentiation in a zebrafish model of fetal valproate syndrome. // *Dev. Model. Mech.* – 2014 – V. 7(1). – P. 107-117.
104. Jeste S. The Neurology of Autism Spectrum Disorders. // *Curr. Opin. Neurol.* – 2011 – V. 24(2). – P. 132–139.
105. Kelleher R.J., Bear M.F. The autistic neuron: troubled translation?. // *Cell*. – 2008 – V. 135(3). – P. 401–406.
106. Kennedy S.H., Giacobbe P., Placenza F., Hudson C.J., Seeman P., Seeman M.V. Depression treatment by withdrawal of short-term low-dose antipsychotic, a proof-of-concept randomized double-blind study. // *J. Affect. Disord.* – 2014 – V. 166. – P. 139-143.
107. Keros S., Hablitz J.J. Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABAA conductances in rat neocortex. // *J. Neurophysiol.* – 2005 – V. 94. – P. 2073-2085.
108. Kerr D.M., Downey L., Conboy M., Finn D.P., Roche M. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism // *Behav. Brain Res.* – 2013 – V. 249. – P. 124-132.
109. Kim K.C., Kim P., Go H.S., Choi C.S., Park J.H., Kim H.J., Jeon S.J., Dela Pena I.C., Han S.H., Cheong J.H., Ryu J.H., Shin C.Y. Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. // *J. Neurochem.* – 2013 – V. 124(6). – P. 832-843.
110. Kim S.J., Young L.J., Gonen D., Veenstra-Vander Weele J., Courchesne R., Courchesne E., Lord C., Leventhal B.L., Cook E.H.Jr., Insel T.R. Transmission disequilibrium testing of arginine vasopressin receptor 1A (AVPR1A) polymorphisms in autism. // *Mol. Psychiatry*. – 2002 – V. 7(5). – P. 503-507.

111. Kinast K., Peeters D., Kolk S.M., Schubert D., Homberg J.R. Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. // Neurodevelopmental serotonin and behavior. – 2013 – V. 7(72). – 1-17.
112. Kinney D.K., Munir K.M., Crowley D.J., Miller A.M. Prenatal stress and risk for autism. // Neurosci. Biobehav. Rev. – 2008 – V. 32(8). – P. 1519-1532.
113. Knigge U., Willems E., Kjaer A., Jørgensen H., Warberg J. Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion. // Endocrinology. – 1999 – V. 140(8). – p. 3713-3719.
114. Kohane I.S. An Autism Case History to Review the Systematic Analysis of Large-Scale Data to Refine the Diagnosis and Treatment of Neuropsychiatric Disorders. // Biol. Psychiatry. – 2014 – V. 12. – P. 23-32.
115. Kolevzon A., Gross R., Reichenberg A. Prenatal and perinatal risk factors for autism. // Arch. Pediatr. Adolesc. Med. – 2007 – V. 161(4). – P. 326-333.
116. Kondo T., Otani K., Hirano T., Kaneko S. Placental transfer and neonatal elimination of mono-unsaturated metabolites of valproic acid. // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1987 – V. 24. – P. 401-403.
117. Kormos V., Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. // Neuropeptides. – 2013 – V. 47(6). – P. 401-419.
118. Kumamaru E., Egashira Y., Takenaka R., Takamori S. Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons. // Neurosci. Lett. – 2014 – V. 569. – P. 142-147.
119. Kundermann B., Hemmeter-Spernal J., Strate P. et al. Pain sensitivity in major depression and its relationship to central serotonergic function as reflected by neuroendocrine response to clomipramine // J. Psych. Res. – 2009 – V. 43. – P. 1253-1261.
120. Landa R. Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life. // Nat. Clin. Pract. Neurol. – 2008 – V. 4(3). – P. 138-147.
121. Lenz W. Thalidomide and congenital abnormalities. // Lancet. – 1962 – V. 1. – P. 45-54.

122. Levinstein M.R., Samuels B.A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. // *Front. Behav. Neurosci.* – 2014 – V. 8. – P. 208-259.
123. Levisohn P.M. The autism-epilepsy connection. // *Epilepsia.* – 2007 – V. 48(9). – P. 33–35.
124. Levy R.H., Bialer M., Johannessen S.I., Kupferberg H.J., Loiseau P., Perucca E. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Sixth Eilat Conference. // *Epilepsy Res.* – 2002 – V. 51(2). – P. 31-71.
125. Li Y.C., Kellendonk C., Simpson E.H., Kandel E.R., Gao W.J. D2 receptor overexpression in the striatum leads to a deficit in inhibitory transmission and dopamine sensitivity in mouse prefrontal cortex. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011 – V. 108(29). – P. 107-112.
126. Lin M.Y., Walters D.E. Dopamine D2 autoreceptors in rats are behaviorally functional at 21 but not 10 days of age. // *Psychopharmacol.* – 1994 – V. 114(2). – P. 261-268.
127. Liu D., Qiu H.M., Fei H.Z., Hu X.Y., Xia H.J., Wang L.J., Qin L.J., Jiang X.H., Zhou Q.X. Histone acetylation and expression of mono-aminergic transmitters synthetases involved in CUS-induced depressive rats. // *Exp. Biol. Med.* – 2014 – V. 239(3). – P. 330-336.
128. Lucki I. The forced swimming test as a model for a core and component behavioral effects of antidepressant drugs // *Behav. Pharmacol.* – 1997 – V. 8. – P. 523-532.
129. Lunke A., El-Osta A. The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy. // *Journal of Neurochemistry.* – 2009 – V. 109(6). – P. 1557– 1569.
130. Lutz P., Kieffer B. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. // *Trends in Neurosciences.* – 2013 – V. 36(3). – P. 195-201.
131. Markram H., Rinaldi T., Markram K. The intense world syndrome – an alternative hypothesis for autism. // *Front. Neurosci.* – 2007 – V. 1. – P. 77–96.
132. Martin-Soelch C. Is depression associated with dysfunction of the central reward system? // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009 – V. 37. – P. 313–317.

133. Matson J.L., Williams L.W. Depression and mood disorders among persons with Autism Spectrum Disorders. // *Res. Dev. Disabil.* – 2014 – V. 35(9). – P. 2003-2007.
134. McNamara I.M., Borella A.W., Bialowas L.A., Whitaker-Azmitia P.M. Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: social, behavioral and peptide changes. // *Brain Res.* – 2008 – V. 1189. – P. 203-214.
135. Meaney M.J. Maternal care, gene expression, and transmission of individual differences in stress reactivity across generations. // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2001 – V. 24. – P. 1161-1192.
136. Mischoulon D., McColl-Vuolo R., Howarth S., Lagomasino I.T., Alpert J.E., Nierenberg A.A., Fava M. Management of major depression in the primary care setting // *Psychother. Psychosom.* – 2001. – V. 70(2). – P. 103-7.
137. Moriceau S., Sullivan R.M. Neurobiology of infant attachment. // *Dev. Psychobiol.* – 2005 – V. 47(3). – P. 230-242.
138. Moy S.S., Nadler J.J., Perez A., Barbaro R.P., Johns J.M., Magnuson T.R., Piven J., Crawley J.N. // *Genes Brain Behav.* – 2004 – V. 3(5) – P. 287-302.
139. Myers S.M., Johnson C.P. Management of children with autism spectrum disorders. // *Pediatrics.* – 2007 – V. 120(5). – P. 1162-1182.
140. Nam H., Clinton S.M., Jackson N.L., Kerman I.A. Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat. // *Front. Behav. Neurosci.* – 2014 – V. 1 – P. 89-109.
141. Narita M., Oyabu A., Imura Y., Kamada B., Yokoyama T., Tano K., Uchida A., Narita N. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. // *Neuroscience Research.* – 2010 – V. 66. – P. 2-6.
142. Nau H., Hendrickx G. Valproic acid teratogenesis. // *ISI Atlas Sci. Pharmacol.* – 1987 – V. 1. – P. 52-56.
143. Newschaffer C.J., Croen L.A., Daniels J. The epidemiology of autism spectrum disorders. // *Annu. Rev. Public Health.* – 2007 – V. 28. – P. 235-258.
144. Olexova L., Senko T., Stefanik P., Talarovicova A., Krskova L. Habituation of exploratory behavior in VPA rats: animal model of autism. // *Interdiscip. Toxicol.* – 2013 – V. 6(4). – P. 222–227.

145. Oswald D.P., Sonenklar N.A. Medication use among children with autism spectrum disorders. // *J. Child. Adolesc. Psychopharmacol.* – 2007 – V. 17(3). – P. 348-355.
146. Oyabu A., Narita M., Tashiro Y. The effects of prenatal exposure to valproic acid on the initial development of serotonergic neurons. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2013 – V. 31(3). – P. 202-208.
147. Ozgen H.M., Hop J.W., Hox J.J., Beemer F.A., van Engeland H. Minor physical anomalies in autism: a meta-analysis. *Mol. Psychiatry.* – 2008 – V. 2(4). – P. 23-32.
148. Papaioannou A., Dafni U., Alikaridis F., Bolaris S., Stylianopoulou F. Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. // *Neuroscience.* – 2002 – V. 114(1). – P. 195-206.
149. Parker G., Hadzi-Pavlovic D., Eyers K. Melancholia: A disorder of movement and mood: a phenomenological and neurobiological review. // Cambridge University Press. – 1996 – V. 3 – P. 173-178.
150. Peca J., Feng G. Cellular and synaptic network defects in autism. // *Current Opinion in Neurobiology* – 2012. – V. 22. – P. 866-872.
151. Persico A.M., Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. // *Trends Neurosci.* – 2006 – V. 29(7). – P. 349-358.
152. Pragnya B., Kameshwari J.S., Veeresh B. Ameliorating effect of piperine on behavioral abnormalities and oxidative markers in sodium valproate induced autism in BALB/C mice. // *Behav. Brain. Res.* – 2014 – V. 5(270) – P. 86-94.
153. Pruessner J.C., Champagne F., Meaney M.J., Dagher A. Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [11C] reclopride. // *J. Neurosci.* – 2004 – V. 24. – P. 2825-2831.
154. Pucilowski O., Eichelman B., Overstreet D., Rezvani A.H., Janowsky D.S. Enhanced affective aggression in genetically bred hypercholinergic rats. // *Neuropsychobiol.* – 1990/1991 – V. 24(1). – P. 37-41.

155. Raineli C., Moriceau S., Sullivan R.M. Developing a neurobehavioral model of infant attachment to an abusive caregiver. // *Biol. Psychiatry*. – 2010 – V. 67. – P. 1137-1145.
156. Rapin I., Tuchman R.F. Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. // *Pediatr. Clin. North. Am.* – 2008 – V. 55(5). – P. 1129–46.
157. Ressler K.J., Nemeroff C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders // *Depress. Anxiety*. – 2000 – V. 12. – P. 2-19.
158. Reynolds S., Millette A., Devine D.P.. Sensory and Motor Characterization in the Post-natal Valproate Rat Model of Autism. // *Dev. Neurosci.* – 2012 – V. 34(3). – P. 258–267.
159. Ristine L.A., Spear LP. Effects of serotonergic and cholinergic antagonists on suckling behavior of neonatal, infant, and weanling rat pups. // *Behav. Neural. Biol.* – 1984 – V. 41(2). – P. 99-126.
160. Robinson S.E., Maher J.R., Wallace M.J., Kunko P.M. Perinatal methadone exposure affects dopamine, norepinephrine, and serotonin in the weanling rat. // *Neurotoxicol. Teratol.* – 1997 – V. 19(4). – P. 295-303.
161. Rodier P.M., Ingram J.L., Tisdale B., Nelson S., Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. // *J. Comp. Neurol.* – 1996 – V. 370. – P. 247–261.
162. Rodier P.M., Ingram J.L., Tisdale B., Croog V.J. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. // *Reprod. Toxicol.* – 1997 – V. 11. – P. 417–422.
163. Rogers S.J., Vismara L.A. Evidence-based comprehensive treatments for early autism. // *J. Clin. Child. Adolesc. Psychol.* – 2008 – V. 37(1). – P. 8-38.
164. Rotzinger S., Lovejoy D.A., Tan L.A. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. // *Peptides*. – 2010 – V. 31(4). – P. 736-756.
165. Rouillet F.I., Wollaston L., Decatanzaro D., Foster J.A. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. // *Neuroscience* – 2010 – V. 170. – P. 514 –522.

166. Sabers A., de Flon P., Luef G., Tomson T., Ohman I. Pharmacokinetics of topiramate during pregnancy. // *Epilepsy Res.* – 2009 – V. 87(3). – P. 124-129.
167. Sabuncu M.R., Konukoglu E. Clinical Prediction from Structural Brain MRI Scans: A Large-Scale Empirical Study. // *Neuroinformatics.* – 2014 – V. 5. – P. 46-78.
168. Sarkisova K.Yu., Midzianovskaia I.S., Kulikov M.A. Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy // *Behavioral Brain Research.* – 2003 – V. 144. – P. 211-226.
169. Sarkisova K.Y., Kulikov M.A., Midzyanovskaya I.S., Folomkina A.A. Dopamine-dependent nature of depression-like behavior in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2008 – V. 38. – P. 119-128.
170. Sarkisova K.Yu., Kuznetsova G.D., Kulikov M.A., van Luijtelaar G. Spike-wave discharges are necessary for the expression of behavioral depression-like symptoms // *Epilepsia.* – 2010 – V. 51. – P. 146-160
171. Sarkisova K., van Luijtelaar G. The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. // *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry.* – 2011 – V.1. – P. 854-876.
172. Schmitz C., Rezaie P. The neuropathology of autism: where do we stand? // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2008 – V. 34(1). – P. 4–11.
173. Schneider T., Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. // *Neuropsychopharmacology.* – 2005 – V. 30. – P. 80-89.
174. Schneider T., Ziolkowska B., Gieryk A., Tyminska A., Przewłocki R. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism. // *Psychopharmacology.* – 2007 – V. 193. – P. 547–555.
175. Schulz D., Huston J.P., Buddenberg T., Topic B. “Despair” induced by extinction trials in the water maze: relationship with measures of anxiety in aged and adult rats // *Neurobiology of Learning and Memory.* – 2007 – V. 87(3). – P. 309–323.

176. Sechi G.P., Conti M., Sau G.F., Cocco G.A. Valproate induced parkinsonism, glial cells and Alexander's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2008 – V. 32(5). – P. 1351-1352.
177. Selim M.E., Al-Ayadhi L.Y. Possible ameliorative effect of breastfeeding and the uptake of human colostrum against coeliac disease in autistic rats. // *World J. Gastroenterol.* – 2013 – V. 19(21). – P. 3281-3290.
178. Seo T., Cho H., Shin M., Kim C., Ji E., Baek S. Treadmill exercise improves behavioral outcomes and spatial learning memory through up-regulation of reelin signaling pathway in autistic rats. // *Journal of Exercise Rehabilitation* – 2013 – V. 9(2). – P. 220-229.
179. Shair H.N., Muller J.M., Moore H. Dopamine's role in social modulation of infant isolation-induced vocalization: Reunion responses to the dam, but not littermates, are dopamine dependent. // *Dev. Psychobiol.* – 2009 – V. 51(2). – P. 131-146.
180. Sigman M., Dijamco A., Gratier M., Rozga A. Early detection of core deficits in autism. // *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* – 2004 – V. 10(4). – P. 221-233.
181. Silvestrin R.B., Bambini-Junior V., Galland F., Bobermim L.D., Quincozes-Santos A., Abiba R.T., Zannotto C., Batassini C., Brolese G., Goncalves C.A., Riesgo R., Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. // *Brain research* – 2013 – V. 1495. – P. 52–60.
182. Spanagel R., Herz A., Shippenberg T.S. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1992 – V. 89(6). – P. 2046-2050.
183. Spooren W., Lindemann L., Ghosh A., Santarelli L. Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2012 – V. 33(12). – P. 669-684.
184. Stanton M.E. Multiple memory systems, development and conditioning. // *Behavioural Brain Research*. – 2000 – V. 110. – P. 25–37.
185. Stein D.J. Depression, anhedonia, and psychomotor symptoms: the role of dopaminergic neurocircuitry // *CNS Spectr.* – 2008. – V. 13. – P. 561-565.

186. Stodgell C.J., Ingram J.L., O'Bara M., Tisdale B.K., Nau H., Rodier P.M. Induction of the homeotic gene *Hoxa1* through valproic acid's teratogenic mechanism of action. // *Neurotoxicol. Teratol.* – 2006 – V. 28. – P. 617-624.
187. Stoll A.L., Haura G. Tranylcypromine plus risperidone for treatment-refractory major depression // *J. Clin. Psychopharmacol.* – 2000 – V. 20(4). – P. 495-496.
188. Strand F.L., Rose K.J., King J.A., Segarra A.C., Zuccarelli L.A. ACTH modulation of nerve development and regeneration // *Prog. Neurobiol.* – 1989 – V. 33(1) – P. 45-85.
189. Strathearn L. Maternal neglect: oxytocin, dopamine and the neurobiology of attachment. // *J. Neuroendocrinology.* – 2011 – V. 23. – P. 1054-1065.
190. Sui L., Chen M. Prenatal exposure to valproic acid enhances synaptic plasticity in the medial prefrontal cortex and fear memories. // *Brain Res. Bull.* – 2012 – V. 87(6). – P. 556-563.
191. Tarazi F.I., Baldessarini R.J. Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2000 – V. 18(1). – P. 29-37.
192. Tyzio R., Nardou R., Ferrari D.C., Tsintsadze T., Shahrokhi A., Eftekhari S., Khalilov I., Tsintsadze V., Brouchoud C., Chazal G., Lemonnier E., Lozovaya N., Burnashev N., Ben-Ari Y. Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. // *Science.* – 2014 – V. 343(6171). – P. 675-9.
193. Volkmar F.R., Chawarska K. Autism in infants: an update. // *World Psychiatry.* – 2008 – V. 7(1). – P. 19-21.
194. Walstra G.J. Reversible dementia due to valproic acid therapy. // *Ned. Tijdschr. Geneesk.* – 1997 – V. 141. – P. 391-393.
195. Wang C.C., Lin H.C., Chan Y.H., Gean P.W., Yang Y.K., Chen P.S. 5-HT1A-receptor agonist modified amygdala activity and amygdala-associated social behavior in a valproate-induced rat autism model. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2013 – V. 16(9). – P. 2027-2039.
196. White S.W., Oswald D., Ollendick T., Scahill L. Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders. // *Clin. Psychol. Rev.* – 2009 – V. 29(3). – P. 216-229.

197. Wigger A., Sánchez M.M., Mathys K.C., Ebner K., Frank E., Liu D., Kresse A., Neumann I.D., Holsboer F., Plotsky P.M., Landgraf R. Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. // *Neuropsychopharmacology*. – 2004 – V. 29(1). – P. 1-14.
198. Williams J. Self-other relations in social development and autism: multiple roles for mirror neurons and other brain bases. // *Autism Res*. V 2008 – V. 1(2). – P. 73-90.
199. Willner P. Dopaminergic mechanisms of depression and mania. // *Psychopharmacology*. – 1995 – V. 2. – P. 921-931.
200. Willner P., Hale A.S., Argyropoulos S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. // *J. Affect. Disord*. – 2005 – V. 86(1). – P. 37-45.
201. Wondolowski J., Dickman D. Emerging links between homeostatic synaptic plasticity and neurological disease. // *Front. Cell. Neurosci*. – 2013 – V. 7. – P. 223-233.
202. Young L.J., Wang Z. The neurobiology of pair bonding. // *Nat. Neurosci*. – 2004 – V. 7(10). – P. 1048-1054.
203. Zafeiriou D.I., Ververi A., Vargiami E. Childhood autism and associated comorbidities. // *Brain Dev*. – 2007 – V. 29(5). – P. 257-272.
204. Zagon I.S., Verderame M.F., Allen S.S., McLaughlin P.J. Cloning, sequencing, chromosomal location, and function of cDNAs encoding an opioid growth factor receptor (OGFr) in humans. // *Brain Res*. – 2000 – V. 856(2). – P. 75-83.