

*На правах рукописи*

**Брошевицкая Надежда Дмитриевна**

**ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА  
ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ, СОЦИАЛЬНОЕ И ОБОРОНИТЕЛЬНОЕ  
ПОВЕДЕНИЕ КРЫС РАЗНОГО ПОЛА**

1.5.5 Физиология человека и животных

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва – 2022 г.**

Работа выполнена в лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии Российской Академии Наук.

**Научный руководитель:**

**Павлова Ирина Вячеславовна**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, г. Москва.

**Официальные оппоненты:**

**Хлебникова Надежда Николаевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей патологии нервной системы ФГБНУ "Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии".

**Тюлькова Екатерина Иосифовна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции функций нейронов мозга ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН.

**Ведущая организация: Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова**, биологический факультет, кафедра высшей нервной деятельности.

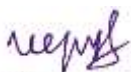
Защита состоится 30 ноября 2022 года в 14:00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, г. Москва, ул. Бутлерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://www.ihna.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Иерусалимский В.Н.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы и степень ее разработанности.** В настоящее время изучение закономерностей возникновения высокого уровня тревожности и страха имеет большую практическую значимость, поскольку у людей в клинике широко распространены такие заболевания, как тревожные и посттравматические стрессовые расстройства, проявляющиеся в патологической тревожности, фобиях и трудно угасимом страхе. Более того, данные литературы демонстрируют наличие половых различий в частоте возникновения этих заболеваний: женщины чаще, чем мужчины страдают депрессией, тревожными расстройствами (Parker, Brotchie, 2010) и более чувствительны к развитию посттравматического синдрома (Kessler et al., 2012). Эти данные подчеркивает важность исследований с участием животных обоих полов. В основу нашего исследования легла гипотеза о влиянии ряда внешних факторов как на ранних, так и на более поздних этапах онтогенеза на возникновение высокого или низкого уровня тревожности и страха у взрослых животных разного пола.

Согласно представлениям о перинатальном программировании (perinatal programming (Hodgson, Cooe, 2006)), различные стрессорирующие воздействия в раннем онтогенезе (сепарация от матери, недостаток строительного материала для гнезда, активация иммунного ответа и др.) способны оказать существенное влияние на дальнейшее развитие и поведение взрослых особей (Maniam, Morris, 2009; Rincel et al., 2016; Maniam et al., 2016). Согласно гипотезе двойного удара (double-hit hypothesis (Maynard et al., 2001; Walker et al., 2009)), вмешательства в нормальное развитие в раннем онтогенезе создают предрасположенность к появлению психопатологии, которая может проявиться при новом вмешательстве в дальнейшей жизни («втором ударе»). Одним из таких воздействий является ранний провоспалительный стресс (Григорьян, 2020), при котором инициация иммунного ответа в раннем онтогенезе происходит в ответ на введение липополисахаридов (ЛПС), являющихся составными компонентами внешней части мембраны различных грамотрицательных бактерий. Интерес к данной модели также обусловлен тем, что нейровоспаление рассматривается в качестве основной причины развития посттравматического стрессового расстройства, тревожного расстройства и депрессии (Capuron, Dantzer, 2003; Степаничев, 2005; Miller et al., 2009; Loftis et al., 2010; Григорьян с соавт., 2014; Echeverria, et al., 2016; Custódio et al., 2018; Hori, Kim, 2019).

Хорошо известно, что провоспалительный стресс, перенесенный в раннем постнатальном периоде, вызывает активацию иммунной системы и гипоталамо-

гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси, что впоследствии может приводить к повышению уровня тревожности и депрессивно-подобного поведения (Walker et al., 2009; Diné et al., 2014; Tishkina et al., 2016). Влияние раннего провоспалительного стресса на процессы выработки различных оборонительных рефлексов изучено в меньшей степени, и практически нет данных о влиянии на угашение рефлексов (Bilbo et al., 2006; Tishkina et al., 2016; Osborne et al., 2017; Tchessalova, Tronson, 2019).

Остается мало изученным влияние раннего постнатального провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых животных, а именно на социальное взаимодействие, на внутривидовую агрессию и социальное доминирование. Ряд данных литературы позволяет предположить возможность такого влияния. На линиях высоко- и низкоагрессивных животных было показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов коррелировали с высоким уровнем агрессии (Audet et al., 2010; Idoва et al., 2016; Alperina et al., 2019). Пациенты с депрессией демонстрировали повышенную агрессивность и высокий уровень провоспалительных цитокинов (Takahashi et al., 2018).

Длительная социальная изоляция, как известно, у крыс является крайне «негативным» фактором, который может приводить к росту уровня тревожности и проявлению депрессивно-подобного поведения (Bledsoe et al., 2011; Lukkes et al., 2012; Zhang et al., 2012; Takatsu-Coleman et al., 2013; Mileva, Bielajew, 2015; Wang et al., 2017; Guarnieri et al., 2020). С другой стороны, длительное содержание в условиях обогащенной среды рассматривается как «положительный» фактор, приводящий к снижению уровня тревожности и улучшению когнитивных способностей (Hellemans et al., 2004; Brenes Sáenz et al., 2006; Cirulli et al., 2010; Pritchard et al., 2013; Grippo et al., 2014; Mora-Gallegos et al., 2019; Leger et al., 2015). Однако сведения о влиянии вышеперечисленных внешних факторов на животных, переживших ранний провоспалительный стресс, в настоящее время отсутствуют. Нами была выдвинута гипотеза, что при совместном влиянии социальной изоляции и ЛПС в раннем онтогенезе произойдет суммация двух негативных эффектов, а воздействие обогащенной среды на животных, переживших ранний провоспалительный стресс, возможно, будет способно ослабить негативные последствия стресса.

**Целью** настоящей работы являлось изучение влияния раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное и социальное поведение, а также различные оборонительные условные рефлексy и нейроэндокринную реактивность у взрослых крыс разного пола.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. У крысят (самцов и самок) в возрасте 3 и 5 дней вызвать провоспалительный стресс путем подкожного введения бактериального липополисахарида. Контрольные группы – с введением физиологического раствора в этом же возрасте или интактные крысы;

2. Изучить влияние провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное поведение в возрасте 1 и 3 месяца в тестах открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, в тесте на предпочтение сахарозы, тесте вынужденного плавания;

3. Оценить влияние провоспалительного стресса на выработку и угашение классического оборонительного условного рефлекса и условного рефлекса пассивного избегания, а также на выработку рефлекса активного избегания у взрослых крыс (3 мес);

4. Оценить влияние содержания крыс в условиях обогащенной среды или социальной изоляции на поведение взрослых крыс, переживших ранний провоспалительный стресс;

5. Изучить влияние провоспалительного стресса на социальное поведение у взрослых крыс (тест социального взаимодействия, тест социального доминирования, тест «резидент-интродер», тест сексуального предпочтения);

6. Сопоставить влияния ЛПС на поведение животных разного пола;

7. Проанализировать содержание кортикостерона и провоспалительного цитокина ИЛ-1бета в крови крыс до и после стрессирующих воздействий в разном возрасте.

**Научная новизна.** Ранний провоспалительный стресс приводит к нарушению угашения реакций условнорефлекторного страха, что было показано на модели условного рефлекса пассивного избегания и классического оборонительного условного рефлекса.

Впервые показано, что ранний провоспалительный стресс приводит к увеличению внутривидовой агрессии, социального доминирования и социального взаимодействия у самцов, но не самок. Высокий уровень социального доминирования коррелирует с высоким уровнем ИЛ-1бета.

Самцы, пережившие ранний провоспалительный стресс оказались менее подвержены влиянию содержания в обогащенной среде, чем контрольные животные. Это проявлялось в показателях тревожного поведения, при выработке и угашении условнорефлекторного страха, в уровне ИЛ-1бета.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении современных представлений о влиянии раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное, оборонительное и социальное поведение животных разного пола, а также о влиянии различных условий содержания, таких как социальная изоляция и обогащение среды, на поведение животных, переживших ранний провоспалительный стресс.

Практическая значимость работы связана с исследованием механизмов возникновения ряда заболеваний, таких как тревожно-депрессивные расстройства и посттравматические стрессовые расстройства, для которых характерны высокие уровни тревожности, страха и агрессии. Полученные данные о влиянии содержания в условиях обогащенной среды могут иметь практическое применение для снижения уровня тревожности, уменьшения проявления и ускорения угашения условнорефлекторного страха у особей мужского пола.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Самцы по сравнению с самками более подвержены влиянию раннего провоспалительного стресса, вызываемого введением бактериального липополисахарида на 3 и 5 дни жизни.

2. Ранний провоспалительный стресс делает крыс более предрасположенными к формированию пассивно-оборонительной стратегии поведения, но не активно-оборонительной.

3. Ранний провоспалительный стресс у самцов приводит к увеличению внутривидовой агрессии, социального доминирования и социального взаимодействия. Повышенный базовый уровень ИЛ-1бета коррелирует с социальным доминированием.

4. Ранний провоспалительный стресс делает крыс наиболее подверженными дополнительному стрессирующему воздействию (социальной изоляции), но наименее чувствительными к положительному влиянию в виде содержания в условиях обогащенной среды.

**Степень достоверности данных.** Достоверность полученных данных определяется большим объемом экспериментального материала, применением современных компьютерных программ и установок для изучения поведения животных, использованием современного биохимического метода анализа, а также адекватных методов статистического анализа с привлечением сертифицированных статистических программ.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 6 статей - в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации и индексируемых в базе Web of Science/Scopus, 3-е тезисов - в международных журналах (European Neuropsychopharmacology, Q1), 8 тезисов - в сборниках трудов всероссийских и международных конференций.

**Апробация результатов.** Основные результаты работы были доложены в рамках XXI, XXII, XXIII и XXIV Школ-конференций молодых ученых в ИВНД и НФ РАН (Москва, 2018-2021 гг.); XVI - XVIII Международного Междисциплинарного Конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ» (Судак, 2020-2022 гг.); 32-го Конгресса ECNP (Коппенгаген, Дания, 2019 г.), 34-го Конгресса ECNP (Лиссабон, Португалия, 2021 г.), FENS Forum (онлайн форум, 2020 г).

**Личный вклад автора.** Автор самостоятельно готовила экспериментальные группы животных, осуществляла сбор биологического материала и иммуноферментный анализ сыворотки крови, проводила опыты и статистический анализ полученных данных, оформляла результаты диссертационной работы. Автор в составе группы участвовала в разработке дизайна и протоколов исследования, написании статей и тезисов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 191 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и иллюстрирована 34-мя рисунками. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования с их обсуждением, заключение и выводы, список сокращений, список литературы. Библиографический указатель содержит 21 отечественный и 245 зарубежных источников литературы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Объект исследования и формирование групп животных.** В опытах участвовало 244 крысы линии Вистар в возрасте от 25 дней до 6 месяцев (128 самцов и 116 самок). На 3-й и 5-й дни жизни у половины крысят из помета вызывали провоспалительный стресс путем введения бактериального липополисахарида (ЛПС) в дозе 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  в объеме 10  $\mu\text{l}/\text{g}$  (группа ЛПС). Другой половине крысят из помета в этом же возрасте подкожно вводили физиологический раствор в объеме 10  $\mu\text{l}/\text{g}$  (группа ФИЗ, контроль 1) или не осуществляли инъекцию, оставляя интактными (группа ИНТ, контроль 2).

**Разные условия содержания.** В стандартных (СТАНД) условиях содержания крысы проживали по 4-6 штук в клетках при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и корму. **Длительная социальная изоляция (СИ)** представляла собой содержание крыс в возрасте от 45 дней до 3.5 мес. поодиночке в клетках, в которых животные не могли контактировать с другими крысами. Условия **долговременного обогащения среды (ОС)** включали в себя постоянное содержание 9-12 крыс в возрасте от 30 дней до 4 мес. в трехъярусных клетках размером 60x38x90см, каждая из которых была оборудована «беличьим колесом», лесенками и гамаками.

**Тестирование на тревожность и депрессивно-подобное поведение.** Тестирование уровня тревожности у крыс проводили в течение 5 мин в круглом «открытом поле» (ОП) и в «приподнятом крестообразном лабиринте» (ПКЛ) стандартных размеров. Для анализа уровня депрессивно-подобного поведения использовали тест на предпочтение 1% раствора сахарозы (ТПС) и тест вынужденного плавания (ТВП).

**Тестирование социального поведения.** Для оценки социальной мотивации использовали тест социального взаимодействия (ТСВ), который проводили в ОП с внутренним отсеком для крысы-гостя в течение 2 дней. Социальное доминирование исследовали в тесте в трубе (dominance tube test, ТСД), формировали пары равные по весу, одна крыса из ФИЗ, а другая из ЛПС группы. Внутривидовую агрессию оценивали по тесту резидент-интродер, который проводили в течение 10 мин как на самцах, так и самках после недельной социальной изоляции. Сексуальную мотивацию анализировали только у самцов по тесту сексуального предпочтения (ТСП), для которого использовали камеру из трех отсеков, в одном из которых в сетчатом цилиндре располагался самец, в другом самка.

В поведенческих тестах для фиксации траектории движения крысы и элементов поведения использовали программу Etho Vision, а для видеорегистрации – программу Mediocruser и вебкамеру Logitech C270 HD Webcam.

**Выработка и угашение условных оборонительных рефлексов.** Для **выработки, тестирования и угашения классического условного оборонительного рефлекса (КУОР)** на звук использовали стандартные протоколы и камеру Startle and Fear Combined System производства PanLab Harvard apparatus (Spain, 2000). Эксперименты начинали у крыс в возрасте 3.5 мес. При выработке рефлекса давали три сочетания звука (30с, 80 дБ, 2000 Гц) и электрокожного



болевого раздражения (2с, 0.8 мА, задержка 28 с от начала действия звука), при тестировании рефлекса давали один неподкрепляемый звуковой стимул, при угашении предъявляли по 10 звуковых стимулов в течение 2-х дней. О наличии страха у крысы судили по реакции замирания. **Выработка условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)** проходила в темно-светлой камере (комплекс Шелтер, ООО «Нейроботикс», 2017) по стандартной методике, при которой крыса избегала болевое воздействие (электрошок), не заходя в темный отсек камеры. Угашение проводили в течение 7 дней. **Выработка условного рефлекса активного избегания (УРАИ)** проходила в челночной камере, разделенной на два равноценных отсека с проходом между ними (комплекс Шелтер), крыса обучалась избегать электрошок переходя в другой отсек камеры при действии звука.

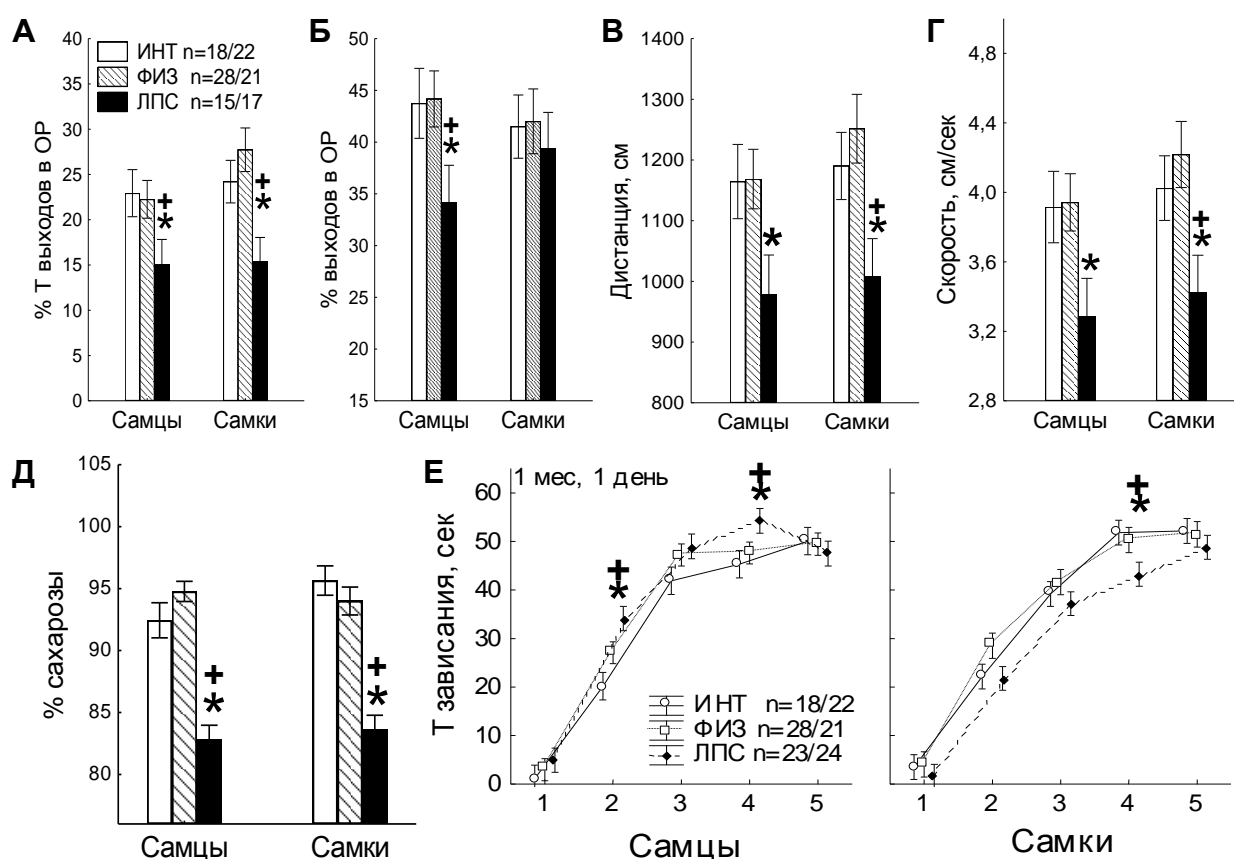
**Иммуноферментный анализ крови.** Забор крови проводили под ингаляционным наркозом из хвостовой вены у крыс перед началом тестирования поведения и через 30-40 мин после ТВП. В отдельных случаях брали декапитационную кровь. Для определения уровня кортикостерона в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (DRG, Германия), а для провоспалительного ИЛ-1бета - наборы производства R&D Systems (США). Для оценки изменения уровня маркеров крови после ТВП рассчитывали %изменения= $(K_{\text{после}}-K_{\text{до}})/K_{\text{до}}*100\%$ , где К – концентрация кортикостерона/ИЛ-1бета.

**Статистическая обработка результатов.** Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение значений исследованных параметров проверяли на нормальность по критерию Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел Factorial ANOVA или Repeated measures ANOVA. При post-hoc анализе применяли критерий Newman-Keuls test. При отсутствии нормальности распределения использовали Kruskal-Wallis test, с последующим сравнением групп с помощью Multiple Comparisons. Для сравнения двух групп крыс применяли Mann–Whitney U Test. При сравнении двух выборочных долей вариант использовали 2 x 2 Table и применяли критерий  $\chi^2$ . Различия считали статистически значимыми при  $p<0.05$ , отмечали наличие тенденции при  $0.05<p<0.1$ . Данные на рисунках представлены в виде средних значений  $\pm$  ошибки средних.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

**1. Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное поведение крыс разного пола.** В возрасте 1 мес. у самок и самцов

ЛПС группы по сравнению с контрольными группами (рис. 1, А) было меньше время выходов в открытые рукава ПКЛ ( $p < 0.05$ ) и меньший процент выходов в открытые рукава (только у самцов, рис. 1, Б), что свидетельствовало об увеличении уровня тревожности. У животных ЛПС группы происходило снижение двигательной активности, судя по меньшей пройденной дистанции (рис. 1, В) и скорости движения (рис. 1, Г). В 1 мес. самцы и самки ЛПС группы в тесте на предпочтение сахарозы потребляли меньший процент сахарозы (рис. 1, Д), а самцы зависали на большее время на второй и четвертой минутах теста вынужденного плавания (рис. 1, Е), что свидетельствовало о признаках депрессивно-подобного поведения. У самцов ЛПС группы признаки тревожно-депрессивного поведения проявлялись в большей степени, чем у самок. В 3 мес. различия в поведении крыс ЛПС и контрольных групп исчезали при тестировании на тревожно-депрессивное поведение.

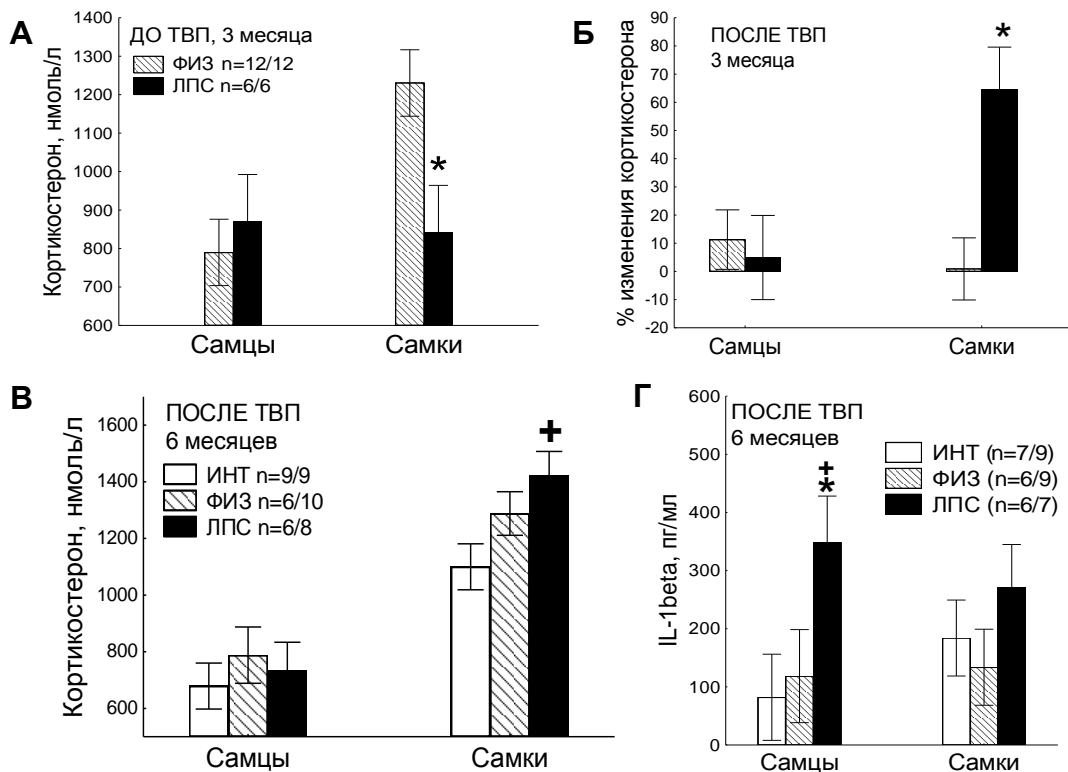


**Рис. 1.** Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное поведение и двигательную активность крыс в возрасте 1 мес. По горизонтали: на А-Д – пол крыс, на Е – время в минутах (верхняя шкала). ИНТ – группа интактных крыс, ФИЗ – группа с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, ЛПС – группа с введением ЛПС. n – число крыс в группе (самцы/самки). Т – время. + - статистически значимые различия между группами ЛПС и ИНТ, \* - ЛПС и ФИЗ ( $p < 0.05$ , на А-Е – post hoc анализ Factorial ANOVA).

Мы полагаем, что последствия раннего провоспалительного стресса в тревожно-депрессивном поведении во взрослом возрасте могут нивелироваться за

счет каких-то компенсационных процессов. Подтверждают это заключение данные о том, что существует определенная возрастная динамика экспрессии генов, участвующих в ответе мозга на стресс и ассоциированных с нейровоспалением в неокортексе и гиппокампе животных (Квичанский, 2022).

Проведенный иммуноферментный анализ сыворотки крови, взятой до ТВП у крыс в возрасте 3 месяца, показал (рис. 2, А), что у самок ЛПС группы базовый уровень кортикостерона был ниже, а после ТВП прирост уровня кортикостерона был выше, чем в группе ФИЗ (рис. 2, Б). У самцов до и после воздействия межгрупповые различия не возникали. Уровень ИЛ-1бета не различался в хвостовой крови у разных групп крыс. Проведенный анализ сыворотки декапитационной крови, взятой после ТВП в возрасте 6 месяцев показал (рис. 2, В и Г), что в группе ЛПС у самцов был выше уровень ИЛ-1бета, а у самок - уровень кортикостерона, чем в контрольных группах.



**Рис. 2.** Влияние раннего провоспалительного стресса на уровни кортикостерона (А, Б - до и после ТВП в 3 мес, хвостовая кровь; В - после ТВП в 6 мес, декапитационная кровь) и ИЛ-1бета (Г - после ТВП в 6 мес, декапитационная кровь). По горизонтали: А-Г – пол крыс. n – число крыс в группе (самцы/самки). + - статистически значимые различия между группами ЛПС и ИНТ, \* - ЛПС и ФИЗ ( $p < 0.05$ , на А-Г – post hoc анализ, Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 1.

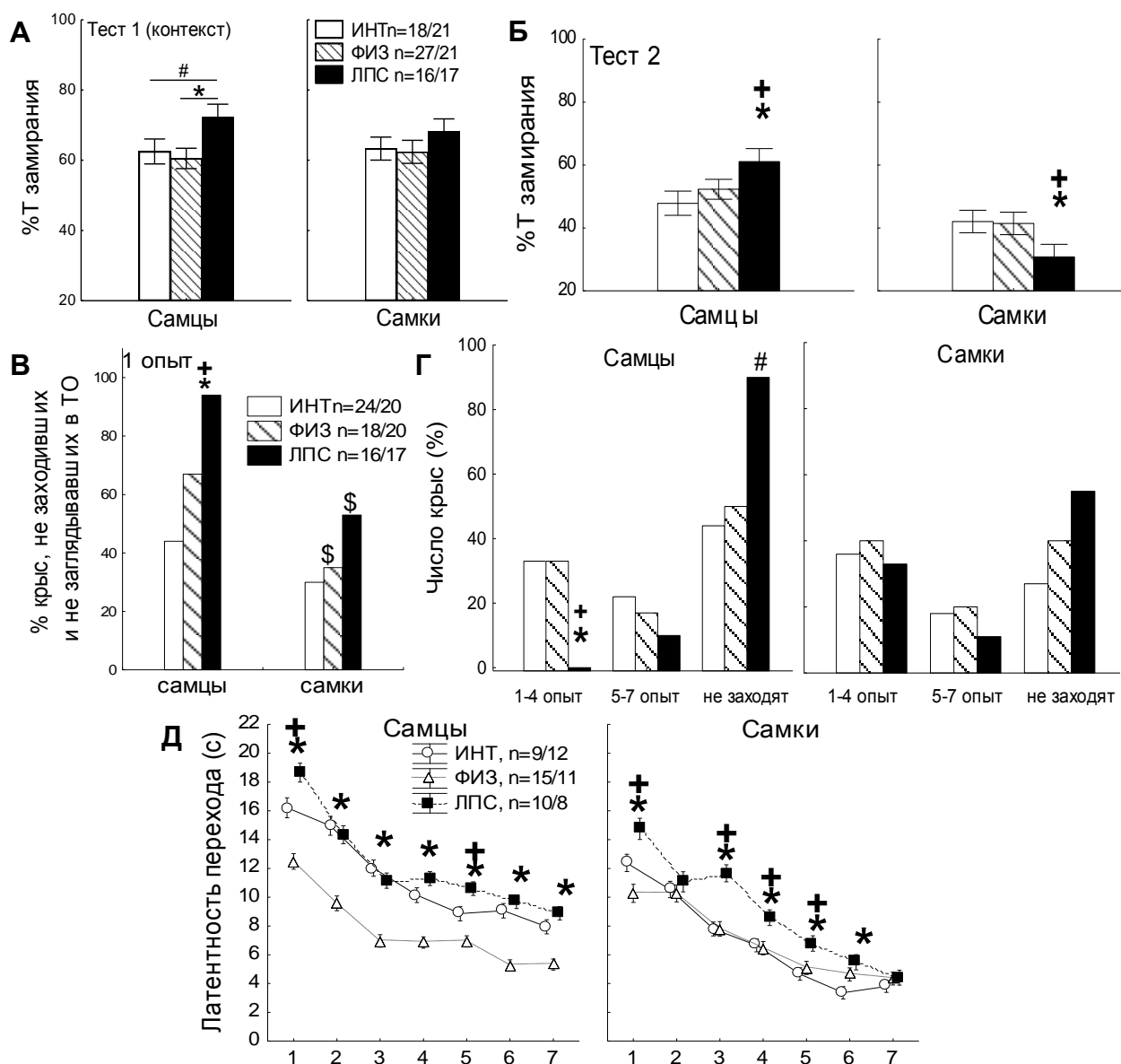
Полученные отличия в уровнях кортикостерона в сыворотке крови у самок ЛПС группы свидетельствуют о нарушении работы ГГН оси, появлении

«глюкокортикоидной резистентности» и нарушения функционирования отрицательной обратной связи. Повышенный уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1бета у самцов после ТВП в совокупности с более сильным эффектом от введения ЛПС на тревожно-депрессивное поведение, как мы полагаем, отражает явление сенситизации воспалительного процесса у самцов. Для самцов, как известно, характерны повышение реактивности микроглии, и большая экспрессия провоспалительных цитокинов в ответ на стресс и введение ЛПС (Fonken et al., 2018). В тоже время эстрогены, преобладающие у самок, оказывают выраженное противовоспалительное действие (Vegeto et al., 2001; Villa et al., 2015; Najjar et al., 2018), которое делает самок менее чувствительными к влиянию раннего провоспалительного стресса.

**2. Влияние раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение взрослых крыс разного пола.** В Тесте 1 через 24 часа после обучения самцы группы ЛПС больше времени замирали в ответ на контекст, но не на звук, чем самцы группы ФИЗ (рис. 3, А). У самок в Тесте 1 различий по уровню замирания между разными группами крыс не было обнаружено, как в условиях контекста, так и при действии звука. В Тесте 2 после двух сеансов угашения самцы группы ЛПС в целом (при пребывании в контексте и действии сигнального раздражителя) замирали большее время ( $p < 0.05$ ) (рис. 3, Б), а самки группы ЛПС, наоборот, замирали меньшее время, чем животные контрольных групп ( $p < 0.05$ ). Таким образом, самцы ЛПС группы имели большее проявление реакции условнорефлекторного страха и хуже ее угашали.

После выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) у самцов имелись межгрупповые различия в особенностях проявления рефлекса в первом опыте после обучения (рис. 3, В): крысы группы ЛПС значительно чаще ( $p < 0.05$ , критерий  $\chi^2$ ) не заходили и не заглядывали в темный отсек (94%), чем самцы ИНТ (44%) и ФИЗ (67%) групп. У самок разных групп такого различия в качестве УРПИ не было обнаружено. При угашении УРПИ (рис. 3, Г), самцы группы ЛПС совсем не заходили темный отсек до 4 опыта в отличие от групп ИНТ и ФИЗ, в которых 33% самцов начинали заходить в темный отсек. За все время угашения 90% самцов группы ЛПС ни разу не зашли в темный отсек, в контрольных группах таких животных было только 44% (ИНТ) и 50% (ФИЗ). У самок в зависимости от дня первого захода в темный отсек не было обнаружено различий между группами ИНТ, ФИЗ и ЛПС (рис. 3, Г). Таким образом, у самцов ЛПС группы, но не у самок,

условнорефлекторный страх после выработки УРПИ проявлялся в большей степени, а угашение его было затруднено по сравнению с самцами контрольных групп.



**Рис. 3.** Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку и угашение оборонительных условных рефлексов у взрослых крыс. По горизонтали: А, Б, В – пол, Г и Д – номера опытов. По вертикали: А и Б – процент времени замирания, на В – процент крыс в первом опыте после выработки УРПИ, Г - распределение крыс в зависимости от дня первого захода в темный отсек при угашении УРПИ, Д - латентность перехода между отсеками при выработке УРАИ. + - статистически значимые отличия между группами ЛПС и ИНТ, \* - ЛПС и ФИЗ ( $p < 0.05$ , на А, Б, Д - Factorial ANOVA, на В и Г – критерий  $\chi^2$  2 x 2 Table), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 1.

Таким образом, ранний провоспалительный стресс оказывал сходное влияние на выработку и угашение двух форм пассивных оборонительных рефлексов - КУОР и УРПИ, причем воздействие на самцов было более сильным и отличалось от эффекта у самок. У самцов проявление условнорефлекторного страха было более

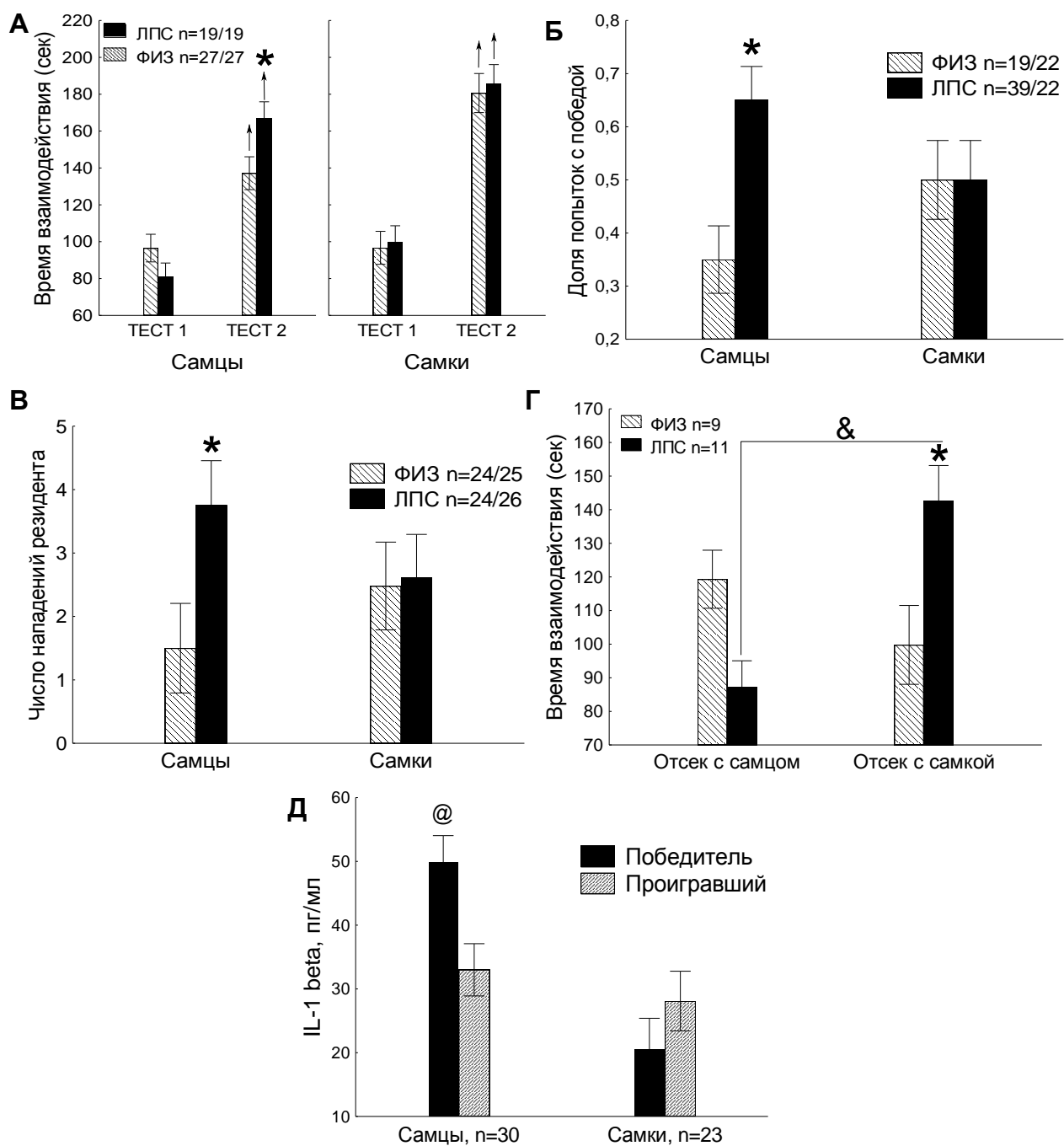
выражено, а угашение затруднено. У самок проявление страха не отличалось, а угашение облегчалось при КУОР.

В других работах (Tishkina et al., 2016; Doenni et al., 2017), также, как и в нашей, ранний провоспалительный стресс приводил к увеличению проявления условнорефлекторного страха. Предполагалось, что повышенная активация миндалины, проявляющаяся в увеличении экспрессии cFos генов в центральном ядре, могла быть причиной нарушений в угашении страха (Doenni et al., 2017). Влияние раннего провоспалительного стресса на самцов по некоторым показателям сходно с тревожными расстройствами и посттравматическим стрессовым расстройством у человека, при которых, как известно, также нарушаются механизмы угашения страха.

При выработке условного рефлекса активного избегания (УРАИ) самцы и самки группы ЛПС имели большую латентность перехода между отсеками, чем крысы контрольных групп (рис.3, Д). Ранний провоспалительный стресс затруднял выработку УРАИ как у самцов, так и у самок. Согласно двухфакторной теории избегания (Cain, 2019) реакция избегания (escape) сопровождается сильным страхом, который постепенно ослабевает по мере выработки реакции избегания (avoidance). Трудности с появлением avoidance реакций у самцов ЛПС группы по сравнению с контрольными крысами могут свидетельствовать о большем страхе, выражающемся в пассивно-оборонительных реакциях. Подтверждают это предположение наши данные о большем проявлении у самцов условнорефлекторного страха на контекст при КУОР и при УРПИ после введения ЛПС.

**3. Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых крыс разного пола.** В тесте социального взаимодействия время взаимодействия увеличивалось в Тесте 2 (с крысой гостем) по сравнению с Тестом 1 (без крысы гостя), при этом у самцов группы ЛПС время взаимодействия было больше, чем в группе ФИЗ (рис. 4, А). У самок различий во времени взаимодействия не было обнаружено в группах ФИЗ и ЛПС. Таким образом, судя по тесту на социальное взаимодействие, самцы после раннего провоспалительного стресса показали большую социальную мотивацию по сравнению с контролем.

В тесте на социальное доминирование в трубе доля попыток, увенчавшихся победой, у самцов ЛПС группы была больше, чем у самцов группы ФИЗ группы (рис. 4, Б). У самок не было различий в числе победителей из ЛПС и ФИЗ групп.



**Рис. 4.** Влияние раннего постнатального введения ЛПС на социальное поведение взрослых самцов. По горизонтали: А – номер теста, Б, В, Д – пол животных, Г – вид отсека. n – число самцов/самок в группе. ↑ - увеличение ( $p < 0.05$ ) значений показателя поведения в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1, \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) между группами ЛПС и ФИЗ, & - между отсеками, @ - между победителями и проигравшими в ТСД (на А и Г - Repeated measures ANOVA, на Б - критерий  $\chi^2$ , 2 x 2 Table, Nonparametric Statistics, на В - Mann-Whitney U Test, на Д - Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 1.

Таким образом, ранний провоспалительный стресс увеличивал социальное доминирование только у самцов, не влияя на самок. У самцов была обнаружена положительная корреляция между числом побед в трубе и длительностью

социального взаимодействия, что может говорить о высокой социальной мотивации у доминантных самцов.

В тесте «резидент-интродер» среднее число нападений резидента на интродера было больше у самцов ЛПС группы, чем у самцов ФИЗ группы, а число нападений у самок из ЛПС и ФИЗ групп не отличалось (рис. 4, В). По числу стоек, длительности преследования, числу сексуальных атак группы не различались. В группе ЛПС возрастало число агрессивных самцов, совершавших от двух до 17 нападений на интродера в тесте, причем число нападений не уменьшалось к концу опыта, а держалось на высоком уровне все время наблюдения. Полученные данные свидетельствуют о увеличении агрессивности у самцов под влиянием раннего провоспалительного стресса.

Анализ поведения крыс самцов в трехкамерном тесте на сексуальное предпочтение показал, что у самцов ЛПС группы по сравнению с ФИЗ группой в отсеке с самкой было больше время взаимодействия (рис. 4, Г), коэффициенты предпочтения у самцов ЛПС группы были больше, чем в ФИЗ группе. Полученные данные свидетельствуют о большем предпочтении самок у самцов ЛПС группы, чем у животных ФИЗ группы, т.е. о большей сексуальной мотивации у животных после раннего провоспалительного стресса.

Было обнаружено, что у самцов крыс победителей в тесте на социальное доминирование в трубе наблюдался более высокий уровень ИЛ-1бета, чем у побежденных крыс (рис. 4, Д), что может говорить о воспалительной природе высокого уровня социального доминирования.

**4. Влияние социальной изоляции на поведение и биохимические показатели сыворотки крови крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса.** СИ приводила к увеличению веса тела ( $p < 0.05$ ) только у самцов ( $354.9 \pm 6.7$  г) по сравнению с животными в стандартных условиях ( $333.1 \pm 4.0$  г), но не сказалась на весе самок ( $227.4 \pm 6.5$  г и  $223.6 \pm 4.8$  г соответственно). Содержание в условиях СИ приводило к уменьшению числа выходов в центр ОП у самок группы ЛПС (рис. 5, А), увеличению времени на периферии у самцов и самок ЛПС группы и уменьшению процента времени выходов в открытые рукава ПКЛ у всех групп крыс (рис. 5, Б). Данные результаты свидетельствуют об увеличении тревожности у всех групп крыс, но наибольшие изменения происходили у животных ЛПС группы. В тесте на ангедонию было обнаружено проявление депрессивно-подобного поведения только у самок группы

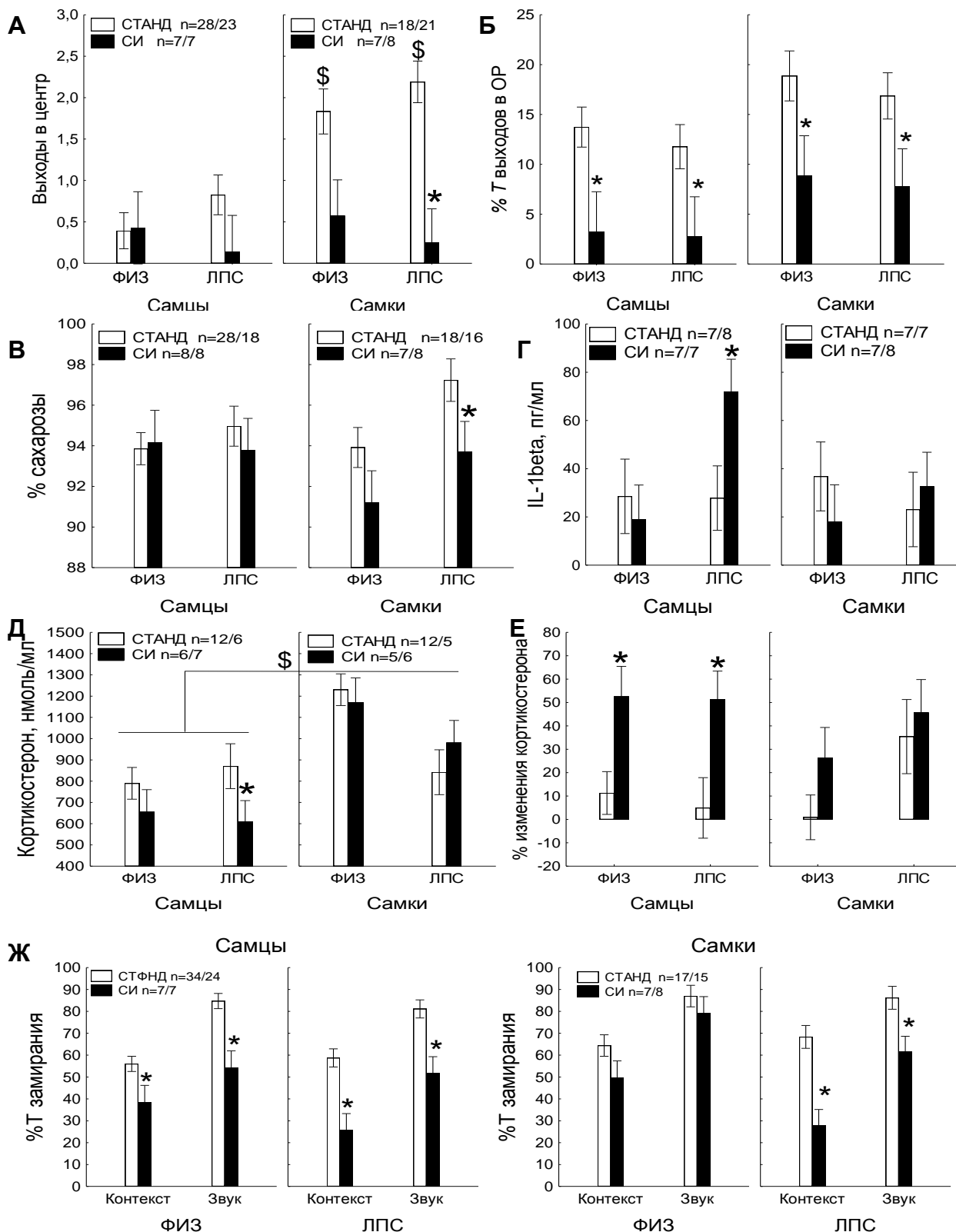


ЛПС+СИ, что выражалось в уменьшении процента выпитой сахарозы по сравнению с самками в группе ЛПС+СТАНД (рис. 5, В). В ТВП признаков депрессивно-подобного поведения не было обнаружено. Таким образом, наибольшие изменения в депрессивно-подобном поведении происходили у самок ЛПС группы. Самки, пережившие ранний провоспалительный стресс, оказались наиболее чувствительными к стрессу социальной изоляции.

У самцов в группе ЛПС после содержания в СИ базовый уровень кортикостерона был ниже, чем у животных, содержащихся в стандартных условиях (рис. 4, Д). После стрессирующего воздействия (рис. 4, Е) большее увеличение уровня кортикостерона наблюдалось у всех самцов после СИ, как у ФИЗ, так и ЛПС групп, по сравнению с группами СТАНД. У самцов ЛПС группы после СИ базовый уровень ИЛ-1бета был выше, чем у крыс в стандартных условиях (рис. 4, Г), что, возможно, является результатом вызванной ранним провоспалительным стрессом сенситизации иммунной системы, из-за чего реакция на стресс СИ оказывается более сильной, чем в случае одиночного стресса. Известно, что СИ может приводить к увеличению провоспалительных цитокинов в крови (Alshammari et al., 2020) и в гиппокампе (Wang et al., 2017). СИ после раннего провоспалительного стресса приводила, по-видимому, к суммации двух влияний.

После выработки КУОР Тест 1 показал, что после СИ крысы хуже выработали условнорефлекторный страх, проявляющийся в виде замирания (рис. 5, Ж), что соответствует данным о нарушении когнитивных способностей после СИ (Võikar et al., 2005; Kuleskaya et al., 2011; Ouchi et al., 2013; Okada et al., 2014). Наибольшую чувствительность к СИ показали крысы ЛПС группы, у которых уменьшилось проявление страха как на звук, так и контекст. Самцы и самки группы ЛПС+СИ также быстрее угашали условнорефлекторный страх по сравнению с крысами из группы ЛПС+СТАНД.

Таким образом, самки и самцы ЛПС группы были наиболее подвержены влиянию СИ: у этой группы изменения в тревожно-депрессивном поведении и в биохимических маркерах крови были наиболее выражены, что согласуется с гипотезой «двойного удара» (Maynard et al., 2001; Walker et al., 2009).



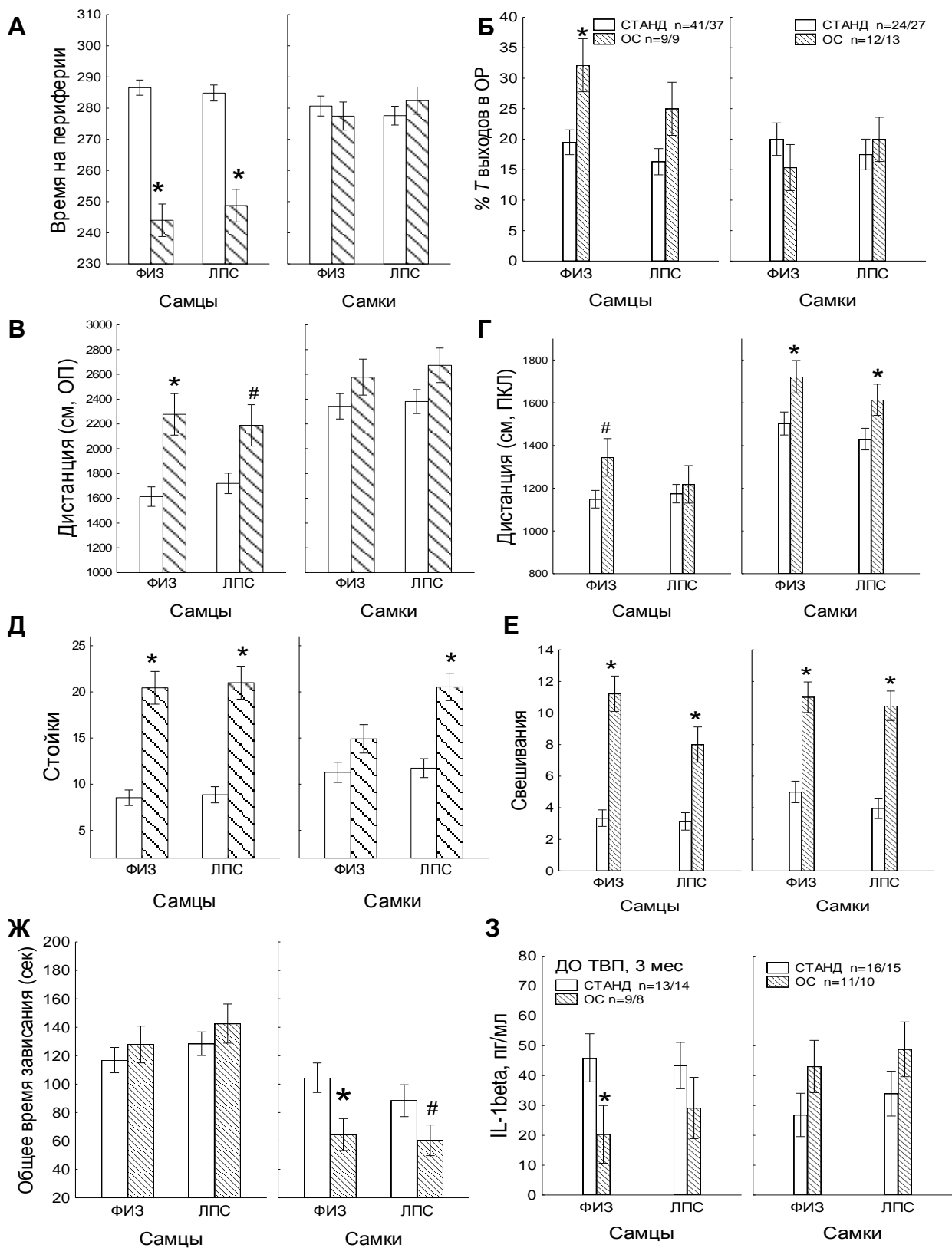
**Рис. 5.** Влияние социальной изоляции крыс на показатели тревожно-депрессивного поведения (А-В), оборонительного поведения (Ж,З) и на уровни ИЛ-1бета (Г) и кортикостерона (Д и Е) в сыворотке крови. СТАНД – стандартные условия содержания, СИ – социальная изоляция. n – число крыс в группе (ФИЗ/ЛПС). \* - статистически значимые различия со стандартными условиями содержания ( $p < 0.05$ , на А-В - Mann-Whitney U test, на Г-Ж - Factorial ANOVA), \$ - половые различия. Остальные обозначения как на рис. 1.

## **5. Влияние обогащения среды на поведение и биохимические показатели сыворотки крови крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса.**

Содержание в условиях ОС не повлияло на вес самцов в три месяца, но приводило к увеличению веса самок, как в группе ФИЗ, так и ЛПС. После ОС по сравнению со стандартными условиями, у самцов как ФИЗ, так и ЛПС группы было больше выходов в центр ОП и меньше время на периферии (рис. 6, А). Самцы ФИЗ группы также демонстрировали больший процент выходов и больший процент времени выходов в ОР ПКЛ (рис. 6, Б). Все это говорит о снижении уровня тревожности у самцов, но не самок, после длительного содержания в ОС, наибольшие изменения происходили в ФИЗ группе. После ОС у крыс всех групп также увеличивались двигательная активность и исследовательская активность, что выражалось в увеличении пройденной дистанции (рис. 6, В и Г) и скорости, а также в увеличении числа стоек (рис. 6, Д) и свешиваний (рис. 6, Е). В ТВП после ОС у самок группы ФИЗ наблюдали снижение общего времени зависания, что могло быть связано с увеличением двигательной активности. В тесте на предпочтение сахарозы не было выявлено влияния содержания в ОС. Таким образом, содержание в условиях ОС привело к снижению уровня тревожности у самцов, и наибольший эффект достигался в группе ФИЗ. Содержание в ОС у большинства крыс уменьшило проявление страха в виде замирания в ответ на контекст в Тесте 1, что могло отражать увеличение двигательной активности крыс. Наиболее устойчивыми к действию ОС оказались самцы ЛПС группы, а наиболее чувствительные были самцы ФИЗ группы.

Базовый уровень кортикостерона в сыворотке крови не отличался после ОС по сравнению со стандартными условиями как у самцов, так и самок, но после ТВП у самцов, содержащихся в ОС, уровень кортикостерона повышался в большей степени по сравнению с базовым уровнем, чем у самцов в стандартных условиях. Базовый уровень интерлейкина у самцов ФИЗ группы после ОС был ниже, чем у самцов в стандартных условиях (рис. 6, З). После ТВП различий в процентах изменений ИЛ-1бета у самцов и самок между группами не было.

Таким образом, наибольший эффект ОС оказало на крыс ФИЗ группы по сравнению с животными ЛПС группы, это проявлялось при анализе поведения в тестах на тревожно-депрессивное поведение и в биохимических маркерах сыворотки крови. Данную закономерность можно объяснить исходя из того, что используемые два воздействия - ранний провоспалительный стресс и обогащение среды – имеют разнонаправленное влияние (Gong et al., 2018; Mileva et al 2017).



**Рис. 6.** Влияние обогащения среды на показатели тревожно-депрессивного поведения крыс (на А, В, Д – ОП, на Б, Г, Е – ПКЛ, Ж - ТВП) и на уровень ИЛ-1бета (3). n – число крыс в группе ФИЗ/ЛПС. \* - статистически значимые различия между крысами в ОС и СТАНД условиях ( $p < 0.05$ , на А, Б, Г, Д и Е - Mann-Whitney U test, на В, Ж, 3 – post hoc анализ, Factorial ANOVA), # -тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было показано влияние раннего провоспалительного стресса на различные аспекты поведения взрослых животных. Крысы, получившие инъекцию бактериального липополисахарида в раннем периоде постнатального онтогенеза, демонстрировали увеличение уровня тревожности и проявление депрессивно-подобного поведения, а также снижение двигательной активности в подростковом возрасте. Отмеченные изменения были непродолжительны и исчезали во взрослом возрасте, по-видимому, за счет развития каких-то компенсационных процессов.

Вместе с тем ранний провоспалительный стресс оказывал влияние на оборонительное поведение крыс во взрослом возрасте, что, возможно, связано с большой стрессогенностью обучения с болевым подкреплением. У самцов с инъекцией ЛПС по сравнению с контролем условнорефлекторный страх в моделях с пассивно-оборонительными рефлексамися проявлялся в большей степени, и имелись трудности с его угашением. При выработке активно-оборонительных рефлексов трудности испытывали как самцы, так и самки после раннего провоспалительного стресса. Таким образом, наблюдался сдвиг в сторону доминирования пассивно-оборонительной стратегии поведения животных, но не активно-оборонительной. Влияние раннего провоспалительного стресса на самцов по некоторым показателям сходно с тревожными расстройствами и посттравматическим стрессовым расстройством у человека.

Ранний провоспалительный стресс существенным образом менял социальное поведение взрослых самцов, но не самок, а именно происходило увеличение уровня внутривидовой агрессии, социального доминирования, рост мотивации к социальным взаимодействиям и сексуальной мотивации. Нами впервые была обнаружена связь между социальным доминированием и повышенным уровнем провоспалительного цитокина ИЛ-1бета, что может свидетельствовать о воспалительной природе социального доминирования. Полученные нами данные отличаются от результатов с пренатальным введением ЛПС беременной матери, когда наблюдалось, наоборот, уменьшение времени социального взаимодействия (Baharnoori et al., 2012; Foley et al., 2014; Lee et al., 2021; Xu et al., 2017; Kirsten et al., 2010). Эти данные подчеркивают наличие специфических особенностей между пре- и постнатальными интервалами воздействия.

Согласно нашим результатам самцы оказались более чувствительны к провоспалительным воздействиям. Именно у самцов группы ЛПС наблюдали

наибольшие изменения в тревожно-депрессивном поведении, а также увеличение агрессии, доминирования в трубе и высокую социальную мотивацию. У самцов группы ЛПС также наблюдали большее проявление страха и трудности в угашении КУОР, в то время как самки группы ЛПС демонстрировали более быстрое угашение условно-оборонительного рефлекса на звук. Анализ биохимических показателей крови также выявил половые различия во влиянии раннего провоспалительного стресса. У самок ЛПС группы наблюдалась повышенная реактивность ГГН оси на стрессирующее воздействие, судя по уровню кортикостерона в плазме крови. У самцов ЛПС группы по сравнению с самками ранний провоспалительный стресс вызывал большую активацию иммунной системы, судя по уровню ИЛ-1бета в сыворотке крови. Для объяснения полученных результатов в работе привлекаются данные литературы о половых различиях в активации и протекании процессов воспаления и влиянии на них эстрогенов (Tronson, Collette, 2017; Klein et al., 2015; Najjar et al., 2018). Усиление реакции иммунитета и ГГН оси в ответ на дополнительные стрессирующие воздействия после раннего провоспалительного стресса рассматриваются с учетом представлений о «сенситизации» процессов (Fonken et al., 2018; Григорьян, 2020).

СИ оказывала наибольшее негативное влияние на животных ЛПС групп, что выражалось в увеличении тревожного поведения и нарушении выработки условно-рефлекторного страха, а также у самцов ЛПС группы в увеличении базового уровня интерлейкина, у самок ЛПС группы - в проявлении депрессивно-подобного поведения. Таким образом, можно заключить, что животные, пережившие ранний провоспалительный стресс, оказались наиболее уязвимы к воздействию СИ. Особенно стоит отметить тот факт, что хотя самки были более устойчивы к действию только провоспалительного стресса, однако при совместном действии провоспалительного стресса и СИ, выступающей в качестве «второго удара», самки оказались наиболее чувствительными. Наши результаты могут помочь в объяснении имеющихся клинических данных о большей склонности женщин, чем мужчин, к развитию депрессии и тревожных расстройств (Parker, Brotchie, 2010; Kessler et al., 2012).

Содержание в условиях обогащенной среды благотворно влияло на поведение крыс: способствовало снижению тревожности у всех групп, а также снижало базовый уровень интерлейкина. Наибольшие изменения наблюдались у крыс, не испытывавших раннего провоспалительного стресса. Для животных группы ЛПС содержание в обогащенной среде оказалось наименее эффективным.

Методика создания обогащенной среды включала в себя несколько факторов, среди которых были повышенная физическая активность, обогащение среды новыми объектами и игрушками, а также большое число социальных контактов за счет больших групп животных. Наши результаты подчеркивают практическое значение пребывания в условиях обогащения среды для уменьшения уровня тревожности и страха, что может использоваться в клинической практике для профилактики и лечения тревожных и депрессивных расстройств.

## **ВЫВОДЫ**

1. Ранний провоспалительный стресс, создаваемый путем введения ЛПС на 3 и 5-ый постнатальный день, приводил к увеличению уровня тревожности и признаков депрессивно-подобного поведения, а также снижению двигательной активности у крыс в подростковом возрасте (1-1.5 мес), у взрослых животных указанные изменения исчезали. Изменения в тревожно-депрессивном поведении в большей степени проявлялись у самцов, чем самок.

2. Ранний провоспалительный стресс приводил к увеличению проявления пассивно-оборонительных условных рефлексов и более длительному их угашению у взрослых самцов (модель классического оборонительного УР и рефлекса пассивного избегания). Выработка активно-оборонительных рефлексов у самцов и самок (модель активного избегания), наоборот, затруднялась.

3. Введение ЛПС в раннем онтогенезе способствовало увеличению уровня внутривидовой агрессивности, социального доминирования и социальной мотивации у самцов по сравнению с контрольной группой, но не у самок. Высокий уровень доминирования коррелировал с повышенным базовым уровнем ИЛ-1бета;

4. Введение ЛПС в раннем возрасте приводило у взрослых самцов, но не самок, к большей реактивности по уровню ИЛ-1бета в сыворотке крови при повторных стрессовых воздействиях по сравнению с самцами контрольных групп. У самок, но не у самцов, после введения ЛПС в раннем онтогенезе наблюдалась большая реактивность ГГН оси, что выражалось в большем приросте уровня кортикостерона.

5. Изменение условий содержания крыс в виде длительного проживания в условиях социальной изоляции вызывало увеличение уровня тревожности, снижение двигательной и исследовательской активности в ОП и ПКЛ, увеличение признаков депрессивно-подобного поведения и нарушение выработки условнорефлекторного страха, проявляющегося в виде замирания, на контекст и звук. Наиболее выраженные изменения в тревожно-депрессивном поведении

происходили у самок ЛПС группы. У самцов ЛПС группы в условиях СИ увеличивался базовый уровень ИЛ-1бета.

6. Длительное проживание в условиях обогащенной среды вызывало снижение уровня тревожности в ОП и ПКЛ, увеличение двигательной и исследовательской активности, уменьшение депрессивно-подобного поведения, уменьшение проявления условнорефлекторного страха на контекст в виде замирания. Содержание крыс в условиях ОС снижало базовый уровень ИЛ-1бета у самцов ФИЗ группы. Влияние на тревожное поведение в большей степени проявлялось у самцов ФИЗ группы, а на депрессивно-подобное поведение - у самок. Самцы ЛПС группы были наименее подвержены влиянию ОС по показателям тревожности и страха.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

*ИЛ-1бета* – интерлейкин-1 бета;  
*ГГН ось* – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось;  
*ИНТ* – интактные, группа интактных крыс;  
*ЛПС* – липополисахарид, группа с введением липополисахарида;  
*ОП* – открытое поле;  
*ОР* – открытые рукава ПКЛ;  
*ОС* – обогащенная среда;  
*ПКЛ* – приподнятый крестообразный лабиринт;  
*СИ* – социальная изоляция;

*СТАНД* – стандартные условия содержания;  
*ТВП* – тест вынужденного плавания;  
*ТПС* – тест предпочтения сахарозы;  
*КУОР* – классический условный оборонительный рефлекс;  
*УРАИ* – условный рефлекс активного избегания;  
*УРПИ* – условный рефлекс пассивного избегания;  
*ФИЗ* – физиологический раствор, группа с введением физиологического р-ра.

### ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА

#### Статьи по теме диссертации.

1. Павлова И. В., Брошевицкая Н. Д., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В. Половые различия в тревожно-депрессивном и оборонительном поведении крыс Вистар. Журн. высш. нервн. деят. 2020. 70 (2): 243-258. DOI: 10.31857/S0044467720020100
2. Брошевицкая Н. Д., Павлова И. В., Зайченко М. И., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В., Григорьян Г. А. Половые различия в оборонительном поведении взрослых крыс в ответ на ранний нейровоспалительный стресс. Журн. высш. нервн. деят. 2020. 70 (2): 261-278. DOI: 10.31857/S0044467720020057
3. Брошевицкая Н. Д., Павлова И. В., Зайченко М. И., Груздева В. А., Григорьян Г. А. Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожное и депрессивно-подобное поведение крыс разного возраста. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. 106 (6): 1–20. DOI: 10.31857/S0869813920060035



4. Павлова И.В., Брошевицкая Н.Д., Зайченко М.И., Григорьян Г.А. Влияние социальной изоляции и обогащенной среды на тревожно-депрессивное поведение крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса. Журн. высш. нервн. деят. 2021. 71 (5): 690-709. DOI: 10.31857/S0044467721050087

5. Pavlova I.V., Broshevitskaya N. D. The influence of social isolation and enriched environment on fear conditioning in rats after early proinflammatory stress. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2021. 57 (4): 803-816. DOI: 10.1134/S0022093021040062

6. Broshevitskaya N.D., Pavlova I.V., Zaichenko M.I. Early proinflammatory stress affects the social behavior of adult rats: effects of sex and the basal level of interleukin 1-beta in the blood. Neurochemical Journal. 2022. 16 (3): 302–310. DOI: 10.1134/S1819712422030023