

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель  
д.б.н., г.н.с. Павлова И.В.

Москва – 2022 г.

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>15</b>
1.1. Индивидуально-групповые различия в тревожном и оборонительном поведении .....	15
1.2. Половые различия в тревожно-депрессивном и оборонительном поведении .....	17
1.2.1. Половые различия в тревожно-депрессивном поведении .....	17
1.2.2. Половые различия в оборонительном поведении .....	18
1.3. Модель раннего провоспалительного стресса на животных .....	20
1.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное поведение .....	22
1.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение .....	24
1.6. Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых животных .....	26
1.7. Влияние раннего провоспалительного стресса у животных разного пола на биохимические показатели крови: кортикостерон и ИЛ-1бета .....	29
1.8. Влияние разных условий содержания на поведение крыс в авersive ситуациях .....	35
1.8.1. Влияние социальной изоляции на тревожно-депрессивное и оборонительное поведение крыс .....	35
1.8.2. Влияние содержания в обогащенной среде на тревожно-депрессивное и оборонительное поведение .....	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>42</b>
2.1. Объект исследования .....	42
2.2. Введение липополисахарида .....	42
2.3. Различные условия содержания .....	43
2.4. Тестирование на тревожность и депрессивно-подобное поведение .....	43
2.5. Выработка и угашение условных оборонительных рефлексов .....	46
2.6. Тестирование социального поведения .....	49
2.7. Иммуноферментный анализ крови .....	52

2.8. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ .....	53
<b>ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРЫС РАЗНОГО ПОЛА .....</b>	<b>54</b>
3.1. СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	54
3.2. Влияние раннего провоспалительного стресса на вес крыс .....	54
3.3. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в открытом поле .....	55
3.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте .....	58
3.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на предпочтение сахарозы.....	60
3.6. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте вынужденного плавания .....	61
3.7. Влияние раннего провоспалительного стресса на уровни кортикостерона и цитокина ИЛ-1бета в сыворотке крови. ....	64
3.8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	66
Выводы .....	73
<b>ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ОБОРОНИТЕЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС РАЗНОГО ПОЛА .....</b>	<b>74</b>
4.1. СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	74
4.2. Влияние раннего провоспалительного стресса на болевую чувствительность крыс .....	74
4.3. Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку, проявление и угашение классического условного оборонительного рефлекса .....	75
4.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку и угашение условного рефлекса пассивного избегания .....	79
4.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку условного рефлекса двустороннего активного избегания .....	82
4.6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	84
Выводы .....	88
<b>ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛПС .....</b>	<b>90</b>

5.1. СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	90
5.2. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ СОЦИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ .....	90
5.3. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА СОЦИАЛЬНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ КРЫС .....	93
5.4. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ «РЕЗИДЕНТ-ИНТРУДЕР» .....	94
5.5. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА СЕКСУАЛЬНОЕ ПРЕДПОЧТЕНИЕ КРЫС .....	97
5.6. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ .....	99
5.7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	102
Выводы .....	109

## **ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ И ОБОРОНИТЕЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА .....**

**110**

6.1. СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	110
6.2. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ВЕС КРЫС .....	110
6.3. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС .....	111
6.3.1. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ .....	111
6.3.2. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ПРИПОДНЯТОМ КРЕСТООБРАЗНОМ ЛАБИРИНТЕ .....	114
6.3.3. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ПРЕДПОЧТЕНИЕ САХАРОЗЫ ...	116
6.3.4. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ТЕСТЕ ВЫНУЖДЕННОГО ПЛАВАНИЯ .....	117
6.4. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ВЫРАБОТКУ, ПРОЯВЛЕНИЕ И УГАШЕНИЕ КЛАССИЧЕСКОГО УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА .....	118
6.4.1. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ВЫРАБОТКУ КЛАССИЧЕСКОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА НА ЗВУК .....	118
6.4.2. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ПРОЯВЛЕНИЕ КЛАССИЧЕСКОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА НА ЗВУК .....	118
6.4.3. ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА УГАШЕНИЕ КЛАССИЧЕСКОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА НА ЗВУК .....	121

6.5. Влияние социальной изоляции на уровень кортикостерона и ИЛ-1БЕТА в сыворотке крови. ....	123
6.6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	125
Выводы .....	134
<b>ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ НА ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНОЕ И ОБОРОНИТЕЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА .....</b>	<b>135</b>
7.1. СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	135
7.2. Влияние обогащенной среды на вес крыс .....	135
7.3. Влияние обогащенной среды на тревожно-депрессивное поведение крыс .....	136
7.3.1. Влияние обогащенной среды на поведение крыс в открытом поле .....	136
7.3.2. Влияние обогащенной среды на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте .....	138
7.3.3. Влияние содержания в обогащенной среде на предпочтение сахарозы .....	140
7.3.4. Влияние содержания в обогащенной среде на поведение крыс в тесте вынужденного плавания .....	140
7.4. Влияние обогащенной среды на выработку, проявление и угашение классического оборонительного рефлекса .....	142
7.5. Влияние содержания в условиях обогащенной среды на уровень кортикостерона и ИЛ-1БЕТА в сыворотке крови. ....	144
7.6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	145
Выводы .....	150
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>151</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>155</b>
<b>СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....</b>	<b>157</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>161</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>162</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

---

**Актуальность проблемы и степень ее разработанности.** В лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций ИВНД и НФ РАН на протяжении многих лет проводятся исследования индивидуально-групповых особенностей в поведении животных как при обучении с положительным подкреплением (Григорьян и Мержанова, 2006; 2008; Зайченко с соавт., 2010, 2011), так и в аверсивных ситуациях (Павлова, Рысакова, 2014; Павлова с соавт., 2018). Было убедительно показано, что уровни импульсивности, тревожности и страха могут сильно различаться от особи к особи даже в пределах одной популяции. П.В. Симонов в своих трудах отводил наиболее значимую роль в формировании индивидуально-групповых особенностей различиям в функционировании и взаимодействии определенных структур головного мозга, не отрицая при этом значения и генетических факторов (Симонов, 2004). В настоящее время вопрос о причинах возникновения индивидуально-групповых особенностей поведения животных и человека не потерял актуальность. 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 возможном 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, Coe, 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; Dinel et al., 2014; Tishkina et al., 2016). В отличие от тревожно-депрессивного поведения, вопрос о влиянии раннего провоспалительного стресса на процессы выработки и угашения оборонительных рефлексов остается мало изученным. В литературе имеются сведения о негативном влиянии раннего провоспалительного стресса на

проявление условно-рефлекторного страха у взрослых животных, однако, результаты достаточно противоречивые (Bilbo et al., 2006; Tishkina et al., 2016; Osborne et al., 2017; Tchessalova, Tronson, 2019).

Известно, что хроническое пренатальное введение ЛПС матери может приводить к существенным нарушениям социального поведения, а именно к нарушениям поведения, схожим с симптомами расстройств аутистического спектра (Kirsten et al., 2010; Baharnoori et al., 2012; Foley et al., 2014; Xu et al., 2017; Lee et al., 2021) и шизофреноподобных отклонений (Chamera et al., 2020). В то же время в литературе имеется мало информации о влиянии раннего постнатального провоспалительного стресса на социальное поведение. В одной из немногих работ с инъекцией ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни у взрослых крыс наблюдалось уменьшение времени социального взаимодействия (Breivik et al., 2002), однако, дальнейшие исследования показали, что именно крыса из ЛПС группы вызывала аверсию, т.е. ее избегали животные из контрольной группы (Macrae et al., 2015). Таким образом, осталось неизвестным, влияет ли ранний провоспалительный стресс на мотивацию к социальному общению. В литературе также не представлены работы, в которых бы у взрослых животных рассматривалось влияние раннего провоспалительного стресса на другие формы социального поведения, такие как внутривидовая агрессия и социальное доминирование. Однако ряд данных литературы позволяет предположить возможность такого влияния. Так, например, на линиях высоко- и низкоагрессивных животных было показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов коррелировали с высоким уровнем агрессии (Audet et al., 2010; Idova et al., 2016; Alperina et al., 2019). Пациенты с депрессией демонстрировали повышенную агрессивность и высокий уровень провоспалительных цитокинов (Takahashi et al., 2018).

Стоит отметить, к настоящему времени в литературе имеются данные о наличии существенных различий в развитии иммунного ответа у самцов и



самок (Berghöfer et al., 2006; Roberts et al., 2013; Martinez, Gordon, 2014; Klein et al., 2015; Tronson, Collette, 2017). В качестве одной из причин разного реагирования самцов и самок на воспаление рассматривается влияние половых гормонов, особенно эстрогена и прогестерона у самок (Milad et al., 2009; Graham, Daher, 2016; Domonkos et al., 2017; Graham, Scott, 2018).

По данным литературы также известно, что влияние различных внешних условий содержания, таких как социальная изоляция, или содержание в обогащенной среде способно изменить уровень тревожности и проявления депрессивно-подобного поведения, однако последствия от разных типов воздействия могут сильно отличаться. Так, социальная изоляция у крыс рассматривается как крайне «негативный» фактор, 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, 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 менее эффективно, чем на контрольных крыс.

**Целью** настоящей работы являлось изучение влияния раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное и социальное

поведение, а также различные оборонительные условные рефлексы и нейроэндокринную реактивность у взрослых крыс разного пола.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Вызвать у крысят (самцов и самок) в возрасте 3 и 5 дней 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 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, а также провоспалительного цитокина ИЛ-1бета в крови крыс до и после стрессирующих воздействий в разном возрасте и сопоставить с поведением крыс во всех сериях опытов.

**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.

Социальная изоляция увеличивала уровень тревожно-депрессивного поведения у самок после раннего провоспалительного стресса по сравнению с контрольными самками.

**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. В условиях

пандемии Covid-19, особенно важны наши результаты, свидетельствующие, что провоспалительный стресс на ранних этапах развития приводит к повышенной чувствительности к стрессу социальной изоляции во взрослом возрасте, что проявляется в увеличении агрессии, тревожности, депрессивности. 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 (244 крысы), 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 были опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации и индексированных в базе Web of Science/Scopus, 3-е тезисов - в международных журналах (European Neuropsychopharmacology, Q1), 8 тезисов - в сборниках трудов всероссийских или 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-м Конгрессе ECNP (Коппенгаген, Дания, 2019 г.), 34-м Конгрессе ECNP (Лиссабон, Португалия, 2021 г.), FENS Forum (онлайн форум, 2020 г).

**Личный вклад автора.** Автор в составе группы участвовала в разработке дизайна и протоколов исследования, постановке задач. Автор самостоятельно проводила разведение животных и готовила экспериментальные группы, осуществляла сбор биологического материала и иммуноферментный анализ сыворотки крови, проводила опыты и статистический анализ полученных данных. В соавторстве с сотрудниками лаборатории были написаны статьи и тезисы.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 192 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и иллюстрирована 34 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 22 отечественных источника и 246 зарубежных источников литературы.

## **ГЛАВА 1. Обзор литературы**

---

### **1.1. Индивидуально-групповые различия в тревожном и оборонительном поведении.**

В нейробиологии принято различать понятия тревожности и страха (Ennaceur, 2014). Тревожность - эмоционально-негативное состояние животного, находящегося в обстановке с потенциальной или сомнительной угрозой. Под страхом понимают реакцию на стимул, непосредственно угрожающий жизни, и проявляющуюся в виде различных оборонительных реакций (замирания, избегания, избавления).

Подходы к исследованию тревожности и страха также отличаются. Оценку уровня тревожности проводят в целом ряде тестов - приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ), открытом поле (ОП), темно-светлой камере (ТСК), тесте на неофагию и др. (Буреш с соавт., 1991; Belzung, Le Pape, 1994; Калуев, 1998). Все эти тесты основаны на страхе грызунов к открытому пространству, яркому освещению, высоте. Для изучения страха одной из наиболее распространенных методик является выработка классического Павловского условного оборонительного рефлекса (fear conditioning), в котором значимый условный стимул в определенной обстановке сочетается с ударами током. В данной модели страх можно количественно оценить по времени замирания (Gaborro et al., 2011; Павлова, Рысакова, 2013; 2014). Две другие, не менее популярные методики для исследования условно-оборонительного поведения - выработка условного рефлекса активного избегания (УРАИ), а также выработка и угашение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ). В первой модели животное должно научиться переходить на звуковой стимул из отсека в отсек для избегания удара током, а во второй - наоборот, не заходить в комфортный темный отсек во избежание удара током.

Даже в рамках одной популяции при тестировании животных как в тестах на тревожность, так и при выработке оборонительных рефлексов можно выделить животных с различными индивидуально-групповыми особенностями поведения. В зависимости от числа выходов в аверсивные отсеки и времени, проведенного в них, при тестировании в приподнятом крестообразном лабиринте животных распределяют на группы с высокой и низкой тревожностью (Landgraf, Wigger, 2003). В зависимости от времени замирания при выработке условнорефлекторного страха животных можно разделить на низко- и высокореактивных (Bush et al., 2007), а во время тестирования на проявление страха после обучения - на мало- и много замирающих крыс (Павлова, Рысакова, 2014; Павлова с соавт., 2018). По скорости выработки активного избегания также можно провести деление грызунов на группы с высокой и низкой скоростью выработки рефлекса активного избегания (Жуков, 1997).

Для более детального исследования механизмов, лежащих в основе индивидуально-групповых особенностей в проявлении тревожности и страха, при помощи методов селекции было выведено несколько линий крыс, отличающихся по уровню тревожности и страха - например, линии LAB и HAV (высоко- и низкотревожных) (Landgraf, Wigger, 2002; Lehner et al., 2014) или HR и LR (высоко- и низкореактивных) (Bush et al., 2007). У мышей также выведены линии, характеризующиеся высоким и низким уровнями тревожности (например, линии C57/BL6J и BALB/c) (Lalonde, Strazielle, 2008). Животные разных линий характеризуются не только поведенческими или нейроэндокринными, но и генетическими различиями (Landgraf, Wigger, 2002; 2003).

В работах нашей лаборатории ранее исследовалась связь между тревожностью и страхом (Павлова, Рысакова, 2015). Было показано, что тревожность, проявляющаяся в разных тестах (ПКЛ и ОП), по-разному связана



со страхом в ответ на обстановку и условный стимул при условнорефлекторных опытах. Корреляционный анализ показал, что крысы, демонстрировавшие более высокий уровень тревожности в ПКЛ, больше затаивалась на контекст, однако уровень тревожности в ПКЛ не коррелировал с затаиванием на звук. Было показано, что крысы с более высоким уровнем замирания после выработки классического оборонительного рефлекса быстрее вырабатывали и хуже угашали рефлекс пассивного избегания по сравнению с крысами с более низким уровнем замирания (Павлова с соавт., 2018). С другой стороны, крысы с низким уровнем замирания легче вырабатывали рефлекс активного избегания в челночной камере. Авторы предположили, что разное проявление страха связано не только с памятью животного, но и с доминирующей оборонительной стратегией. Крысы с высоким уровнем замирания предпочитали пассивную стратегию поведения в оборонительных ситуациях, в то время как крысы с низким уровнем замирания при классическом оборонительном рефлексе демонстрировали активную стратегию поведения. В других работах предполагается, что животные с высоким уровнем замирания имеют более сильную память о стимулах, ассоциированных со страхом (An et al., 2012). Другие авторы полагают, что важную роль играет уровень реактивности на страх, высокий или низкий (Ledoux et al., 1983). Также высказывается мнение о разных формах выражения страха, не связанных с памятью (Skorzewska et al., 2015).

## **1.2. Половые различия в тревожно-депрессивном и оборонительном поведении.**

### **1.2.1. Половые различия в тревожно-депрессивном поведении.**

На протяжении долгого времени в подавляющем большинстве нейрофизиологических экспериментов на животных использовались только самцы. В настоящее время показано, что помимо индивидуально-групповых особенностей поведения выявляются различия, связанные с полом, что может

говорить о крайне ограниченной репрезентативности ранее полученных научных данных. Так в тестах на тревожность, открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте, было показано, что самки демонстрируют более высокую двигательную и исследовательскую активность и более низкий уровень тревожности по сравнению с самцами (Johnston, File, 1991; Belviranlı et al., 2012; Domonkos et al., 2017; Azogu et al., 2018; Ou et al., 2019; Павлова с соавт., 2020). Однако в темно-светлой камере половых различий в поведении не было обнаружено (Domonkos et al., 2017). В тесте социального взаимодействия и в тесте Фогеля (питьевой конфликтный тест) у самок наблюдали больший уровень тревожности, чем у самцов (Johnston, File, 1991). В тесте на депрессивно-подобное поведение, тесте вынужденного плавания, самцы больше зависают по сравнению с самками, в то время как самки, в отличие от самцов, демонстрируют больше двигательной активности: вскарабкиваний и отряхиваний (Borbelyova et al., 2016; Colom-Lapetina et al., 2017). Это свидетельствует о большей выраженности депрессивно-подобного поведения у самцов по сравнению с самками.

### **1.2.2. Половые различия в оборонительном поведении.**

Представленные в литературе данные содержат достаточно противоречивые сведения относительно половых различий в оборонительных условных рефлексах. Самцы больше замирали на контекст и дольше угашали классический оборонительный рефлекс и рефлекс пассивного избегания, но медленнее вырабатывали рефлекс активного избегания (Van Haaren et al., 1990; Maren et al., 1994; Dalla, Shors, 2009; Daviu et al., 2014; Pettersson et al., 2016; Colon et al., 2018; Павлова с соавт., 2020). Также у самцов, в отличие от самок, больше проявлялась когнитивная генерализация страха на нейтральные контексты (Daviu et al., 2014). В других работах у самок наблюдали более выраженный условнорефлекторный страх на контекст и большую генерализацию страха на нейтральные контексты (Keiser et al., 2017). При

предъявлении не болевых стимулов (запах естественного хищника, кошки) также наблюдали половые различия: самки демонстрировали больше защитных реакций в ситуациях с потенциальной, но не реальной угрозой (Blanchard et al., 1991). В проявлении стартл-рефлекса после выработки условнорефлекторного страха половые различия обнаружены не были (Zhao et al., 2018).

Данные о половых различиях в угашении условнорефлекторного страха не многочисленны. Самки быстрее угашали страх на контекст по сравнению с самцами (Daviu et al., 2014; Павлова с соавт., 2020). Вместе с тем, отмечается, что для самок в большей степени, чем для самцов характерно восстановление угашенного страха после напоминания или спонтанное восстановление, что происходит, по мнению авторов, за счет большего вовлечения лимбических структур (Park et al., 2017). Авторы полагают, что такая особенность спонтанного восстановления страха может объяснить большую распространенность тревожных расстройств среди женщин.

В литературе также имеются данные о половых различиях в болевой чувствительности у крыс. Показано, что самки были более чувствительны к болевой стимуляции, чем самцы (Sorge, Totsch, 2017; Павлова с соавт. 2020). Схожие закономерности были выявлены и у людей: девочки оказались более чувствительны и менее устойчивы к болевой стимуляции, причем половые различия усиливались после 12 лет (Sorge, Totsch, 2017). Это объясняет тот факт, что число пациентов с хронической болью больше среди женщин, чем среди мужчин.

Стоит отметить, что самки крайне редко становятся объектом исследования в работах с выработкой и угашением оборонительных рефлексов. Полученные в ходе исследований данные говорят о наличии различий между полами: самцы медленнее угашают классический условный рефлекс и рефлекс пассивного избегания, но хуже вырабатывают рефлекс

активного избегания. Самки, с другой стороны, легче угашают классический оборонительный рефлекс на звук, причем в стадии проэструса, когда наблюдаются высокие уровни эстрогена, процесс угашения условнорефлекторного страха проходил наиболее успешно (Kashefi, Rashidy-Pour, 2014). Предполагается, что половые гормоны играют важную роль в различиях в выработке и угашении оборонительных рефлексов.

### **1.3. Модель раннего провоспалительного стресса на животных.**

Основываясь на имеющихся данных о существовании индивидуально-групповых особенностей в тревожном и оборонительном поведении, возникает вопрос, могут ли какие-то внешние воздействия в раннем постнатальном периоде повлиять на уровень тревожности или на уровень замиранья при выработке условнорефлекторного страха взрослого животного?

Известно, что ранние периоды онтогенеза (пренатальный и ранний постнатальный) характеризуются высокой чувствительностью к различного рода стрессам и изменениям внешних условий. Согласно представлениям о перинатальном программировании (perinatal programming, (Hodgson, Coe, 2006)), воздействия в определенные временные интервалы в раннем онтогенезе способны спровоцировать существенные изменения в дальнейшем развитии и поведении взрослых особей. Согласно гипотезе двойного удара (double-hit hypothesis, (Maynard et al., 2001; Walker et al., 2009)), вмешательства в нормальное развитие на ранних этапах онтогенеза (“первый удар”) создают предрасположенность к появлению психопатологии, которая может проявиться при повторном вмешательстве в дальнейшей жизни (“втором ударе”).

Последние два десятилетия особо пристальное внимание уделяется влиянию на формирование и поведение взрослого организма таких

негативных стрессирующих воздействий в раннем онтогенезе, как инфекции, интоксикации, временная материнская сепарация, недостаток строительного материала для гнезда, болевые воздействия и др. В целом направлении исследований в качестве базовой причины многих психоневрологических расстройств (клиническая депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство, аутизм и шизофрения) рассматривается нейровоспаление (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). На данный момент известно, что нейровоспаление, возникающее под влиянием раннего стресса, запускает целый каскад сложных молекулярных, биохимических, гормональных, нервно-гуморальных и иных преобразований, что приводит к особым изменениям поведения и развитию специфических психопатологий. Хотя исследование механизмов, лежащих в основе этих процессов, еще далеко от завершения, одно очевидно: эти преобразования имеют существенные половые различия, которые находят свое отражение в реактивности иммунной системы, особенностях внутриклеточного сигналинга, влиянии половых гормонов и гормонов стресса на систему нейровоспаления и т.д. (Vegeto et al., 2001; Villa et al., 2015; Berkiks et al., 2019; Tchessalova, Tronson, 2019).

Исследования в этой области в значительной степени стали возможны благодаря разработке и применению моделей нейровоспаления в опытах на животных (Григорьян, Гуляева, 2015). Среди них наиболее часто используется модель с инициацией нейровоспаления путем введения бактериального липополисахарида (ЛПС) на ранних этапах жизни (Григорьян, 2020). Инъекция ЛПС в раннем онтогенезе приводит к активации иммунной системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси.

#### **1.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное поведение.**

В большом количестве работ, представленных в литературе, показано, что введение ЛПС в ранний постнатальный период приводит к увеличению уровня тревожности и проявлению депрессивно-подобного поведения у взрослых животных (Breivik et al., 2002; Tishkina et al., 2016; Dinel et al., 2014; Custódio et al., 2018; Huang et al., 2015). Так в работе на крысах линии Lewis после введения ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни у взрослых животных наблюдали признаки повышения тревожности в тестах ПКЛ и ОП (Breivik et al., 2002). В то же время можно найти работы, демонстрирующие, что ранний провоспалительный стресс может, наоборот, оказывать анксиолитический эффект на взрослых животных. Так, в некоторых работах раннее введение ЛПС приводило к снижению уровня тревожности в ТСК (Tenk et al., 2013; Stolp et al., 2011). Такой противоречивый результат можно объяснить особенностями установки ТСК.

При оценке изменений, произошедших под влиянием инъекции ЛПС, важно учитывать возраст животного. В одних исследованиях при введении ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни наблюдали, как с возрастом усугублялись последствия от раннего провоспалительного стресса (Tishkina et al., 2016). В данном исследовании крысы группы ЛПС в подростковом возрасте демонстрировали высокий уровень тревожности только в ОП, в то время как взрослые животные группы ЛПС проявляли высокий уровень тревожности уже в ПКЛ и демонстрировали депрессивно-подобное поведение в тесте вынужденного плавания. В других работах было показано, что с возрастом некоторые поведенческие изменения могут исчезать. Так, введение ЛПС на 14 день оказало влияние на тревожное поведение у мышей в подростковом возрасте (30 постнатальных дней, ПНД) в тесте на неофагию, но в возрасте 90 дней различий между контрольной группой и группой с введением ЛПС не

наблюдали (Dinel et al., 2014). После введения ЛПС на 5 и 7 день в подростковом возрасте (35 ПНД) самцы мышей демонстрировали депрессивно-подобное, тревожное и репитативное (повторяющееся) поведение, а также нарушения рабочей памяти, в то время как в возрасте 70 дней оставались только признаки депрессивно-подобного и тревожного поведения (Custódio et al., 2018).

В некоторых работах ранний провоспалительный стресс дополняли новым стрессом во взрослом возрасте. Так в одной работе исследовали влияние инъекции ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни на поведение взрослых животных после столкновения с трехдневным комплексным стрессом (иммобилизация и социальная изоляция) (Walker et al., 2009). После стрессирования во взрослом возрасте крысы группы ЛПС демонстрировали повышенный уровень тревожности как в ОП, так и в ПКЛ, в то время как без дополнительного стресса изменений в поведении не наблюдали. В похожей работе с ранним провоспалительным стрессом и более поздним комбинированным стрессом на линиях крыс с разным уровнем тревожности получили, что низко- и высокотревожные животные ЛПС группы демонстрировали больший уровень тревожности в ОП по сравнению с контролем (Claypoole et al., 2017). В другой работе ранний провоспалительный стресс сочетали со стрессом электрокожного раздражения хвоста, и крысы группы ЛПС, наоборот, демонстрировали более низкий уровень депрессивно-подобного поведения во взрослом возрасте и низкий уровень кортикостерона (Vilbo et al., 2008).

Сопоставление влияния раннего провоспалительного стресса на животных разного пола проводили в небольшом числе работ (Walker et al., 2009; Custódio et al., 2018; Claypoole et al., 2017). Самцы после раннего провоспалительного стресса показали более выраженные изменения в тревожно-депрессивном поведении, чем самки (Walker et al., 2009; Claypoole et al., 2017). Изменения в тревожно-депрессивном поведении и биохимических

показателях крови отличались у самцов и самок (Custódio et al., 2018; Claypoole et al., 2017). Следует признать, что вопрос о влиянии пола на последствия раннего провоспалительного стресса изучен недостаточно.

Основываясь на всем вышеизложенном, можно заключить, что ранний провоспалительный стресс способен оказывать влияние на уровень тревожности и способствовать развитию депрессивно-подобного поведения. Некоторую противоречивость результатов можно объяснить рядом причин: разные модели тестов, применение разных дозировок ЛПС в разные периоды постнатального развития, диета матери в период беременности и вскармливания. Было показано, что высококалорийная и разнообразная диета самки в период беременности и лактации благотворно влияла на устойчивость потомства к стрессам и препятствовала формированию тревожного и депрессивно-подобного поведения в ответ на провоспалительный стресс (Павлова с соавт., 2020; Huang et al., 2015) и материнскую изоляцию (Rincel et al., 2016) в раннем возрасте. Имеются также данные, что употребление вкусной пищи (comfort food) может смягчать последствия отрицательных эмоций, вызванных стрессом (Dallman et al., 2003), и снижать у потомства проявления тревожно-депрессивного поведения, вызванного материнской изоляцией (Maniam et al., 2016; Maniam and Morris, 2009) и социальным стрессом (Finger et al., 2011). Важно отметить, что эффект от раннего провоспалительного стресса может не проявляться вплоть до повторного столкновения с новым стрессом во взрослом возрасте.

### **1.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение.**

В литературе имеются достаточно противоречивые сведения о влиянии раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение взрослых животных. В работах с введением иммуностимулятора на разных стадиях онтогенеза было показано, что именно введение ЛПС на 4-5 постнатальные



дни нарушало обучение на контекст у взрослых животных (Bilbo et al., 2006; Harre et al., 2008), но не у молодых (24 ПНД) (Osborne et al., 2017). Однако другие авторы отмечают, что введение ЛПС в тот же период, наоборот, приводит к увеличению проявления условнорефлекторного страха на контекст у взрослых крыс после введения ЛПС в раннем онтогенезе (Tishkina et al., 2016). В работах с более поздним введением ЛПС (14-й ПНД) не было обнаружено влияние на образование условнорефлекторного страха на контекст или сигнал у взрослых крыс (самцов и самок), но наблюдался дефицит в угашении классического оборонительного рефлекса (Doenni et al., 2017). Неонатальное введение ЛПС в первую (4 и 5 ПНД) и третью (15, 18, 21 ПНД) недели жизни нарушало обучение активному избеганию у взрослых крыс, что выражалось в уменьшении числа избеганий и увеличении их латентности (Kohman et al., 2008; Trofimov et al., 2017). В литературе имеется работа, в которой было показано, что неонатальное введение (на 5 ПНД) ЛПС в гиппокамп также приводило к нарушению выработки и облегчению угашения УРПИ (Fan et al., 2005).

В работах с острым введением ЛПС взрослым животным были получены более однородные данные, которые свидетельствуют в основном о нарушении обучения. Было показано, что введение ЛПС взрослым самцам мышей C57BL/6J перед и во время выработки рефлекса активного избегания приводило к снижению числа реакций избегания и увеличению числа межсигнальных реакций, что расценивалось как ухудшение выработки условного оборонительного рефлекса (Sparkman et al., 2005; Kohman et al., 2007). Введение ЛПС взрослым грызунам перед выработкой классического оборонительного рефлекса на звук нарушало у самцов, но не у самок, выработку рефлекса на контекст, но не на условный стимул (Bilbo et al., 2005, 2006; Tchessalova, Tronson, 2019). Авторы также подчеркивают, что ухудшения в основном наблюдали в долговременной памяти, но не кратковременной (Bilbo et al., 2006). Введение ЛПС в мозг взрослым грызунам

приводило к нарушению выработки и ускорению угашения рефлекса пассивного избегания (Wang et al., 2013; Arai et al., 2001).

Таким образом, анализ литературы показывает, что ранний провоспалительный стресс, вызванный введением ЛПС, оказывает влияние на механизмы формирования страха и памяти о нем. Однако, из-за существенных различий в методиках инициации провоспалительного стресса в разные периоды жизни исследователи приходят к различным, и иногда даже противоположным, результатам, что не позволяет создать цельную картину о механизмах влияния раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение. Кроме того, вопрос о влиянии раннего провоспалительного стресса на угашение оборонительных рефлексов практически не исследован. Также было обнаружено крайне мало работ, в которых бы поднимался вопрос о половых различиях во влиянии раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение. В части данных работ в экспериментах участвовали животные в подростковом возрасте, т.е. в том возрасте, когда половые различия еще не очевидны (Osborne et al., 2017; Fan et al., 2005). Мы предположили наличие половых различий во влиянии раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение. Это предположение подтверждают данные о большей чувствительности оборонительного поведения самцов по сравнению с самками при введении ЛПС взрослым животным (Tchessalova, Tronson, 2019).

#### **1.6. Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых животных.**

В литературе представлено крайне мало работ о влиянии раннего постнатального провоспалительного стресса на различные формы социального поведения, при этом имеющиеся результаты достаточно противоречивые.

В одной из первых работ после инъекций ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни у взрослых крыс наблюдалось уменьшение времени социального взаимодействия (Breivik et al., 2002). В работах с постнатальным введением ЛПС на 7 день непосредственно в гиппокамп, было показано, что у взрослых крыс наблюдали дефициты в социальном поведении, ухудшение распознавания нового объекта, нарушение предимпульсного торможения и рост числа активной микроглии (Zhu et al., 2014). Дальнейшие исследования показали, что в тесте на социальное взаимодействие интактные крысы меньше контактировали с крысами из ЛПС группы (MacRae et al., 2015). Была выдвинута гипотеза о влиянии обонятельных сигналов, исходящих от крысы ЛПС группы, на продолжительность социальных контактов. Для проверки гипотезы о роли обонятельных сигналов в социальной аверсии, у партнера крысы из ЛПС группы вызывали дегенерацию обонятельного эпителия с помощью интраназальной перфузии ZnSO<sub>4</sub> (MacRae et al., 2015). После данной процедуры увеличивалось число социальных контактов, направленных на крыс из ЛПС группы. Было выдвинуто предположение, что на запах влияют нарушения в содержании микробиоты кишечника крыс после неонатального воспаления. Однако секвенирование РНК из фекальных болюсов не выявило отличий в составе микрофлоры у самцов ЛПС группы (Kentner et al., 2018). Несмотря на это, лечение крыс группы ЛПС антибиотиками, которые оказывали серьезный эффект на микробиоту, устраняло социальное избегание по отношению к ним. Известно, что крысы стараются избегать общения с больными особями. Так, острое введение большой дозы ЛПС, вызывающей болезненное состояние у крысы, приводило к снижению социальных взаимодействий в отношении больного партнера и могло вызывать упреждающий иммунный ответ у здоровой крысы в виде увеличения содержания TNF- $\alpha$  в обонятельных луковицах (Hamasato et al., 2017). Вопрос меняется ли мотивация к социальному общению у крыс, переживших ранний провоспалительный стресс, все еще остается открытым.

В литературе нет работ о влиянии раннего провоспалительного стресса на социальное доминирование, но в ряде работ с применением других видов стрессирующих воздействий, таких как хронический непредсказуемый стресс средней силы во взрослом возрасте (Yang et al., 2015), хроническая боль (Tansley et al., 2019) или хронический стресс обездвижения (Park et al., 2018), были показаны изменения как в сторону увеличения, так и уменьшения уровня социального доминирования. На основании этих данных возникает вопрос, окажет ли влияние ранний стресс на социальное доминирование и в какую сторону, увеличения или уменьшения уровня доминантности.

В литературе имеются крайне мало работ, посвященных влиянию раннего провоспалительного стресса на агрессивное поведение, и их результаты неоднозначные. При введении ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни сирийским хомякам, взрослые самки демонстрировали увеличение агрессивности в отношении самцов при размножении (Sylvia, Demas, 2017). У мышей агрессивной линии введение ЛПС в возрасте 5 и 6 дней приводило к уменьшению частоты агрессивных атак и увеличению иммобильности (Granger et al., 1996). Введение ЛПС во время беременности приводило к уменьшению времени боксирования и драк в рамках материнской агрессии (Penteado et al., 2014).

В ряде работ на линиях высоко- и низкоагрессивных животных было показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов коррелировали с высоким уровнем агрессии (Alperina et al., 2019; Idova et al., 2016; Audet et al., 2010). Похожие данные были получены и при исследовании пациентов с депрессией, которые демонстрировали повышенную агрессивность и высокий уровень провоспалительных цитокинов (Takahashi et al., 2018). На основании этих данных мы предположили, что ранний провоспалительный стресс может способствовать росту агрессивности у крыс.

### **1.7. Влияние раннего провоспалительного стресса у животных разного пола на биохимические показатели крови: кортикостерон и ИЛ-1бета.**

Бактериальный липополисахарид (ЛПС) представляет собой важный компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, например, *E. coli*. (Wang, Quinn, 2009; Григорьян., 2020). Молекулу ЛПС можно разделить на три части: липид А, центральные полисахариды и О-антигенные повторы (Wang, Quinn, 2009). Липид А представляет собой гидрофобный компонент ЛПС, который локализуется во внешней листке наружной мембраны, тогда как центральные полисахариды и повторы О-антигена экспонируются на поверхности бактериальных клеток (Raetz et al., 2007; Raetz, Whitfield, 2002). Основная биологическая активность осуществляется липидом А – именно он распознается иммунными клетками, как молекула, ассоциированная с патогеном (Galanos et al., 1985). ЛПС является эндотоксином, и в больших дозах он может вызвать лихорадку, увеличивать частоту сердечных сокращений, приводить к септическому шоку и даже смерти вследствие легочной или почечной недостаточности. Однако в относительно низких концентрациях липид А является активным иммуномодулятором.

Первичными клетками-мишенями для ЛПС являются фагоциты: периферические моноциты, тканевые макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки. ЛПС распознается димером, толл-4 рецептором (TLR4), располагающимся на поверхности иммунных клеток организма-хозяина (Poltorak et al., 1998; Akira et al., 2006). TLR4 зависит от небольшого белка MD-2 для распознавания ЛПС (Triantafilou, Triantafilou, 2002). Другие белки, такие как CD14 и LBP, являются вспомогательными молекулами, ускоряющими связывание ЛПС с MD-2 (Zhang et al., 1999; Carpenter, O'Neill, 2007). После активации ЛПС TLR4 рекрутирует адапторные молекулы, такие как MyD88, Mal, Trif и Tram, в цитоплазме клеток для распространения сигнала (Yamamoto

et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Эти адаптерные молекулы, в свою очередь, активируют другие молекулы внутри клетки, в том числе протеинкиназы IRAK1, IRAK4, TBK1 и IKK $\alpha$ , для усиления сигнала, что влияет на гены, управляющие воспалительной реакцией, и приводит к высвобождению большого числа эндогенных медиаторов, про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов (Alexander, Rietschel, 2001).

В норме при высвобождении небольших концентраций цитокинов и хемокинов происходит общая активация противовирусных, противомикробных и противоопухолевых механизмов (Григорьян, 2020; Григорьян с соавт., 2014). При этом стимулируется продукция молекул, связанных с воспалением, среди которых выделяются эйкозаноиды – простагландины, лейкотриены и глюкокортикоиды (кортикостерон). Однако при патологиях повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов может приводить к серьезным последствиям, вплоть до летального исхода в результате септического заражения организма.

Провоспалительные медиаторы вызывают характерные процессы в организме, такие как повышение температуры тела, снижение двигательной активности, сонливость, снижение аппетита и сокращение реакций ухода за собой. В совокупности это состояние можно охарактеризовать как «болезненное состояние» (sickness behavior) (Григорьян, 2019; Tronson, Collette, 2017). Схожее состояние наблюдается сразу после введения ЛПС (Claupole et al., 2017; Cai et al., 2016), причем самцы показывают более выраженное болезненное поведение и большие изменения температуры тела, чем самки (Cai et al., 2016). В последнее время публикуется все больше данных, демонстрирующих, что нейровоспаление, развивающееся под воздействием стрессов или патогенов на ранних этапах онтогенеза, протекает по-разному у самцов и самок (Григорьян, 2020; Klein, Flanagan, 2016; Tronson, Collette, 2017).

В литературе представлено большое количество работ о влиянии нейровоспаления на реактивность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) оси, что выражается в изменении уровней адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортикостерона, которые являются маркерами стресс-реакции. Развитие и контроль стресс-ответа реализуются посредством ГГН оси (Григорьян с соавт., 2014). Под действием стресса гиппокамп стимулирует в паравентрикулярном ядре гипоталамуса секрецию гормона высвобождения кортикотропина (ГВК) и аргинин-вазопрессина (АВ), которые активируют секрецию АКТГ в гипофизе. АКТГ, в свою очередь, стимулирует в коре надпочечников секрецию глюкокортикоидов (кортизол у человека или кортикостерон у животных), которые взаимодействуют с глюкокортикоидными рецепторами, расположенными во многих структурах и тканях организма, в том числе в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, обеспечивая через отрицательную обратную связь торможение секреции ГВК и АВ (Tasker, Herman, 2011; Holsboer-Trachsler et al., 1991; Keller-Wood, Dallman, 1984).

Глюкокортикоиды взаимодействуют с двумя типами рецепторов: минералкортикоидными (МР) и глюкокортикоидными (ГР) (de Kloet et al., 2009). Оба типа рецепторов представлены в мозге. МР обладают большей аффинностью к глюкокортикоидам (de Kloet et al., 2009), стимулируют активность клеток гиппокампа и влияют на поддержание базового суточного уровня глюкокортикоидов (Berardelli et al., 2013). ГР, в свою очередь, связывают глюкокортикоиды или при их суточных пиках, или при стрессах, вызывая торможение нейронов гиппокампа и реализуя негативную обратную связь (de Kloet et al., 1998). Негативная обратная регуляция крайне быстро подавляет высвобождение ГВК и АКТГ, уменьшая силу стресс-ответа (Keller-Wood, Dallman, 1984). Однако, при ряде расстройств, таких как депрессия, наблюдают глюкокортикоидную резистентность в гиппокампе, когда ГР более не способны в должной мере связываться с глюкокортикоидами и направлять

каскад внутриклеточных молекулярных механизмов на подавление экспрессии ГВК (Carvalho, Pariante, 2008), что, в свою очередь, влечет нарушения обратной тормозной связи (Holsboer-Trachsler et al., 1991).

Острое введение ЛПС взрослым крысам провоцировало увеличение уровней кортикостерона и цитокинов в сыворотке крови через 6 часов после введения, и их уровни возвращались к норме через 24 часа после инъекции (Biesmans et al., 2016). Раннее неонатальное введение на 3 и 5-й дни жизни также провоцировало увеличение уровня кортикостерона, причем наибольший рост наблюдали на 3-й день (первое введение), а на 5-й день значимый прирост кортикостерона наблюдали лишь через 4-е часа после введения (Walker et al., 2004). Введение ЛПС на ранних этапах онтогенеза оказывало влияние на реактивность ГН оси и приводило к длительному увеличению уровня кортикостерона и гормона АКТГ у взрослых животных, а также росту количества глюкокортикоидных рецепторов в гипоталамусе (Nilsson et al., 2002; Walker et al., 2009; Shanks et al., 2000; Walker et al., 2008; Doosti et al., 2013).

В работах, проведенных в лаборатории функциональной биохимии нервной системы под руководством Н.В. Гуляевой, было показано, что после раннего постнатального провоспалительного стресса (ЛПС на 3 и 5 дни) у самцов крыс в возрасте 1 мес наблюдали увеличение концентрации кортикостерона и экспрессии мРНК ИЛ-6 в гиппокампе, но не в неокортексе (Onufriev et al., 2017). Также исследования показали, что реактивность ГН оси после раннего провоспалительного стресса меняется с возрастом: так в молодом возрасте (32 ПНД) уровень кортикостерона был выше по сравнению с контролем, но при этом изменения уровня кортикостерона в ответ на поведенческий стресс практически не происходило (Tishkina et al., 2016). У взрослых (101 ПНД) уровень кортикостерона в крови до поведенческого



стресса не отличался от контроля, но при этом после стресса наблюдалось явное его увеличение.

В работе, в которой исследовали влияние хронического и острого введения ЛПС взрослым крысам Вистар, были обнаружены половые различия: у самцов при хроническом введении ЛПС наблюдали снижение уровня кортикостерона, а у самок снижение происходило при остром введении ЛПС (Ariza Traslaviña et al., 2014). В работе других авторов после раннего провоспалительного стресса, индуцированного инъекцией ЛПС, у взрослых самок уровень кортикостерона был выше, чем у самцов во взрослом возрасте (Girard-Joyal et al., 2015).

Хорошо известно, что иммунный ответ различается у самок и самцов. У самцов была обнаружена более яркая реакция на патогены (Tronson, Collette, 2017) и преобладает клеточный иммунный ответ, а именно активация Т-хэлперов (Т-helper) первого типа («классический»), и повышенная продукция интерферона гамма (IFN- $\gamma$ ) и ИЛ-2. Для самок более характерна активация гуморального иммунитета, высокий уровень продуцирования антител и активация Т-хэлперов второго типа («альтернативный»), которые в основном секретируют ИЛ-4 и ИЛ-5 (Klein et al., 2015; Huber, Pfaeffle., 1994). Также у самцов была обнаружена большая экспрессия толл-4 рецепторов (TLR4), непосредственно участвующих в распознавании ЛПС (Roberts et al., 2012), в то время как у самок - толл-7 (TLR7) (Berghöfer et al., 2006). То есть, отличия между самцами и самками наблюдаются даже в процессах выявления патогенов (Scotland et al., 2011; Tronson, Collette, 2017). Наблюдаются и половые различия в процессе передачи сигнала от толл-4-рецепторов в клетке: у самцов наибольшую роль в передаче играет белок Src, в то время как у самок (проэструс) – MyD88 (Zheng et al., 2006). В процессах активации макрофагов также наблюдаются отличия по полу: у самцов также более выражена активация клеток М1 типа, а у самок - клеток типа М2 (Martinez, Gordon, 2014).

В большинстве работ обнаружены половые различия в продукции цитокинов в ответ на введение ЛПС. В работе с ранним постнатальным введением ЛПС у взрослых самцов, но не у самок, наблюдали увеличение экспрессии в гиппокампе мРНК ИЛ-6 и TNF, которое коррелировало с проявлением депрессивно-подобного поведения у тех же самцов (Kvichansky et al., 2021). В другой работе у самок интраназальное введение ЛПС вызывало большую, чем у самцов, экспрессию ИЛ-6 и TNF- $\alpha$  в гиппокампе и стволе мозга (Tonelli et al., 2008). При нейровоспалении, вызванном ишемическим инсультом, у самок по сравнению с самцами повышалась продукция противовоспалительного цитокина ИЛ-4, а также увеличивалась экспрессия рецепторов к ИЛ-4 и ИЛ-10 на глиальных клетках (Bodhankar et al., 2015). Повышение уровня цитокинов после экспериментального инфаркта у крыс, создаваемого путем пережатия артерии, происходило в префронтальной коре только у самцов, но не самок (Najjar et al., 2018).

Половые различия наблюдаются в морфологии и работе глиальных клеток (астроцитов и микроглии) после нейровоспаления. Так, введение ЛПС на 14 день от рождения приводило к увеличению числа активных микроглиальных клеток в дорсальном и вентральном гиппокампе, причем изменения были более выражены у самок, чем у самцов (Berkiks et al., 2019). Число астроцитов увеличивалось у самок, но уменьшалось у самцов. У самцов микроглия является источником цитокинов при нейровоспалении, их экспрессия увеличивается после стресса, у самок не происходит увеличения выделения цитокинов из микроглии (Fonken et al., 2018).

Во многих работах большую роль в половых различиях в активности иммунной системы отводят стероидным гормонам: эстрадиолу, прогестерону и тестостерону (Tronson, Collette, 2017; Klein et al., 2015). Известно, что эстрогены оказывают большое влияние на разные типы иммунных клеток и ускоряют протекание воспалительного процесса в сторону его деактивации,

большая роль при этом отводится противовоспалительному ИЛ-4 (Villa et al., 2015). Эстрогены также могут затормозить выработку провоспалительных цитокинов (Najjar et al., 2018).

Помимо этого, в литературе высказывается гипотеза (Fonken et al., 2018), что первичные стрессы (priming) разной природы могут приводить к сенситизации нейровоспалительной системы, т.е. увеличению амплитуды провоспалительного ответа на последующие стрессы. В исследовании, где крысы получали электрокожное раздражение хвоста с последующей инъекцией ЛПС через 24 ч, было показано, самцы и самки демонстрировали более значимые изменения в потреблении сахарозы, в уровне концентраций провоспалительных цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-6 и TNF- $\alpha$ ) в гиппокампе и в снижении экспрессии противовоспалительных генов (CD200R и CX3CR1). Однако, авторы также подчеркивают наличие половых различий в уровне активации микроглии и реактивности ГНН оси: самки, в отличие от самцов, не демонстрируют рост активности микроглии в мозге, а, наоборот, у них наблюдается снижение провоспалительной активности микроглии, а также более длительный кортикостероновый ответ. В более поздних работах других авторов (Григорьян, 2020) высказывается предположение, что помимо «сенситизации», можно наблюдать и процесс «десенситизации», т.е. снижение иммунного ответа на последующие стимулы. Причем предполагается, что для самцов в большей степени характерна сенситизация, а для самок десенситизация процессов нейровоспаления.

## **1.8. Влияние разных условий содержания на поведение крыс в аверсивных ситуациях.**

### **1.8.1. Влияние социальной изоляции на тревожно-депрессивное и оборонительное поведение крыс.**

Среди многих хронических стрессирующих воздействий, применяемых в экспериментах на грызунах, широко используется социальная изоляция (СИ). Как следует из названия, в условиях СИ крысы не имеют возможности контактировать с сородичами, что для социальных животных является сильнейшим стрессом, который находит отражение в изменениях активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и может повлечь за собой развитие психопатологий.

В большинстве работ животные, подвергшиеся СИ, демонстрировали более высокий уровень тревожности (Bledsoe et al. 2011; Zhao et al., 2009; Lukkes et al. 2012, 2009; Zhang et al. 2012; Rau et al., 2015; Brenes et al., 2020; Weiss et al., 2004; Хоничева с соавт., 2002). Увеличение тревожности в условиях СИ было ассоциировано с увеличением возбудимости пирамидных нейронов базолатерального ядра миндалина, что связано с нарушениями функционирования кальциевых каналов (Rau et al., 2015). Однако одновременно с этим в литературе имеются данные как о неизменности уровня тревожности после СИ (Alshammari et al., 2020; Pietropaolo et al. 2008), так и об ее уменьшении (Võikar et al. 2005; Thorsell et al., 2006; Kuleshkaya et al. 2011; Weintraub et al. 2010). Анализ столь противоречивых данных позволяет сделать вывод о том, что на результаты СИ влияет ряд параметров, таких как возраст начала изоляции и ее длительность. Есть предположение, что СИ в раннем подростковом возрасте является анксиогенной, а в позднем – анксиолитической (Thorsell et al., 2006). Было установлено, что требуется не меньше трех недель СИ для выявления поведенческого эффекта (Gorlova et al., 2018), в то время как краткосрочная изоляция в течение 10 дней не имела поведенческих эффектов (Alshammari et al., 2020).

В большом количестве работ показано, что СИ способствует развитию депрессивно-подобного поведения, что может проявляться в уменьшении предпочтения раствора сахарозы и увеличении суммарного времени зависания

в тесте вынужденного плавания (Guarnieri et al., 2020; Wang et al., 2017; Mileva, Bielajew, 2015; Takatsu-Coleman et al., 2013). В ряде работ, однако, различий в уровне потребления сахарозы и времени зависания под влиянием СИ обнаружено не было (Alshammari et al., 2020; Gorlova et al., 2018). Показано, что, у крыс в условиях СИ увеличивается потребление раствора сахарозы без изменения процента предпочтения сахарозы, что может рассматриваться как компенсация за нарушение чувствительности к подкреплению (Hong et al., 2012; Yildirim et al., 2012; Brenes et al., 2020). В других работах после СИ уменьшалось общее время зависания в тесте вынужденного плавания (Huang et al., 2017; Vöikar et al., 2005; Hong et al., 2012), что авторы трактуют как проявление антидепрессивного эффекта.

В ряде исследований было показано, что при содержании в условиях СИ страдает именно долговременная память, а не кратковременная. Так, например, после СИ нарушалась долговременная память в тесте после выработки условнорефлекторного страха (Ouchi et al., 2013), в то время как кратковременная рабочая память не страдала в Y-образном лабиринте и в тесте распознавания новых объектов. В другой работе крысы, подвергавшиеся социальной изоляции и смене партнера по клетке, демонстрировали дефицит долговременной памяти в УОР, но не кратковременной при обучении в бассейне Морриса и в тесте на пространственное расположение объектов (Green, McCormick 2013). Было показано, что крысы после СИ плохо вырабатывали рефлекс пассивного избегания, при этом самки оказались более чувствительны к измененным условиям содержания в отличие от самцов (Krupina et al., 2020). В ряде работ также было продемонстрировано, что содержание в условиях СИ приводило к дефициту угашения УОР у крыс и мышей (Hori et al., 2014; Skelly et al., 2015; Pietropaolo et al., 2006). В ряде исследований было показано, что разные условия содержания не влияли на болевую чувствительность мышей в тесте на горячей пластинке (Kuleshkaya et

al., 2011; Võikar et al., 2005) и у крыс при прищемлении хвоста (Hellemans et al., 2004).

### **1.8.2. Влияние содержания в обогащенной среде на тревожно-депрессивное и оборонительное поведение.**

Содержание в обогащенной среде (ОС) впервые было предложено Дональдом Хэббом в 40-х г.г. прошлого века для изучения силы влияния внешних факторов на мозг и поведение (Kempermann, 2019). На данный момент данному методическому приему насчитывается более 75-ти лет, и его основные принципы остаются практически без изменений в течение десятилетий. В условиях ОС животных содержат в больших группах и в клетках большой площади. Часто дополнительно домашнюю клетку обогащают игрушками, укрытиями, местами для гнездования, трубами и иными элементами для лазанья, «беличьим колесом» для физических нагрузок. При этом четких стандартов к оборудованию ОС до сих пор не существует. При планировании дизайна эксперимента исследователи могут использовать либо постоянное проживание животных в условиях ОС, либо содержание животных в условиях ОС в ограниченные периоды времени. Однако, несмотря на кажущуюся нерегламентированность методики, она пользуется большой популярностью в основном за счет того, что содержание в условиях ОС оказывает существенное влияние на поведение животных и работу их мозга.

Показано, что содержание в условиях ОС способствует увеличению размера и веса как самого мозга, так и его отдельных структур (Diamond et al., 1966; Rosenzweig et al., 1962). ОС оказывает заметное влияние на разных уровнях: от молекулярного и клеточного до поведенческого. ОС оказывает положительные эффекты на клеточную пролиферацию и нейрогенез (Vega-Rivera et al., 2016; Kempermann, Gage, 1999). Эти эффекты могут быть частично объяснены тем фактом, что ОС также влияет на экспрессию генов во

многих клетках и тканях (Rampon et al., 2000; Rattazzi et al., 2016; Zhang et al., 2018), изменяет продукцию белка (Zhang et al., 2016) и модулирует биохимические процессы, например, выделение нейромедиаторов (серотонина) (Ragu Varman, Rajan, 2015), нейротрофических факторов (Gualtieri et al., 2017), гормонов (Sztainberg et al., 2010) и факторов иммунной системы (Singhal et al., 2014).

Большое количество работ, представленных в литературе, демонстрируют, что ОС вызывает улучшение когнитивных функций и уменьшение тревожности (Mora-Callegos et al., 2019; Grippo et al., 2014; Leger et al., 2015; Hendershott et al., 2016; Pritchard et al., 2013; Hellemans et al., 2004). В опытах на мышах было показано, что содержание в условиях ОС с трехнедельного возраста является оптимальным временем для проявления улучшений когнитивных функций и антитревожных эффектов (Leger et al., 2015). Помещение крыс в условия ОС, предпринятое после СИ, способно ослабить негативные последствия от изоляции (Hellemans et al., 2004; Brenes et al., 2020). Однако в ряде работ ОС не оказывало анксиолитических влияний (Mileva, Bielajew 2015; Yildirim et al., 2012), а в других, даже наоборот, приводило к увеличению тревожности. Например, ОС в течение 2-х месяцев у самок-мышей приводило к увеличению тревожности (Pietropaolo et al., 2006). Что касается влияний ОС на тревожное поведение после раннего провоспалительного стресса, то подобных работ в литературе нам не известно.

Во многих работах животные, содержавшиеся в условиях ОС, меньше проявляли депрессивно-подобное поведение, чем животные, содержавшиеся в стандартных условиях или в изоляции, что могло проявляться как в тесте предпочтения сахарозы, так и в тесте вынужденного плавания (Mileva, Bielajew, 2015; Brenes et al., 2020). Содержание в ОС до или после СИ было способно предотвратить либо, соответственно, ослабить анксиогенные и депрессивные эффекты от изоляции (Grippo et al., 2014). Таким образом,

содержание в условиях ОС может способствовать снижению тревожности и ослаблению проявления депрессивно-подобного поведения как в норме, так и у животных, испытавших стресс СИ.

Литературные данные относительно влияния обогащенной среды на проявление условнорефлекторного страха достаточно противоречивы. Обогащение среды усиливало замирание на контекст в парадигме павловского условнорефлекторного страха (Mora-Gallegos et al., 2019). Обогащение среды у самок мышей нарушало угашение условнорефлекторного страха на звук (Pietropaolo et al., 2006). Имеются данные, что обогащение среды длительностью от трех недель улучшало память как о значимых стимулах при выработке рефлекса пассивного избегания, так и о нейтральных объектах в тесте распознавания объектов (Leger et al., 2015). Обогащение среды способствовало быстрой выработке рефлекса активного избегания за счет увеличения числа реакций избегания и уменьшения реакций избавления (Weiss et al., 2004).

Основываясь на данных литературы, можно заключить, что такое «негативное» стрессирующее воздействие, как социальная изоляция может приводить к увеличению тревожного и депрессивно-подобного поведения взрослых животных. Кроме того, социальная изоляция приводит к нарушению когнитивных способностей и дефициту памяти у животных, а также в ряде исследований у изолянтов возникали трудности при угашении условнорефлекторного страха и условного рефлекса пассивного избегания. С другой стороны, обогащение среды обитания оказывает «положительное» действие, уменьшает тревожное и депрессивно-подобное поведение, способствует улучшению когнитивных функций и смягчает последствия воздействия стресса социальной изоляции.

Возникает вопрос о том, может ли пережитый в раннем онтогенезе провоспалительный стресс повлиять на реакции крыс на дополнительные



воздействия как «негативные», так и «благоприятные». Будут ли крысы ЛПС группы, согласно нашим предположениям, наиболее уязвимы к негативным изменениям условий содержания? Как скажутся положительные влияния на животных после раннего провоспалительного стресса? Рассматриваемая проблема имеет непосредственное отношение к пониманию механизмов влияния ранних стрессов на возможное возникновение различных психопатологий у человека во взрослом возрасте.

## **ГЛАВА 2. Материалы и методы**

---

### **2.1. Объект исследования.**

В опытах участвовало 244 крысы линии Вистар в возрасте от 25 дней до 6 месяцев (128 самцов и 116 самок). Крысята были выведены в виварии ИВНД и НФ РАН от родителей, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. животных содержали в виварии в стандартных условиях при обычном 12-часовом световом режиме (день/ночь: 8:00-20:00/20:00-8:00) в свободном доступе к воде и стандартному корму (ПК-120, ГОСТ Р 50258-92, ООО МЭСТ, Россия). В клетках размером 52x31x20 см содержали группы по 4-6 крыс одного пола и, как правило, из разных пометов. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU) и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

### **2.2. Введение липополисахарида.**

На 3-й и 5-й дни жизни у половины крысят из помета вызывали провоспалительный стресс путем введения бактериального липополисахарида (ЛПС) в дозе 50  $\mu\text{г}/\text{кг}$  в объеме 10  $\mu\text{л}/\text{г}$  (группа ЛПС). Во время этой процедуры мать отсаживали из клетки на 15-20 мин, крысят взвешивали на электронных весах с точностью до 0,01 г и делали подкожную инъекцию ЛПС в холку с помощью инсулинового шприца. После инъекции крысят дополнительно метили с помощью подкожного введения у основания хвоста 10  $\mu\text{л}$  черной краски, которая используется для татуировок (Dynamic Tattoo Ink, triple black, USA). Другой половине крысят из помета в этом же возрасте подкожно вводили физиологический раствор в объеме 10  $\mu\text{л}/\text{г}$  (группа ФИЗ, контроль 1) или не осуществляли инъекцию, оставляя их интактными (группа ИНТ, контроль 2). При разделении помета старались уравнивать число самцов и самок в группах. Разделение пометов делали с целью ослабить влияние генетического фактора и особенностей матери на результаты экспериментов.

В возрасте 25 дней крысят отлучали от матери, и формировали клетки таким образом, что в одной клетке проживали 4-6 крыс одного пола из 2-3 пометов одной группы (либо ЛПС, либо ФИЗ, либо ИНТ).

### **2.3. Различные условия содержания.**

В отдельных сериях использовались разные условия содержания, отличные от стандартных.

**2.3.1. Длительная социальная изоляция (СИ)** представляла собой содержание крыс поодиночке в клетках размером 30 x 30 x 17,5 см, каждая из которых была оборудована индивидуальной вентиляцией, кормушкой и поилкой. Животные, находящиеся в изоляции, не могли контактировать с другими крысами ни визуально, ни тактильно, ни посредством запахов. Согласно дизайну эксперимента животных содержали в условиях СИ в возрасте от 45 ПНД до 3.5 мес.

**2.3.2. Условия долговременного обогащения среды (ОС)** включали в себя постоянное содержание группами по 9-12 крыс в многоярусных клетках размером 60 x 38 x 90 см, каждая из которых была оборудована «беличьим колесом», лесенками, материалом для зарывания (опилки, пенопластовый наполнитель, бумага и др.) и гамаками. Параллельно с содержанием в обогащенной среде крыс также приручали к рукам экспериментатора (хендлинг). Согласно дизайну эксперимента животных содержали в условия ОС в возрасте от 30 ПНД до 4 мес (окончание проведения экспериментов).

### **2.4. Тестирование на тревожность и депрессивно-подобное поведение.**

**2.4.1. Тестирование уровня тревожности** у крыс проводили в «открытом поле» (ОП) и в «приподнятом крестообразном лабиринте» (ПКЛ). Перед первым тестированием для снижения стрессирующей нагрузки на животных проводили 10-15 минутное приручение (хендлинг) в течение 3-4 дней.

**Открытое поле** представляло собой круглую арену диаметром 100 см и

со стенками высотой 30 см. Освещенность в ОП достигала 130-190 лк. В компьютерной программе условно вся арена с помощью окружностей, центр которых совпадал с центром в ОП, была поделена на центральную часть ОП ( $d=30$  см), среднюю часть (шириной 16.5 см) и периферию (шириной 17 см). Время наблюдения в тесте 5 мин. Анализировали показатели, отражающие тревожность крыс (время нахождения на периферии, число и длительность выходов в центр), двигательную активность крыс (пройденную дистанцию, скорость движения, время движения), исследовательское поведение (стойки), поведение по оценке риска (вытягивания (stretch-attend postures), элементы «замещающей активности» (число эпизодов и общую длительность груминга), а также ряд показателей, отражающих вегетативные реакции (число дефекаций и уринаций).

**Приподнятый крестообразный лабиринт** состоял из 4-х рукавов (двух открытых и двух закрытых шириной 10 см и длиной 50 см) и центральной площадки (10 x 10 см). Закрытые рукава имели боковые стенки, высота которых составляла 40 см. Лабиринт располагался на высоте 50 см над уровнем пола. Освещенность открытых рукавов достигала 130-190 лк, закрытых – 90-130 лк. В начале опыта крысу помещали на центральную площадку, голова была направлена в сторону открытого рукава. Время наблюдения в тесте 5 мин. Анализировали показатели, отражающие тревожность крыс (число и длительность выходов в открытые рукава; число и длительность выходов в закрытые рукава), двигательную активность крыс (пройденную дистанцию, скорость движения, время движения, число переходов между рукавами), исследовательское поведение (стойки, выглядывания в открытые рукава), поведение по оценке риска (свешивания и вытягивания (stretch-attend postures)) элементы «замещающей активности» (число эпизодов и длительность груминга), а также ряд показателей, отражающих вегетативные реакции (число дефекаций и уринаций). При дальнейшей обработке для оценки тревожности в ПКЛ подсчитывали процент

времени нахождения в открытых рукавах от общего времени нахождения в открытых и закрытых рукавах, а также процент заходов в открытые рукава от общего числа заходов в открытые и закрытые рукава.

Для фиксирования траектории движения крыс и элементов поведения использовали программу Etho Vision, а также видеорегистрацию. Всегда вначале тестировали крысу в ОП, а через 2-3 дня в ПКЛ. Перед помещением в камеру животного другого пола кроме обычной влажной и сухой уборки лабиринт протирали 10% раствором этилового спирта. Для переноски самцов и самок из вивария в экспериментальную комнату и для ожидания своей очереди использовали разные клетки.

**2.4.2. Тест на предпочтение сахарозы (ТПС).** Для оценки депрессивно-подобного поведения проводили тест на ангедонию в течение 1-2 суток. Крыс пересаживали в новую клетку, где размещались 2 бутылки: одна с 1% раствором сахарозы, другая с водой. Через 12 часов бутылки взвешивали и меняли местами. Определяли объем выпитого раствора сахарозы и воды за сутки. Дополнительно рассчитывали процент выпитой сахарозы от общего объема потребленной жидкости для каждого животного.

**2.4.3. Тест вынужденного плавания (ТВП)** проводили в цилиндрах из оргстекла диаметром 20 см и высотой 50 см, которые заполняли водой температурой 25-26°C до уровня 30 см. В первой серии крыс тестировали два дня: первый день - обучение, когда крысы плавали в течение 15 мин, и второй день - сам тест на 5 мин. В последующих сериях использовали упрощенную версию теста без обучения. При зависании (неподвижности) в ходе плавания крысы осуществляли лишь слабые движения лапами и хвостом для коррекции положения тела около поверхности воды. Во время опыта проводили видеорегистрацию с помощью вебкамеры Logitech C270 HD Webcam. При обработке данных подсчитывали время зависания крыс поминутно и суммарно за весь опыт, число эпизодов зависания, среднюю длительность

таких эпизодов за опыт, число отряхиваний и ныряний.

## **2.5. Выработка и угашение условных оборонительных рефлексов.**

**2.5.1. Определение порогов болевых реакций.** Опыты проводили в камере Startle and Fear Combined System производства PanLab Harvard apparatus, Spain, 2000. Внутренняя камера размером 24 x 24 x 24 см, куда помещали животное, располагалась на 4-х датчиках, фиксирующих движения крысы. Пол камеры представлял собой решетку, на которую подавался ток нарастающей силы (0, 25, 50, 100, 150 и 200  $\mu$ A) с межстимульным интервалом 90-120 с, длительностью 0,3 с. В опытах участвовали крысы в возрасте 3-х месяцев. Реакцию крысы на ток определяли визуально, а также по записи механограммы, которую анализировали в интервалах 5 с до, во время и 50 с после стимула. Определяли порог вздрагивания, прыжков, побежки и вокализации в слышимом для человека диапазоне частот. После опыта с определением порогов в течение двух дней проводили угашение страха на обстановку камеры, для чего крыс помещали в камеру на 10 мин. Во всех последующих экспериментах в данной камере значительно меняли контекст: опилками покрывали пол, на стены прикрепляли панели с наклеенными кусочками разноцветной бумаги. Перед помещением в камеру животного другого пола кроме обычной влажной и сухой уборки камеру протирали 10% раствором этилового спирта. Для переноски самцов и самок из вивария в экспериментальную комнату использовали разные клетки.

**2.5.2. Выработка, тестирование и угашение классического условного оборонительного рефлекса (*fear conditioning, UOP*).** Для выработки классического павловского условного оборонительного рефлекса использовали камеру Startle and Fear Combined System производства PanLab Harvard apparatus (Spain, 2000). Эксперименты начинали у крыс в возрасте 3.5 мес. При обучении после 120 с периода обследования камеры животным давали 3 сочетания звука (30 с, 80 дБ, 2000 Гц) и электрокожного болевого

раздражения (2 с, 0.8 мА, задержка 28 с от начала действия звука) с 40-50 с межсигнальными интервалами, после чего следовал период последствий в 40 с. Затем через 24 часа после обучения проводили тестирование условнорефлекторного страха (Тест 1). При тестировании животных помещали в тот же контекст на 120 с, после чего предъявляли звук в течение 120 с (80 дБ, 2000 Гц), далее следовал период последствий в 120 с. Далее в двух опытах проводили угашение условно-рефлекторного страха, при этом давали по 10 изолированных звуковых стимулов (30 с, 80 дБ, 2000 Гц) без электрокожных раздражений с 20-секундными межсигнальными интервалами. После процедуры угашения тестировали сохранность рефлекса (Тест 2).

Во всех опытах поведение крыс анализировали в интервалах времени до (реакции на контекст), во время (на контекст и сигнальный раздражитель) и после действия звука (последствие). Замирание - периоды неподвижности длительностью не менее 2 с, когда можно было наблюдать только дыхательные движения животного. Замирание определяли с помощью амплитудного и временного порогов. Амплитудный порог зависел от веса крысы, коэффициента усиления, и выставлялся таким образом, чтобы отсечь интервалы с активным движением животного. Обработка проводилась с помощью стандартной программы, прилегающей к установке фирмы Panlab. Программа позволяла детектировать эпизоды замирания, определять их длительность и рассчитывать процент времени замирания от времени регистрации. Кроме того, для оценки уровня эмоционального напряжения у крыс подсчитывали число дефекаций и уринаций.

**2.5.3. Выработка условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)** проходила в темно-светлой камере (аппаратно-программный комплекс Шелтер, ООО «Нейроботикс», 2017) по стандартной методике. Детекция положения крысы проводилась с использованием инфракрасного излучения, а также с помощью видеорегистрации. Через 30 с после помещения крысы в

светлый отсек (24 x 24 x 35 см) открывалась дверца между светлым и темным отсеком (24 x 24 x 35 см) и в течение 180 с у крысы была возможность переходить из одного отсека камеры в другой. Сначала проводили два контрольных опыта, в которых измеряли латентный период перехода из светлого отсека камеры в темный и время нахождения в темном отсеке. В третьем опыте вырабатывали УРПИ путем подачи тока на пол темного отсека (3с, 0.8 мА) после захода в него крысы и закрытия дверцы. В 7 последующих опытах, проводившихся в течение 7 дней, проверяли сохранность и угашение выработанного навыка. Определяли латентный период захода в темный отсек (когда животное находится в темном отсеке всеми четырьмя лапами) и время пребывания в нем, число заглядываний в темный отсек, количество стоек, актов груминга, дефекаций и уринаций. Выделяли заглядывания с упором на 1-3 лапы на пол темного отсека и заглядывания с засовыванием только головы в темный отсек. Кроме того, проводили оценку качества УРПИ в баллах: 5 баллов – крыса не заходит и не заглядывает в темный отсек; 4 балла – крыса не заходит, но заглядывает в темный отсек, засовывая только голову; 3 балла – крыса не заходит, но заглядывает, ставя 1-3 лапы на пол темного отсека; 2 балла – крыса заходит в темный отсек с большей латентностью, чем в контрольных опытах; 1 балл – крыса заходит в темный отсек с такой же латентностью, как в контрольных опытах.

**2.5.4. Выработка условного рефлекса активного избегания (УРАИ)** проходила в камере, разделенной на два равноценных отсека (24 x 24 x 35 см) с проходом (6 x 8 см) между ними (аппаратно-программный комплекс Шелтер, ООО «Нейроботикс», 2017). Контекст камеры меняли по сравнению с опытами с УРПИ путем размещения панелей с черно-белым геометрическим рисунком на стенах камеры. После 2 мин исследования крысой камеры с посещением обоих отсеков начинали выработку УРАИ. В качестве условного стимула использовали комплексный световой (100 лкс) и звуковой (60 дБ) раздражители, в качестве безусловного стимула – ток на решетку пола (0.4



мА), задержка подачи тока от начала условного стимула составляла 10 с, максимальная длительность подачи тока - 30 с. При переходе крысы в другой отсек стимулы автоматически выключались. Межсигнальные интервалы варьировали от 20 до 60 с. В каждом опыте давалось по 12 сочетаний условных и безусловных стимулов, выработка рефлекса проходила в течение 7 дней. Выделяли два вида реакций крысы – реакция избавления (переход в другой отсек после начала действия тока) и реакция избегания (переход до начала действия тока). В каждом опыте подсчитывали частоту и латентные периоды реакций избегания и избавления, число межсигнальных переходов между отсеками, количество дефекаций и уринаций. Частота избегания (избавления) = число реакций избегания (избавления) за опыт/ общее число сочетаний за опыт (12).

## **2.6. Тестирование социального поведения.**

**2.6.1. Тестирование социального взаимодействия (ТСВ)** проводили на арене квадратной формы (100 x 100 x 30см). Внутри арены рядом с одной из стенок, в середине располагался пластиковый отсек (21 x 21 x 14см) с прозрачными перфорированными стенками, в который помещали крысу-гостя. Тест проводился в течение двух дней: в первый день внутренний отсек был пустой, во второй день в отсек заранее помещали интактную незнакомую крысу-гостя одного пола и возраста с исследуемой крысой. Экспериментальное животное сажали в центр арены спиной к отсеку с гостем. Время наблюдения в каждом тесте 5 мин. Для фиксирования траектории движения крыс и элементов поведения использовали программу Etho Vision, а также программу для видеофиксации Mediocruser. Анализировали время нахождения крысы в зоне взаимодействия (коридор шириной 13 см около внутреннего отсека), а также число и длительность взаимодействий (нос крысы вблизи стенки внутреннего отсека). Рассчитывали коэффициент времени взаимодействия  $K_B = T_{B2}/T_{B1} * 100\%$ , где  $T_{B2}$  - время взаимодействия во второй опыт,  $T_{B1}$  – в первый опыт. Такой же коэффициент рассчитывали по

времени пребывания в зоне взаимодействия  $K_{ЗВ} = T_{ЗВ2} / T_{ЗВ1} * 100\%$ , где  $T_{ЗВ2}$  – время пребывания в зоне взаимодействия во второй опыт,  $T_{ЗВ1}$  – в первый опыт.

**2.6.2. Тестирование на социальное доминирование (*dominance tube test, ТСД*)** проводили с помощью трубы из прозрачного оргстекла длиной 150 см и внутренним диаметром 6 см. Эксперимент проводили в течение двух дней: в первый день животным давали исследовать новую обстановку и пройти по трубе в обоих направлениях, во второй проводили само тестирование. За день до начала эксперимента крыс взвешивали и распределяли на пары так, чтобы в каждой из них присутствовали крысы из ФИЗ и ЛПС группы, и они весили примерно одинаково (погрешность могла составлять  $\pm 10$  г). Во время тестирования крыс запускали одновременно с разных концов трубы, чтобы животные двигались друг другу навстречу. «Победителем» считали то животное, которое смогло оттеснить оппонента назад и выйти с противоположного конца трубы. У каждой пары было две попытки, при этом каждую крысу запускали с разных концов трубы. Если в течение 2 мин не выявлялся «победитель», считали, что ничья. Поведение регистрировали на цифровую видеокамеру Logitech C270 HD Webcam. Анализировали число и латентность побед у крыс в группе ФИЗ и ЛПС.

**2.6.3. Тестирование сексуального предпочтения (ТСП)** проводили только у самцов в камере (120 x 80 x 35 см), состоящей из трех равных отсеков (40 x 80 x 35 см), соединенных между собой дверками, внутренние перегородки были сделаны из прозрачного оргстекла. В каждом боковом отсеке размещались цилиндры (диаметр 20 см) с боковым стенками, сделанными из сетки с ячейками 10 x 10 мм, в одном цилиндре помещался незнакомый интактный самец (отсек с самцом), в другом самка на стадии диэструс (отсек с самкой). Стадию диэструса определяли по присутствию лейкоцитов во влагалищном мазке, взятому в день опыта (Becker et al., 2005).

В качестве «гостя» использовали самок на стадии диэструс, чтобы избежать влияния стадий эстрального цикла на результаты эксперимента. Исследуемая крыса в начале опыта сажалась в средний стартовый отсек, носом в сторону сплошной стены. Время тестирования составляло 10 мин. Регистрация поведения животных проводилась с помощью программы Etho Vision и Mediocruser. При обработке подсчитывали число заходов и время пребывания в отсеке с самцом и с самкой, число и длительность взаимодействия с самцом и с самкой (нос крысы находился в непосредственной близости от сетки цилиндра с самцом или самкой), пройденную дистанцию и скорость в разных отсеках, а также рассчитывали коэффициенты предпочтения  $K_{\text{предп.}} = (\Pi \text{ в отсеке с самкой} - \Pi \text{ в отсеке с самцом}) / (\Pi \text{ в отсеке с самкой} + \Pi \text{ в отсеке с самцом})$ , где  $\Pi$  – показатель поведения. Коэффициенты предпочтения рассчитывались по разным показателям поведения (по числу заходов, по времени пребывания, времени взаимодействия в отсеках с самцом и с самкой). Положительные  $K_{\text{предп.}}$  свидетельствовали о предпочтении самки, отрицательные – самца. Из анализа исключили двух крыс, которые после ухода из стартового отсека все время тестирования находились только в одном отсеке.

**2.6.4. Внутривидовое агрессивное поведение** оценивали в *тесте «резидент-интродер» (Р-И)*. Перед проведением теста уровень агрессии повышали путем содержания крыс в социальной изоляции в течение недели в индивидуальных клетках размером 35 x 55 x 20 см. Тест «резидент-интродер» проводили в затемненной комнате (20-25 лкс). В домашнюю клетку к резиденту подсаживали незнакомую более молодую и меньшую по весу крысу-интродера того же пола, и поведение обеих крыс регистрировали на видеокамеру в течение 10 минут. При обработке анализировали такие показатели, как латентность и число нападений резидента на интродера с последующими драками, число и длительность стоек (боксирование) напротив оппонента, число и длительность преследований интродера с аногенитальным

обнюхиванием, случаи агрессивного груминга со стороны резидента, число «сексуальных атак» со стороны резидента. Сексуальные атаки у самцов выражались во взбирании резидента на интродера-самца сзади и с последующей эякуляцией, за которой следовал груминг гениталий. Сексуальные атаки у самок выражались во взбирании на интродера-самку.

## **2.7. Иммуноферментный анализ крови.**

Забор крови проводили у крыс перед началом тестирования поведения и через 30-40 мин после теста вынужденного плавания. Для этого крыс наркотизировали с помощью изофлуранового ингаляционного наркоза (Аэрран), на кончике хвоста делали косые надрезы скальпелем и собирали периферическую кровь в объеме 0.7-1 мл в микропробирки с ранее добавленным гепарином (10  $\mu$ л). Затем кровь центрифугировали 15 мин при 1500 g для получения сыворотки и отбирали аликвоты объемом 50 и 150  $\mu$ л. Аликвоты сыворотки хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения иммуноферментного анализа.

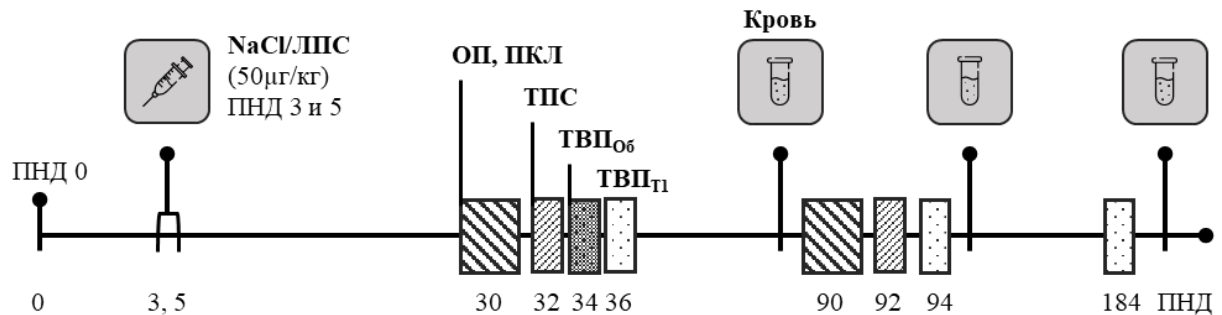
Для определения уровня кортикостерона в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (DRG, Германия), с помощью которых детектировали как свободный, так и связанный с транспортными белками кортикостерон методом конкурентного иммуноферментного анализа. Содержание провоспалительного ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови определяли с помощью наборов производства R&D Systems (США) согласно инструкции производителя. При дальнейшей статистической обработке из выборки исключали экстремумы. Для оценки изменения уровня маркеров крови после стрессирующего воздействия рассчитывали процент изменения:  $\% \text{ изменения} = (K_{\text{после}} - K_{\text{до}}) / K_{\text{до}} * 100\%$ , K – концентрация кортикостерона/ИЛ-1 $\beta$ ).

## 2.8. Статистическая обработка результатов.

Для вторичной обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение значений исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова-Смирнова (Basic Statistics, раздел Descriptive Statistics). Если анализируемый параметр удовлетворял данному критерию, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел *factorial ANOVA*. При *post-hoc* анализе применяли критерий *Newman-Keuls test*. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ , отмечали наличие тенденции при  $0.05 < p < 0.1$ . При сравнении двух выборочных долей вариант использовали 2 x 2 Table (Nonparametric Statistics), применяли критерий  $\chi^2$ . Во всех экспериментах анализировали влияние факторов ПОЛ (самцы, самки), ГРУППА (ФИЗ, ЛПС, ИНТ), в некоторых случаях также анализировали влияние факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ (стандартные, СИ, ОС), ВОЗДЕЙСТВИЕ (до и после ТВП), ВРЕМЯ (в ТВП - 1-5 минуты, при выработке и тестировании УОР - до, во время, после, межсигнальный интервал), ВОЗРАСТ (подростковый, взрослый), НОМЕР ТЕСТА (Тест 1, Тест 2), НОМЕР ОПЫТА при выработке УРПИ (от -2 до 7), ВИД ОТСЕКА (тест сексуального предпочтения), ПОБЕДА (в тесте социального доминирования). При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров использовали *Kruskal-Wallis test*, с последующим сравнением групп с помощью *Multiple Comparisons (Nonparametric Statistics)*. Для сравнения двух групп крыс применяли *Mann-Whitney U Test*. Данные на рисунках представлены в виде средних значений  $\pm$  ошибки средних.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ: Влияние раннего провоспалительного стресса на тревожно-депрессивное поведение крыс разного пола.

### 3.1. Схема эксперимента.



**Рис. 1.** Схема проведения эксперимента. По горизонтали: постнатальные дни (ПНД), 0 ПНД – день родов. На 3 и 5 ПНД – инъекция ЛПС или физиологического раствора (контроль). Кровь – процедура сбора хвостовой/декапитационной крови. ОП – открытое поле. ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт. ТПС – тест на предпочтение сахарозы. ТВП – тест вынужденного плавания: ТВП<sub>Об</sub> – 15 мин обучение, ТВП<sub>Т1</sub> – 5 мин тест.

На рис. 1 представлена схема проведения эксперимента. Поведенческие эксперименты проводили в возрасте 1 мес и 3 мес, т.е. в подростковом и во взрослом возрасте, соответственно. Вначале крыс тестировали в ОП, затем через день в ПКЛ, потом проводили ТПС в течении 1-2 дней, после чего в 1 мес следовал ТВП, проводимый в течении 2 дней (в первый день - 15 мин, на следующий день - 5 мин). В возрасте 3 мес ТВП проводили в один день в течении 5 мин. Кровь для биохимического анализа уровня кортикостерона и ИЛ-1бета брали в возрасте 3 мес из хвостовой вены, за сутки до начала тестирования, и через 30-40 мин после ТВП, и в 6 мес после ТВП брали декапитационную кровь.

### 3.2. Влияние раннего провоспалительного стресса на вес крыс.

Вес крыс в группе ЛПС не отличался от групп ИНТ или ФИЗ в возрасте 3 дня (до первого введения ЛПС), 5 дней (перед вторым введением), в 1 мес и 3 мес перед началом тестирования на тревожность (табл. 1). Введение ЛПС

или физиологического раствора вызывало небольшое замедление прироста веса. Прибавка веса у крысят группы ЛПС в 5 дней по сравнению с 3-м днем составляла 2.6-2.8 г, группы ФИЗ – 2.4-2.9 г, в то время как в группе ИНТ 4.1-4.5 г. Однако из-за большого разброса веса крысят в 3 дня влияние болевого воздействия и воспаления не сказалось на средних значения веса в группах. В возрасте 3 мес проявились половые различия в весе животных, самцы весили значительно больше самок.

**Таблица 1.** Масса крыс разных групп в возрасте 3 дня (до инъекции), 5 дней (перед повторной инъекцией), в 1 и 3 мес.

Возраст	Группа крыс	Масса самцов, г	Масса самок, г
3 дня	ИНТ	7.3±0.6	6.9±0.4
	ФИЗ	7.8±0.3	7.8±0.3
	ЛПС	7.8±0.3	7.5±0.3
5 дней	ИНТ	11.8±0.8	11.0±0.7
	ФИЗ	10.7±0.3	10.2±0.3
	ЛПС	10.4±0.3	10.3±0.4
1 месяц	ИНТ	79.5±2.8*	76.6±2.6
	ФИЗ	72.6±2.2*	72.0±2.5
	ЛПС	80.0±2.4	73.4±2.3
3 месяца	ИНТ	302.2±8.0 <sup>§</sup>	227.1±7.4 <sup>§</sup>
	ФИЗ	323.6±6.0 <sup>§</sup>	230.5±7.1 <sup>§</sup>
	ЛПС	317.6±6.7 <sup>§</sup>	220.0±6.7 <sup>§</sup>

\* - статистически значимые различия между группами крыс в одном возрасте (Kruskal-Wallis test). § - различия между самцами и самками внутри группы в одном возрасте ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U Test).

### 3.3. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в открытом поле.

Тестирование тревожно-депрессивного поведения проводили в возрасте 1 и 3 мес (рис. 1). Необходимо отметить, что только некоторые из анализируемых показателей поведения в ОП имели нормальное распределение, результаты их анализа с помощью Factorial ANOVA представлены в табл. 2. Было выявлено влияние факторов ГРУППА, ПОЛ и ВОЗРАСТ крыс на показатели двигательной активности (дистанция, скорость и время движения) и замещающую активность (груминг).

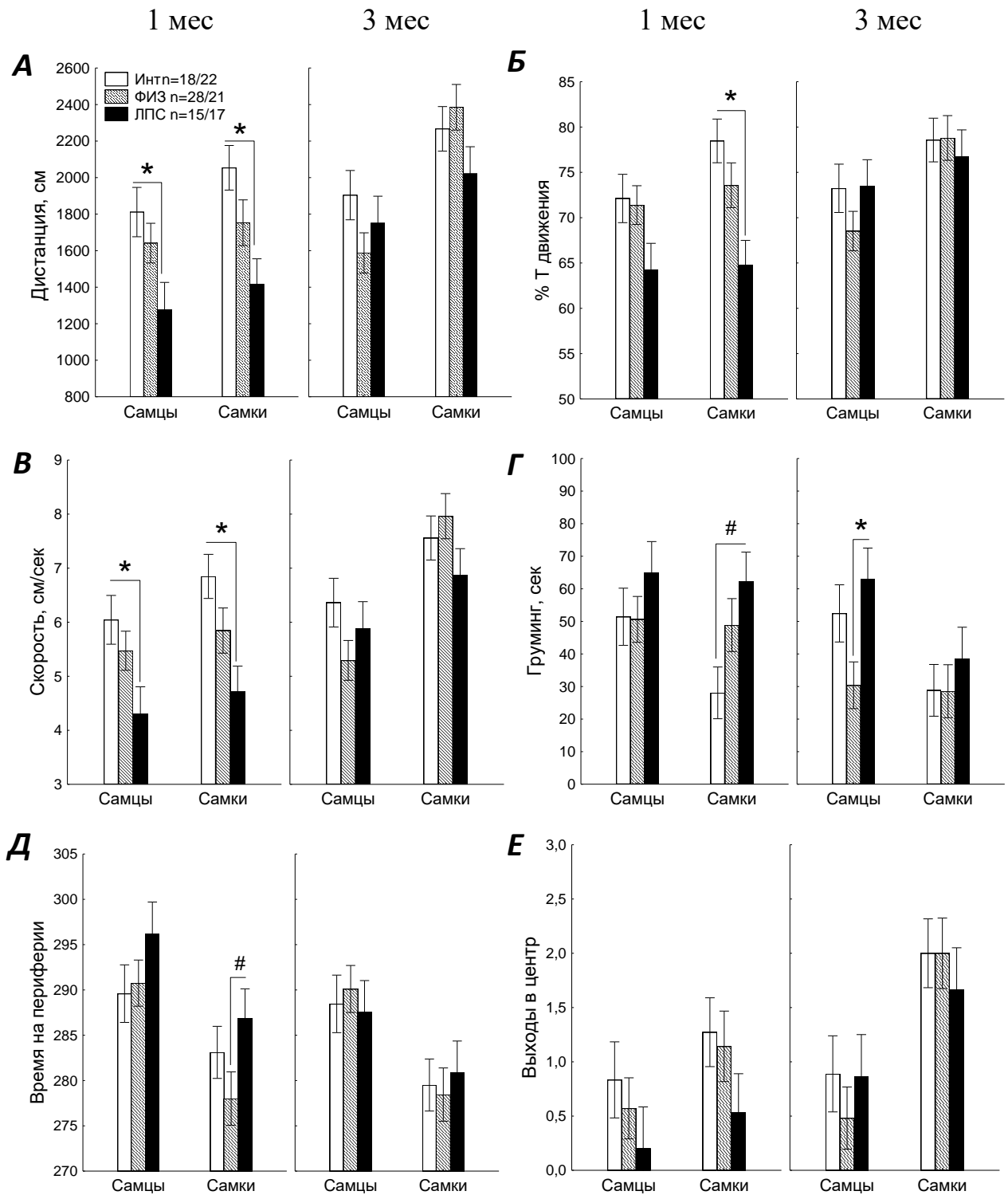
**Таблица 2.** Значения F и p при анализе с помощью Factorial ANOVA некоторых показателей поведения крыс в ПКЛ и ОП.

Тест	Показатель поведения	Фактор				
		ВОЗРАСТ	ПОЛ	ГРУППА	ВОЗРАСТ x ПОЛ	ВОЗРАСТ x ГРУППА
ОП	Дистанция	$F_{1,23}=18.633,$ $p=0.000$	$F_{1,23}=17.940,$ $p=0.000$	$F_{2,23}=8.1497,$ $p=0.000$	$F_{1,23}=4.2806,$ $p=0.04$	_*
	Т движения, %	$F_{1,23}=7.6477,$ $p=0.006$	$F_{1,23}=9.6946,$ $p=0.002$	$F_{2,23}=4.5464,$ $p=0.012$	-	$F_{2,23}=4.2137,$ $p=0.016$
	Грумминг, с	$F_{1,23}=4.7439,$ $p=0.030$	$F_{1,23}=6.8749,$ $p=0.009$	$F_{2,23}=4.9129,$ $p=0.008$	-	-
	Скорость	$F_{1,23}=19.414,$ $p=0.000$	$F_{1,23}=17.982,$ $p=0.000$	$F_{2,23}=7.4850,$ $p=0.001$	$F_{1,23}=4.6043,$ $p=0.033$	-
ПКЛ	Дистанция	-	$F_{1,23}=14.252,$ $p=0.000$	$F_{2,23}=5.0370,$ $p=0.007$	$F_{1,23}=5.9242,$ $p=0.016$	-
	Т движения, %	$F_{1,23}=13.932,$ $p=0.000$	$F_{1,23}=9.0556,$ $p=0.003$	-	-	-
	Грумминг, с	$F_{1,23}=5.8411,$ $p=0.016$	-	-	-	-
	Скорость	-	$F_{1,23}=15.496,$ $p=0.000$	$F_{2,23}=4.9721,$ $p=0.008$	$F_{1,23}=5.8401,$ $p=0.017$	-
	Т в ОР, %	$F_{1,23}=9.3549,$ $p=0.003$	$F_{1,23}=5.3330,$ $p=0.022$	$F_{2,23}=9.1861,$ $p=0.000$	-	-
	% входов в ОР	$F_{1,23}=21.584,$ $p=0.000$	-	$F_{2,23}=3.2283,$ $p=0.041$	-	-
	Стойки	$F_{1,23}=17.054,$ $p=0.000$	-	-	-	-

\* – прочерк свидетельствует о статистически незначимом влиянии фактора.

Post-hoc анализ показал, что в возрасте 1 мес у самцов и самок ЛПС группы была меньше пройденная дистанция (рис. 2, А), время (у самок, рис. 2, Б) и скорость (рис. 2, В) движения, чем у животных в контрольной группе ИНТ. В три месяца межгрупповые различия по указанным выше показателям исчезали (рис. 2, А, Б, В). Анализ остальных показателей поведения, не имеющих нормального распределения, проводили с помощью *Kruskal-Wallis test*. По времени на периферии и числу выходов в центр различия не были об-





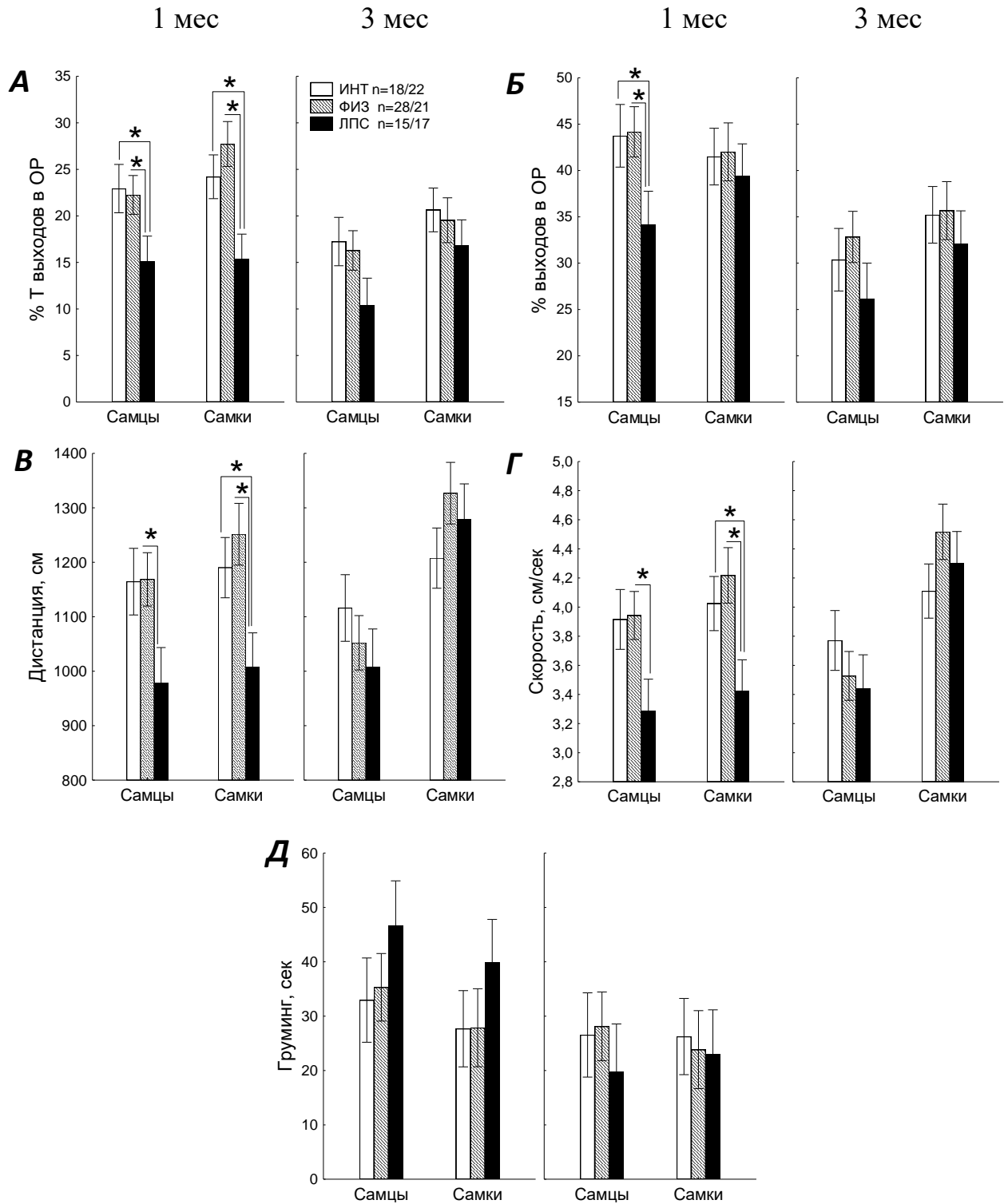
**Рис.2.** Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в открытом поле в возрасте 1 и 3 мес. По горизонтали – пол крыс, по вертикали - значения различных показателей поведения. ИНТ – группа интактных крыс, ФИЗ – группа с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, ЛПС – группа с введением ЛПС. n – число крыс в группе (самцы/самки). Т – время. \* - статистически значимые различия между группой ЛПС и группой ИНТ или ФИЗ ( $p < 0.05$ , на А, Б, В, Г – post hoc анализ Factorial ANOVA, на Д, Е - Kruskal-Wallis test), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ).

наружены ни в 1, ни в 3 месяца (рис. 2, Д и Е). По длительности груминга межгрупповые различия не наблюдались в 1 мес, но появлялись в 3 месяца (рис. 2, Г), при этом у самцов ЛПС группы время груминга было больше, чем у группы ФИЗ.

Таким образом, ранний провоспалительный стресс приводил к снижению двигательной активности в ОП у самцов и самок в возрасте 1 мес. В возрасте 3 мес влияние провоспалительного стресса исчезало, только у самцов ЛПС наблюдалось увеличение замещающей активности.

#### **3.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.**

В приведенной таблице (табл. 2) видно, что факторы ГРУППА крыс, ПОЛ, ВОЗРАСТ и взаимодействие этих факторов оказывали влияние на показатели двигательной активности (пройденную дистанцию и скорость) и тревожности (процент выходов в ОР и процент времени выхода в ОР). Post-hoc анализ показал, что в возрасте 1 мес у самцов и самок ЛПС группы по сравнению с группами ФИЗ и ИНТ были меньше пройденная дистанция (рис. 3, В) и скорость (рис. 3, Г). Процент времени выходов в открытые рукава в 1 мес был меньше ( $p < 0.05$ ) у самок и самцов ЛПС группы, чем у самок и самцов групп ИНТ и ФИЗ (рис. 3, А). Процент выходов в открытые рукава был меньше ( $p < 0.05$ ) у самцов ЛПС группы в 1 мес по сравнению с самцами ИНТ и ФИЗ групп (рис. 3, Б), у самок различий между группами не наблюдалось. По длительности груминга межгрупповые различия не наблюдались ни в 1 мес, ни в 3 месяца (рис. 3, Д). В возрасте 3 месяцев различий между ЛПС и контрольными группами крыс уже не было (рис. 3), что свидетельствует об исчезновении влияния раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в ПКЛ в этом возрасте. По числу стоек, свешиваний и выглядываний межгрупповые различия не наблюдались ни в 1 мес, ни в 3 мес.



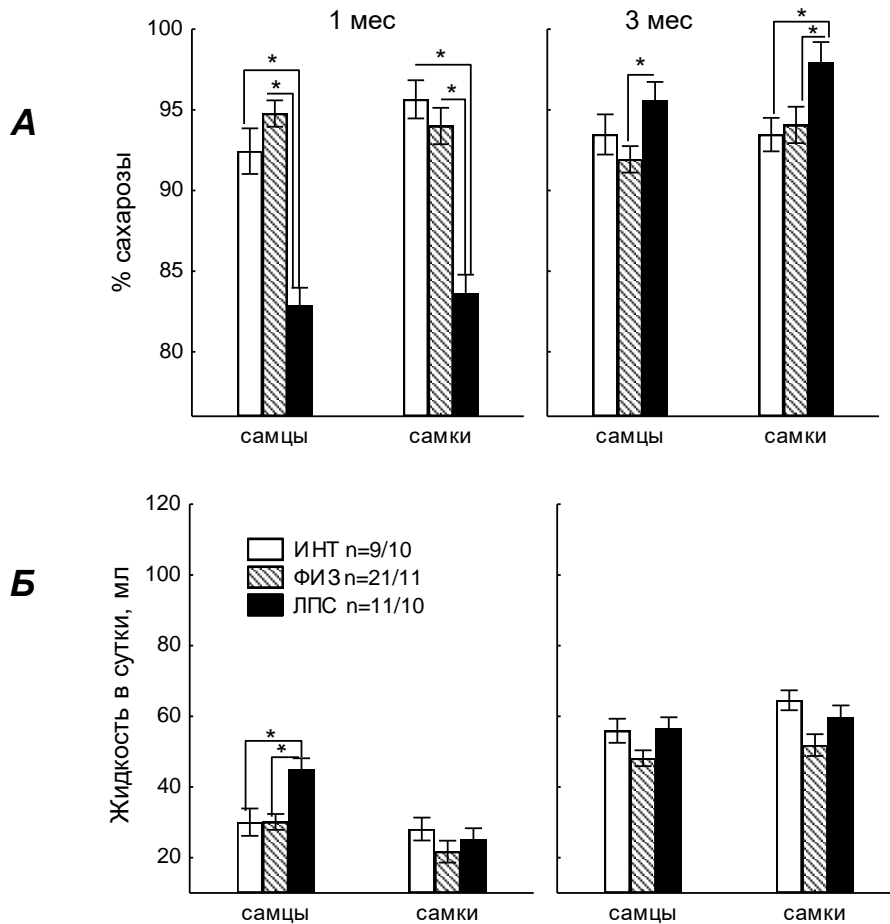
**Рис.3.** Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте в возрасте 1 и 3 мес. По горизонтали – пол крыс, по вертикали – значения различных показателей поведения. ОР – открытые рукава лабиринта, Т – время. \* – статистически значимые различия между группой ЛПС и группой ИНТ или ФИЗ ( $p < 0.05$ , на А-Д - post hoc анализ Factorial ANOVA), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 2.

Таким образом, судя по полученным результатам, в возрасте 1 мес ранний провоспалительный стресс приводил к снижению двигательной активности, а также к увеличению уровня тревожности в ПКЛ, изменения проявились сильнее у самцов, чем у самок.

### **3.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на предпочтение сахарозы.**

Результаты теста на потребление раствора сахарозы у крыс в одно- и трехмесячном возрасте представлены на рис. 4, А, Б. На процент потребления сахарозы оказывали влияние факторы ВОЗРАСТ ( $F_{1,131}=34.4$ ,  $p<0.001$ ) и ГРУППА крыс ( $F_{2,131}=13.9$ ,  $p<0.001$ ). Было также обнаружено значимое взаимодействие этих факторов ( $F_{2,131}=53.4$ ,  $p<0.001$ ). На объем выпитой жидкости за сутки оказывали влияние факторы ВОЗРАСТ ( $F_{1,131}=211.1$ ,  $p<0.001$ ) и ГРУППА ( $F_{2,131}=9.7$ ,  $p<0.001$ ), наблюдалось так же взаимодействие факторов ВОЗРАСТ x ПОЛ ( $F_{1,131}=18.1$ ,  $p<0.001$ ) и ГРУППА x ПОЛ ( $F_{2,131}=3.2$ ,  $p=0.046$ ). Post-hoc анализ показал, что в одномесячном возрасте самцы и самки группы ЛПС потребляли существенно меньше ( $p<0.05$ ) раствора сахарозы, чем животные ФИЗ и ИНТ групп (рис. 4, А). У самцов ЛПС группы в один месяц общий объем выпитой жидкости за сутки был больше, чем у крыс ФИЗ и ИНТ групп (рис. 4, Б) ( $p<0.05$ ). В три месяца самцы и самки ЛПС группы, наоборот, потребляли больше ( $p<0.05$ ) раствора сахарозы, чем животные ФИЗ или ИНТ группы (рис. 4, А). По объему выпитой жидкости за сутки животные разных групп не отличались в три месяца (рис. 4, Б).

Таким образом, судя по результатам теста на сахарозу, крысы ЛПС группы в один месяц демонстрировали признаки депрессивно-подобного поведения, но в три месяца эти признаки исчезали.



**Рис. 4.** Влияние раннего провоспалительного стресса на потребление сахарозы (А) и общее потребление жидкости (Б) в тесте на предпочтение сахарозы в возрасте 1 и 3 мес. По горизонтали – пол крыс, по вертикали на А – процент выпитого раствора сахарозы от общего объема потребленной жидкости в сутки, на Б – общий объем выпитой жидкости в сутки (мл). \* - статистически значимые различия между группой ЛПС и группой ИНТ или ФИЗ (post hoc анализ Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 2.

### 3.6. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте вынужденного плавания.

Результаты анализа времени зависания у крысят в возрасте 1 мес (1 и 2 день), а также в 3 мес представлены на рис. 5 и в табл. 3. Фактор ВРЕМЯ и ПОЛ оказывали влияние во всех опытах (табл. 3). Влияние фактора ПОЛ увеличивалось к 3 мес, post-hoc анализ показал, что наибольшие различия между самцами и самками наблюдались на 1-ой минуте тестирования, самцы зависали на большее ( $p < 0.05$ ) время, чем самки (табл. 3 и рис. 5, В). Влияние фактора ВРЕМЯ было максимальным в первый день тестирования в 1 мес. На первой минуте время зависания не превышало 5 с, к

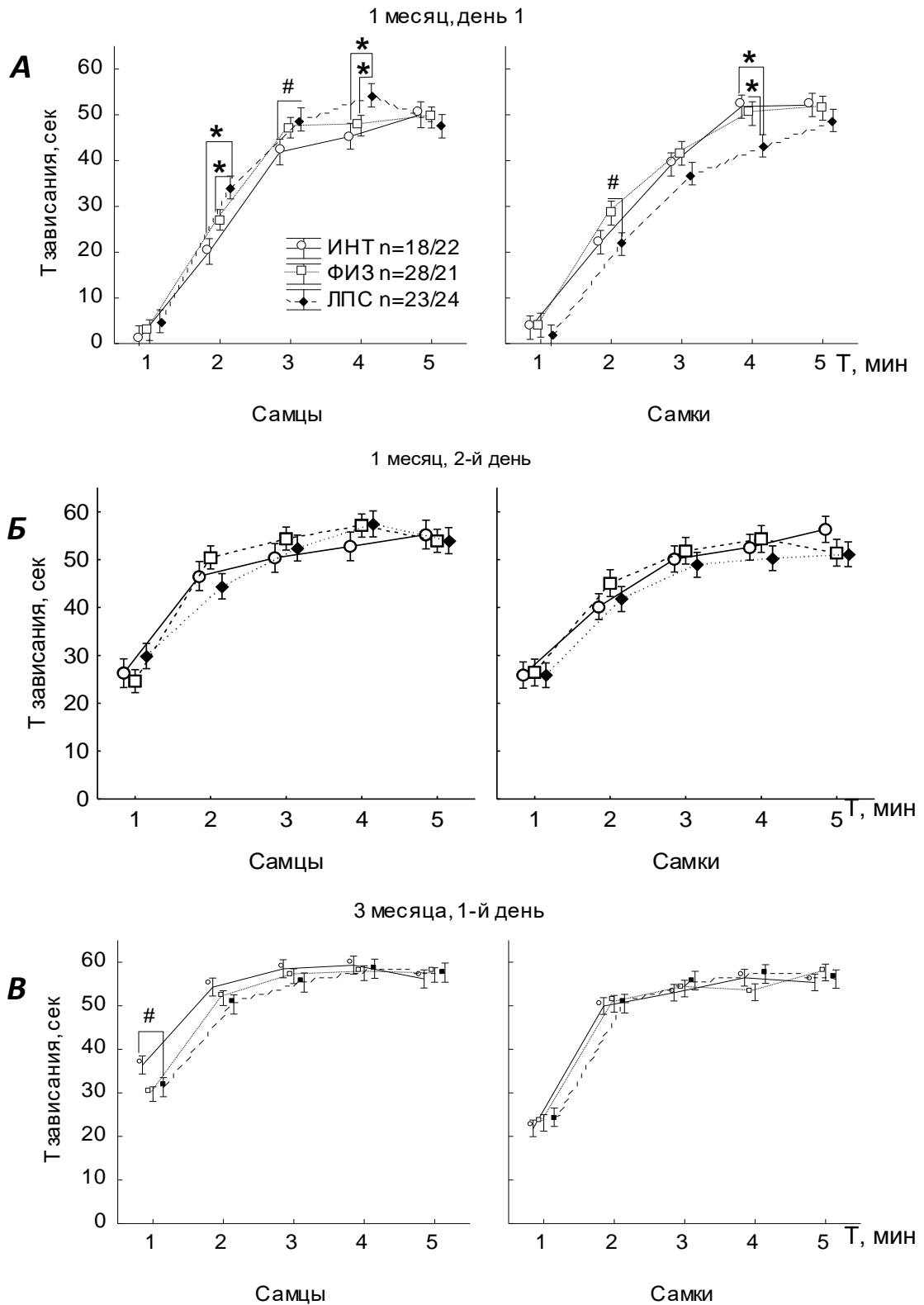
5 минуте – возрастало до 50-60 с (рис. 5, А). В последующие дни уже на первой минуте тестирования время зависания было значительным (рис. 5, Б, В). Кроме того, только в 1 мес в 1-й день было обнаружено взаимодействие факторов ГРУППА x ПОЛ. Оно проявилось в большем времени зависания у самцов ЛПС группы по сравнению с контрольными группами, и, наоборот, в меньшем времени зависания у самок ЛПС группы в сравнении с контролем. Post-hoc анализ показал, что в 1 день у самцов ЛПС группы время зависания на 2 и 4-ой минутах было статистически значимо больше, чем у самцов группы ИНТ и ФИЗ (рис. 5, А). У самок ЛПС группы в первый день в 1 мес на 4 минуте время зависания было, наоборот, меньше, чем у самок ИНТ и ФИЗ групп. При последующих тестированиях межгрупповых различий не было обнаружено.

Таким образом, тест вынужденного плавания показал, что только в первый день в возрасте 1 мес самцы ЛПС группы проявляли признаки депрессивно-подобного поведения, в дальнейшем указанные различия в поведении исчезали. У самок ЛПС группы депрессивно-подобное поведение не проявлялось ни в 1, ни в 3 мес.

**Таблица 3.** Значения F и p при анализе с помощью Factorial ANOVA некоторых показателей поведения крыс в тесте вынужденного плавания.

Возраст и день тестирования	Факторы				
	ВРЕМЯ	ПОЛ	ПОЛ x ВРЕМЯ	ГРУППА x ПОЛ	ГРУППА x ПОЛ x ВРЕМЯ
1 мес Обучение	$F_{4,646} = 365.4$ $p = 0.000$	-	$F_{4,646} = 2.5$ $p = 0.041$	$F_{2,646} = 9.9$ $p = 0.000$	-*
1 мес Тест	$F_{4,647} = 109.8$ $p = 0.000$	$F_{1,647} = 6.4$ $p = 0.012$	-	-	-
3 мес Тест	$F_{4,570} = 234.3$ $p = 0.000$	$F_{1,570} = 22.4$ $p = 0.000$	$F_{4,570} = 4.4$ $p = 0.002$	-	-

\* – прочерк свидетельствует о статистически незначимом влиянии фактора.



**Рис. 5.** Влияние раннего провоспалительного стресса на время зависания в тесте вынужденного плавания. А – время зависания по минутам в 1 день в возрасте 1 мес, Б – во 2-й день в возрасте 1 мес, В – в возрасте 3 мес. \* - статистически значимые различия показателей в группе ЛПС по сравнению с группой ИНТ или ФИЗ ( $p < 0.05$ , post-hoc анализ, Factorial ANOVA), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 2.

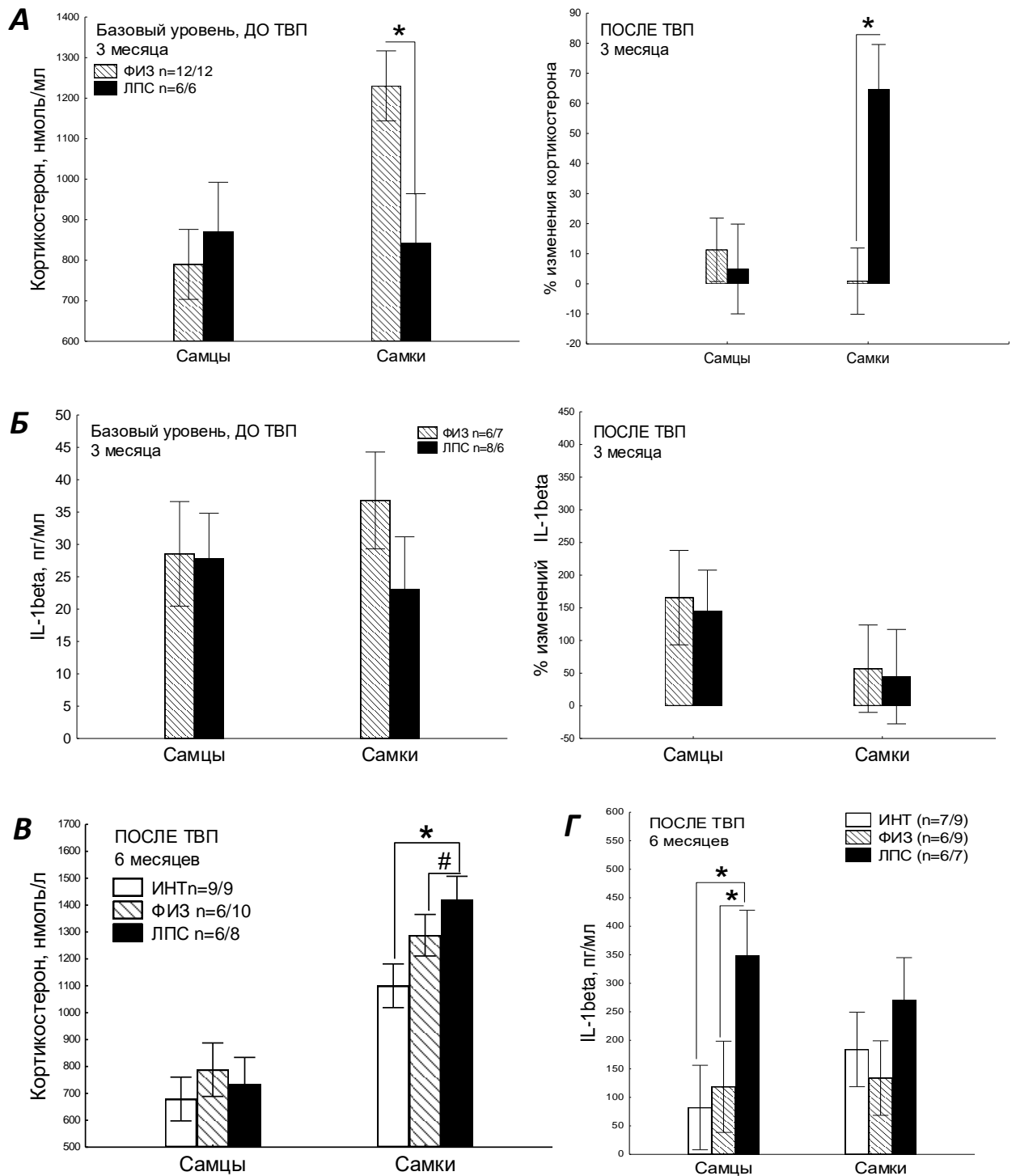
### **3.7. Влияние раннего провоспалительного стресса на уровни кортикостерона и цитокина ИЛ-1бета в сыворотке крови.**

Кровь для ИФА брали из хвостовой вены за сутки до начала поведенческого тестирования и через 30-40 мин после стрессирующего воздействия в виде теста вынужденного плавания, в возрасте 3 мес (рис. 1). В 6 мес брали декапитационную кровь через 30-40 мин после ТВП. В результате выхода из строя части лабораторного оборудования образцы сыворотки крови крыс группы ИНТ в 3 мес были испорчены, а группа исключена из результатов анализа. Таким образом, в результатах представлена только одна контрольная группа, группа ФИЗ.

Проведенный иммуноферментный анализ сыворотки крови, взятой до теста вынужденного плавания у крыс в возрасте 3 месяца, показал (рис. 6, А), что на базовый уровень кортикостерона значительное влияние оказывало взаимодействие факторов ГРУППА x ПОЛ ( $F_{1,32}=4.9145$ ,  $p=0.034$ ). До воздействия у самок ЛПС группы уровень кортикостерона был ниже, чем в группе ФИЗ ( $p<0.05$ , post-hoc анализ) (рис. 6, А). Как у самцов, так и самок уровень кортикостерона увеличивался после теста вынужденного плавания, однако статистически значимые межгрупповые различия наблюдались только у самок, но не у самцов. Значительное влияние на процент изменения уровня кортикостерона оказывал фактор ГРУППА ( $F_{1,31}=4.860$ ,  $p=0.035$ ) и взаимодействие факторов ГРУППА x ПОЛ ( $F_{1,31}=7.250$ ,  $p=0.011$ ). После вынужденного плавания у самок в группе ЛПС процент изменения уровня кортикостерона был выше, чем в группе ФИЗ. У самцов до и после воздействия межгрупповые различия не возникали.

Анализ базового уровня ИЛ-1бета (рис. 6, Б) не выявил различий между группами ни у самцов, ни у самок в возрасте 3 месяцев как до стрессирующего воздействия, так и после.





**Рис. 6.** Влияние раннего провоспалительного стресса на уровни кортикостерона (нмоль/л) (А - до и после ТВП в 3 мес; В – после ТВП в 6 мес) и ИЛ-1бета (пг/мл) (Б - до и после ТВП в 3 мес; Г – после ТВП в 6 мес) в сыворотке крови у самцов и самок. По горизонтали – пол крыс. \* - статистически значимые различия между группами ЛПС и ФИЗ, ( $p < 0.05$ , post hoc анализ Factorial ANOVA), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 2.

Проведенный иммуноферментный анализ сыворотки декапитационной крови, взятой через 30-40 мин после стрессового воздействия (тест вынужденного плавания) в возрасте 6 месяцев показал (рис. 6, В), что на уровень кортикостерона существенное влияние оказывал фактор ПОЛ ( $F_{1,42}=55.78$ ,  $p<0.001$ ). У самок всех групп уровень кортикостерона был выше, чем у самцов ( $p<0.05$ , post-hoc анализ). Фактор ГРУППА крыс оказывал слабое влияние на уровень кортикостерона в виде тенденции ( $F_{2,42}=2.71$ ,  $p=0.078$ ). Только у самок группы ЛПС уровень кортикостерона был выше, чем у интактной группы ( $p<0.05$ , post-hoc анализ).

На уровень ИЛ-1бета влияние оказывал фактор ГРУППА крыс ( $F_{2,38}=3.81$ ,  $p=0.031$ ). Post hoc анализ показал, что у самцов группы ЛПС уровень ИЛ-1бета был выше, чем у самцов контрольных групп (рис. 6, Г). У самок значимых различий в уровне ИЛ-1бета у разных групп крыс не было обнаружено.

Таким образом, ранний провоспалительный стресс оказывал разное влияние на базовый уровень кортикостерона в сыворотке крови и на реактивность ГГН оси у самцов и самок. Судя по уровню кортикостерона, самки после раннего провоспалительного стресса демонстрировали повышенную реактивность на стрессирующее воздействие. В возрасте 6 мес в группе ЛПС у самцов был повышен уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1бета, а у самок - уровень кортикостерона.

### **3.8. Обсуждение результатов.**

В настоящих опытах провоспалительный стресс от введения ЛПС на 3 и 5-й дни жизни приводил к уменьшению двигательной активности, усилению тревожности и к признакам депрессивно-подобного поведения у крыс в возрасте одного месяца (табл. 4). Усиление тревожности в тесте ПКЛ проявилось у обоих полов, но в большей степени у самцов. В тесте ОП

признаков усиления тревожности обнаружено не было. Усиление депрессивно-подобного поведения у крыс с ранним провоспалительным стрессом было выявлено в тесте предпочтения сахарозы в равной степени у самцов и самок, в то время как в тесте вынужденного плавания - только у самцов в первый день экспериментов. В возрасте трех месяцев все перечисленные выше различия в поведении крыс, получавших провоспалительный стресс, и контрольных животных исчезали, за исключением результатов теста предпочтения сахарозы, в котором и самцы, и самки, получавшие ранний ЛПС стресс, показали даже большее предпочтение сахарозы, чем контрольные животные.

**Таблица 4.** Схематичное изображение влияния раннего провоспалительного стресса на проявление двигательной, исследовательской активности, тревожного и депрессивно-подобного поведения у самцов и самок крыс в подростковом и взрослом возрасте.

Показатели поведения	Тест		Самцы		Самки	
			1 мес	3 мес	1 мес	3 мес
Двигательная активность	ОП		↓↓*	-	↓↓↓	-
	ПКЛ		↓↓	-	↓↓	-
Исследовательская активность	ОП		-	-	-	-
	ПКЛ		-	-	-	-
Тревожность	ОП		-	-	-	-
	ПКЛ		↑↑	-	↑	-
Депрессивно-подобное поведение	ТПС		↑	↓	↑	↓
	ТВП	Д1	↑	-	-	-
		Д2	-	Тест не проводился	-	Тест не проводился

\* - примечание: ОП – открытое поле, ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт, ТПС – тест на предпочтение сахарозы, ТВП – тест вынужденного плавания (Д1,2 – день проведения теста). ↑ - усиление соответствующего поведения, ↓ - его ослабление. Прочерк – отсутствие изменений. Две и три стрелки – изменение двух или более параметров однотипного поведения.

В литературе традиционно для оценки депрессивно-подобного поведения у грызунов применяют тесты вынужденного плавания и предпочтения сахарозы. Однако эти тесты отражают разные аспекты данного

вида поведения и с этим, по-видимому, могут быть связаны некоторые различия в полученных нами результатах по этим двум тестам. Тест предпочтения сахарозы оценивает степень ангедонии животных, т.е. уменьшение удовольствия от потребления сладкого раствора. Тест вынужденного плавания оценивает степень иммобильности, пассивного зависания, склонность животных к «поведенческому отчаянию» (Porsolt et al., 1978). Кроме того, некоторые различия в результатах наших опытов в тестах вынужденного плавания и предпочтения сахарозы могут быть связаны с разной чувствительностью этих двух тестов. Ранее отмечалось, что ангедония является наиболее чувствительным индикатором депрессивного поведения после хронического стресса (Stepanichev et al., 2016). В тесте вынужденного плавания в 1 мес увеличение времени иммобильности у самцов ЛПС группы по сравнению с контролем наблюдали на второй минуте только в первый день пребывания в воде, т.е. у них «поведенческое отчаяние» возникало раньше. У самок при этом, наоборот, время зависания в ЛПС группе было меньше, чем в контрольных группах. Во второй день тестирования межгрупповые различия среди самцов и самок исчезали, все животные, начиная с первой минуты, зависали на значительное время, что свидетельствовало, по-видимому, о том, что животные обучились экономить силы. Таким образом, наиболее показателен был первый день пребывания крыс в воде, только в этот день можно было оценить coping style, т.е. способ, как животные справляются со стрессом, предпочтение активных или пассивных реакций на неизбежный стресс.

В литературе имеется ряд работ, в которых исследовали влияние провоспалительного стресса в раннем возрасте на тревожное и депрессивно-подобное поведение у взрослых животных, при этом имеются существенные различия в дозе вводимого препарата (от 50 до 250 мкг/кг) и возрасте воздействия. В одних работах введение ЛПС проводилось в возрасте 3 и 5 дней (Tishkina et al., 2016; Claypoole et al., 2017; Walker et al., 2009; Tenk et al., 2013),

в других – 14 дней (Berkiks et al., 2019; Doenni et al., 2017; Dinel et al., 2014). При введении ЛПС на 3 и 5 день, также как в нашей работе, наблюдалось увеличение тревожности у самцов в ОП (у подростков) и в ПКЛ (у взрослых) и депрессивно-подобного поведения в тесте вынужденного плавания (Tishkina et al., 2016). Увеличение тревожности и депрессивно-подобного поведения у мышей самцов, но не самок в 35 и 70 дней наблюдали после введения ЛПС на 5 и 7 дни жизни (Custódio et al., 2018). Эффект от введения ЛПС мог зависеть от линии крыс (Clauroole et al., 2017), у высокотревожных крыс введение ЛПС приводило к снижению тревожности, а у низкотревожных, наоборот, к ее увеличению. Имеются данные, что ранний провоспалительный стресс мог не менять уровень тревожности в ПКЛ и ОП у взрослых крыс, только дополнительный хронический стресс (изоляция и ограничение движения) у взрослых животных, рассматриваемый в качестве «второго удара», вызывал увеличение тревожности (Walker et al., 2009). Введение ЛПС взрослым животным за 24 часа до тестирования дало более однородные результаты, показано увеличение депрессивноподобного поведения (Millett et al., 2019), причем самцы демонстрировали большую чувствительность, чем самки.

При анализе наших данных возникает вопрос о том, с чем может быть связано исчезновение изменений в тревожном и депрессивно-подобном поведении крыс в возрасте три месяца. Согласно данным литературы существует ряд факторов, которые могут уменьшать влияние раннего провоспалительного стресса на проявления тревожного и депрессивно-подобного поведения у взрослых животных. К ним относятся хендлинг (Wilbo et al., 2007), предсказуемый умеренный хронический стресс (Dang et al., 2019), обогащенная среда (Harrison, Vaune, 2014), физические упражнения и усиленная двигательная активность (Harrison, Vaune, 2014; Huang, Lin, 2010). Эти факторы ослабляют нейровоспалительный процесс путем уменьшения продукции провоспалительных цитокинов и торможения активации микроглии. В данной серии экспериментов между первым (в 1 месяц) и

повторным (в 3 месяца) тестированием животные были использованы в опытах с выработкой пищевых условных рефлексов, во время которых они подвергались многодневному хендлингу, что могло уменьшить признаки тревожного и депрессивно-подобного поведения у ЛПС группы. Однако проведенные в дальнейшем другие серии экспериментов (глава 7, 8) показали, что у животных в стандартных условиях содержания в возрасте 3 мес не наблюдались различия в тревожно-депрессивном поведении в группах ФИЗ и ЛПС. Следует признать, что последствия раннего провоспалительного стресса в тревожно-депрессивном поведении во взрослом возрасте нивелируются за счет каких-то компенсационных процессов. Подтверждают данное заключение результаты анализа динамики экспрессии генов, участвующих в ответе мозга на стресс (*Nr3c1*, *Nr3c2*, *Crh*, *Crhr1*, *Crhrh2*) и ассоциированных с нейровоспалением (*Il1b*, *Il6*, *Il10*, *TNF*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*) в неокортексе и гиппокампе подопытных животных (Квичанский, 2022). У взрослых крыс исчезала повышенная экспрессия генов, связанных со стрессом, которая наблюдалась в возрасте 30 дней в группе ЛПС.

В литературе при рассмотрении молекулярно-клеточных механизмов генеза депрессии большую роль отводят глюкокортикоидам и цитокинам (Григорьян с соат., 2014). В настоящих опытах мы обнаружили пониженный базовый уровень кортикостерона у самок группы ЛПС в возрасте 3 мес и увеличение реактивности ГН оси у самок группы ЛПС, выраженное в большем приросте концентрации кортикостерона после ТВП в возрасте как 3, так и в более высоком уровне кортикостерона в 6 мес. Причиной повышенной секреции кортикостерона в ответ на стрессирующее воздействие может являться «глюкокортикоидная резистентность» и нарушение функционирования отрицательной обратной связи. Причиной снижения базового уровня кортикостерона у самок группы ЛПС может быть нарушение работы ГН оси. Схожий результат наблюдали на самцах крыс,

содержавшихся в СИ: у них также наблюдали снижение базового уровня кортикостерона в крови и увеличенный стресс-ответ (Воеро et al., 2018).

В группе ЛПС в декапитационной крови (6 мес) был обнаружен повышенный уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1бета у самцов, но не самок, по сравнению с контрольными животными. Это может свидетельствовать о явлении сенситизации воспалительного процесса у самцов. При этом у самцов, получавших провоспалительный стресс в раннем возрасте, по некоторым показателям проявление тревожного и депрессивно-подобного поведения наблюдалось в большей степени, чем у самок. Как было описано ранее, в литературе есть точка зрения (Bilbo, Schwartz, 2012) что провоспалительный стресс в раннем возрасте активирует микроглию (эффект прайминга, priming), которая становится более чувствительной к последующим стрессам. Это явление проходит неодинаково у самцов и самок. В то время как у самцов стресс и введение ЛПС ведут к повышению реактивности микроглии, которая увеличивает экспрессию цитокина ИЛ-1бета, у самок реактивность микроглии не меняется (Fonken et al., 2018). В опытах на мышях с ишемическим провоспалительным стрессом, вызванным на 9-й день жизни, у самцов в отличие от самок наблюдалось увеличение активности микроглии и макрофагов, появление амебоидной морфологии и увеличение экспрессии генов TNF- $\alpha$  и ptgs2 (Cox-2) (Villapol et al., 2019). Показано, что депрессивно-подобное поведение у самцов и самок реализуется через разные молекулярные механизмы в гипоталамусе (Adzic et al., 2015). У самок оно больше связано с увеличением гормона высвобождения кортикотропина в гипоталамусе, снижением BDNF, ростом активности ядерных глюкокортикоидных рецепторов и увеличением NFkB и 20 kDa C/EBP $\beta$ . У самцов, в отличие от самок, вместе с ростом гормона высвобождения кортикотропина происходит увеличение уровня COX-2, глюкокортикоидных рецепторов в цитоплазме, ядерного 38 kDa C/EBP $\beta$  и NFkB (Adzic et al., 2015).

У самок эстрогены обладают выраженным противовоспалительным действием, что было показано *in vitro* на культуре микроглиальных клеток с введением  $17\beta$ -эстрадиола, которое предохраняло от морфо-функциональных изменений, вызываемых ЛПС, и сопутствующего синтеза провоспалительных цитокинов (Vegeto et al., 2001). Эффекты эстрадиола связаны с модуляцией воспалительных реакций через глиальные клетки и регуляцией высвобождения провоспалительных цитокинов и хемокинов (Villa et al., 2016), при этом считается, что эстрогенные рецепторы альфа играют более существенную роль в уменьшении воспалительных эффектов микроглии, чем эстрогенные рецепторы бета. Овариоэктомия у грызунов приводила к большему вовлечению микроглии в нейровоспалительный процесс и усилению регуляции большего числа маркеров реактивности микроглии, включая рецепторы для провоспалительных сигналов и фагоцитоза (Sárvári et al., 2014). По-видимому, благодаря противовоспалительному действию эстрогенов у самок ЛПС группы в нашей работе не наблюдалось повышения уровня ИЛ-1бета по сравнению с контрольными группами после дополнительного стрессирования.

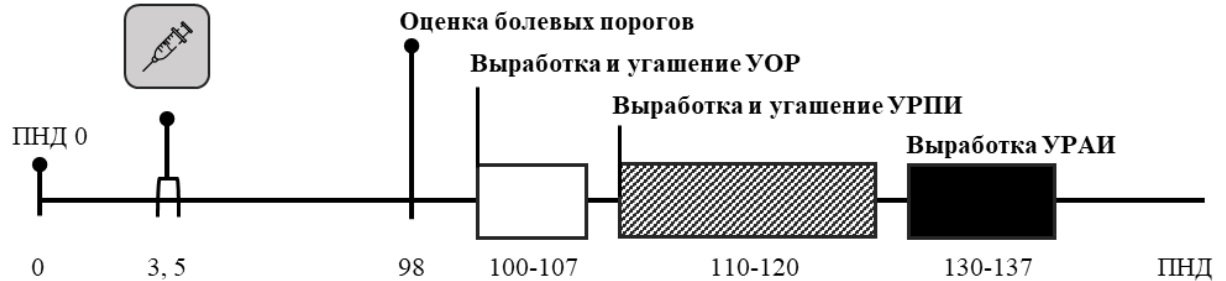


**Выводы:**

1. Ранний провоспалительный стресс, создаваемый путем введения ЛПС на 3 и 5 постнатальные дни, приводил к снижению двигательной активности в тестах ОП и ПКЛ и к увеличению тревожности в ПКЛ у крысят в возрасте 1 месяца. В возрасте 3 месяцев указанные изменения практически исчезали.
2. Ранний провоспалительный стресс вызывал депрессивно-подобное поведение у самцов и самок в возрасте 1 месяца, которое проявлялось в уменьшении предпочтения 1% раствора сахарозы по сравнению с контрольными группами. В возрасте 3 месяцев признаки ангедонии исчезали.
3. В тесте вынужденного плавания признаки депрессивно-подобного поведения в ответ на ранний провоспалительный стресс проявились только у самцов только в первый день тестирования в возрасте 1 месяца; при повторных тестированиях во 2 день и в 3 месяца они исчезали.
4. Наибольшие изменения в тревожно-депрессивном поведении под влиянием введения ЛПС в раннем возрасте происходили у самцов по сравнению с самками.
5. После раннего провоспалительного стресса у самок наблюдалась повышенная реактивность ГГН оси на стрессирующее воздействие, судя по уровню кортикостерона в плазме крови. У самцов по сравнению с самками после раннего провоспалительного стресса дополнительное стрессирующее воздействие вызывало большую активацию иммунной системы, судя по уровню ИЛ-1бета в сыворотке крови.

## Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ: Влияние раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение крыс разного пола.

### 4.1. Схема эксперимента.



**Рис. 7.** Схема проведения эксперимента. По горизонтали: постнатальные дни (ПНД), 0 ПНД – день родов. На 3 и 5 ПНД – инъекция ЛПС или физиологического раствора (контроль). УОР – классический оборонительный рефлекс на звук. УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания. УРАИ – условный рефлекс активного избегания.

Как видно на рис. 7 выработку условных рефлексов проводили на взрослых животных в возрасте 3-4.5 мес. Оценка болевых порогов проводили предварительно, до начала выработки оборонительных рефлексов по методке «flinch-jump» с целью оценить наличие влияния ЛПС на болевую чувствительность крыс.

### 4.2. Влияние раннего провоспалительного стресса на болевую чувствительность крыс.

В табл. 5 представлены значения порогов различных болевых реакций у крыс трех разных групп. Анализ с помощью Factorial ANOVA обнаружил влияние фактора ПОЛ на порог вздрагивания ( $F_{1,66}=6.85$ ,  $p=0.019$ ) и побежек ( $F_{1,40}=11.89$ ,  $p<0.001$ ). У самок по сравнению с самцами наблюдались более низкие пороги болевых реакций, как это отмечалось ранее (Павлова с соавт., 2020). На порог прыжков и вокализации в слышимом для человека диапазоне частот фактор ПОЛА не оказывал влияния. Фактор ГРУППА крыс не оказывал существенного влияния ни на один из анализируемых видов болевых порогов

(для вздрагивания  $p=0.276$ , прыжков  $p=0.749$ , побегов  $p=0.713$ , вокализации  $p=0.206$ ). Таким образом, нейровоспалительный стресс существенным образом не влиял на болевую чувствительность крыс.

**Таблица 5.** Пороги различных болевых реакций крыс в группах ИНТ, ФИЗ и ЛПС.

Пол	Группа	Порог (мкА)			
		вздрагивания	прыжков	побежки	вокализации
Самцы	ИНТ	30.6±3.8	122.2±12.1	137.5±12.5	58.3±15.3
	ФИЗ	39.1±2.5	122.5±9.2	133.0±14.4	70.0±10.3
	ЛПС	35.0±3.6	108.3±30.0	150.0±18.3	37.5±14.5
Самки	ИНТ	27.1±3.3	100.0±14.4	70.5±12.5	45.8±13.3
	ФИЗ	29.5±3.4	81.8±10.2	100.0±15.4	77.3±13.8
	ЛПС	25.0±3.8	112.5±15.7	88.9±25.4	72.2±15.3

#### **4.3. Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку, проявление и угашение условного оборонительного рефлекса.**

Анализ с помощью Factorial ANOVA выработки условного оборонительного рефлекса (рис. 7, 8, А) обнаружил влияние фактора ГРУППА крыс ( $F_{2,796}=3.9$ ,  $p=0.021$ ) и взаимодействие факторов ГРУППА x ПОЛ ( $F_{2,796}=4.2$ ,  $p=0.015$ ). Влияние фактора ПОЛ проявилось на уровне тенденции ( $F_{1,796}=3.6$ ,  $P=0.057$ ). Post hoc анализ показал, что во время второго условного стимула и после окончания сочетаний продолжительность замирания у самок группы ЛПС и ФИЗ была достоверно больше, чем у животных ИНТ группы. Однако различий между ЛПС и ФИЗ группами обнаружено не было. Таким образом, ранний провоспалительный стресс не оказал существенного влияния на процесс выработки классического оборонительного рефлекса.

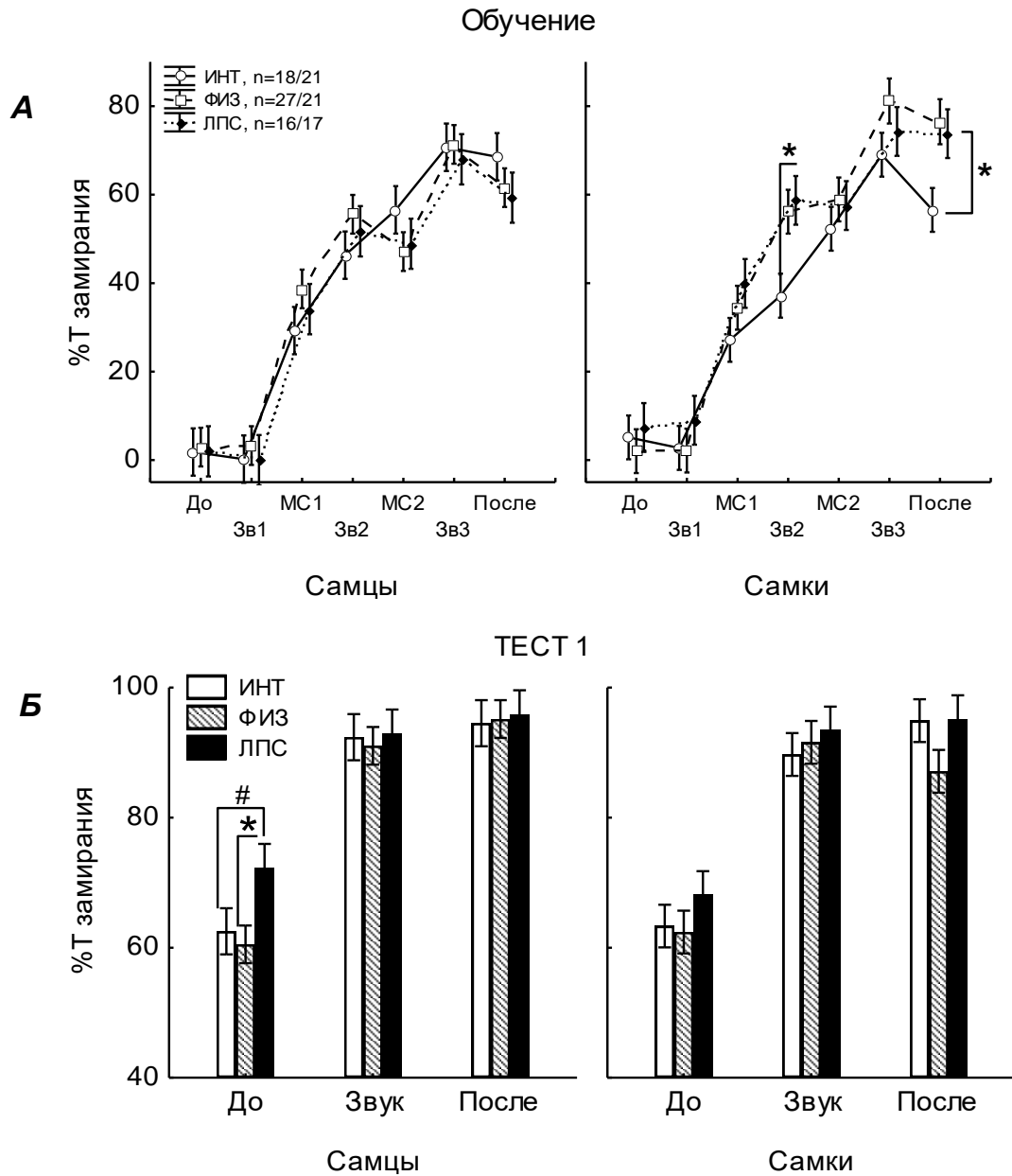
В Тесте 1 через 24 часа после обучения на время замирания оказывал влияние фактор ГРУППА ( $F_{2,342}=3.18$ ,  $p=0.042$ ), фактор ПОЛ не влиял ( $F_{1,342}=0.6$ ,  $p=0.439$ ). Детальный анализ поведения по интервалам времени в Тесте 1 показал (рис. 8, Б), что самцы группы ЛПС большее замирали на контекст, чем самцы группы ФИЗ, различие с группой ИНТ проявлялось на уровне тенденции. В ответ на сигнальный раздражитель время замирания у

самцов разных групп не отличалось. У самок в Тесте 1 различий по уровню замирания между разными группами крыс не было обнаружено, как в условиях контекста, так и при действии сигнального раздражителя. Таким образом, у самцов группы ЛПС проявление условнорефлекторного страха в ответ на обстановку камеры было больше, чем у контрольных крыс.

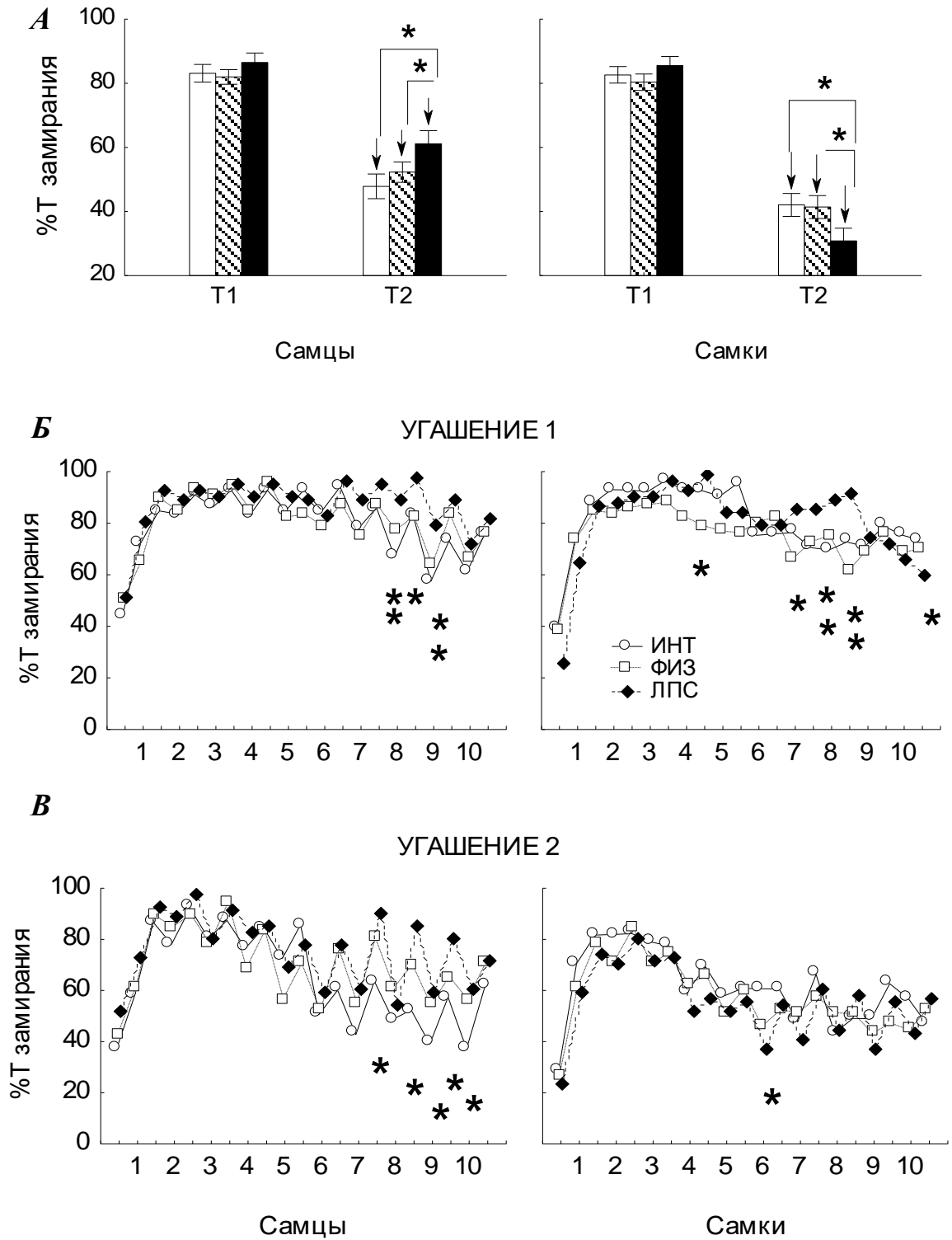
Из других анализируемых показателей поведения крыс межгрупповые различия наблюдались только по числу уринаций, у самцов в группе ЛПС число уринаций в Тесте 1 было меньше, чем в группе ИНТ ( $p=0.037$ , *post hoc* анализ). Это свидетельствовало о парадоксальном реагировании, несмотря на большее время замирания у этой группы, вегетативная реактивность была снижена.

Для оценки эффективности угашения рефлекса проводили сопоставление Теста 1 (после обучения) и Теста 2 (после угашения) с помощью Repeated measures ANOVA (рис. 9, А). Было выявлено влияние факторов ПОЛ ( $F_{1,455}=19.5$ ,  $p<0.001$ ), НОМЕР ТЕСТА ( $F_{1,455}=1080$ ,  $p<0.001$ ) и взаимодействие факторов ГРУППА x ПОЛ x НОМЕР ТЕСТА ( $F_{2,455}=9.5$ ,  $p<0.001$ ). *Post hoc* анализ показал, что в Тесте 2 самцы группы ЛПС в целом (при пребывании в контексте и действии сигнального раздражителя) замирали большее время, чем самцы ИНТ и ФИЗ групп ( $p<0.05$ ). Самки группы ЛПС в Тесте 2, наоборот, в целом замирали меньшее время, чем самки ИНТ и ФИЗ групп ( $p<0.05$ ).

Анализ времени замирания крыс в процессе первого и второго сеанса угашения (рис. 9, Б, В) с помощью Factorial ANOVA выявил влияние фактора ПОЛ ( $F_{1,2394}=14.09$ ,  $p<0.001$  для первого дня и  $F_{1,2394}=85.88$ ,  $p<0.001$  для второго дня). Фактор ГРУППА крыс оказывал влияние только при первом угашении ( $F_{2,2394}=12.8$ ,  $p<0.001$ ). Взаимодействие факторов ГРУППА x ПОЛ наблюдалось при первом ( $F_{2,2394}=5.09$ ,  $p=0.006$ ) и втором сеансах угашения



**Рис. 8.** Влияние провоспалительного стресса на выработку и проявление классического условного оборонительного рефлекса. А – обучение крыс, Б – Тест 1. По вертикали везде процент времени замирания, по горизонтали на А и Б – различные интервалы в опыте (До – до действия звука, Зв 1-3 – 1-3 применение звука, После – после звука, MC1-2 – 1 и 2 межсигнальный интервал). ИНТ – группа интактных крыс, ФИЗ – группа крыс с введением физиологического раствора, ЛПС – группа крыс с введением ЛПС. n - число крыс в группе (самцы/самки). \* - статистически значимые отличия между группой ЛПС и группой ФИЗ или ИНТ ( $p < 0.05$ , Factorial ANOVA), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ).



**Рис. 9.** Влияние провоспалительного стресса на угашение классического условного оборонительного рефлекса. А – сопоставление Теста 1 и 2, Б – угашение день первый, В – угашение день второй. По вертикали везде процент времени замирания, по горизонтали на А – номер теста, на Б и В – номер звукового стимула. \* - статистически значимые отличия между группой ЛПС и группой ФИЗ или ИНТ ( $p < 0.05$ , Repeated measures ANOVA на А, Factorial ANOVA на Б и В), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). ↓ - снижение показателей в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1 ( $p < 0.05$ , Repeated measures ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 6.

( $F_{2,2394}=14.66$ ,  $p<0.001$ ). Post hoc анализ показал, что самцы группы ЛПС замирали на большее время, чем самцы контрольных групп, начиная с 7-8 применения звука при первом и втором угашении. Самки группы ЛПС также замирали больше, чем контрольные группы при первом угашении, однако при втором угашении различия исчезали, и при шестом применении звука они замирали меньше, чем интактные самки (рис. 9, Б, В).

Таким образом, угашение рефлекса у самцов группы ЛПС было затруднено, самки группы ЛПС, наоборот, быстрее угашали реакцию страха, чем контрольные группы ФИЗ и ИНТ. Влияние ЛПС на проявление и угашение условно-рефлекторного страха зависело от пола животных.

#### **4.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку и угашение условного рефлекса пассивного избегания.**

Выработка УРПИ и тестирование сохранности навыка только в одном (первом после получения электрошока) опыте были проведены у всех крыс. У половины крыс, кроме этого, было исследовано угашение УРПИ в течение последующих 7 дней. Анализ с помощью Factorial ANOVA латентности захода в темный отсек при выработке и угашении УРПИ обнаружил влияние фактора ГРУППА крыс ( $F_{2,799}=9.0$ ,  $p<0.001$ ), ПОЛ ( $F_{1,799}=12.4$ ,  $p<0.001$ ), НОМЕР ОПЫТА ( $F_{9,799}=152.3$ ,  $p<0.001$ ). Дальнейший post hoc анализ показал, что преобладающее большинство крыс всех групп успешно выработали УРПИ. Межгрупповые различия в первом опыте по латентным периодам и по числу крыс, входящих в темный отсек, проявились на уровне тенденций за счет разницы между группами, получавшими ЛПС и ФИЗ (рис. 10, А, Б). Вместе с тем, у самцов имелись различия в особенностях проявления УРПИ в первом опыте (рис. 10, В): крысы группы ЛПС значительно чаще ( $p<0.05$ , критерий  $\chi^2$ ) не заходили и не заглядывали в ТО, т.е. имели рефлекс на 5 баллов (94%), чем самцы ИНТ (44%) и ФИЗ (67%) групп. У самок разных групп такого различия в качестве УРПИ не было обнаружено. В группах ФИЗ и ЛПС крыс

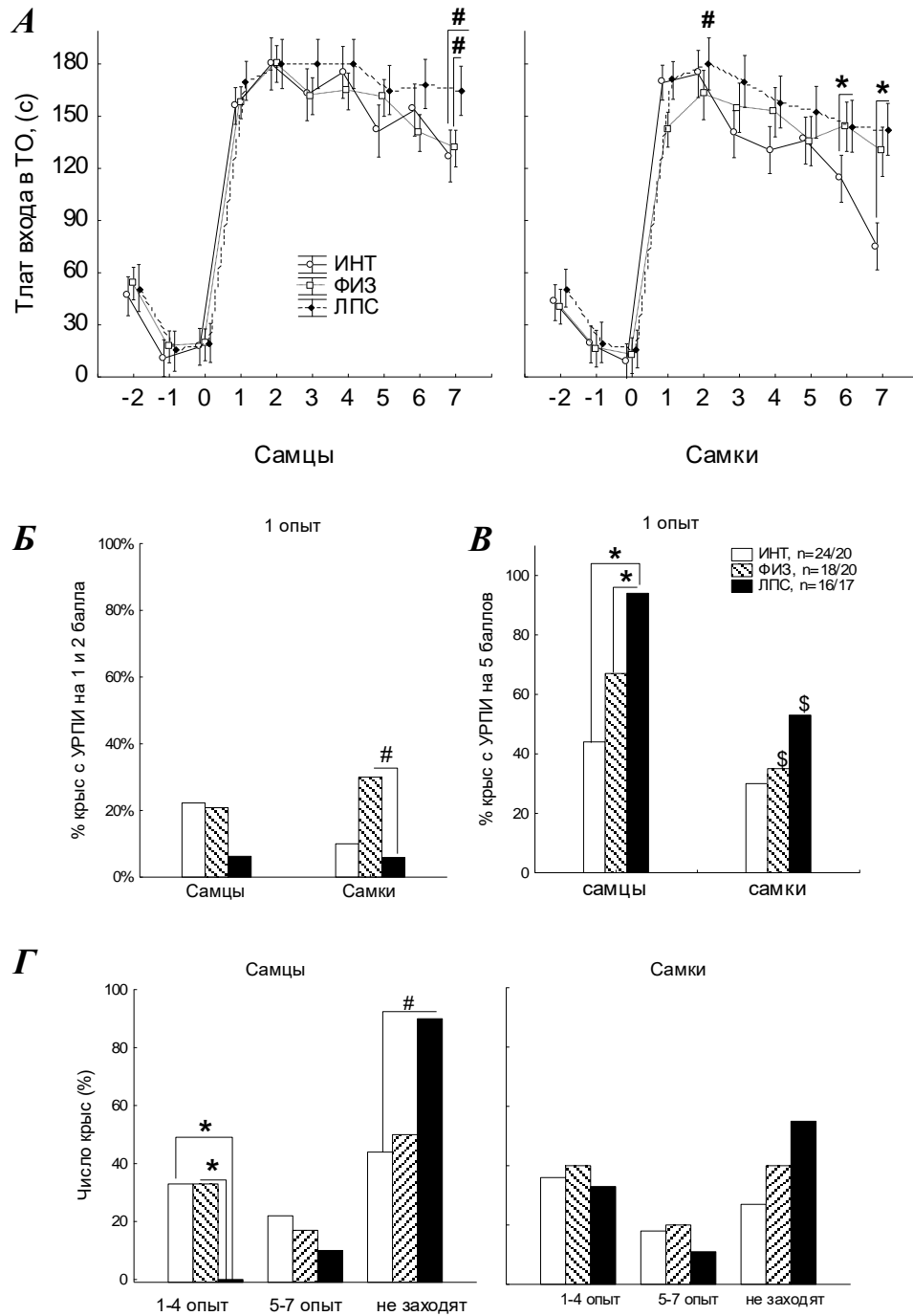
имелись межполовые различия в качестве УРПИ: у самцов рефлекс на 5 баллов проявлялся чаще, чем у самок.

Таким образом, у самцов ЛПС группы условно-рефлекторный страх после обучения проявлялся в большей степени, чем у самцов контрольных групп. У самок введение ЛПС существенно не повлияло на выработку УРПИ.

Угашение УРПИ у самцов группы ЛПС было затруднено (рис. 10, А, Г). Латентность входа в темный отсек у самцов группы ЛПС в седьмом опыте была больше, чем у группы ФИЗ и ИНТ (рис. 10, А). Судя по гистограмме распределения крыс в зависимости от дня первого захода в темный отсек (рис. 10, Г), самцы группы ЛПС совсем не заходили с 1 по 4 опыт 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. 10, Г). Латентный период входа в темный отсек в седьмом опыте был больше у самок группы ЛПС, чем у группы ИНТ, различий между группами ЛПС и ФИЗ не обнаружилось (рис. 10, А). Таким образом, у самцов группы ЛПС угашение УРПИ проходило медленнее, чем у контрольных животных. У самок введение ЛПС не оказало существенного влияния на скорость угашения по сравнению с контрольными животными.

Из других анализируемых показателей поведения крыс фактор ГРУППА оказывал влияние только на число уринаций ( $F_{2,800}=10.75$ ,  $p<0.000$ ), также было обнаружено взаимодействие факторов ПОЛ x ГРУППА ( $F_{2,800}=5.12$ ,  $p=0.006$ ). Post hoc анализ показал, что у самцов группы ЛПС было меньше уринаций с 0 по 7 опыт, у самок различий между группами не наблюдалось. Полученные данные свидетельствуют о снижении вегетативной реактивности при выработке и угашении УРПИ у самцов группы ЛПС.

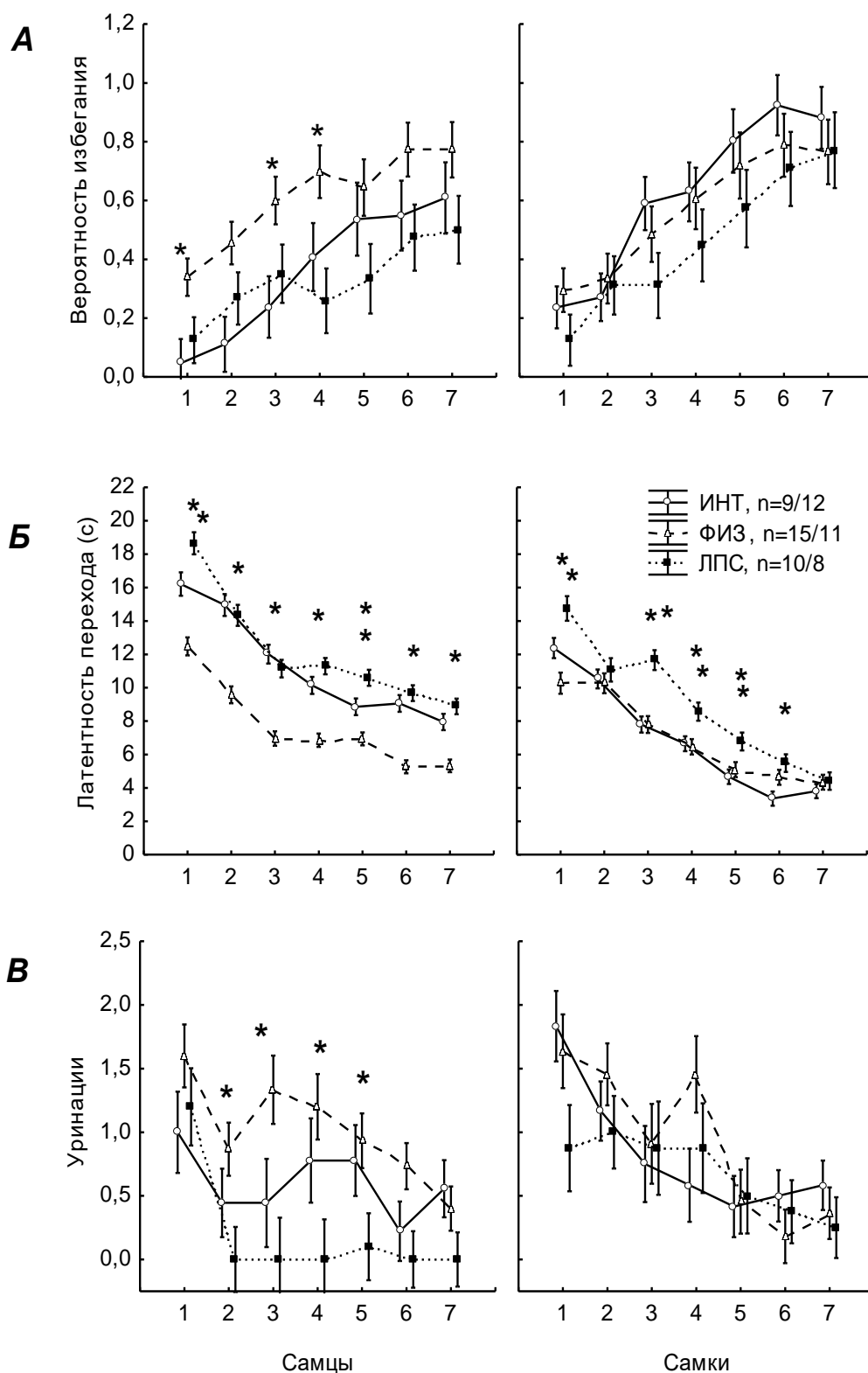




**Рис. 10.** Влияние провоспалительного стресса на выработку и угашение условного рефлекса пассивного избегания. А – средняя латентность входа в темный отсек от открывания дверцы в группах интактных крыс (ИНТ), животных с введением физиологического раствора (ФИЗ) и ЛПС (ЛПС). По горизонтали – номер опыта (-2, -1 – до выработки рефлекса, 0 – день обучения, 1-7 – после обучения при угашении). Б – процент крыс с УРПИ на 1 и 2 балла в первом опыте после обучения (заходят в темный отсек). В – процент крыс с УРПИ на пять баллов в первом опыте после обучения (не заходят и не заглядывают в темный отсек). Г – распределение крыс в зависимости от дня первого захода в темный отсек после обучения. \* - статистически значимые отличия между группой ЛПС и группой ФИЗ или ИНТ ( $p < 0.05$ , на А – post hoc анализ Repeated measures ANOVA, на Б-Г – критерий  $\chi^2$  2 x 2 Table). # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). \$ - статистически значимые отличия между подгруппами самцы/самки.

#### **4.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку условного рефлекса двустороннего активного избегания.**

На вероятность появления реакции избегания слабое влияние оказывали факторы ГРУППА крыс ( $F_{2,59}=3.1$ ,  $p=0.052$ ) и ПОЛ ( $F_{1,59}=3.37$ ,  $p=0.071$ ), (рис. 11, А). На латентность перехода между отсеками существенное влияние оказывали факторы ГРУППА ( $F_{2,774}=47.9$ ,  $p<0.001$ ) и ПОЛ ( $F_{1,774}=96.0$ ,  $p<0.001$ ) животных, а также наблюдалось взаимодействие между ними ( $F_{2,774}=17.0$ ,  $p<0.001$ ). Post hoc анализ показал (рис. 11, Б), что самцы группы ЛПС имели большую латентность перехода между отсеками, чем самцы группы ФИЗ (во всех опытах), а также чем самцы группы ИНТ (в 1-м и 5-м опытах). Самки группы ЛПС также имели большую латентность перехода между отсеками, чем самки группы ИНТ и ФИЗ (в 1-ом и 3-6-х опытах). В группах ЛПС и ИНТ имелись половые различия, у самцов латентные периоды переходов были больше, чем у самок. На число уринаций оказывали влияние факторы ГРУППА крыс ( $F_{2,59}=11.29$ ,  $p<0.001$ ) и ПОЛ ( $F_{1,59}=5.29$ ,  $p=0.025$ ), также наблюдалось взаимодействие между этими факторами ( $F_{2,59}=3.41$ ,  $p=0.040$ ). Post hoc анализ показал (рис. 11, В), что у самцов группы ЛПС число уринаций было меньше, чем у группы ФИЗ (со 2-го по 6-й опыт) и у группы ИНТ (4-5-й опыты). У самок различий между группами крыс по числу уринаций не наблюдалось. На другие анализируемые показатели поведения введение ЛПС не оказывало влияния. Таким образом, провоспалительный стресс в раннем возрасте с помощью введения ЛПС приводил к увеличению латентности переходов между двумя отсеками у самцов и самок, а также к уменьшению вегетативной реактивности у самцов.



**Рис. 11.** Влияние раннего провоспалительного стресса на выработку рефлекса активного избегания. По оси абсцисс - номер опыта, по оси ординат на А – средняя вероятность реакции избегания, на Б – латентность перехода между отсеками, на В – число уринаций за опыт. \* - статистически значимые отличия между группой ЛПС и группой ФИЗ или ИНТ ( $p < 0.05$ , Factorial ANOVA), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). n - число крыс в группе (самцы/самки). Остальные обозначения как на рис. 8.

#### 4.6. Обсуждение результатов.

Проведенное исследование болевой чувствительности к электрокожному раздражению по методике «flinch-jump» не выявило влияние введения ЛПС в раннем онтогенезе на пороги болевых реакций у взрослых крыс. Ранее также не было обнаружено влияния введения ЛПС на 14 день от рождения на пороги болевых реакций крыс в тесте на горячей пластинке (Doenni et al., 2017). Эти данные свидетельствуют о том, что изменения в условнорефлекторной деятельности под влиянием ЛПС не связаны с изменением болевой чувствительности крыс.

**Таблица 6.** Схематичное изображение влияния раннего провоспалительного стресса на выработку и угашение оборонительных рефлексов у самцов и самок крыс.

Пол	Пассивно-оборонительные рефлексы					Рефлекс активного избегания	
	Выработка УОР		Угашение УОР		Выработка УРПИ	Угашение УРПИ	Выработка УРАИ
	Контекст	Звук	Контекст	Звук			
Самцы	↑*	-	↓	↓	↑	↓	↓
Самки	-	-	↑	↑	-	-	↓

\* - примечание: УОР – классический условно-оборонительный рефлекс, УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания, УРАИ – условный рефлекс активного избегания. ↑ - усиление соответствующего поведения, ↓ - его ослабление. Прочерк – отсутствие изменений.

В настоящей работе ранний провоспалительный стресс оказывал сходное влияние на выработку и угашение двух форм пассивных оборонительных рефлексов (табл. 6) - классического оборонительного рефлекса и рефлекса пассивного избегания, причем воздействие на самцов и самок существенно различалось. У самцов провоспалительный стресс приводил к увеличению проявления условнорефлекторного страха на контекст при классическом рефлексе и проявления УРПИ при тестировании через 24 час после обучения, у самок – не оказывал значимого влияния. Угашение этих форм рефлексов у самцов после провоспалительного стресса

было затруднено, у самок - облегчалось при классическом рефлексе или оставалось без изменений по сравнению с контролем при УРПИ.

В литературе имеются сведения о влиянии раннего провоспалительного стресса на проявление условнорефлекторного страха и память, причем данные достаточно противоречивые. Большинство работ свидетельствуют о нарушении гиппокамповозависимых условных рефлексов - условнорефлекторного страха на контекст, но не на сигнал (Bilbo et al., 2006; Harre et al., 2008; Tchessalova, Tronson, 2019), а также о нарушении памяти о предметах при распознавании новых/знакомых объектов (Tchessalova, Tronson, 2019). В некоторых работах (Tishkina et al., 2016), также, как и в наших опытах, провоспалительный стресс, создаваемый путем введения ЛПС самцам на 3 и 5 день после рождения, приводил, наоборот, к увеличению проявления условнорефлекторного страха на контекст, но не на звук. Известно, что другие виды раннего стресса могут также приводить к увеличению проявления условнорефлекторного страха на контекст. Например, стресс, создаваемый путем нанесения неизбежных ударов током на 17 день от рождения, приводил к увеличению условнорефлекторного страха в разные периоды жизни (Quinn et al., 2014). Стресс в подростковом возрасте, создаваемый путем предъявления запаха хищника крысе, находящейся на приподнятой платформе, приводил к увеличению проявления условнорефлекторного страха на звук и нарушению его угашения у взрослых самцов (Toledo-Rodriguez, Sandi, 2007).

Существенные половые различия во влиянии раннего провоспалительного стресса проявились в нашей работе при угашении классического оборонительного рефлекса и УРПИ (табл. 6). Необходимо отметить, что в норме угашение условнорефлекторного страха быстрее проходит у интактных самок, чем у самцов (Daviu et al., 2014; Павлова с соавт., 2020). Возникает вопрос, почему у самок, получавших ЛПС стресс в раннем возрасте, условнорефлекторный страх при классическом условном рефлексе

угашается даже быстрее, чем у контрольных самок? Одно из возможных объяснений может быть связано с нарушением у них механизмов сигнальной и контекстуальной памяти. Действительно, известно, что острое введение ЛПС взрослым животным ведет к ухудшению памяти (Czerniawski, Guzowski, 2014; Cunningham, Sanderson, 2008; Pugh et al., 1998), что происходит за счет выделяемых микроглией и другими клетками провоспалительных цитокинов и хемокинов. Например, показано, что микроинъекция цитокина ИЛ-6 непосредственно в миндалину приводила к ухудшению выработки и нарушению угашения условнорефлекторного страха на звук (Hao et al., 2014). Предотвращение активации микроглии и снижение продукции цитокинов уменьшает нарушение памяти (Williamson et al., 2011). После инфекции в раннем онтогенезе клетки микроглии богатые CD11b+, являющиеся источником ИЛ-1бета, увеличивают свою чувствительность и продукцию цитокина (Williamson et al., 2011). Цитокины могут влиять на память не только прямо, но и опосредованно, вызывая торможение активности трофических факторов, в частности, BDNF, играющего важную роль в синаптической пластичности и памяти (Andero et al., 2014). Причем, надо помнить, что активность BDNF в гиппокампе и миндалине находится также под влиянием половых гормонов (Scharfman, MacLusky, 2014).

Кроме того, в электрофизиологических исследованиях на срезах было показано, что введение ЛПС в раннем онтогенезе приводит к дефициту длительной потенциации в поле CA1 гиппокампа, т.е. влияет на синаптическую пластичность (Tishkina et al., 2016). Интересно отметить, что у самок, получавших ранний ЛПС стресс, по сравнению с самцами наблюдается более выраженный дефицит длительной посттетанической потенциации в гиппокампе (Kudryashova et al., 2018). Нарушение пластичности в гиппокампе после введения ЛПС может быть связано с уменьшением экспрессии некоторых субъединиц NMDA рецепторов (Harre et al., 2008), а также накоплением кортикостерона и ИЛ-6 в гиппокампе (Onufriev et al., 2017).

Существуют определенные трудности для объяснения более длительного угашения условнорефлекторного страха у самцов после введения ЛПС. Ранее также наблюдали увеличение времени угашения условнорефлекторного страха на звуковой сигнал у взрослых крыс после введения ЛПС на 14 день от рождения (Doenni et al., 2017). Кроме того, происходило увеличение экспрессии cFos генов в центральном ядре миндалины, на основании чего предполагалось, что такая повышенная активация миндалины могла быть причиной нарушений в угашении страха (Doenni et al., 2017). Необходимо отметить, что влияние раннего нейровоспалительного стресса на самцов может служить моделью для возникновения тревожных расстройств и посттравматического стрессового расстройства. При этих заболеваниях, широко распространенных в клинике у человека, как известно, нарушаются механизмы угашения страха.

При выработке активного избегания у крыс ЛПС группы, как у самцов, так и самок наблюдались трудности в обучении и увеличение латентностей переходов между отсеками (табл. 6). Внутри ЛПС группы у самцов латентности переходов были больше, чем у самок. Ранее также было показано, что неонатальное введение ЛПС на 4 и 5 день жизни могло нарушать обучение активному избеганию у взрослых крыс (Kohman et al., 2008). Введение ЛПС непосредственно перед сеансами обучения активному избеганию у взрослых животных также приводило к дефициту в обучении (Sparkman et al., 2005). Как известно, выработка УРАИ состоит из двух фаз – выработки реакции избавления (escape), когда животное перебегает на безопасную половину камеры после получения болевого электрического раздражения. Вторая фаза выработки УРАИ связана с выполнением собственно реакции избегания (avoidance), при которой животное во время действия условного раздражителя успевает перебежать на безопасную половину камеры и избежать получения тока. Согласно двухфакторной теории избегания (Cain, 2019) escape фаза сопровождается сильным страхом, который постепенно ослабевает по мере

выработки avoidance реакции. Трудности с появлением escape и avoidance реакций у самцов ЛПС группы могут свидетельствовать о проявлении у них страха в большей степени, чем у контрольных животных. Подтверждают это предположение наши данные о большем проявлении у самцов условнорефлекторного страха на контекст при классическом условном рефлексе и при УРПИ после введения ЛПС.

### **Выводы:**

1. У самцов и самок, получавших на 3 и 5 дни жизни подкожное введение ЛПС, выработка классического оборонительного условного рефлекса не отличалась от контрольных животных. У самцов при тестировании через сутки проявление условно-рефлекторного страха на контекст, оцениваемое по реакции замирания, было выше, чем у контрольных животных. У самок, получавших ЛПС, различий с контрольными группами животных не наблюдалось.
2. После угашения классического оборонительного рефлекса у самцов, получавших ЛПС, условно-рефлекторный страх на звуковой сигнал оставался более выраженным, чем у контрольных животных. У самок ЛПС группы, наоборот, страх был менее выраженным, чем у контрольных животных, причем, как в условиях контекста, так и при действии сигнального раздражителя.
3. Реакция пассивного избегания лучше проявлялась и труднее угашалась у самцов, получавших ЛПС, чем у контрольных животных. У самок после введения ЛПС не было существенных различий в выработке и угашении реакции пассивного избегания по сравнению с контрольными животными.
4. Реакция двустороннего активного избегания труднее вырабатывалась у самцов и самок, получавших ЛПС, по сравнению с контрольными животными. Латентные периоды перебежки на безопасную половину камеры



были более длинными у самцов и самок, получавших ЛПС, чем у контрольных животных. В пределах ЛПС группы у самцов латентности были больше, чем у самок.

5. У самцов введение ЛПС в раннем онтогенезе приводит к облегчению выработки пассивно-оборонительных реакций и затруднению их угашения, а также ухудшению выработки активно-оборонительных реакций. По характеристикам оборонительного поведения взрослых животных, самки были более устойчивы к раннему провоспалительному стрессу, чем самцы.

## Глава 5. РЕЗУЛЬТАТЫ: Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых крыс в норме и после введения ЛПС.

### 5.1. Схема эксперимента.



**Рис. 12.** Схема проведения эксперимента. По горизонтали: постнатальные дни (ПНД), 0 ПНД – день родов. На 3 и 5 ПНД – инъекция ЛПС или физиологического раствора (контроль). Кровь – процедура сбора хвостовой крови.

Согласно дизайну эксперимента в тестах на социальное поведение принимали участие крысы в возрасте 3-5 мес. Вначале проводили тест социального взаимодействия в течение двух дней, затем следовал тест социального доминирования в трубе, после недельной социальной изоляции проводили тест «резидент-интрuder» и в конце тест сексуального предпочтения самок и самцов. Кровь для биохимического анализа базового уровня кортикостерона и ИЛ-1бета брали из хвостовой вены за несколько дней до начала проведения тестирования.

### 5.2. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте социального взаимодействия.

Сопоставление поведения крыс в Тесте 1 (без крысы-гостя) и Тесте 2 (с гостем во внутреннем отсеке) с помощью Repeated measures ANOVA выявило существенное влияние фактора НОМЕР ТЕСТА (табл. 7) на время взаимодействия, время нахождения в зоне взаимодействия и пройденную дистанцию в зоне взаимодействия. Значения всех указанных показателей увеличивались в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1 во всех группах, как у

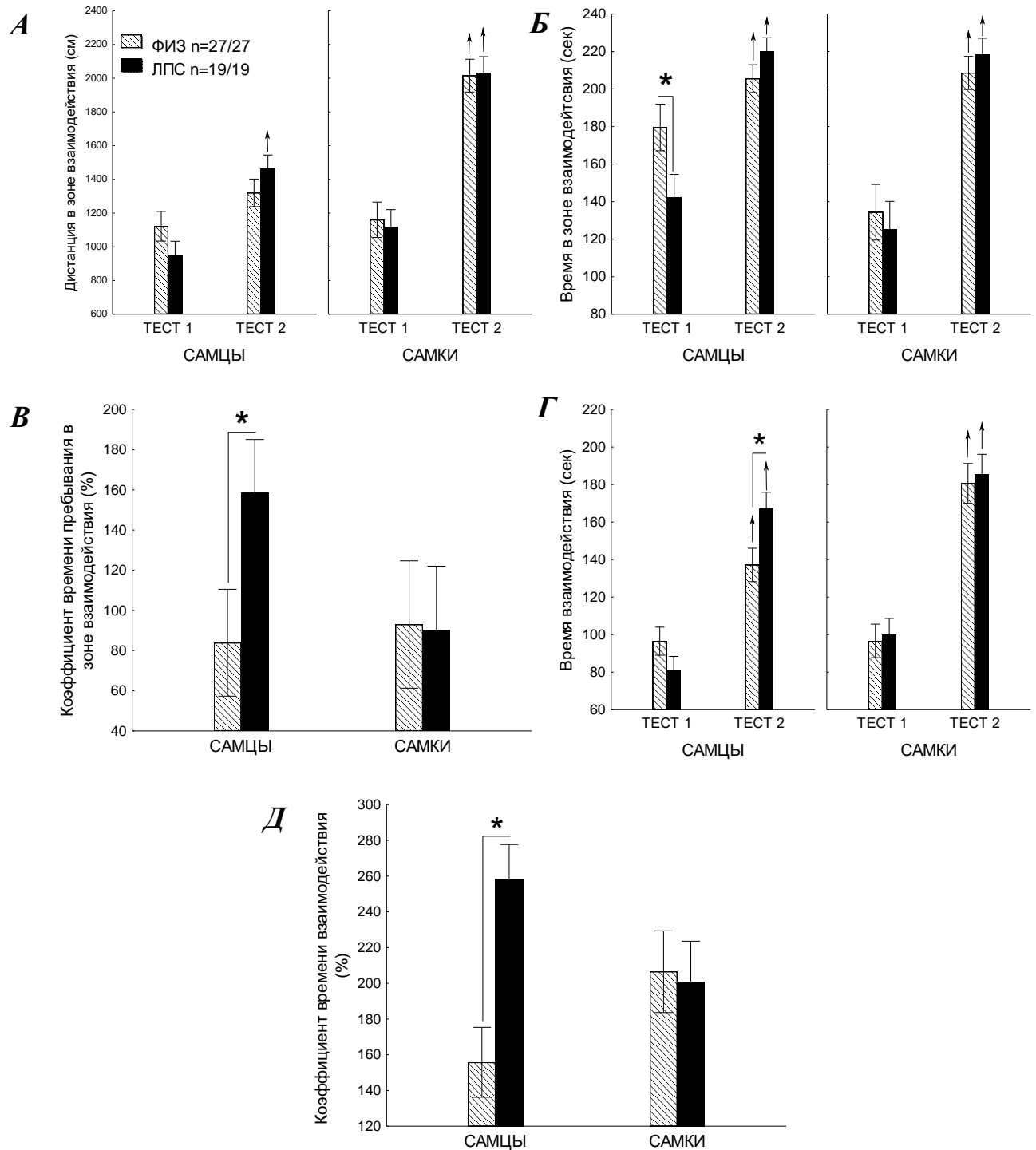
самцов, так и самок, что свидетельствовало о наличии социальной мотивации (рис. 13, А, Б, Г). Было обнаружено только 4 самца (15%) из ФИЗ группы, 1 самец (5%) из ЛПС группы, 1 самка (4%) из ФИЗ группы и 1 самка из ЛПС группы (5%) у которых время взаимодействия в Тесте 2 было ниже, чем в Тесте 1. У этих крыс можно было предположить слабую социальную мотивацию.

Фактор ПОЛ оказывал влияние на время взаимодействия и дистанцию в зоне взаимодействия. Также наблюдалось взаимодействие факторов ПОЛ и НОМЕР ТЕСТА во влиянии на время взаимодействия, время в зоне взаимодействия, дистанцию в зоне взаимодействия, при этом у самок дистанция в зоне взаимодействия и время взаимодействия в Тесте 2 были больше (рис. 13, А, Г), чем у самцов. Было обнаружено взаимодействие факторов НОМЕР ТЕСТА, ГРУППА и ПОЛ во влиянии на время взаимодействия. Post hoc анализ показал (рис. 13, Д), что в Тесте 2 у самцов группы ЛПС время взаимодействия было больше, чем в группе ФИЗ. Время нахождения в зоне взаимодействия в Тесте 1 было меньше у самцов из ЛПС

**Таблица 7.** Значения F и p при анализе с помощью Repeated measures ANOVA показателей поведения в тесте на социальное взаимодействие.

Показатели	Факторы					
	ПОЛ	НОМЕР ТЕСТА	ГРУППА	НОМЕР ТЕСТА x ПОЛ	НОМЕР ТЕСТА x ГРУППА	НОМЕР ТЕСТА x ГРУППА x ПОЛ
Время взаимодей-я	$F_{1,88}=7.19,$ $p=0.009$	$F_{1,88}=219.26,$ $p=0.000$	_*	$F_{1,88}=4.62,$ $p=0.034$	$F_{1,88}=5.56,$ $p=0.021$	$F_{1,88}=4.75,$ $p=0.032$
Время в зоне взаимодей-я	-	$F_{1,88}=130.78,$ $p=0.000$	-	$F_{1,88}=7.13,$ $p=0.009$	$F_{1,88}=8.86,$ $p=0.004$	-
Дистанция в зоне взаимодей-я	$F_{1,88}=23.43,$ $p=0.000$	$F_{1,88}=130.97,$ $p=0.0000$	-	$F_{1,88}=23.54,$ $p=0.000$	-	-

\* – прочерк свидетельствует о статистически незначимом влиянии фактора.



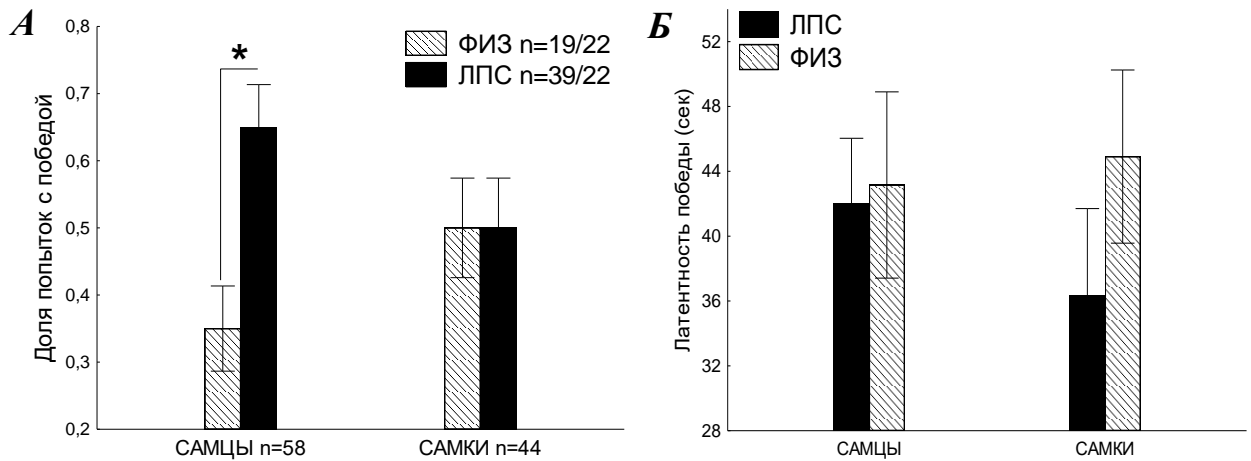
**Рис. 13.** Влияние раннего постнатального введения ЛПС на поведение взрослых крыс в тесте на социальное взаимодействие. А-Д – различные показатели поведения у крыс в Тесте 1 (без крысы-гостя во внутреннем отсеке камеры) и Тесте 2 (с крысой-гостем). ФИЗ – животные с введением физиологического раствора, ЛПС – крысы с введением ЛПС. n – число крыс в группе (Самцы/Самки). ↑ - увеличение ( $p < 0.05$ ) значений показателя поведения в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1, \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) между группой ЛПС и ФИЗ (на А, Б, Г - Repeated measures ANOVA, post hoc анализ, на В и Д – критерий Mann-Whitney U Test).

группы (рис. 13, Б). Сопоставление коэффициентов, рассчитанных по времени взаимодействия (рис. 13, Д), а также по времени пребывания в зоне взаимодействия (рис. 13, В), показало, что у самцов ЛПС группы коэффициенты были больше, чем у группы ФИЗ ( $U=178$ ,  $p=0,002$  и  $U=226$ ,  $p=0.017$  соответственно, Mann-Whitney U Test). У самок различий в коэффициентах взаимодействия не было обнаружено в группах ФИЗ и ЛПС. Полученные данные свидетельствуют о том, что ранний провоспалительный стресс оказал влияние на социальное взаимодействие только у самцов и привел к увеличению социальной мотивации.

### **5.3. Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное доминирование крыс.**

Доля попыток, увенчавшихся победой, у самцов ЛПС группы была больше ( $0.65$ ,  $\chi^2=13.79$ ,  $p=0.0002$ , 2 x 2 Table, критерий  $\chi^2$ ), чем у самцов группы ФИЗ группы ( $0.35$ ). У самок не было различий в числе победителей из ЛПС и ФИЗ групп (рис. 14, А). Не было обнаружено различий в латентности «побед» у крыс группы ФИЗ и ЛПС (рис. 14, Б). Таким образом, ранний провоспалительный стресс увеличивал социальное доминирование только у самцов, не влияя на самок.

При сопоставлении результатов тестов социального взаимодействия и социального доминирования у самцов была обнаружена слабая, но статистически значимая положительная корреляция между числом побед в трубе и длительностью социального взаимодействия в Тесте 2 ( $r=0.291$ ,  $p=0.033$ ), что может говорить о высокой социальной мотивации у доминантных самцов. У самок не было обнаружено статистически значимой корреляции между данными показателями ( $r=-0.182$ ,  $p=0.275$ ).

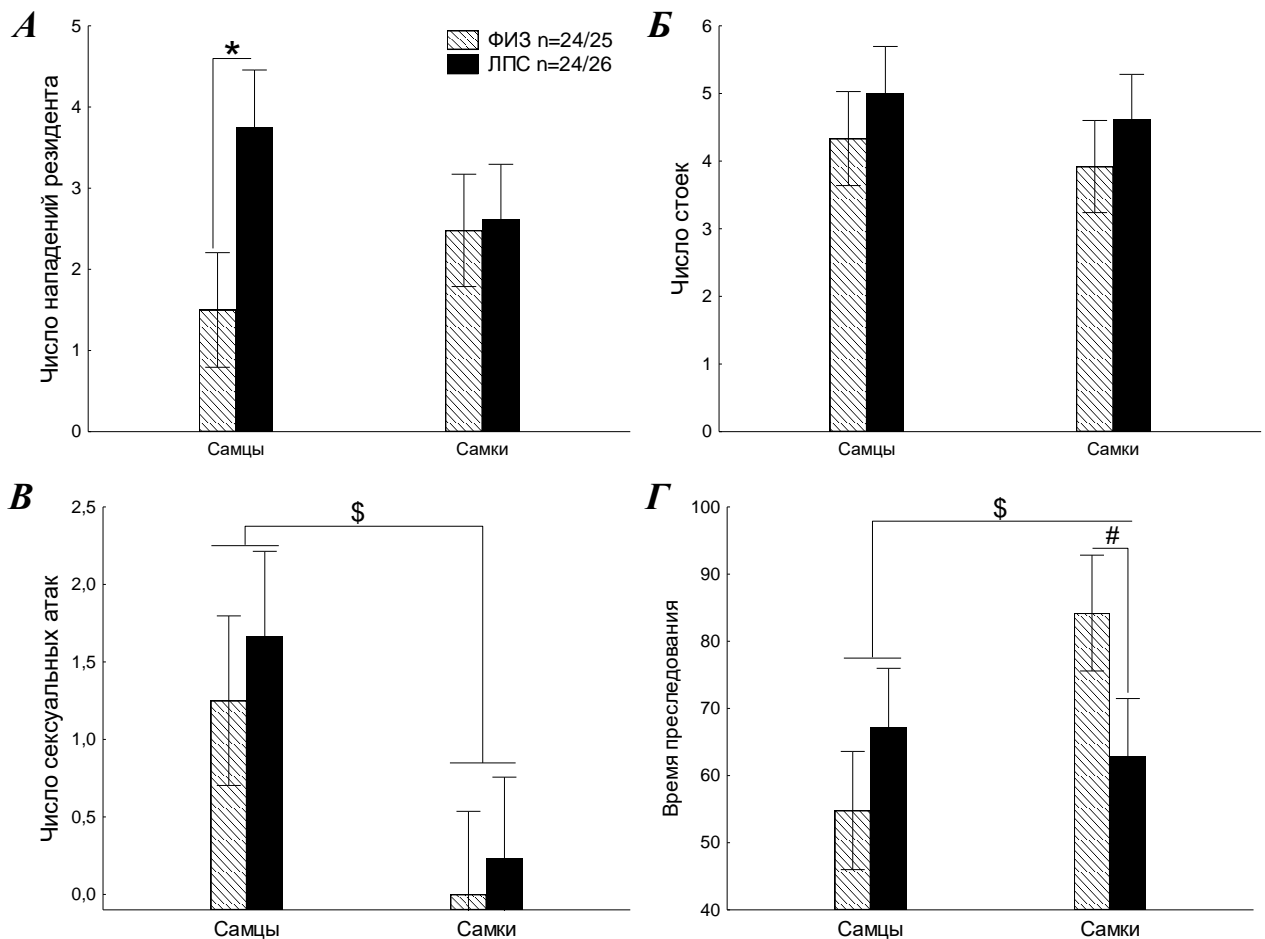


**Рис. 14.** Влияние раннего постнатального введения ЛПС на поведение взрослых крыс в тесте на социальное доминирование в трубе. А и Б – различные показатели поведения в тесте. ФИЗ – животные с введением физиологического раствора, ЛПС – крысы с введением ЛПС. n – число попыток. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) между группой ЛПС и ФИЗ (критерий  $\chi^2$ , 2 x 2 Table, Nonparametric Statistics).

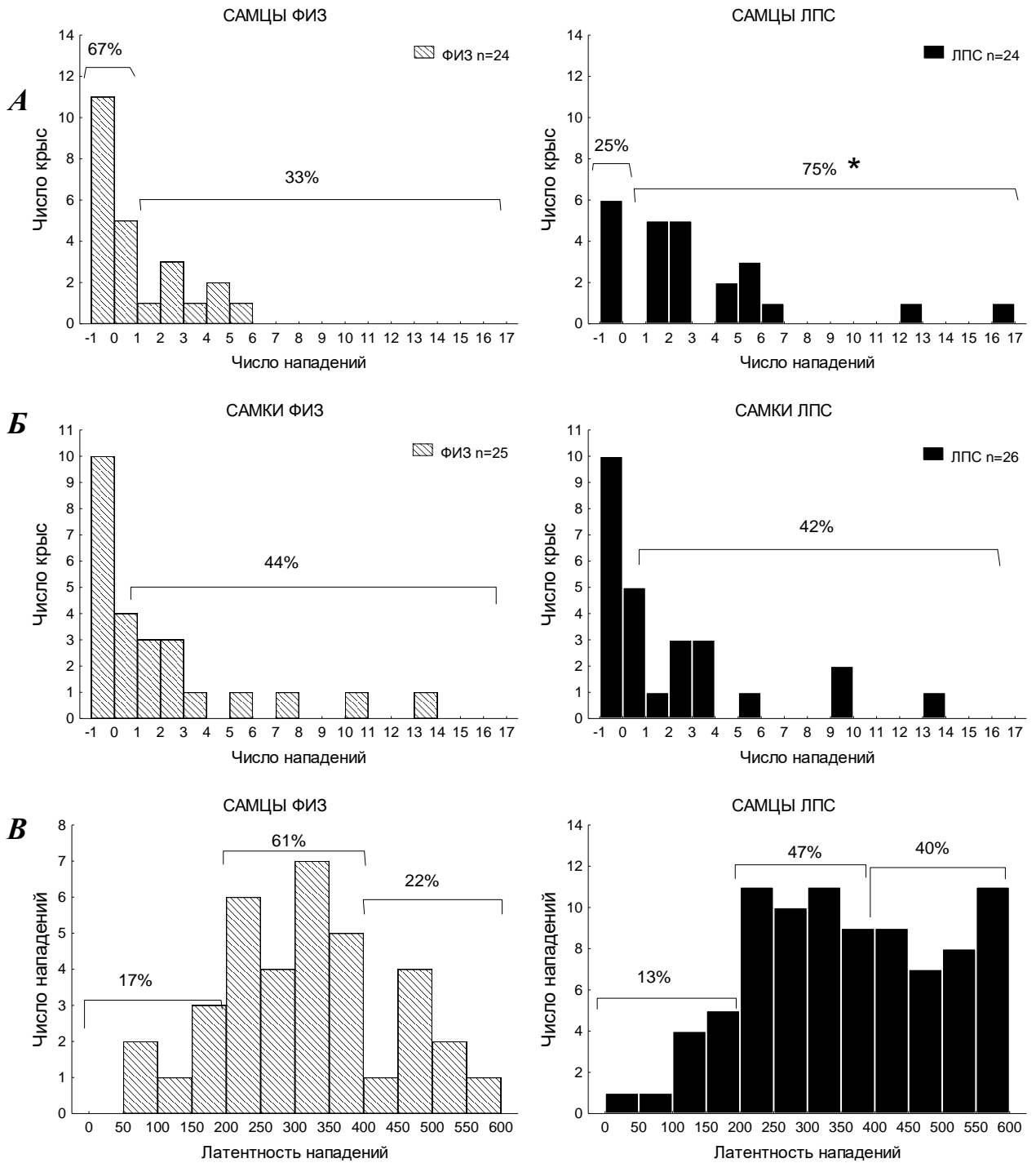
#### 5.4. Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте «Резидент-Интрuder».

Сопоставление с помощью критерия Манна-Уитни в группах ФИЗ и ЛПС различных показателей поведения показало, что среднее число нападений резидента на интродера было больше у самцов ЛПС группы, чем у самцов ФИЗ группы ( $U=181.5$ ,  $p=0,028$ , Mann-Whitney U Test), число нападений у самок из ЛПС и ФИЗ групп не отличалось ( $U=315.5$ ,  $p=0.858$ ) (рис. 15, А). Число стоек друг напротив друга (рис. 15, Б), число случаев агрессивного груминга, число сексуальных атак (рис. 15, В) не различалось у крыс в ФИЗ и ЛПС группах, как у самцов, так и самок. Половые различия были обнаружены по числу сексуальных атак (рис. 15, В) и времени преследования с аногенитальным обнюхиванием (рис. 15, Г), у самцов число сексуальных атак было больше ( $U=969$ ,  $p=0.002$ ), а время преследования меньше ( $U=921$ ,  $p=0.047$ ), чем у самок. Анализ гистограмм распределения крыс самцов в зависимости от числа нападений за опыт (рис. 16, А) показал, что в группе ЛПС было больше агрессивных самцов (75%), совершавших от 2 до 17

нападений на интродера за опыт, по сравнению с группой ФИЗ (33%,  $\chi^2=8.39$ ,  $p=0.004$ ). Число таких агрессивных самок не отличалось в группах ФИЗ (44%) и ЛПС (42%, рис. 16, Б). Анализ гистограмм распределения нападений в зависимости от их латентности (рис. 16, В), показал, что максимальное число нападений наблюдалось в интервале от 200 до 400 с как в группе ФИЗ (61%), так и ЛПС (47%). В конце опыта от 400 до 600 с число нападений у самцов группы ФИЗ уменьшалось до 22%, а в группе ЛПС оставалось на высоком уровне (40%). Таким образом, тест резидент интродер показал увеличение числа агрессивных крыс самцов в группе ЛПС.



**Рис. 15.** Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте «резидент-интродер». А-Г - сопоставление различных показателей поведения тесте в ФИЗ и ЛПС группах. ФИЗ – животные с введением физиологического раствора, ЛПС – крысы с введением ЛПС. \* - статистически значимые различия между ФИЗ и ЛПС группой ( $p<0.05$ , на А-Д - Mann-Whitney U Test), # - тенденция ( $0.05\leq p<0.1$ ) \$ - различия между самцами и самками ( $p<0.05$ ).



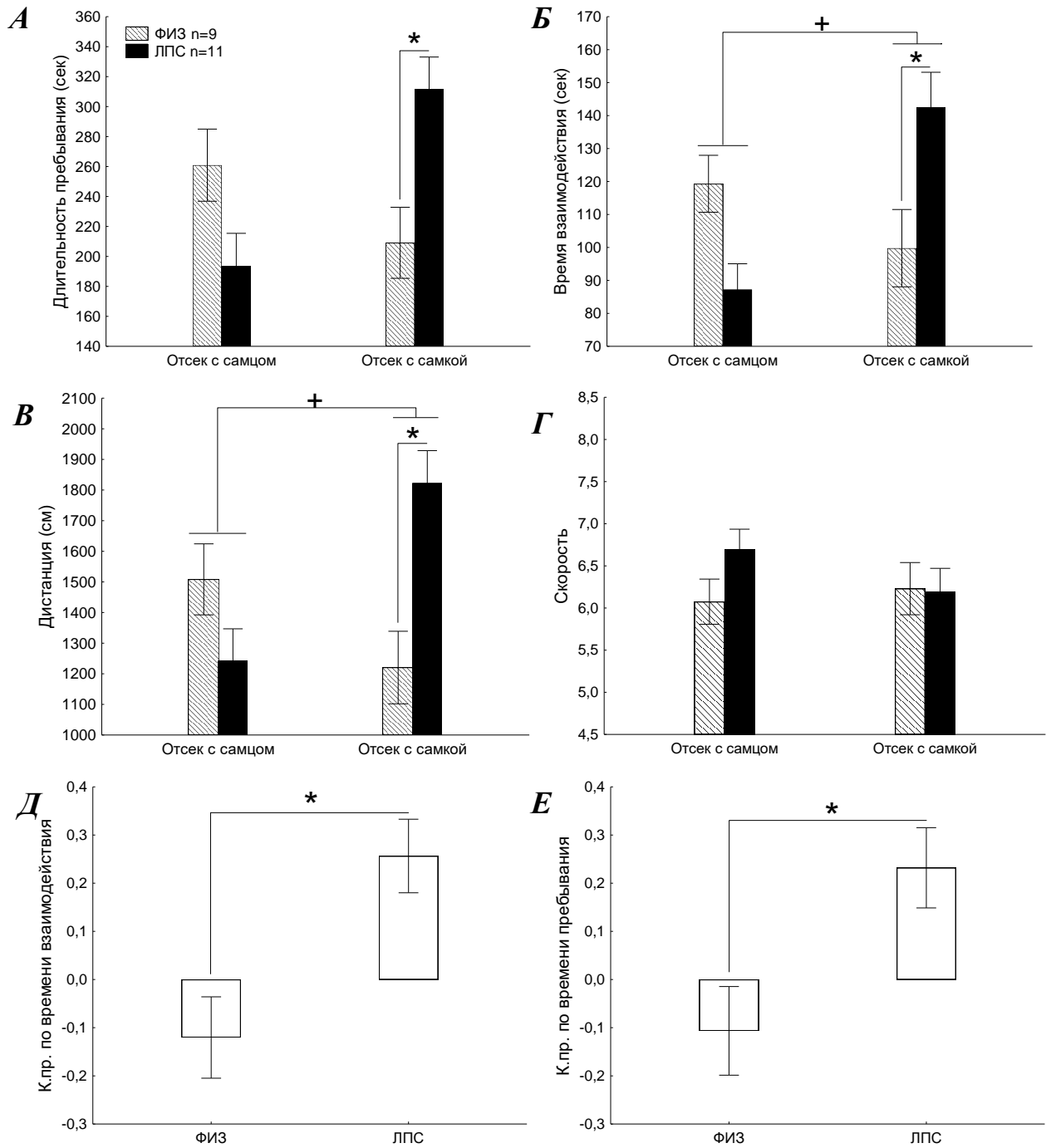
**Рис. 16.** Влияние раннего провоспалительного стресса на поведение крыс в тесте «резидент-интродер». А, Б – гистограммы распределения крыс в зависимости от числа нападений на интродера за опыт, В – распределение нападений в зависимости от их латентности. ФИЗ – животные с введением физиологического раствора, ЛПС – крысы с введением ЛПС. \* - статистически значимые различия между ФИЗ и ЛПС группой ( $p < 0.05$ ). На А-В - критерий  $\chi^2$ , 2 x 2 Table, Nonparametric Statistics.



Проводили сопоставление поведения крыс в тесте на социальное доминирование и в тесте резидент интродер. К группе «победителей» относили крыс, выигравших два раза в трубе, а к группе «проигравших» - не выигравших ни разу. Сопоставление с помощью критерия Манна-Уитни различных показателей поведения крыс самцов в тесте «резидент-интродер» в группах победителей и проигравших не выявило статистически значимых различий ( $p > 0.05$  и  $p > 0.1$ ). Сопоставление поведения самок в тесте резидент интродер в группах победителей и побежденных выявило большее число стоек ( $Z = 2.449490$ ,  $p = 0.014$ ) в группе побежденных, чем в группе победителей. Корреляционный анализ обнаружил отрицательную корреляцию между числом побед в трубе и числом стоек в тесте резидент интродер у самок ( $r = -0.919$ ,  $p = 0.000$ ).

### **5.5. Влияние раннего провоспалительного стресса на сексуальное предпочтение крыс.**

Анализ поведения крыс самцов в трехкамерном тесте с помощью Repeated measures ANOVA обнаружил взаимодействие факторов ВИД ОТСЕКА и ГРУППА во влиянии на длительность пребывания крыс ( $F_{1,18} = 7.554$ ,  $p = 0.013$ ), на время взаимодействия ( $F_{1,18} = 13.222$ ,  $p = 0.002$ ) и пройденную дистанцию ( $F_{1,18} = 9.578$ ,  $p = 0.006$ ) в отсеках с самцом и самкой. Post-hoc анализ показал, что у самцов ЛПС группы по сравнению с ФИЗ группой в отсеке с самкой были больше длительность пребывания (рис. 17, А), время взаимодействия (рис. 17, Б) и пройденная дистанция (рис. 17, В). Данные показатели не различались в отсеке с самцом у крыс ЛПС и ФИЗ групп. Скорость движение не различалась у крыс ФИЗ и ЛПС групп в разных отсеках (рис. 17, Г). Коэффициенты предпочтения между отсеками, рассчитанные по времени взаимодействия ( $F_{1,18} = 10.944$ ,  $p = 0.004$ , One-Way ANOVA) или по времени пребывания ( $F_{1,18} = 7.439$ ,  $p = 0.014$ ), показывают, что самцы ЛПС в отличие от самцов группы ФИЗ предпочитали отсек с самкой (рис. 17, Д и Е). Полученные данные свидетельствуют о большем предпочте-



**Рис. 17.** Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное предпочтение самцов отсека с самцом или самкой. А - Е – сопоставление различных показателей поведения в группах ФИЗ и ЛПС. \* - статистически значимые различия между группами ФИЗ и ЛПС, + - между отсеками ( $p < 0.05$ , на А-Г - Repeated measures ANOVA, post hoc анализ, на Д и Е – One Way ANOVA). К пр. – коэффициент предпочтения.

нии самок у самцов ЛПС группы, чем у животных ФИЗ группы, т.е. о большей сексуальной мотивации у животных после раннего провоспалительного стресса. В то же время корреляционный анализ между числом сексуальных атак на однополого партнера в тесте резидент интродер и коэффициентом предпочтения по времени взаимодействия в тесте на сексуальное предпочтение не выявил статистически значимой корреляции ( $r=0.185$ ,  $p=0.447$ ).

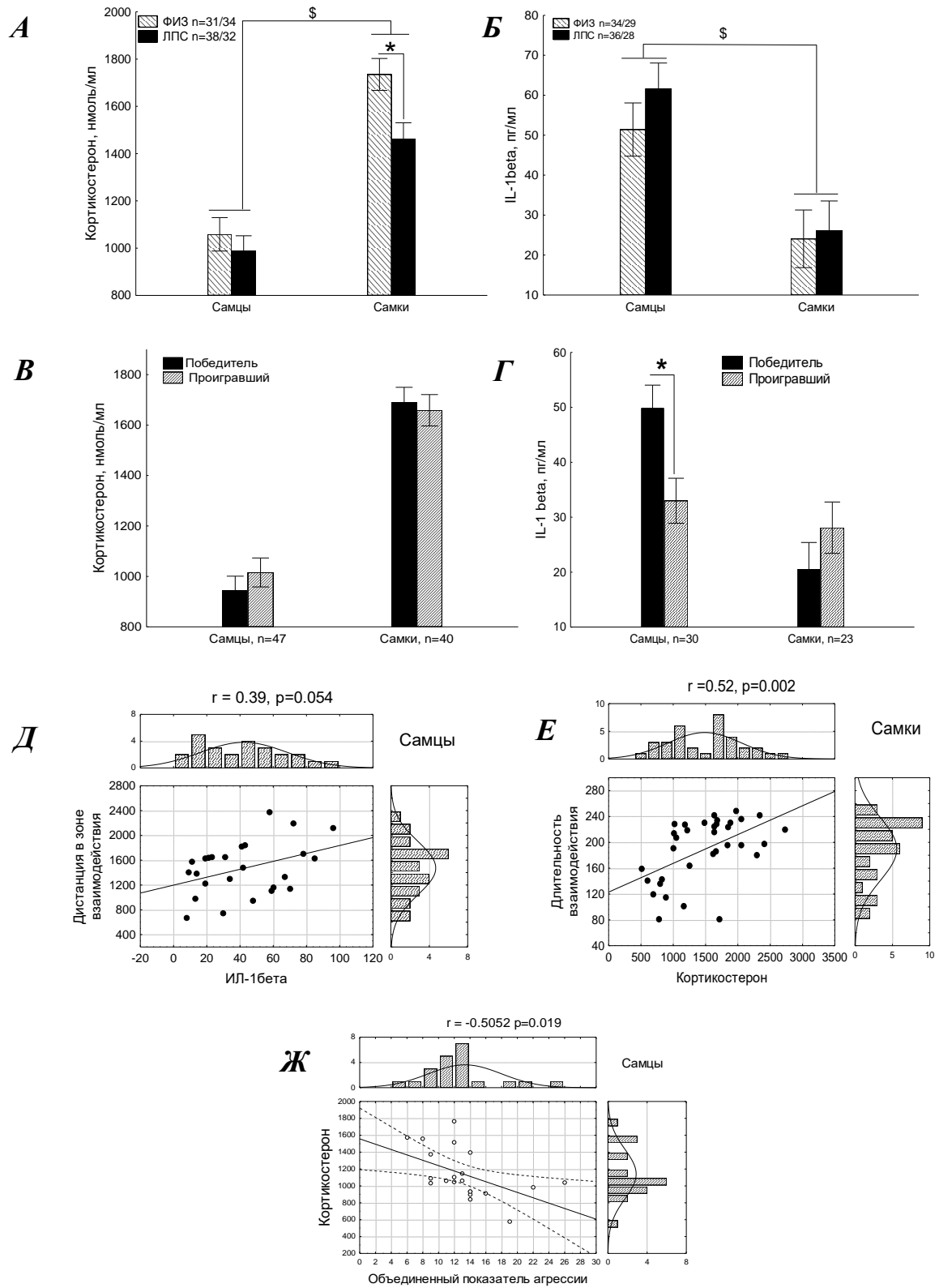
### **5.6. Сопоставление показателей социального поведения и биохимических показателей крови.**

Кровь на ИФА брали за сутки до начала поведенческого тестирования с целью оценить базовый уровень кортикостерона и ИЛ-1бета (рис. 12). На рис. 18, А и Б представлены усредненные значения по уровню кортикостерона и ИЛ-1бета у всех крыс, у которых исследовалось социальное поведение. Видно, что для самок был характерен более высокий уровень кортикостерона, чем для самцов (рис. 18, А). У самцов наблюдался, наоборот, более высокий уровень ИЛ-1бета, чем для самок (рис. 18, Б). Различия между группами ФИЗ и ЛПС наблюдались только у самок по уровню кортикостерона, в ЛПС группе уровень был ниже, что соответствует ранее полученным данным в главе 3 (рис. 6). Далее в работе проводили сопоставление данных по биохимии и поведению животных в различных тестах. На рис. 18, В и Г представлены результаты сопоставления поведения в тесте на социальное доминирование с уровнями кортикостерона и ИЛ-1бета в сыворотке крови. На уровень интерлейкина оказывал влияние фактор ПОЛ ( $F_{1,51}=13.78$ ,  $p=0.001$ , Factorial measures ANOVA), у самцов уровень интерлейкина был выше, также наблюдалось взаимодействие фактора ПОЛ и ПОБЕДА ( $F_{1,51}=7.82$ ,  $p=0.007$ ). Post hoc анализ показал, что уровень ИЛ-1бета был выше у самцов-победителей по сравнению с самцами-проигравшими (рис. 18, Г). У самок не наблюдалось различий в уровне ИЛ-1бета у проигравших и победителей (рис. 18, Г). На уровень кортикостерона оказывал влияние фактор ПОЛ ( $F_{1,85}=133.37$ ,  $p=0.000$ ).

Уровень кортикостерона у самок был выше по сравнению с самцами (рис. 18, В). Post hoc анализ показал, что у победителей и побежденных не наблюдалось различий по уровню кортикостерона, как у самцов, так и самок (рис. 18, В). Таким образом, для доминантных самцов характерен высокий уровень ИЛ-1бета.

На рис. 18 Д и Е представлены результаты корреляционного анализа между показателями поведения в Тесте 2 на социальное взаимодействие и уровнем кортикостерона и ИЛ-1бета в сыворотке крови. У самок была обнаружена статистически значимая положительная корреляция между длительностью взаимодействия в Тесте 2 и уровнем кортикостерона ( $r=0.52$ ,  $p=0.002$ ), но не ИЛ-1бета ( $r=0.231$ ,  $p=0.210$ ). У самцов не было обнаружено значимой корреляции между длительностью взаимодействия в Тесте 2 и уровнем кортикостерона ( $r=-0.163$ ,  $p=0.252$ ) или ИЛ-1бета ( $r=-0.113$ ,  $p=0.449$ ). У самцов была обнаружена тенденция к положительной корреляции между уровнем ИЛ-1бета и дистанцией в зоне взаимодействия в Тесте 2 на социальное взаимодействие ( $r=0.39$ ,  $p=0.054$ ). Таким образом, высокая социальная мотивация коррелировала у самок с высоким уровнем кортикостерона, а у самцов - с высоким уровнем ИЛ-1бета.

Проведенный корреляционный анализ между различными показателями агрессивного поведения в тесте «резидент-интродер» и показателями уровня ИЛ-1бета в сыворотке крови не выявил статистически значимой корреляции как у самцов, так и самок ( $p>0.1$ ). Между уровнем кортикостерона в сыворотке крови и объединенным показателем агрессии у самцов (сумма числа нападений, случаев агрессивного груминга и числа преследований) была обнаружена отрицательная корреляция ( $r= -0.5052$   $p=0.019$ ) (рис. 18, Ж). Наиболее агрессивными были самцы с низким уровнем кортикостерона. У самок не было обнаружено статистически значимой корреляции между уров-



**Рис. 18.** Сопоставление различных показателей социального поведения и уровня кортикостерона или ИЛ-1бета в сыворотке крови. \* - статистически значимые различия между победителями и проигравшими (Factorial ANOVA, post hoc анализ). \$ - различия между самцами и самками ( $p < 0.05$ ). На В-Д корреляционные матрицы,  $r$  - коэффициент корреляции. Остальные обозначения как на рис. 10.

нем кортикостерона и объединенным показателем агрессии ( $r = -0.162$ ,  $p > 0.05$ ).

### 5.7. Обсуждение результатов.

В нашей работе впервые было показано, что введение ЛПС на ранних сроках постнатального развития приводит к увеличению социального доминирования у взрослых крыс самцов в тесте в трубе (табл. 8). Ранее увеличение социального доминирования наряду с увеличением агрессивного поведения наблюдали в модели депрессии, создаваемой с помощью хронического непредсказуемого стресса средней силы во взрослом возрасте (Yang et al., 2015), или в биохимической модели депрессии, вызываемой с помощью диеты с низким уровнем триптофана (Uchida et al., 2005). Травмы мозга в подростковом возрасте (Semple et al., 2012) также могли приводить к увеличению социального доминирования. Вместе с тем, содержание в обогащенной среде (Cao et al., 2017), частое использование «беличьего колеса» (Klomberg et al., 2002), хроническая боль (Tansley et al., 2019), хронический стресс обездвижения (Park et al., 2018), наоборот, способны делать крыс более подчиненными в тесте на социальное доминирование.

**Таблица 8.** Схематичное изображение влияния раннего провоспалительного стресса на социальное взаимодействие, социальное доминирование и внутривидовую агрессию у самцов и самок крыс.

Пол	Социальное взаимодействие	Социальное доминирование	Внутривидовая агрессия
Самцы	↑*	↑	↑
Самки	-	-	-

\* - примечание: ↑ - усиление соответствующего поведения. Прочерк – отсутствие изменений.

Необходимо отметить, что тест на социальное доминирование в трубе в настоящее время используется достаточно широко у грызунов, как в работах на крысах, так и мышах, при этом часто проводится сопоставление результатов с другими тестами на социальную доминантность (конкурентный

поиск пищи, предпочтение при спаривании, тест теплого места, маркировка территории мочой и др.) (Cao et al., 2017; Fan et al., 2019). Считается, что тест на доминирование в трубе определяет территориальное доминирование, но не учитывает агрессию и может использоваться у животных, живущих группами (Pallé et al., 2019). Анализ нейронных механизмов социальной иерархии приводит к выводу о роли префронтальной коры в качестве центрального регулятора (Wang et al., 2014). Анализ транскриптома в медиальной префронтальной коре обнаружил различия в экспрессии определенных генов у доминантов и подчиненных (Pallé et al., 2019), в частности различалась экспрессия вомероназальных и обонятельных рецепторов в коре мозга. Авторы приходят к выводу, что различные гены в медиальной префронтальной коре могут быть использованы как биомаркеры социального доминирования. Кроме того, обнаружена корреляция между социальным доминированием и фосфорилированием AMPA рецепторов в медиальной префронтальной коре, которое может также служить биомаркером социального доминирования (Park et al., 2018). Можно предположить, что в нашей работе ранний провоспалительный стресс мог вызвать нейровоспаление в префронтальной коре, что в свою очередь повлияло на экспрессию генов, отвечающих за социальное доминирование.

Кроме увеличения социального доминирования самцы ЛПС группы в нашей работе показали большее время взаимодействия в тесте на социальное взаимодействие по сравнению с контрольной группой (табл. 8). Корреляционный анализ показал наличие корреляционной связи между числом побед в трубе и длительностью социального взаимодействия. Эти данные свидетельствуют о высокой социальной мотивации у самцов ЛПС группы. В ряде работ также была продемонстрирована связь между доминантностью и высокой социальной мотивацией (Kunkel, Wang, 2018). С исследовательской мотивацией авторы не увидели связи. В литературе имеются противоречивые данные относительно влияния раннего

провоспалительного стресса на социальное взаимодействие крыс. В одной из первых работ (Breivik et al., 2002) после введения ЛПС на 3 и 5 день после рождения у взрослых крыс наблюдалось уменьшение времени социального взаимодействия при нахождении опытной крысы в одной клетке с незнакомой крысой. В дальнейшем, было установлено, что социальное взаимодействие уменьшается за счет контактов, направленных на крысу из ЛПС группы (MacRae et al., 2015). Как известно, крысы избегают общения с больными особями. Так, острое введение большой дозы ЛПС, вызывающей болезненное состояние у крысы, приводило к подавлению социального взаимодействия в отношении больного партнера (Hamasato et al., 2017) и могло вызывать упреждающий иммунный ответ у здоровой крысы в виде увеличения содержания TNF- $\alpha$  в обонятельных луковицах.

Необходимо отметить, что в отличие от наших данных с ранним постнатальным введением ЛПС, активация иммунной системы матери (введение ЛПС беременным самкам) приводила к нарушениям социального поведения аутистического спектра у потомства. Самцы из такого потомства проводили меньше времени за активным социальным взаимодействием с незнакомой крысой, показали больше повторяющегося поведения, нарушения ультразвуковой коммуникации и имели отличия в бактериях в фекалиях, что характерно для аутистических заболеваний у людей (Lee et al., 2021; Xu et al., 2017; Kirsten et al., 2018; Baharnoori et al., 2012). В нашей работе число крыс с низкой социальной мотивацией было крайне мало (4-15%). Кроме того, активация иммунной системы матери во время беременности могла приводить к шизофреноподобным изменениям в поведении потомства, о чем судили по дефициту предимпульсного торможения (Chamera et al., 2020).

В нашей работе введение ЛПС в раннем онтогенезе привело к изменениям уровня агрессии у взрослых крыс (табл. 8). У самцов ЛПС группы по сравнению с ФИЗ группой было больше нападений на интродеров, в данной



группе возрастало число агрессивных крыс, совершавших не менее двух нападений на интродера в тесте, причем число нападений не уменьшалось к концу опыта, а держалось на высоком уровне все время наблюдения. В настоящей работе использовали модификацию теста «резидент-интродер» после недельной социальной изоляции, что определялось тем, что социальная изоляция, даже кратковременная, приводит к увеличению агрессивности крыс (Oliveira et al., 2019; Viro et al., 2017; Toth et al., 2012). Известно, что агрессия после социальной изоляции приводит к активации областей мозга, которые контролируют межсамцовую агрессию – медиальной и латеральной орбитофронтальной коры, передней цингулярной коры, медиальной и базолатеральной миндалины, «гипоталамической области атак» (гипокомпальные механизмы, задействованные в контроле акта нападения), паравентрикулярного ядра гипоталамуса и др. (Toth et al., 2012).

В литературе имеются только единичные и достаточно противоречивые работы по влиянию раннего провоспалительного стресса на агрессивное поведение. Введение ЛПС на 3 и 5 день после рождения сирийским хомякам привело к увеличению агрессивности у взрослых самок в отношении самцов при размножении (Sylvia, Demas, 2017). У мышей агрессивной линии введение ЛПС в возрасте 5 и 6 дней приводило к уменьшению частоты агрессивных атак и увеличению иммобильности (Granger et al., 1996). В литературе имеются работы, в которых показана связь между доминантностью и агрессивностью, агрессию внутри группы обычно проявляет доминирующая особь (Barabas et al., 2021; Кудрявцева, 2013). В тоже время в некоторых работах на грызунах не обнаруживается различий в уровне агрессивности у доминантов и подчиненных (Hladlovská et al., 2015). О различиях в нейронных механизмах, определяющих социальное доминирование и агрессивность, свидетельствуют данные об уменьшении агрессивного поведения, но не доминантности после стресса под влиянием антидепрессанта флюоксетина (Yang et al., 2015).

Авторы делают вывод о том, что доминирование может быть отделено от агрессивности.

Необходимо отметить, что для всех самцов, как ФИЗ, так и ЛПС группы, были характерны сексуальные атаки на интродеров-самцов в тесте «резидент-интродер», проводимом после недельной социальной изоляции. Исходя из этих данных, возникла необходимость провести тест на социальное предпочтение самцов и самок. Можно было предположить, что большое число сексуальных атак самцов резидентов на интродеров отражает увеличение сексуальной мотивации после стресса социальной изоляции. Проведенный тест на сексуальное предпочтение показал, что у самцов ЛПС группы по сравнению с ФИЗ группой была больше длительность пребывания в отсеке с самкой и время взаимодействия с самкой, что можно рассматривать как свидетельство увеличения сексуальной мотивации. В литературе имеются сведения о том, что различные виды стрессов могут оказать влияние на сексуальное поведение самцов. Стресс в ранней жизни в виде недостатка строительного материала для гнезда или сепарация от матери в раннем онтогенезе приводил к увеличению сексуальной мотивации, что проявлялось в увеличении времени, проводимом в отсеке с противоположным полом в трехкамерном тесте на сексуальное предпочтение (Davis et al., 2020). Увеличение сексуальной мотивации после стресса в виде сепарации от матери в раннем онтогенезе могло проявляться и в виде уменьшения латентностей копулятивного поведения самцов (Greisen et al., 2005). У самцов ФИЗ группы предпочтение отсека с самкой не проявлялось, что возможно было связано с тем, что в качестве «гостей» использовали самок на стадии диэструс. Подтверждают это предположение данные о большем предпочтении интактных рецептивных самок в стадии эструс по сравнению с овариэктомированными самками (Greisen et al., 2005). Однако в других работах было обнаружено противоположное влияние раннего провоспалительного стресса на сексуальное поведение. Введение ЛПС на 10 и

25 день приводила к задержке полового созревания у самцов и уменьшению сексуального поведения у самцов и самок крыс (Mayila et al., 2018; 2020). Ранний стресс в виде изоляции от матери на несколько часов со 2 по 10 постнатальный день также мог приводить к нарушениям в сексуальном поведении самцов, проявляющихся в большей латентности взбирания на самку, уменьшении животных с эякуляцией (Rhees et al., 2001).

В нашей работе в ряде случаев была обнаружена связь между показателями социального поведения и уровнем кортикостерона и ИЛ-1бета в сыворотке крови. Впервые было показано, что у самцов крыс победителей в тесте на социальное доминирование в трубе наблюдался более высокий уровень ИЛ-1бета, чем у побежденных крыс. У крыс с высокой социальной мотивацией также наблюдался более высокий уровень ИЛ-1бета у самцов и более высокий уровень кортикостерона у самок. Причем биохимические показатели определялись задолго до начала социального тестирования и, возможно, способствовали проявлению особенностей социального поведения. Косвенным подтверждением наших результатов являются данные о том, что экспрессия маркера активации микроглии (IBA-1) и активации генов, связанных с пролиферацией микроглии (CSF1 и ИЛ-34) снижается в гипоталамусе при уменьшении доминирования у крыс после содержания в обогащенной среде (Cao et al., 2017). Введение ингибитора микроглии уменьшало процент победителей в тесте на социальное доминирование. В нашей работе мы не получили корреляционной связи между показателями агрессивного поведения и уровнем ИЛ-1бета в сыворотке крови, с уровнем кортикостерона такая связь была выявлена. В литературе имеются сведения о связи более выраженных проявлений агрессивности с высоким базовым уровнем кортикостерона у крыс (Gulevich et al., 2021). У животных и у человека, у агрессивных особей показан увеличенный уровень провоспалительных цитокинов (Takahashi et al., 2018; Alperina et al., 2019; Idova et al., 2016). Наличие корреляции между соотношением

провоспалительных/противовоспалительных цитокинов и агрессией позволила ряду авторов высказать гипотезу о связи агрессии с изменениями в уровне цитокинов (Das et al., 2016).

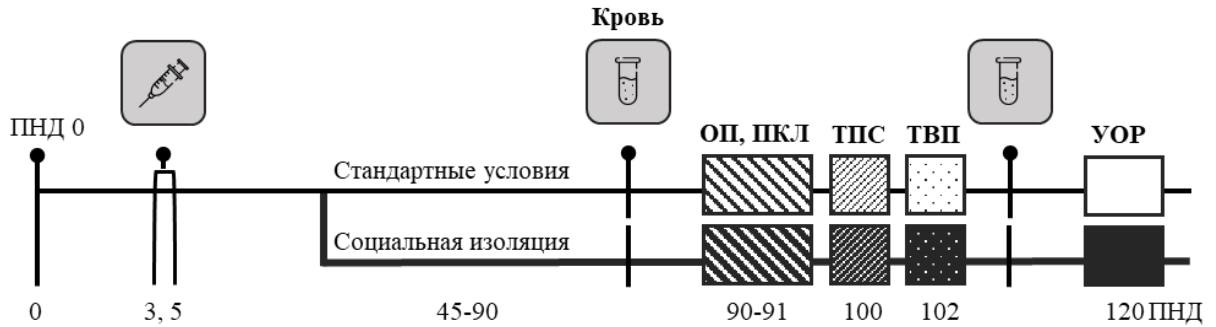
В заключении необходимо отметить, что ранний провоспалительный стресс оказывал влияние только на самцов в тестах на социальное доминирование, взаимодействие и агрессию. Ранее мы также наблюдали более выраженные изменения в тревожно-депрессивном поведении и оборонительном поведении самцов под влиянием введения ЛПС в раннем онтогенезе (глава 3 и 4). Большая уязвимость самцов к влиянию ЛПС объясняется тем, что нейровоспалительный процесс протекает по-разному у самцов и самок (Григорьян, 2020). У самцов и самок может различаться набор выделяемых цитокинов, их локализация и клеточный источник при нейровоспалении. У самцов микроглия является источником цитокинов при нейровоспалении, их экспрессия увеличивается после стресса, у самок не происходит увеличения выделения цитокинов из микроглии (Fonken et al., 2018). Кроме того, эстрогены самок способны оказывать противовоспалительное влияние. Известно, что эстрогены ускоряют протекание воспалительного процесса в сторону его деактивации, большая роль при этом отводится противовоспалительному ИЛ-4 (Villa et al., 2015), и эстрогены способны затормозить выработку провоспалительных цитокинов (Najjar et al., 2018).

**Выводы:**

1. Введение ЛПС (50 мкг/кг) на 3 и 5 постнатальные дни приводило к увеличению социального доминирования у взрослых самцов в тесте в трубе по сравнению с контрольными крысами, которым вводили физиологический раствор. Для самцов победителей в тесте на социальное доминирование был характерен более высокий базовый уровень ИЛ-1бета в сыворотке крови по сравнению с побежденными крысами.
2. У самцов ЛПС группы по сравнению с контролем увеличивалось время взаимодействия в тесте на социальное взаимодействие, что свидетельствовало об увеличении социальной мотивации.
3. В тесте «резидент-интродер» после недельной социальной изоляции у самцов ЛПС группы по сравнению с контролем было больше нападений на интродера, увеличивалось число агрессивных крыс, совершавших не менее двух нападений на интродера, причем высокая вероятность нападений сохранялась до конца опыта.
4. В трех-камерном тесте на сексуальное предпочтение самцы ЛПС группы по сравнению с самцами ФИЗ группы больше времени проводили в отсеке с самкой и больше времени взаимодействовали с ней. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении сексуальной мотивации у самцов ЛПС группы.
5. У самок не наблюдалось изменений в социальном доминировании, взаимодействии и в агрессивном поведении после введения ЛПС в раннем онтогенезе.

## Глава 6. РЕЗУЛЬТАТЫ: Влияние социальной изоляции на тревожно-депрессивное и оборонительное поведение крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса.

### 6.1. Схема эксперимента.



**Рис. 19.** Схема проведения экспериментов. По горизонтали: постнатальные дни (ПНД), 0 ПНД – день родов. На 3 и 5 ПНД – инъекция ЛПС или физиологического раствора (контроль). Кровь – процедура сбора хвостовой крови. ОП – открытое поле. ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт. ТПС – тест на предпочтение сахарозы. ТВП – тест вынужденного плавания. УОР – классический оборонительный рефлекс на звук.

Как видно на рис. 19 содержание в условиях социальной изоляции начиналось в возрасте 45 дней и длилось до окончания эксперимента. Кровь для ИФА анализа брали из хвостовой вены у животных, уже находившихся в различных условиях содержания, за сутки до начала поведенческих тестов, а также через 30-40 мин после стрессирующего воздействия (ТВП).

### 6.2. Влияние социальной изоляции на вес крыс.

Вес самцов в три месяца был значительно больше, чем у самок ( $t$ -test,  $t=23.7$ ,  $p=0.000$ ). Влияние фактора ГРУППА крыс не было выявлено, но фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ оказывал влияние на вес самцов ( $F_{1,50}=6.6534$ ,  $p=0.013$ ), но не самок ( $F_{1,39}=0.24251$ ,  $p=0.625$ ). СИ вызывала увеличение веса ( $p<0.05$ ) только у самцов ( $354.9\pm 6.7$  г), но не сказалась на весе самок ( $227.4\pm 6.5$  г) по сравнению с животными в стандартных условиях ( $333.1\pm 4.0$  г и  $223.6\pm 4.8$  г соответственно).

### **6.3. Влияние социальной изоляции на тревожно-депрессивное поведение крыс.**

#### ***6.3.1. Влияние социальной изоляции на поведение крыс в открытом поле.***

Из всех анализируемых показателей поведения в ОП только часть имела нормальное распределение. С помощью Factorial ANOVA анализировали влияние факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ, ПОЛ, ГРУППА на эти параметры, значения F и p представлены в табл. 9. Остальные параметры анализировали с помощью Mann-Whitney U test. Из таблицы видно, что фактор ПОЛ оказывал существенные влияния на ряд параметров поведения, имеющих нормальное распределение, кроме того, были обнаружены половые различия и по другим параметрам, имеющим ненормальное распределение. У самок, содержащихся в стандартных условиях, по сравнению с самцами была больше пройденная дистанция и скорость (рис. 20, В,  $p < 0.05$ , post hoc анализ Factorial ANOVA), было больше выходов в центр и меньше время, проведенное на периферии поля (рис. 20, А, Б,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). Таким образом, самки отличались меньшей тревожностью и большей двигательной активностью, что соответствует ранее полученным данным (Павлова с соавт., 2020).

Сопоставление эффективности влияния социальной изоляции на крыс разных групп показало, что число выходов в центр (рис. 20, А) было меньше у самок ЛПС группы после СИ, чем у животных в стандартных условиях ( $U=27.0$ ,  $Z=2.78$ ,  $p=0.005$ ), у самок ФИЗ группы различие проявлялось на уровне тенденции ( $U=34.5$ ,  $Z=1.72$ ,  $p=0.084$ ), у самцов ФИЗ и ЛПС группы различий не наблюдалось. Время на периферии поля (рис. 20, Б), было больше у самок ФИЗ группы ( $U=2.5$ ,  $Z=-2.3$ ,  $p=0.021$ ) и ЛПС группы ( $U=22.5$ ,  $Z=-3.0$ ,  $p=0.003$ ) после СИ, а также у самцов ЛПС группы ( $U=23.0$ ,  $Z=-2.8$ ,  $p=0.005$ ), чем у животных в стандартных условиях. Данные результаты свидетельствуют об увеличении тревожности у всех самок, а также самцов ЛПС группы под

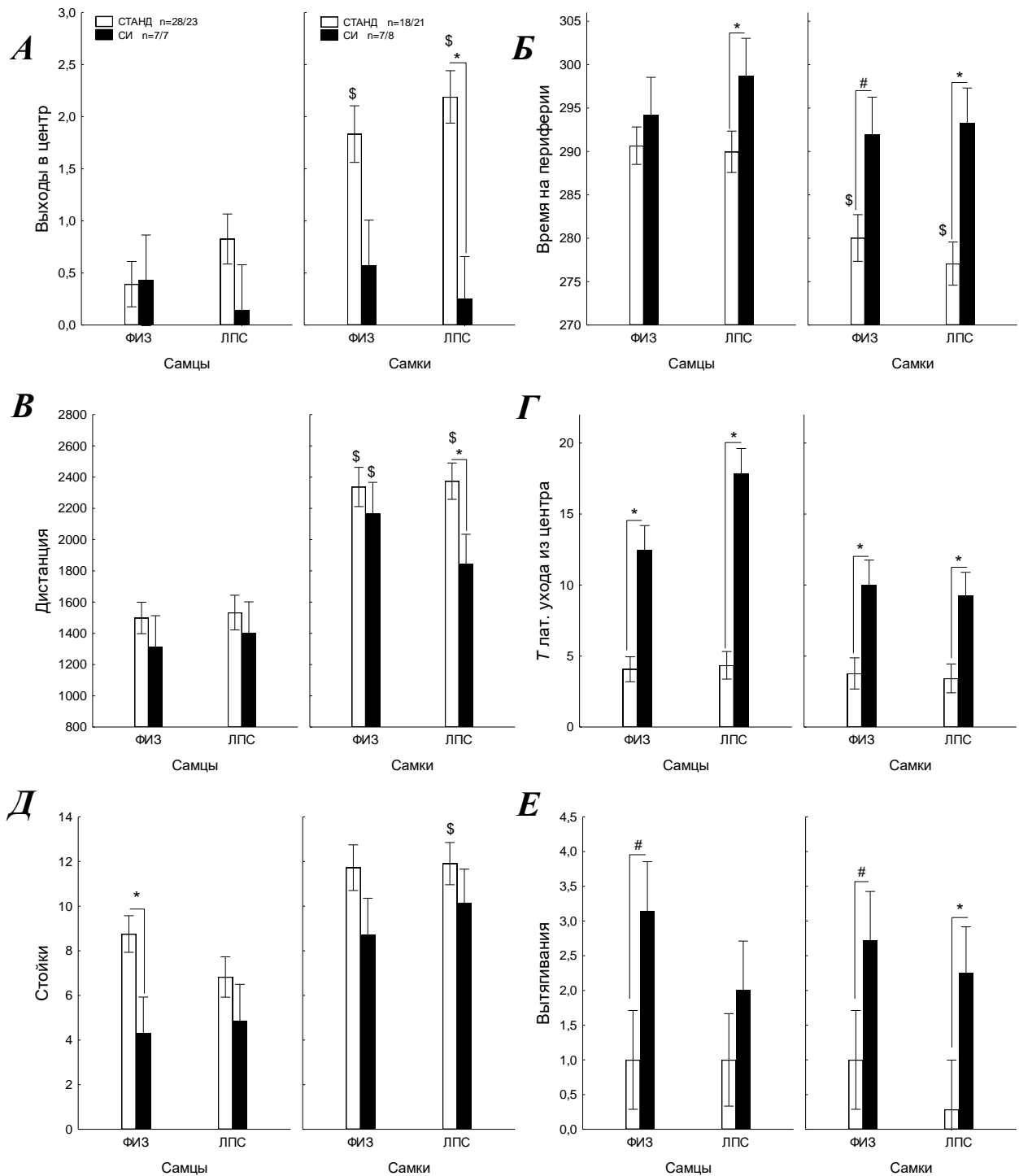
влиянием социальной изоляции, наибольшие изменения происходили у самок ЛПС группы. Пройденная дистанция и скорость были меньше только у самок ЛПС группы после СИ, чем при стандартных условиях (рис. 20, В, post hoc анализ  $p < 0.05$ ). Характерной особенностью поведения крыс после СИ был большой латентный период ухода из центра поля (рис. 20, Г), куда крыс сажали в начале опыта (для самцов ФИЗ группы  $U=16.5$ ,  $Z=-3.4$ ,  $P=0.001$ , для самцов ЛПС группы  $U=15.0$ ,  $Z=-3.2$ ,  $p=0.001$ , для самок ФИЗ группы  $U=10.0$ ,  $Z=-3.2$ ,  $p=0.001$ , для самок ЛПС группы  $U=3.5$ ,  $Z=-3.9$ ,  $p=0.000$ ). Это отражало, по-видимому, торможение двигательной активности крысы при попадании в авersiveную обстановку. Замирания при этом не наблюдали, животное совершало небольшие движения, крутилось на месте. Меньшее число стоек (рис. 20, Д) было обнаружено только у самцов ФИЗ группы после СИ, чем в стандартных условиях ( $U=40.0$ ,  $Z=2.4$ ,  $p=0.017$ ). Число вытягиваний было больше у самок ЛПС группы после СИ, чем в стандартных условиях (рис. 20, Е,  $U=10$ ,  $Z=-2.1$ ,  $p=0.037$ ). На другие показатели поведения в ОП СИ не оказывала влияния.

**Таблица 9.** Значения F и p при анализе с помощью Factorial ANOVA некоторых показателей поведения в ОП и ПКЛ у крыс, содержащихся в условиях социальной изоляции.

Тест	Показатель поведения	Факторы				
		УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ	ПОЛ	ГРУППА	УСЛ.СОД. x ПОЛ	УСЛ.СОД. x ПОЛ x ГРУППА
ОП	Дистанция	$F_{1,111}=4.9716$ , $p=0.028$	$F_{1,111}=42.373$ , $p=0.000$	-*	-	-
	Скорость	$F_{1,111}=5.3558$ $p=0.023$	$F_{1,111}=43.337$ , $p=0.000$	-	-	-
ПКЛ	Дистанция	-	$F_{1,111}=34.17$ , $p=0.000$	-	-	-
	Скорость	-	$F_{1,111}=33.330$ $p=0.000$	-	-	-
	Г выглядыв-я в ОР	-	-	-	-	-

\* – поперек свидетельствует о статистически незначимом влиянии фактора.





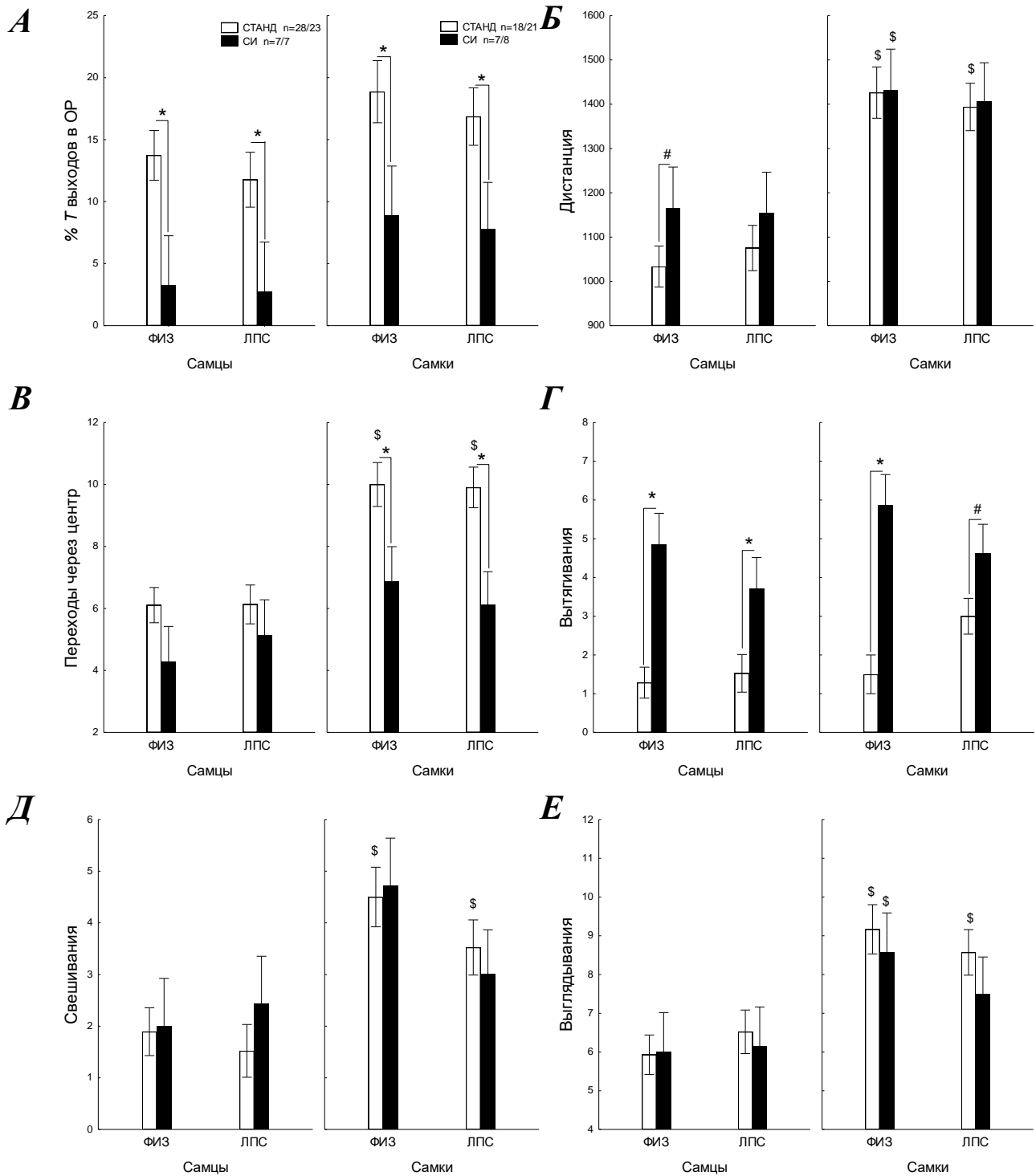
**Рис. 20.** Влияние социальной изоляции крыс на различные параметры поведения (А-Е) в открытом поле. ФИЗ – группа крыс с постнатальным введением физиологического раствора, ЛПС – с введением липополисахарида. СТАНД – стандартные условия содержания, СИ – социальная изоляция. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , на А, Б, Г, Д, Е - Mann-Whitney U test, на В – post hoc анализ, Factorial ANOVA) по сравнению со стандартными условиями содержания, # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ), \$ - различия между самцами и самками внутри группы.

Таким образом, животные ЛПС группы были более чувствительны к СИ. Под влиянием изоляции у них происходило увеличение тревожности, снижение двигательной активности, торможение двигательной активности в начале эксперимента, а также увеличение поведения по оценке риска. СИ у контрольных животных вызывала меньшие изменения в поведении: уменьшалась исследовательская активность, тормозилась двигательная активность в самом начале эксперимента. Самки ЛПС группы по сравнению с самцами ЛПС группы были более подвержены изменениям в поведении при СИ.

### ***6.3.2. Влияние социальной изоляции на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.***

Из табл. 9 видно, что фактор ПОЛ оказывал существенное влияние на ряд параметров поведения. Самки проходили большую дистанцию, с большей скоростью, чем самцы ( $p < 0.05$ , post hoc анализ, Factorial ANOVA, рис. 21, Б). Кроме того, самки при стандартных условиях содержания совершали больше переходов через центр (рис. 21, В,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test), совершали больше свешиваний и выглядываний (рис. 21 Д, Е), т.е. отличались большей двигательной и исследовательской активностью (табл. 9).

Подробный анализ влияния СИ на разные группы крыс показал, что процент времени выходов в открытые рукава лабиринта был меньше после СИ у всех групп крыс, чем у животных в стандартных условиях (рис. 21, А, для самцов ФИЗ группы  $U=48$ ,  $Z=2.1$ ,  $p=0.039$ , для самцов ЛПС группы  $U=38$ ,  $Z=2.1$ ,  $p=0.037$ , для самок ФИЗ группы  $U=27$ ,  $Z=2.2$ ,  $p=0.029$ , для самок ЛПС группы  $U=44$ ,  $Z=1.9$ ,  $p=0.049$ ), что свидетельствовало об увеличении тревожности. Пройденная дистанция не менялась под влиянием СИ (рис. 21, Б), число переходов через центр было меньше у самок ФИЗ группы ( $U=31$ ,  $Z=2.0$ ,  $p=0.049$ ) и ЛПС группы ( $U=43$ ,  $Z=2.0$ ,  $p=0.045$ ). У большинства групп крыс после СИ число вытягиваний было больше по сравнению со стандартны-



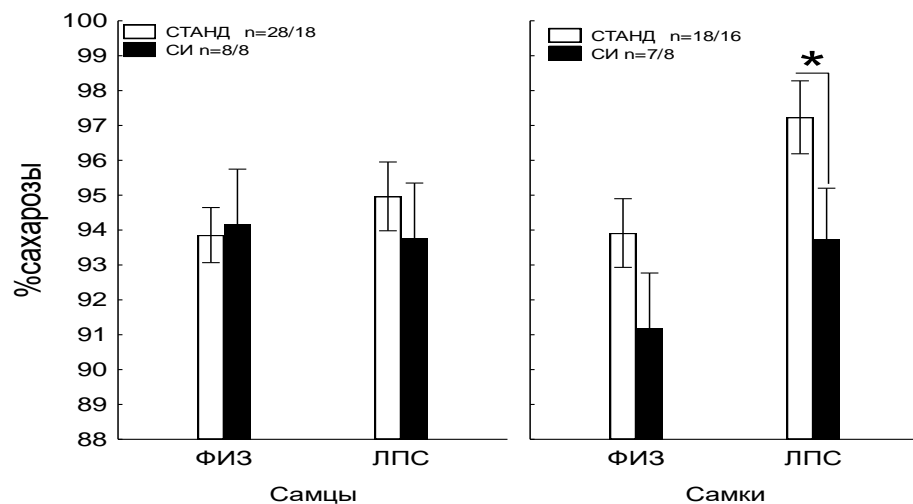
**Рис. 21.** Влияние социальной изоляции крыс на различные параметры поведения (А-Е) в приподнятом крестообразном лабиринте. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , на А, В, Г, Д, Е - Mann-Whitney U test на Б – post hoc анализ, Factorial ANOVA) по сравнению со стандартными условиями содержания, # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ), \$ - различия между самцами и самками внутри группы. Остальные обозначения как на рис. 20.

ми условиями (для самцов ФИЗ группы  $U=20$ ,  $Z=-3.2$ ,  $p=0.001$ , для самцов ЛПС группы  $U=13.5$ ,  $Z=-3.1$ ,  $p=0.002$ , для самок ФИЗ группы  $U=7.5$ ,  $Z=-3.4$ ,  $p=0.001$ , рис.21, Г). Другие показатели поведения в ПКЛ не менялись под влиянием СИ. Таким образом, СИ вызывала у всех групп крыс в ПКЛ увеличение тревожности, элементов поведения по оценке риска (вытягивания). Некоторое снижение двигательной активности происходило только у самок.

### 6.3.3. Влияние социальной изоляции на предпочтение сахарозы.

При анализе процента выпитой сахарозы было обнаружено, что содержание в условиях социальной изоляции не повлияли на процент выпитой сахарозы у самцов как в группе ФИЗ, так и ЛПС. У самок в группе ЛПС+СИ процент выпитой сахарозы был ниже, чем в группе ЛПС+СТАНД ( $p<0.05$ , Mann-Whitney U test), а между группой ФИЗ+СИ и группой ФИЗ+СТАНД отличий обнаружено не было.

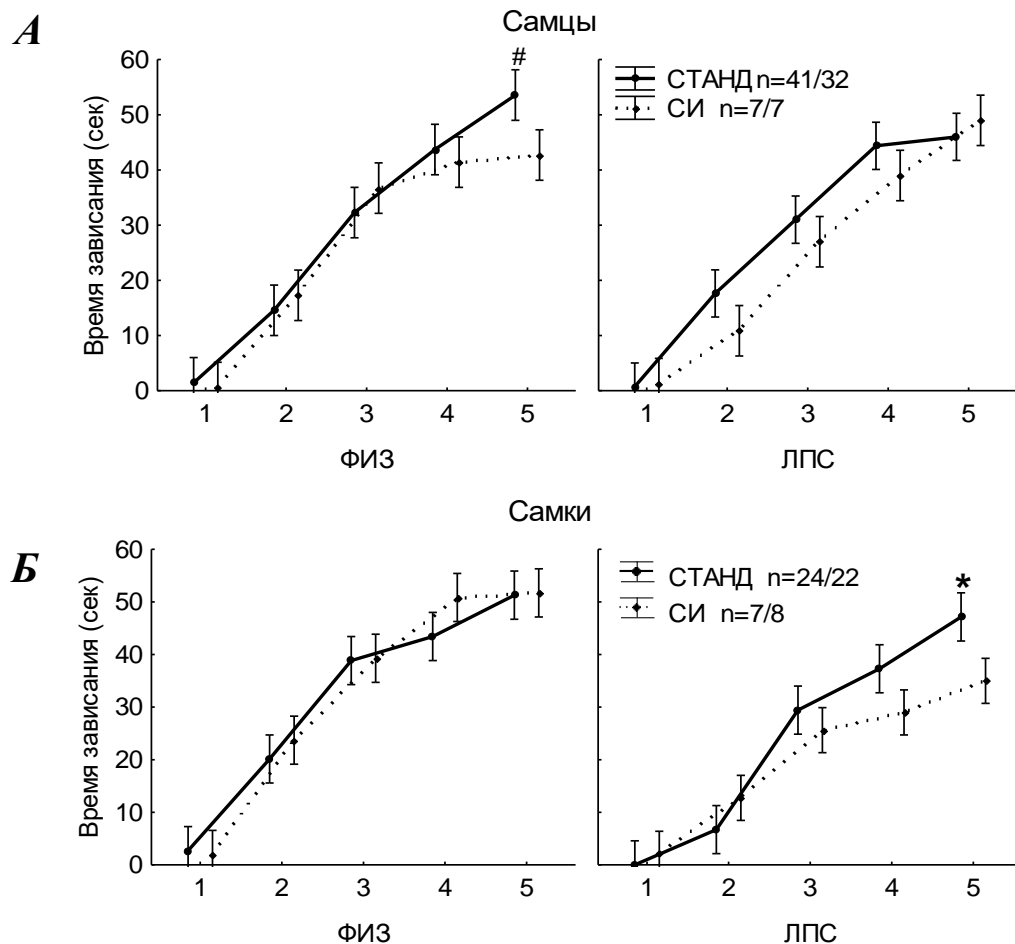
Таким образом, тест на предпочтение сахарозы выявил признаки депрессивно-подобного поведения только у самок ЛПС группы после СИ.



**Рис. 22.** Влияние социальной изоляции на процент предпочтения сахарозы в тесте на процент потребления сахарозы. \* - статистически значимые различия между крысами в стандартных условиях и в социальной изоляции ( $p<0.05$ , Mann-Whitney U test). Остальные обозначения как на рис. 20.

### 6.3.4. Влияние социальной изоляции на поведение крыс в тесте вынужденного плавания.

На время зависания крыс в течение пяти минут теста вынужденного плавания существенное влияние оказывали факторы ВРЕМЯ ( $F_{4,249}=121.48$ ,  $p=0.000$ ), ГРУППА ( $F_{1,249}=14.680$ ,  $p=0.000$ ), наблюдалось взаимодействие факторов ПОЛ x ГРУППА ( $F_{1,249}=7.237$ ,  $p=0.008$ ). СИ не привела к изменениям во времени зависания у самцов группы ФИЗ и ЛПС, а также самок группы ФИЗ (рис. 23, А, Б). У самок ЛПС группы после изоляции время зависания было меньше на пятой минуте теста, чем у группы ЛПС+СТАНД (рис. 23, Б).



**Рис. 23.** Влияние социальной изоляции на время зависания в тесте вынужденного плавания. А – время зависания по минутно в тесте у самцов, Б – у самок. По оси абсцисс на А и Б – время, мин. \* - статистически значимые различия между крысами в стандартных условиях и в социальной изоляции ( $p < 0.05$ , post hoc анализ, Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 20.

Таким образом, судя по результатам теста вынужденного плавания, содержание в условиях СИ оказало влияние только на самок ЛПС группы.

#### **6.4. Влияние социальной изоляции на выработку, проявление и угашение классического оборонительного рефлекса.**

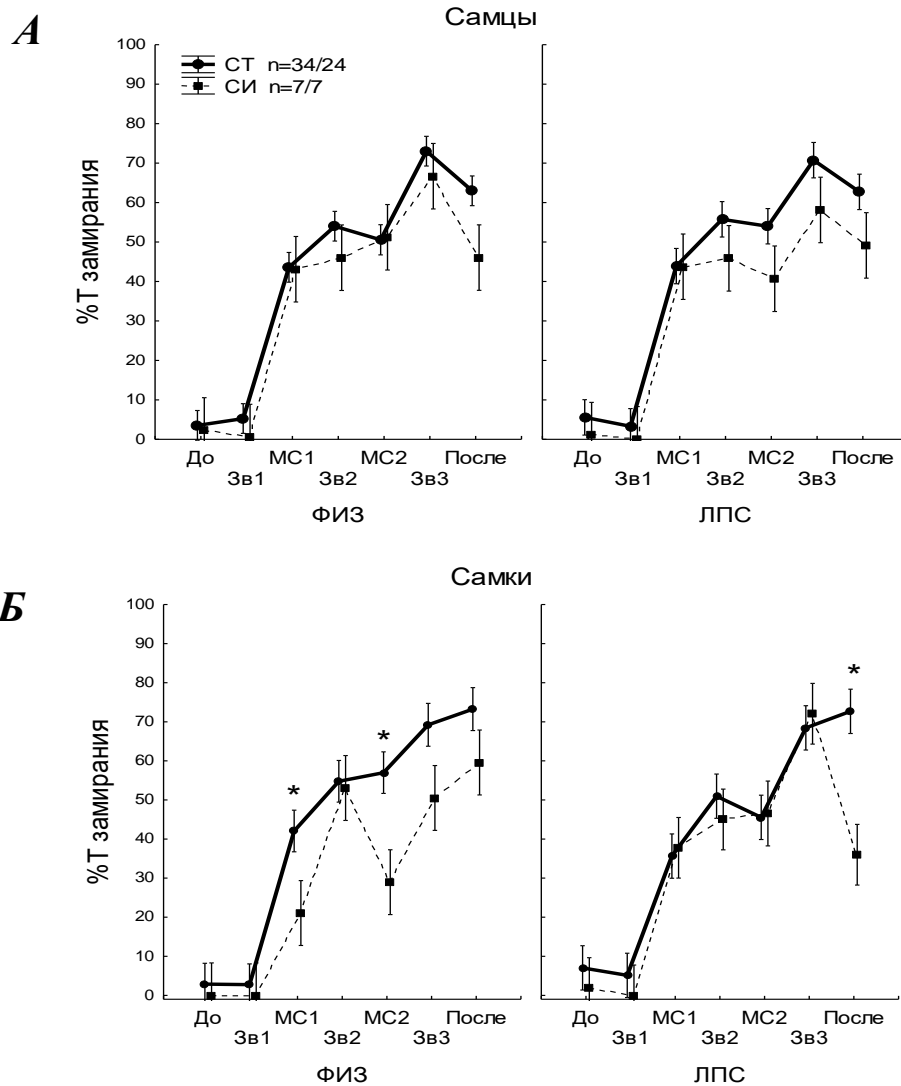
##### ***6.4.1. Влияние социальной изоляции на выработку классического оборонительного рефлекса на звук.***

Анализ с помощью Factorial ANOVA динамики обучения крыс выявил влияние факторов ВРЕМЯ ( $F_{6,953}=121.63$ ,  $p=0.000$ ) и УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ( $F_{1,953}=21.373$ ,  $p=0.000$ ). Социальная изоляция не оказывала влияния на время замирания у самцов (рис. 24, А). У самок, наоборот, социальная изоляция приводила к уменьшению в целом времени замирания в группах ФИЗ+СИ и ЛПС+СИ по сравнению с группами ФИЗ+СТАНД и ЛПС+СТАНД соответственно (рис. 24, Б). Статистически значимые различия наблюдались только в отдельных интервалах времени. Таким образом, социальная изоляция затрудняла обучение у самок, но не у самцов.

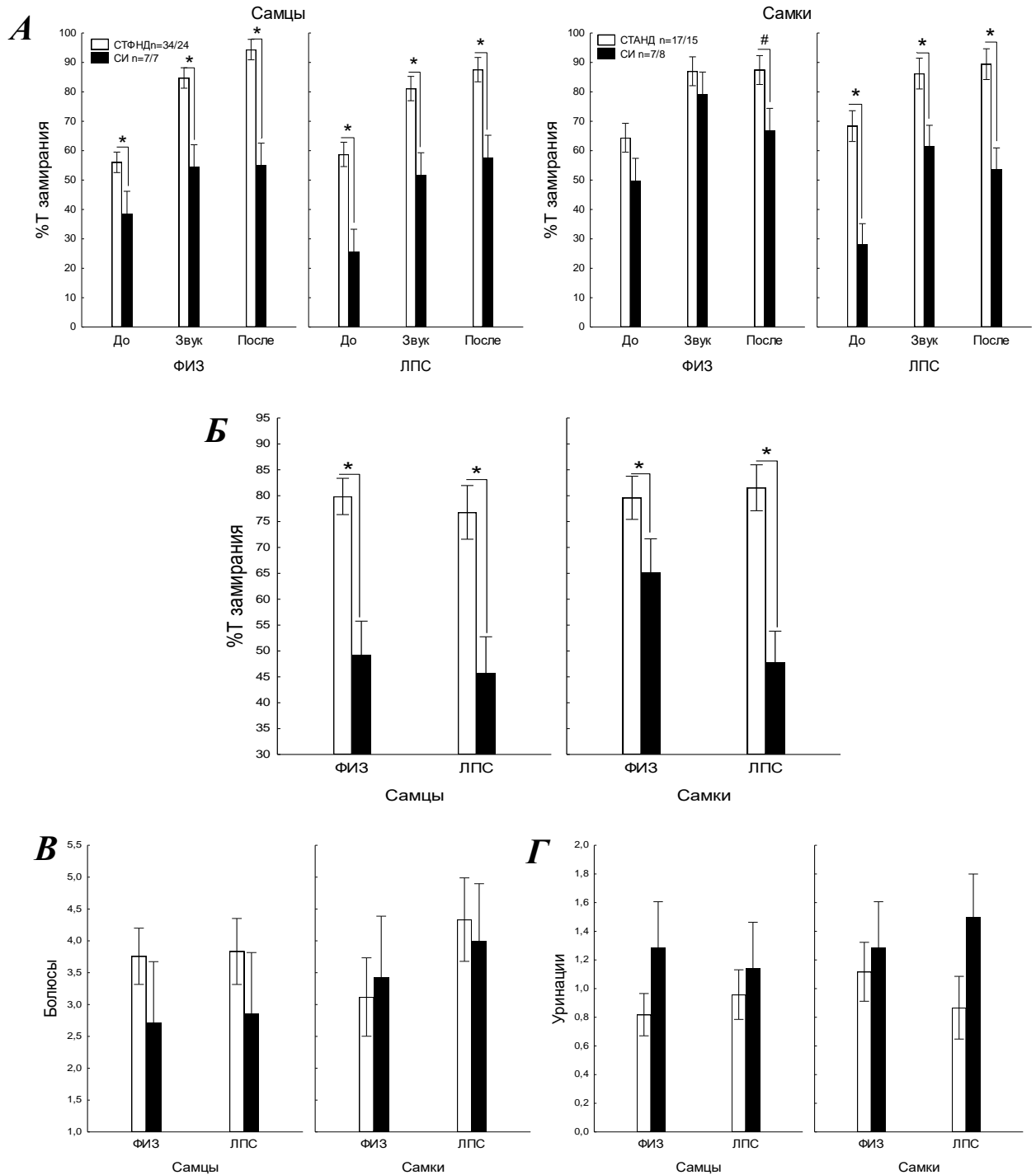
##### ***6.4.2. Влияние социальной изоляции на проявление классического оборонительного рефлекса на звук.***

На процент времени замирания в Тесте 1 оказывали влияние факторы ВРЕМЯ ( $F_{2,333}=42.983$ ,  $p=0.000$ ), УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ( $F_{1,333}=113.52$ ,  $p=0.000$ ), ГРУППА ( $F_{1,333}=4.976$ ,  $p=0.026$ ), ПОЛ ( $F_{1,333}=6.321$ ,  $p=0.012$ ) также наблюдалось взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ГРУППА ( $F_{1,333}=4.257$ ,  $p=0.040$ ). Post hoc анализ в целом по всему Тесту показал (рис. 25, Б), что в группах как ФИЗ, так и ЛПС СИ приводила к уменьшению времени замирания по сравнению с животными в стандартных условиях, причем после социальной изоляции снижение было более выраженным у самцов в группах ФИЗ и ЛПС, а также у самок в группе ЛПС. СИ у ЛПС групп вызывала существенные изменения, происходило снижение времени замирания как при действии звука, так и в интервалах до и после

действия (рис. 25, А). СИ у самок ФИЗ вызывала наименьшие изменения. Социальная изоляция не влияла на число дефекаций (рис. 25, В), как и на число уринаций у крыс (рис. 25, Г).



**Рис. 24.** Влияние социальной изоляции крыс на выработку условнорефлекторного страха. По оси абсцисс на А и Б – интервалы времени (До – до начала сочетаний, Зв1,2,3 - во время 1-ого, 2-ого, 3-его звука, МС1,2 – 1-й и 2-й межсигнальный интервал, После – после сочетаний). По оси ординат – на А и Б – процент времени замирания. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , на А, Б – post hoc анализ, Factorial ANOVA) по сравнению со стандартными условиями содержания. Остальные обозначения как на рис. 20.



**Рис. 25.** Влияние социальной изоляции крыс на проявление условнорефлекторного страха в Тесте 1. А – по различным интервалам времени в Тесте, Б – суммарные данные по времени замирания по всему тесту, В - число дефекаций, Г – число уринаций за опыт. По оси абсцисс на А – различные интервалы времени, До – до действия звука, Звук – во время, После – после звука. По оси ординат на А, Б – процент времени замирания. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , на А, Б – post hoc анализ, Factorial ANOVA) по сравнению со стандартными условиями содержания. Остальные обозначения как на рис. 20 и 24.

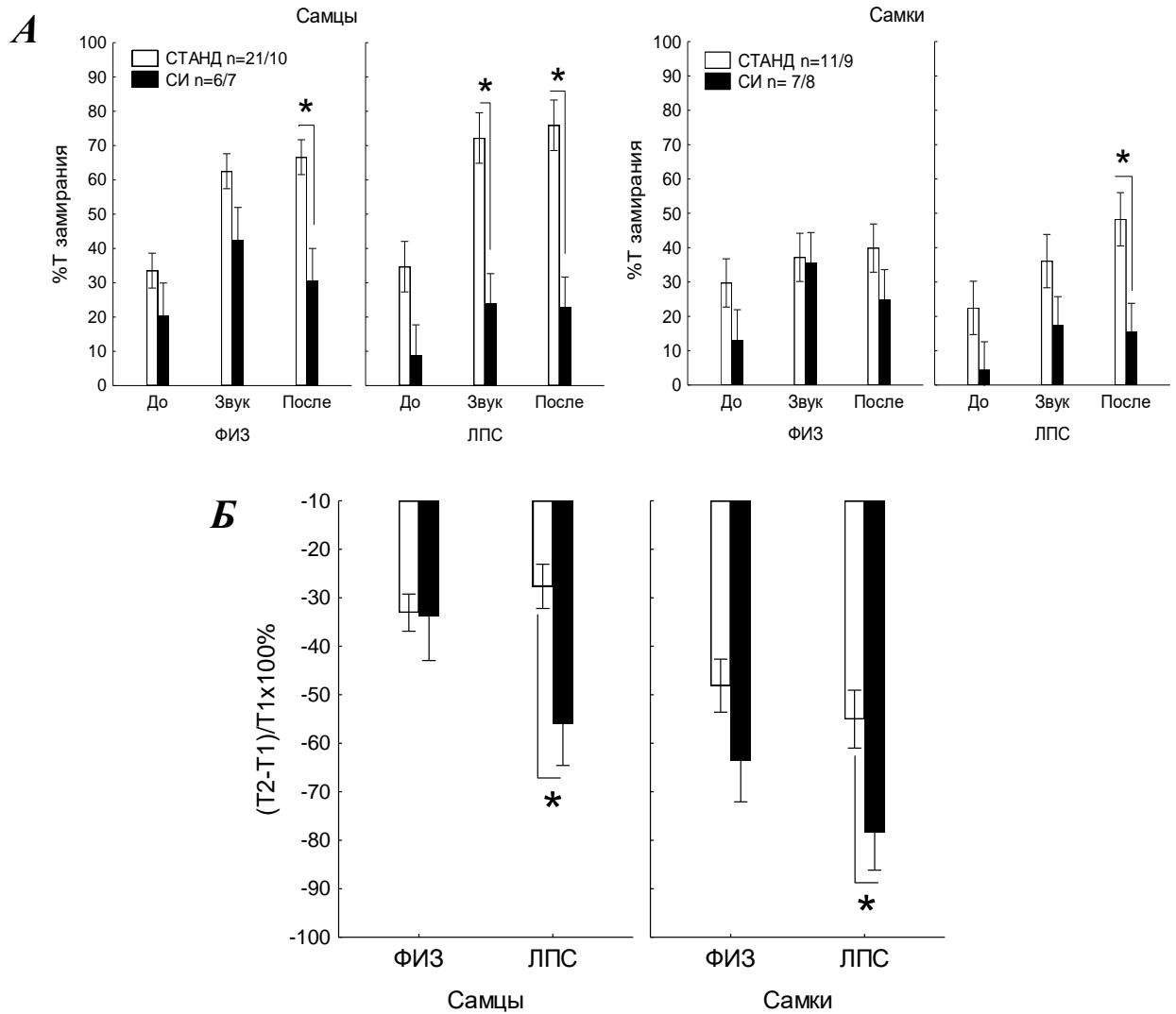


Таким образом, Тест 1 показал, что после СИ крысы хуже выработали условнорефлекторный страх, проявляющийся в виде замирания. Наибольшую чувствительность к СИ показали крысы с ранним провоспалительным стрессом, у которых уменьшилось проявление страха как на сигнал, так и контекст.

#### ***6.4.3. Влияние социальной изоляции на угашение классического оборонительного рефлекса на звук.***

После двух сеансов угашения был проведен Тест 2, результаты которого представлены на рис. 26, А. На процент времени замирания в Тесте 2 оказывали влияние факторы ВРЕМЯ ( $F_{2,213}=16.679$ ,  $p=0.000$ ), УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ( $F_{1,213}=59.284$ ,  $p=0.000$ ), ПОЛ ( $F_{1,213}=19.125$ ,  $p=0.000$ ), наблюдалось взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ГРУППА ( $F_{1,213}=5.8542$ ,  $p=0.016$ ) и УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ПОЛ ( $F_{1,213}=5.8385$ ,  $p=0.017$ ). Post hoc анализ показал (рис. 26, А), что в целом по тесту как в группе ФИЗ, так и группе ЛПС самцы замирали значительно меньше после социальной изоляции, чем самцы, содержащиеся в стандартных условиях. Социальная изоляция у самок группы ЛПС вызывала уменьшение времени замирания в Тесте 2 по сравнению с животными в нормальных условиях, но не влияла на результаты угашения у самок группы ФИЗ.

Таким образом, у крыс после социальной изоляции условнорефлекторный страх угашался быстрее, чем у животных, содержащихся в стандартных условиях. Возникает вопрос, более быстрое угашение связано с тем, что замирание у этих крыс было изначально меньше по времени (данные по Тесту 1), или социальная изоляция влияла на сам процесс угашения? Для ответа на этот вопрос для каждой группы крыс сравнивали соотношение времени замирания в Тесте 2 и Тесте 1 по формуле:  $((T \text{ замирания в Тесте 2}) - (T \text{ замирания в Тесте 1})) / (T \text{ замирания в Тесте 1}) \times 100\%$ .



**Рис. 26.** Влияние социальной изоляции на угашение условнорефлекторного страха. По оси абсцисс на А – интервалы времени (До – до действия звука, Звук – во время, После – после действия звука) / группы крыс ФИЗ и ЛПС, Б - группы крыс ФИЗ и ЛПС. По оси ординат – на А – процент времени замирания в Тесте 2, на Б –  $((T \text{ замирания в Тесте 2}) - (T \text{ замирания в Тесте 1})) / (T \text{ замирания в Тесте 1}) \times 100\%$ . \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , на А-В - post hoc анализ, Factorial ANOVA) по сравнению со стандартными условиями содержания. Остальные обозначения как на рис. 20 и 24.

Результаты такого анализа представлены на рис. 26, Б. На такое соотношение времени замирания в разных тестах (рис. 26, Б) оказывали влияние факторы УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ( $F_{1,325}=11,674$ ,  $p=0.000$ ) и ПОЛ ( $F_{1,325}=22,776$ ,  $p=0.000$ ). В группе ФИЗ у самцов и самок социальная изоляция не оказывала влияние на угашение рефлекса на контекст и на звук по сравнению со стандартными условиями содержания (рис. 26, А). У самцов и

самок группы ЛПС угашение проходило быстрее после социальной изоляции по сравнению со стандартными условиями содержания.

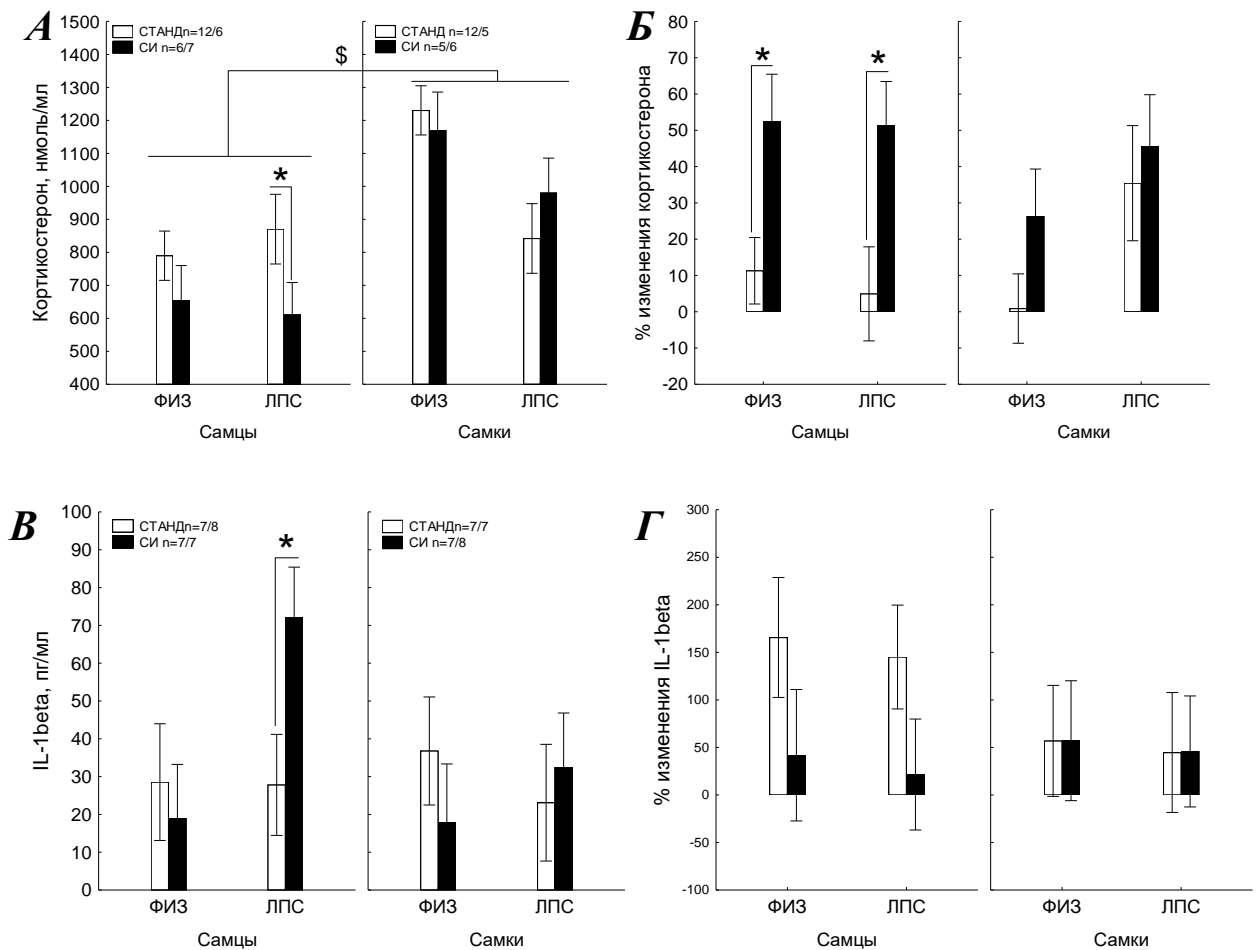
Таким образом, у самцов и самок ЛПС группы содержание в СИ способствовало более быстрому угашению условнорефлекторного страха.

### **6.5. Влияние социальной изоляции на уровень кортикостерона и ИЛ-1бета в сыворотке крови.**

Анализ уровня кортикостерона до и после теста вынужденного плавания показал влияние факторов ВОЗДЕЙСТВИЕ ( $F_{1,49}=49.133$ ,  $p=0.000$ ), ПОЛ ( $F_{1,49}=89.495$ ,  $p=0.000$ ), а также взаимодействие факторов ВОЗДЕЙСТВИЕ x УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ( $F_{1,49}=9.418$ ,  $p=0.004$ ), УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ПОЛ ( $F_{1,49}=6.743$ ,  $p=0.012$ ), ПОЛ x ВОЗДЕЙСТВИЕ ( $F_{1,49}=9.192$ ,  $p=0.004$ ). Через 30-40 мин после теста вынужденного плавания в среднем наблюдалось увеличение содержания кортикостерона в крови, при этом у самок уровень кортикостерона был выше ( $p<0.05$ ), чем у самцов как до, так и после воздействия (рис. 27, А). Подробный post hoc анализ показал (рис. 27, А), что до воздействия (базовый уровень) содержание в условиях СИ могло оказывать влияние на уровень кортикостерона, у самцов в группе ЛПС после содержания в СИ уровень кортикостерона был ниже, чем у животных, содержащихся в стандартных условиях. После стрессирующего воздействия (рис. 27, Б) статистически значимое увеличение уровня кортикостерона наблюдалось у всех самцов после СИ - (как у ФИЗ, так и ЛПС групп), по сравнению с животными группы СТАНД.

На уровень ИЛ-1бета оказывали влияние факторы ВОЗДЕЙСТВИЕ ( $F_{1,47}=6.016$ ,  $p=0.018$ ), также наблюдалось взаимодействие факторов ГРУППА x УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ( $F_{1,47}=7.744$ ,  $p=0.008$ ), ГРУППА x ПОЛ ( $F_{1,47}=4.384$ ,  $p=0.042$ ). У самцов ЛПС группы после СИ базовый уровень ИЛ-1бета был выше, чем у крыс в стандартных условиях (рис. 27, В). После

стрессирующего воздействия (рис. 27, Г) статистически значимых различий между группами обнаружено не было.



**Рис. 27.** Влияние условий содержания на уровни кортикостерона (А и Б) и ИЛ-1бета (В и Г) в сыворотке крови до и процент изменения после теста вынужденного плавания. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) по сравнению со стандартными условиями содержания (Factorial ANOVA), \$ - половые различия. n – число крыс в группе (ФИЗ/ЛПС). Остальные обозначения как на рис. 20 и 24.

Содержание крыс в социальной изоляции не влияло на базовый уровень кортикостерона и ИЛ-1бета у ФИЗ групп, но могло приводить к изменениям данного уровня в ЛПС группе, что свидетельствует о том, что животные после раннего провоспалительного стресса наиболее уязвимы к измененным условиям содержания. Стрессирующее воздействие в виде теста вынужденного плавания выявило наибольший прирост уровня

кортикостерона у самцов после СИ как в ФИЗ, так и ЛПС группах. Таким образом, содержание в СИ приводило к увеличению реактивности ГН оси у самцов в ответ на стрессирующее воздействие при вынужденном плавании.

#### **6.6. Обсуждение результатов.**

В наших опытах социальная изоляция приводила к увеличению уровня тревожности крыс в ПКЛ. Это наблюдалось у всех групп крыс, о чем свидетельствовало снижение процента времени в открытых рукавах, а в ОП - только у животных ЛПС групп, судя по уменьшению числа выходов в центр у самок и увеличению времени на периферии поля у самцов и самок группы ЛПС. Кроме того, характерной особенностью поведения крыс в обоих тестах после СИ являлось увеличение числа вытягиваний (*stretch attend postures*), что в литературе рассматривается как признаки поведения по оценке рисков, принятия решения (Rodgers, Johnson, 1995). По-видимому, такие вытягивания в сторону открытого рукава ПКЛ или в сторону центра ОП заменяли полноценные выходы в аверсивную часть лабиринта или поля, и, исходя из этого, такие вытягивания можно рассматривать как косвенные признаки увеличения тревожности. Эти предположения подтверждают данные об уменьшении числа вытягиваний под влиянием анксиолитиков, и об их увеличении при действии некоторых анксиогенов (Molewijk et al., 1995). В ОП после СИ у всех групп крыс также увеличивалась латентность ухода из центра поля, куда экспериментатор сажал животное в самом начале опыта. Такое увеличение латентности можно рассматривать как торможение двигательной активности при попадании в аверсивную обстановку, признак безинициативности животного, замирания при этом не наблюдали. Вероятно, торможение двигательной активности в начале опыта было следствием увеличения уровня тревожности. Важно подчеркнуть, что в наших опытах СИ не приводила к увеличению двигательной активности животных как в ОП, так и ПКЛ, а у отдельных групп даже, наоборот, вызывала ее снижение.

В большинстве работ СИ вызывала у животных гиперлокомоцию, проявляющуюся в виде усиления двигательной и исследовательской активности в тестах на тревожность (Kuleshkaya et al., 2011; Zhao et al., 2009; Võikar et al., 2005; Heidbreder et al., 2000; Krupina et al., 2020; Jahng et al., 2012). Реже наблюдалось снижение двигательной активности (Хоничева с соавт., 2002) или отсутствие эффекта (Weiss et al., 2004). Такие противоречивые данные объясняются особенностями аппарата (ОП, ПКЛ) тестирования, продолжительностью изоляции, возрастом, полом, линией животных и другими факторами (Lukkes et al. 2009).

В литературе имеются неоднозначные данные по влиянию СИ на проявления тревожного поведения у грызунов. В большинстве работ СИ усиливала тревожность (Bledsoe et al. 2011; Lukkes et al. 2012; 2009; Zhao et al., 2009; Rau et al., 2015; Brenes et al., 2020; Zhang et al. 2012; Weiss et al., 2004; Хоничева с соавт., 2002), в особенности, если изоляция начиналась в раннем возрасте. Считается, что в раннем возрасте СИ, подобно другим стрессирующим воздействиям, вызывает сенситизацию механизмов мозга, связанных со стрессом и негативными эмоциями (моноаминоергические системы мозга, структуры гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой и иммунной системы, др.), которые в зрелом возрасте приводят к более серьезным реакциям на повторные стрессы. После СИ показано увеличение возбудимости пирамидных нейронов базолатерального ядра миндалины, что связывают с нарушениями функционирования Са-каналов (Rau et al., 2015). Однако, имеются данные как об уменьшении (Võikar et al. 2005; Thorsell et al., 2006; Kuleshkaya et al. 2011; Weintraub et al. 2010), так и неизменности уровня тревожности после СИ (Alshammari et al., 2020; Pietropaolo et al., 2008). Анализ столь противоречивых данных позволяет сделать вывод о том, что на результаты СИ влияет возраст начала изоляции и ее длительность. Высказывалось предположение, что СИ в раннем подростковом возрасте является анксиогенной, а в позднем – анксиолитической. Требуется не меньше

трех недель СИ для выявления поведенческого эффекта (Gorlova et al., 2018), краткосрочная изоляция в течение 10 дней не имела поведенческих эффектов (Alshammari et al., 2020).

Применительно к влиянию двойного (ЛПС и СИ) стресса на тревожное поведение в зрелом возрасте нам известна только одна работа (Walker et al., 2009). Как и в наших опытах, крысы линии Вистар получали на 3- и 5-й дни жизни инъекции ЛПС (50 мкг/кг) или физиологического раствора. В возрасте 85 дней часть животных получала в течение трех дней стресс иммобилизации (restraint stress) (30 мин) и СИ. Хотя условия изоляции в наших опытах и в работе (Walker et al., 2009) существенно отличались, результаты были схожими. Крысы ЛПС группы, получавшие в зрелом возрасте комбинированный стресс, проявляли тревожное поведение в большей степени, чем контрольные животные, что авторы рассматривают как подтверждение гипотезы «двойного удара». В работе (Peña et al., 2019) было получено транскриптомное доказательство того, что ранний стресс повышает чувствительность организма к будущим стрессам. Авторы использовали методику РНК секвенирования (RNA-sequencing) в вентральной тегментальной зоне, прилежащем ядре и префронтальной коре самцов и самок мышей, и показали, что стресс у взрослых животных, отчетливо представленный в транскриптомах мозга, зависит от истории ранних влияний. Они обнаружили транскрипционные регуляторы эффектов раннего стресса на стрессирующие воздействия в зрелом возрасте (Peña et al., 2019).

Судя по уменьшению предпочтения раствора сахарозы в тесте на ангедонию, признаки депрессивно-подобного поведения наблюдались только у самок ЛПС группы, находящихся в СИ. Т.е. именно в группе ЛПС происходили наибольшие изменения в поведении после пребывания в условиях социальной изоляции.

В литературе в большинстве работ показано, что СИ оказывает депрессивное действие, что проявляется в уменьшении предпочтения раствора сахарозы и увеличении суммарного времени зависания в тесте вынужденного плавания, иногда проявляется только один признак (Guarnieri et al., 2020; Wang et al., 2017; Mileva, Bielajew, 2015; Takatsu-Coleman et al., 2013). Имеются работы, в которых у крыс при СИ могло увеличиваться потребление раствора сахарозы без изменения процента предпочтения сахарозы, что рассматривается как нарушение порога подкрепления, компенсация за нарушение чувствительности к подкреплению (Hong et al., 2012; Yildirim et al., 2012; Brenes et al., 2020). В ряде работ, однако, различий в уровне потребления сахарозы и времени зависания под влиянием СИ обнаружено не было (Alshammari et al., 2020; Gorlova et al., 2018). В других работах при СИ уменьшалось общее время зависания в тесте вынужденного плавания (Huang et al., 2017; Vđikar et al., 2005; Hong et al., 2012), что авторы трактуют как проявление антидепрессивного эффекта. В ряде работ была показана большая чувствительность самок к стрессу СИ (Hong et al., 2012; Huang et al., 2017). Это соответствует полученным в ходе работы нашим данным, только самки ЛПС группы показали признаки депрессивно-подобного поведения.

Нам удалось найти всего несколько работ с комбинированным стрессом (СИ и провоспалительным стрессом, вызванным введением ЛПС), в которых бы изучалось депрессивно-подобное поведение. В опытах на мышах исследовали влияние ранней восьмидневной СИ совместно с действием ЛПС, который вводили за 5 часов до начала теста у животных в возрасте 8-10 недель (Gong et al., 2018). Судя по уменьшению количества потребленной сахарозы и увеличению времени иммобильности в тесте вынужденного плавания одиночные влияния как СИ, так и ЛПС вызывали депрессивные эффекты. Совместное же влияние двух стрессов, вызывало не депрессивные, а наоборот, антидепрессивные эффекты (Gong et al., 2018). Авторы большое значение в развитии депрессивных эффектов после СИ придают потере микроглии в



гиппокампе, которая после начальной активации претерпевает апоптоз. В ответ на ЛПС происходит пролиферация микроглии, число клеток микроглии не уменьшается после СИ, и исчезают поведенческие депрессивные эффекты. К сожалению, сравнивать с нашими данными невозможно ввиду больших методических отличий.

В нашей работе было показано существенное уменьшение уровня замирания в Тесте 1 у крыс после социальной изоляции по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях. Причем время замирания могло уменьшаться как на контекст, так и звуковой сигнал. В литературе также имеются сведения о том, что социальная изоляция приводит к нарушению когнитивных способностей у животных. У изолянтов была нарушена выработка условнорефлекторного страха, в тесте через 24 после обучения. Животные меньше замирали только на контекст (Mora-Gallegos, Fornaguera, 2019; Weiss et al., 2004; Hsiao et al., 2012), на контекст и сигнал (Võikar et al., 2005; Kuleshkaya et al., 2011; Ouchi et al., 2013; Okada et al., 2014), или только на сигнал (Badowska et al., 2015). В то же время в отдельных работах у мышей после 2-х недельной социальной изоляции показано увеличение замирания в последствии звука при тестировании условнорефлекторного страха на звук и увеличение реактивности на ток (Zelikowsky et al., 2018). У изолянтов нарушалась выработка условного рефлекса пассивного избегания (Krupina et al., 2020), все крысы заходили в опасный отсек на следующий день после выработки.

Закономерно возникает вопрос о причинах такого нарушения обучения. В наших экспериментах при обучении, время замирания у самцов не отличалось в группах СИ и СТАНД, что говорит о том, что животные после СИ были способны реагировать замиранием на болевые стимулы. В литературе есть данные о появлении гиперлокомции у крыс после СИ (Heidbreder et al., 2000). Однако результаты тестирования в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте не выявили увеличения двигательной

активности после СИ, в отдельных группах наблюдалось даже ее снижение. Уменьшение времени замирания в Тесте 1, по-видимому, в нашей работе не может быть связано с увеличением двигательной активности крыс. Известно, что социальная изоляция не влияла на болевую чувствительность мышей в тесте на горячей пластинке (Kuleshkaya et al., 2011; Vöikar et al., 2005), что свидетельствует о том, что нарушения обучения не были связаны с изменениями болевой чувствительности и уменьшением силы подкрепления. Наиболее вероятной причиной нарушения замирания в Тесте 1 является дефицит памяти, и в литературе есть подтверждение данному предположению. В большинстве работ показано, что после СИ страдает долговременная, а не кратковременная память. Так, например, после СИ нарушалась долговременная память в тесте после выработки условнорефлекторного страха (Ouchi et al., 2013), в то время как кратковременная рабочая память не страдала в Y-образном лабиринте и в тесте при распознавании новых объектов. Крысы после стресса социальной нестабильности, в котором животные подвергались социальной изоляции и смене партнера по клетке, показали дефицит долговременной памяти, но не кратковременной при обучении в бассейне Морриса и в тесте на пространственное расположение объектов (Green, McCormick, 2013). Считают, что после СИ возникает нарушение процессов консолидации памяти, а не ее приобретения в модели выработки условнорефлекторного страха. В специальных опытах было показано нарушение под влиянием социальной изоляции консолидации памяти о страхе, при этом у животных нарушалась память через 24 часа или 4 дня после обучения, но оставалась неизменной через 90 мин и 4 часа после выработки рефлекса (Okada et al., 2014). Относительно механизмов нарушения консолидации памяти у изолянтов имеются отдельные сведения. У изолянтов был понижен уровень экспрессии гена *Egr-1* (early growth response protein 1, фактор транскрипции), но не *Egr-2* в цитозольных фракциях гиппокампа и коры по сравнению с контрольными животными (Okada et al., 2014). У

изолянтов по сравнению с контролем был понижен уровень фосфорилирования сигнальных белков в гиппокампе, связанных с синаптической пластичностью, субъединицы NR1 NMDA рецептора, кальмодулин-зависимой киназы II. Считают, что дисфункция Egr-1 и нейросигнальной системы приводит к дефициту консолидации памяти о страхе. В механизмах возникновения поведенческих изменений после длительной социальной изоляции большую роль играет также увеличенная экспрессия нейропептида тахикинина 2 (Tac2) и нейрокинина В (NkB), которая была обнаружена в дорзомедиальном гипоталамусе, центральном ядре миндалины, dBNST, дорзальном гиппокампе и передней цингулярной коре (Zelikowsky et al., 2018). Системное или локальное введение в структуры мозга антагониста рецепторов нейрокинина (осанетанта) предотвращало поведенческие эффекты от социальной изоляции.

Проведенный специальный анализ процентного изменения времени замирания в Тесте 2 после угашения и в Тесте 1 после выработки рефлекса показал, что содержание в условиях изоляции ускорило угашение рефлекса только в группе ЛПС у самцов и самок, в ФИЗ группах крыс содержание в измененных условиях не сказалось на скорости угашения. В предыдущей главе было продемонстрировано, что у самцов ЛПС группы, содержащихся в стандартных условиях, условнорефлекторный страх угашался хуже, чем в группе ФИЗ. Имеющиеся немногочисленные данные по влиянию социальной изоляции на угашение страха отличаются от полученных нами результатов. Социальная изоляция могла тормозить угашение условнорефлекторного страха на звук (Nogi et al., 2014) и нарушать снижение амплитуды стартл рефлекса после угашения страха (Skelly et al., 2015). Длительный комбинированный стресс (ограничение движения, вынужденное плавание, социальная изоляция) приводил к нарушениям угашения условнорефлекторного страха у крыс (Noble et al., 2017). Возможно,

полученные нами данные связаны с нарушениями памяти у самцов под влиянием ЛПС и социальной изоляции.

Анализ уровня кортикостерона в плазме крови показал, что не у всех групп животных наблюдался прирост после стрессирующего воздействия – ТВП. Возможно, меньшая реакция на стресс по сравнению с нашими ранее проведенными экспериментами связана с однодневным протоколом тестирования (Брошевицкая с соавт., 2020). Тем не менее, статистически значимый прирост уровня кортикостерона наблюдался у всех самцов после СИ, что свидетельствовало об их большей реактивности на стрессирующее воздействие по сравнению с другими группами. В литературе имеются сведения о том, что СИ вызывает изменение функционирования ГГН оси. Так, у крыс изолянтов базовый уровень кортикостерона мог быть понижен (Martin, Brown, 2010; Roeskner et al., 2017; Mileva et al., 2017), либо увеличен, а ответ на острый стресс при этом сглажен (Jahng et al., 2012). В нашей работе пониженный базовый уровень кортикостерона наблюдался после СИ только у самцов ЛПС группы, что свидетельствует о большей чувствительности к изоляции крыс ЛПС группы. Другие авторы также отмечают пониженный базовый уровень кортикостерона и АКТГ после СИ, ответ на стрессирующие стимулы был увеличенный (Voero et al., 2018), при этом наблюдался длительный ответ по кортикостерону, АКТГ и кортикотропин-релизинг гормону. Авторы приходят к выводу, что СИ меняет базовую активность ГГН оси и нарушает отрицательную обратную связь после острого стресса, опосредованную глюкокортикоидными рецепторами. Увеличенное выделение кортикостерона после стресса наблюдали у самцов изолянтов и в другой работе (Weiss et al., 2004).

В нашей работе базовый уровень интерлейкина у самцов группы ЛПС после СИ был выше, чем у животных в стандартных условиях. Известно, что СИ сама по себе может приводить к увеличению провоспалительных

цитокинов в крови (Alshammari et al., 2020) и в гиппокампе (Wang et al., 2017). В нашей работе увеличение уровня ИЛ-1бета проявилось только в группе ЛПС, возможно потому, что провоспалительный ЛПС стресс в раннем возрасте вызвал сенситизацию иммунной системы, из-за чего реакция на второй стресс оказывается более сильной, чем в случае одиночного стресса (Walker et al., 2009; Брошевицкая с соавт., 2020).

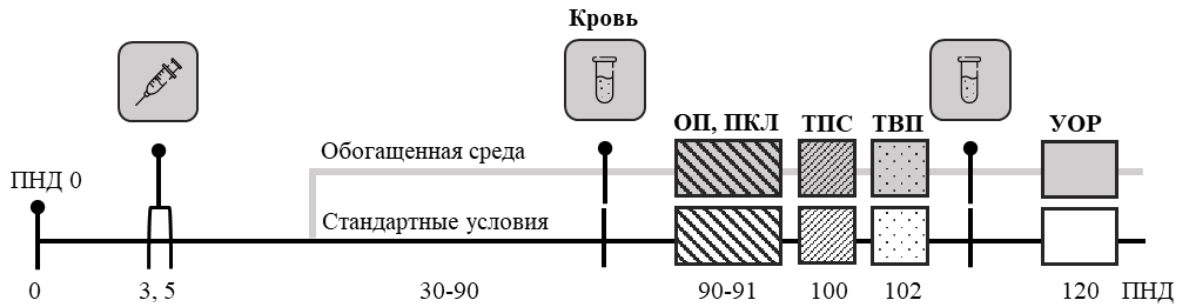
Таким образом, самки и самцы ЛПС группы были наиболее подвержены влиянию социальной изоляции, у этой группы изменения в тревожно-депрессивном поведении, обучении и в биохимических маркерах крови были наиболее выражены. Полученные результаты подтверждают ранее высказанную гипотезу «двойного удара» (Maynard et al., 2001; Walker et al., 2009). Согласно ей последствия ранних воздействий могут проявляться на более поздних этапах жизни, при столкновении с негативными воздействиями и стрессами, и проявляться в виде различных нарушений. Мы предполагаем, что в основе увиденных нами изменений может лежать процесс «сенситизации» иммунной системы (Fonken et al., 2018; Григорьян, 2020).

**Выводы:**

1. Тестирование крыс в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте показало, что социальная изоляция приводила к увеличению тревожности животных, поведения по оценке риска (вытягивания), снижению двигательной и исследовательской активности. Наибольшие изменения после социальной изоляции происходили у крыс ЛПС групп.
2. Признаки депрессивно-подобного поведения согласно тесту на предпочтение сахарозы выявились у самок ЛПС группы после социальной изоляции.
3. Тестирование через 24 часа после выработки классического оборонительного условного рефлекса показало, что после социальной изоляции у самцов и самок ухудшилась выработка условнорефлекторного страха, проявляющегося в виде замирания. Наибольшую чувствительность к социальной изоляции показали крысы с ранним провоспалительным стрессом, у которых уменьшилось проявление страха, как на сигнал, так и контекст.
4. Угашение страха у самцов ЛПС группы ускорялось после социальной изоляции по сравнению с животными этой группы, содержащимися в стандартных условиях.
5. У самцов ЛПС группы в условиях СИ увеличивался базовый уровень ИЛ-1бета, но снижался уровень кортикостерона.
6. Самки и самцы ЛПС группы были наиболее подвержены влиянию социальной изоляции, у этой группы изменения в тревожно-депрессивном поведении, обучении и в биохимических маркерах крови были наиболее выражены.

## Глава 7. РЕЗУЛЬТАТЫ: Влияние обогащенной среды на тревожно-депрессивное и оборонительное поведение крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса.

### 7.1. Схема экспериментов.



**Рис. 28.** Схема проведения экспериментов. По горизонтали: постнатальные дни (ПНД), 0 ПНД – день родов. На 3 и 5 ПНД – инъекция ЛПС или физиологического раствора (контроль). Кровь – процедура сбора хвостовой крови. ОП – открытое поле. ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт. ТПС – тест на предпочтение сахарозы. ТВП – тест вынужденного плавания. УОР – классический оборонительный рефлекс на звук.

Содержание в условиях ОС начиналось в возрасте 30 дней и длилось до окончания эксперимента (рис. 28). Кровь для иммуноферментного анализа брали из хвостовой вены у животных, уже находившихся в различных условиях содержания, за сутки до начала поведенческих тестов, а также через 30-40 мин после стрессирующего воздействия (ТВП).

### 7.2. Влияние обогащенной среды на вес крыс.

**Таблица 9.** Влияние условий содержания на вес крыс разных групп в 3 мес.

Пол	Группа	Условия содержания		One –Way ANOVA, F, p
		СТАНД	ОС	
Самцы	ФИЗ	331.6±4.2	333.2±8.3	-*
	ЛПС	333.2±4.4	333.4±8.3	-
Самки	ФИЗ	223.7±5.9	245.1±7.2	F <sub>1,28</sub> =6.34, p=0.018
	ЛПС	227.9±5.3	247.8±6.9	F <sub>1,33</sub> =7.84, p=0.008

\* - прочерк – отсутствие статистически значимых различий.

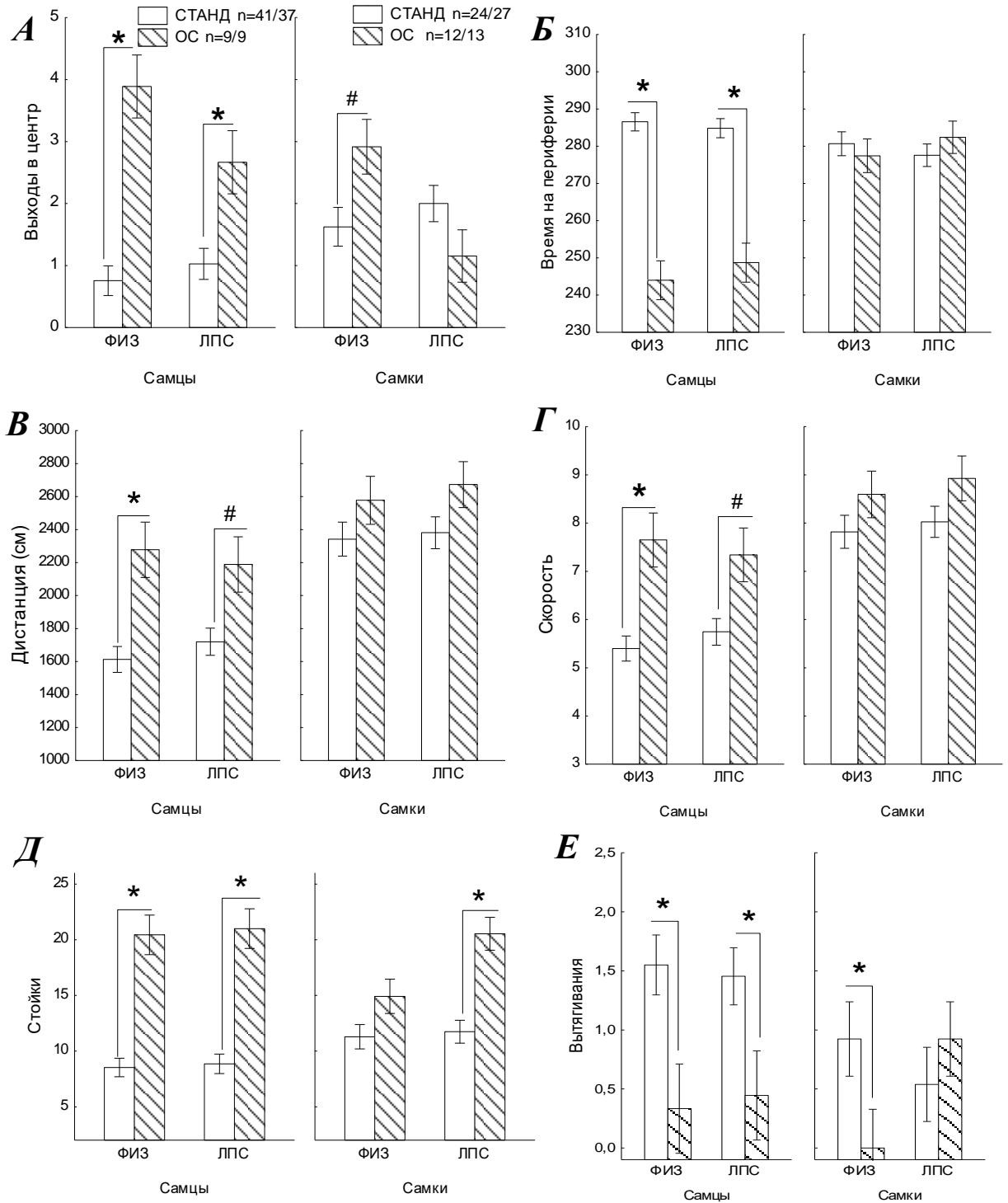
Содержание в условиях обогащенной среды не повлияло на вес самцов в три месяца (табл. 9), но приводило к увеличению ( $p < 0.05$ , One Way ANOVA) веса самок, как в группе ФИЗ, так и ЛПС.

### **7.3. Влияние обогащения среды на тревожно-депрессивное поведение крыс.**

#### **7.3.1. Влияние обогащения среды на поведение крыс в открытом поле.**

Анализ поведения крыс в ОП показал (рис. 29), что после ОС по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях, число выходов в центр поля было больше как у самцов ФИЗ ( $U=46.5$ ,  $p=0.000$ , Mann Whitney U test), так и ЛПС группы ( $U=51.5$ ,  $p=0.001$ , рис. 29, А). ОС также вызывало уменьшение времени, проведенного на периферии поля у самцов ФИЗ ( $U=33.0$ ,  $p=0.000$ , рис. 29, Б) и ЛПС группы ( $U=23.0$ ,  $p=0.000$ ). У самок ОС не вызывало изменения данных показателей. Фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ оказывал влияние на пройденную дистанцию ( $F1, 164=21.3$ ,  $p=0.000$ ) и скорость движения ( $F1, 164=21.3$ ,  $p=0.000$ ). Post hoc анализ показал, что самцы ФИЗ группы после ОС проходили большую ( $p < 0.05$ ) дистанцию с большей ( $p < 0.05$ ) скоростью, чем крысы, содержащиеся в стандартных условиях (рис. 29, В, Г). У самцов ЛПС группы данная закономерность проявлялась только на уровне тенденции ( $0.05 < p < 0.1$ ). У самок данные показатели двигательной активности не различались у крыс, содержащихся в ОС и СТАНД условиях. Число стоек (рис. 29, Д) было больше после содержания в ОС по сравнению со стандартными условиями как у самцов ФИЗ группы ( $U=14.0$ ,  $p=0.000$ ), так и ЛПС группы ( $U=10.0$ ,  $p=0.000$ ), а также у самок ЛПС группы ( $U=51.5$ ,  $p=0.000$ ). Число вытягиваний (stretch poster attitude, рис. 29, Е) после ОС было меньше у самцов ФИЗ ( $U=35.0$ ,  $p=0.009$ ) и ЛПС группы ( $U=54.0$ ,  $p=0.039$ ), а также у самок ФИЗ группы ( $U=42.0$ ,  $p=0.008$ ). На другие анализируемые показатели (время груминга, число болюсов и уринаций) содержание в ОС не оказало влияния.





**Рис. 29.** Сопоставление поведения крыс, содержащихся в условиях обогащенной среды (ОС) и в стандартных условиях (СТАНД), в открытом поле. ФИЗ – группа крыс с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, ЛПС – группа крыс с введением ЛПС, n – число крыс в группе ФИЗ/ЛПС. \* - статистически значимые различия между крысами в ОС и СТАНД условиях ( $p < 0.05$ , на А, Б, Д, Е - Mann-Whitney U test, на В и Г – post hoc анализ, Factorial ANOVA), # -тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ).

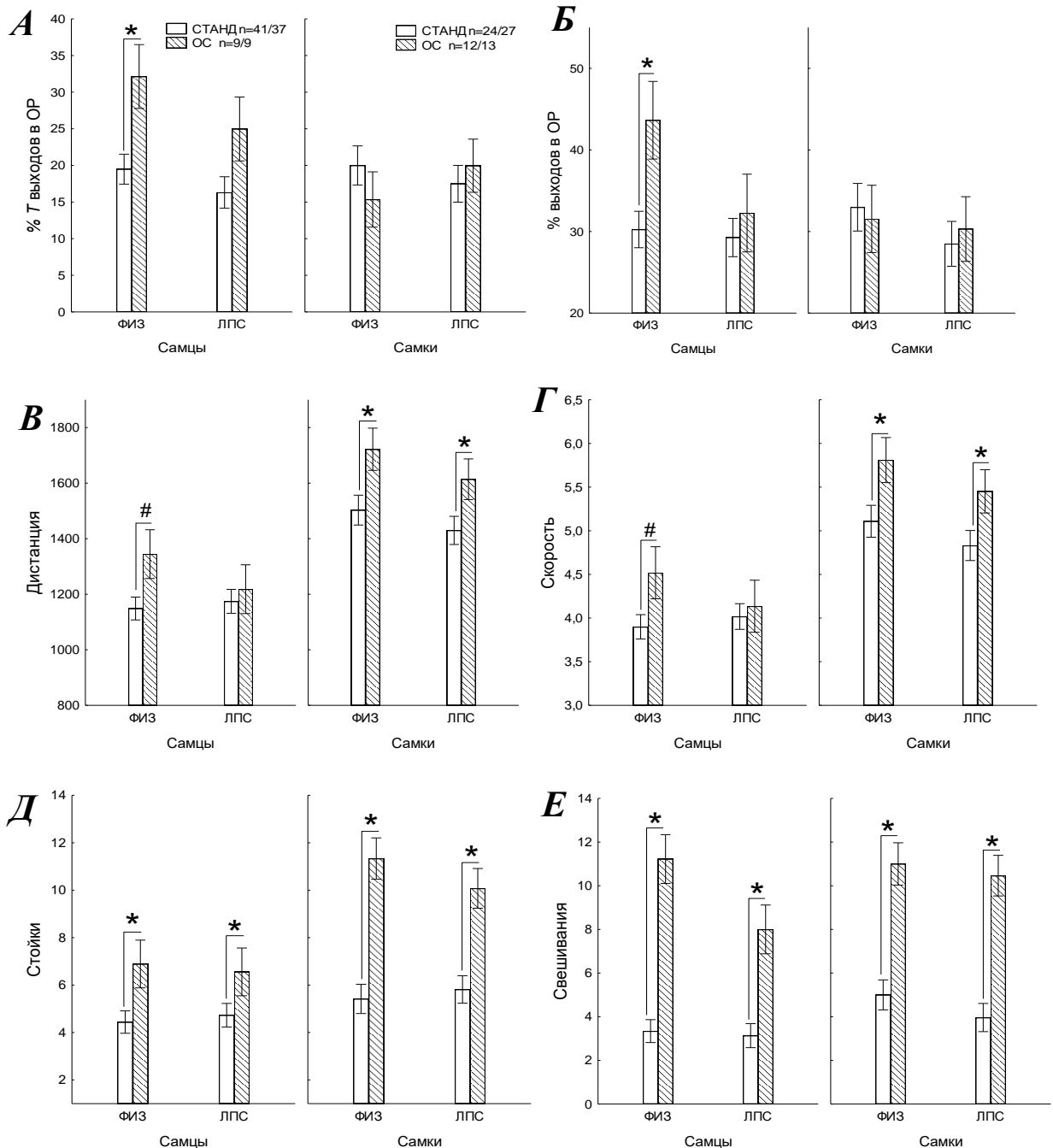
Таким образом, содержание в условиях обогащенной среды приводило к снижению уровня тревожности и увеличению двигательной активности в ОП только у самцов, но не у самок, в то время как исследовательская активность возрастала у самцов всех групп и самок группы ЛПС.

### ***7.3.2. Влияние обогащения среды на поведение крыс в приподнятом крестообразном лабиринте.***

Анализ поведения крыс в ПКЛ (рис. 30) показал, что после содержания в ОС по сравнению со СТАНД условиями у самцов ФИЗ группы были больше процент проведенного времени ( $U = 89.0, p = 0.016$ ) и процент выходов ( $U = 73.5, p = 0.005$ ) в открытые рукава ПКЛ (рис. 30, А, Б). У самок и самцов ЛПС группы данные показатели не менялись после ОС. Пройденная дистанция после ОС (рис. 30, В) была больше у самцов ФИЗ группы ( $U = 95.0, p = 0.024$ ) и у самок ФИЗ ( $U = 54.0, p = 0.004$ ) и ЛПС групп ( $U = 49.0, p = 0.000$ ). Скорость движения (рис. 2, Г) после ОС была больше, чем при СТАНД условиях у самок ФИЗ ( $U = 77, p = 0.024$ ) и ЛПС ( $U = 98, p = 0.025$ ) группы, у самцов ФИЗ группы различие проявлялось на уровне тенденции ( $U = 119, p = 0.098$ ). Число стоек (рис. 30, Д) было больше после ОС, чем при СТАНД условиях у самцов ФИЗ ( $U = 78.5, p = 0.007$ ) и ЛПС ( $U = 95, p = 0.047$ ) групп, а также у самок ФИЗ ( $U = 35.5, p = 0.000$ ) и ЛПС групп ( $U = 67, p = 0.002$ ). Число свешиваний (рис. 30, Е) также было больше после ОС, чем при СТАНД условиях как у самцов ФИЗ ( $U = 21.5, p = 0.000$ ) и ЛПС ( $U = 46, p = 0.001$ ) групп, так и самок ФИЗ ( $U = 38, p = 0.000$ ) и ЛПС ( $U = 41.5, p = 0.000$ ) групп. На другие показатели поведения в ПКЛ (латентность первого выхода в открытые рукава, время груминга, длительность выглядываний, число вытягиваний) содержание в ОС не оказало влияния.

Таким образом, судя по результатам тестирования в двух тестах содержание в ОС приводило к снижению уровня тревожности у самцов, но не самок, при этом у самцов группы ФИЗ наблюдались большие изменения, чем

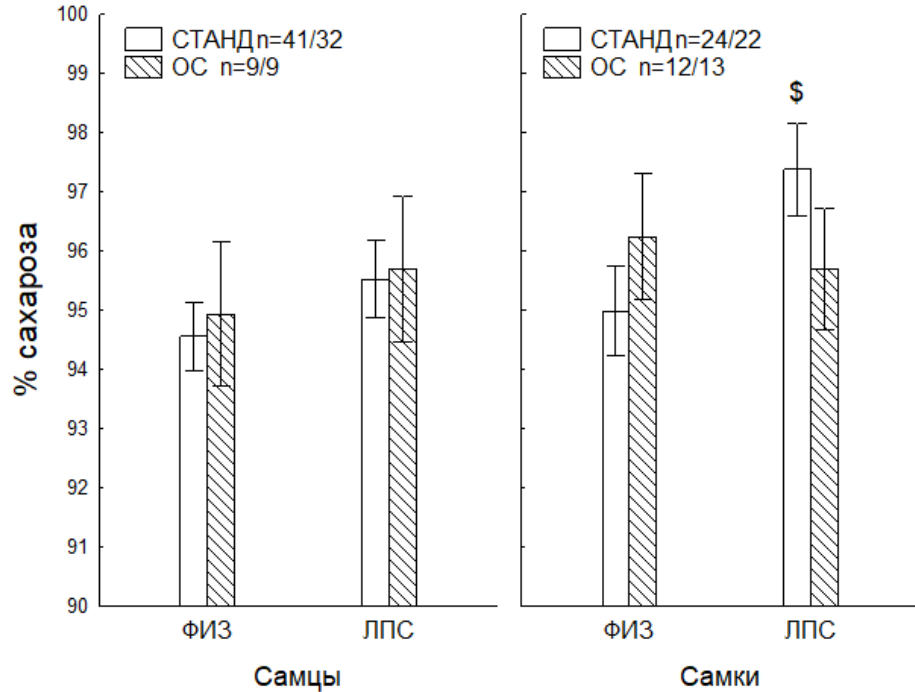
у группы ЛПС. Двигательная активность увеличивалась после ОС: у самцов это проявлялось в обоих тестах, причем в ФИЗ группе в большей степени, чем в ЛПС, у самок это наблюдалось только в ПКЛ. Показатели исследовательской активности (стойки, свешивания) после ОС увеличивались практически у всех групп крыс.



**Рис. 30.** Сопоставление поведения крыс, содержащихся в условиях обогащенной среды (ОС) и в стандартных условиях (СТАНД), в приподнятом крестообразном лабиринте. \* - статистически значимые различия между крысами в ОС и СТАНД условиях ( $p < 0.05$ , на А-Е - Mann-Whitney U test), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 29.

### 7.3.3. Влияние содержания в обогащенной среде на предпочтение сахарозы.

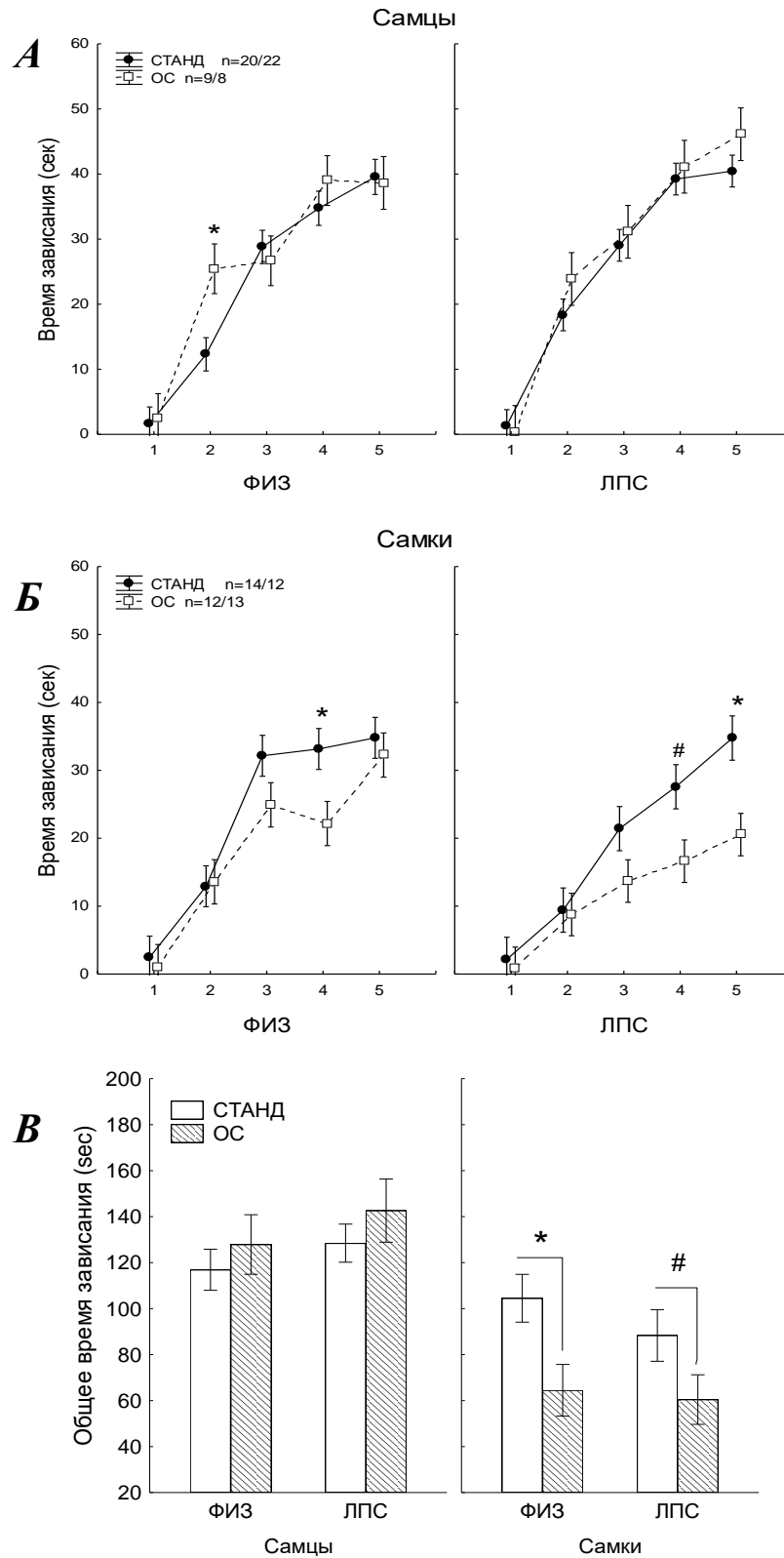
Тест на предпочтение сахарозы не выявил различий между крысами, содержащимися в СТАНД условиях и в ОС (рис. 31).



**Рис. 31.** Влияние содержания в обогащенной среде на депрессивно-подобное поведение крыс в тесте на предпочтение сахарозы. \$ - половые различия ( $p < 0.05$ , post hoc анализ, Factorial ANOVA). Остальные обозначения как на рис. 29.

### 7.3.4. Влияние содержания в обогащенной среде на поведение крыс в тесте вынужденного плавания.

У самок как в ФИЗ, так и ЛПС группах время зависания в конце теста после ОС было меньше, чем у животных в СТАНД условиях (рис. 32, В). У ФИЗ группы самок различия между СТАНД и ОС были получены на 4 минуте ( $F_{1, 24} = 4.5$ ,  $p = 0.044$ ), а у ЛПС группы на 4 ( $F_{1, 23} = 3.9$ ,  $p = 0.060$ , тенденция) и 5 ( $F_{1, 23} = 4.9$ ,  $p = 0.036$ ) минутах (рис. 32 А и Б). Таким образом, судя по тесту вынужденного плавания, содержание в условиях ОС приводило к уменьшению депрессивно-подобного поведения у самок, но не самцов.

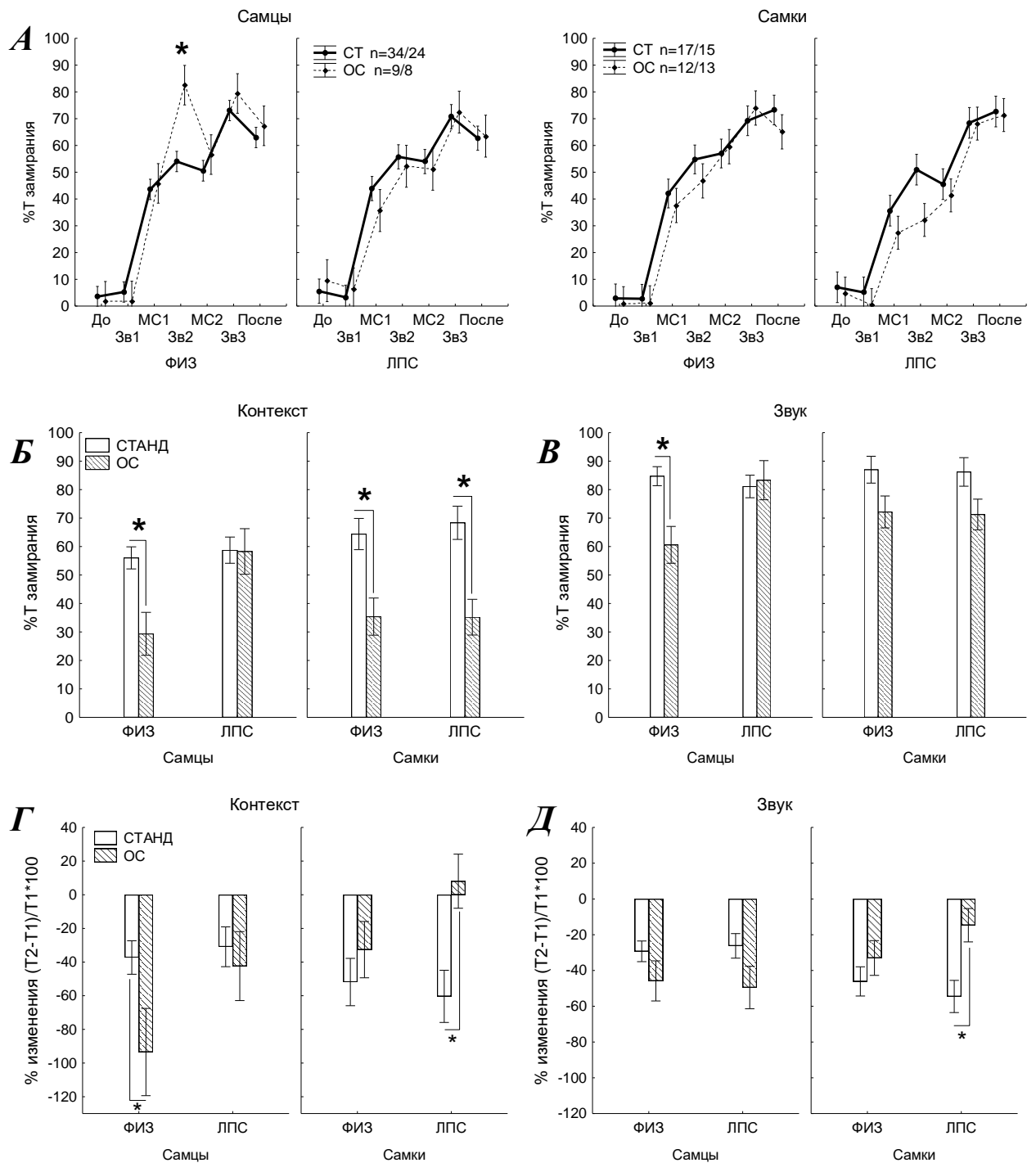


**Рис. 32.** Влияние обогащенной среды на время зависания в тесте вынужденного плавания. А – время зависания по минутно в тесте у самцов, Б – у самок. В – общее время зависания в тесте. По оси абсцисс на А и Б – время, мин. \* - различия между крысами в ОС и СТАНД условиях ( $p < 0.05$ , One Way ANOVA), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ). Остальные обозначения как на рис. 29.

#### **7.4. Влияние содержания в обогащенной среде на выработку, проявление и угашение классического оборонительного рефлекса на звук.**

В процессе выработки условнорефлекторного страха (рис. 33, А) у самцов ФИЗ группы после содержания в ОС время замирания на второй звуковой стимул было больше, чем у крыс в стандартных условиях ( $F_{1,41}=6.18$ ,  $p=0.017$ ), что может свидетельствовать о более быстром обучении крыс после ОС. На обучение самцов ЛПС группы и на всех самок содержание в ОС не оказало влияния. В Тесте 1 через 24 часа после обучения после содержания в ОС самцы ФИЗ группы замирали меньше (рис. 33, Б, В), чем крысы в стандартных условиях в ответ на предъявление контекста ( $F_{1,41}=8.41$ ,  $p=0.006$ ) или звука ( $F_{1,41}=9.24$ ,  $p=0.004$ , One Way ANOVA). У самцов ЛПС группы в разных условиях содержания проявление страха не отличалось в ответ, как на контекст, так и звук. У самок ФИЗ и ЛПС группы время замирания после содержания в ОС было меньше в ответ на контекст, чем у крыс в стандартных условиях ( $F_{1,27}=11.92$ ,  $p=0.002$  и  $F_{1,26}=24.18$ ,  $p=0.000$  соответственно). У самок содержание в ОС не оказало влияния на уровень замирания в ответ на звук. Таким образом, содержание в ОС у большинства крыс уменьшило проявление страха в виде замирания в ответ на контекст. Наиболее устойчивыми к действию ОС оказались самцы ЛПС группы, а наиболее чувствительные самцы ФИЗ группы, у которых уменьшалось проявление страха как на контекст, так и звук.

Для того, чтобы оценить эффективность угашения условнорефлекторного страха после двух сеансов угашения после проведения Теста 2 рассчитывали % изменения уровня замирания по формуле:  $(\%T \text{ замирания Тест 2} - \%T \text{ замирания Тест 1}) / \%T \text{ замирания Тест 1} \times 100\%$ . Результаты такого анализа представлены на рис. 33, Г и Д. Из рис. 33, Г видно, что процент уменьшения времени замирания после ОС в ответ на контекст у самцов ФИЗ группы был больше, чем у самцов этой группы в стандартных ус-



**Рис. 33.** Влияние содержания в условиях обогащенной среды (ОС) по сравнению со стандартными условиями (СТАНД) на выработку условнорефлекторного страха (А), проявление страха в Тесте 1 через 24 часа после обучения (Б, В) и Тесте 2 после двух сеансов угашения (Г, Д). По оси абсцисс на А – интервалы времени (До – до начала сочетаний, Зв1,2,3 - во время 1-ого, 2-ого, 3-его звука, МС1,2 – 1-й и 2-й межсигнальный интервал, После – после сочетаний), на Б-Д – группы крыс. \* - статистически значимые различия ( $p < 0.05$ , на А-В – post hoc анализ, Factorial ANOVA) по сравнению со стандартными условиями содержания. Остальные обозначения как на рис. 29.

ловиях ( $F_{1,37}=4.59$ ,  $p=0.039$ ). У самок ЛПС группы после ОС процент изменения уровня замирания, наоборот, был меньше, чем у животных в стандартных условиях в ответ на контекст ( $F_{1, 25}=7.84$ ,  $p=0.009$ ) и на звук ( $F_{1, 25}=7.59$ ,  $p=0.011$ ). Таким образом, содержание в ОС приводило к ускорению угашения страха у самцов ФИЗ группы в ответ на контекст, и к замедлению угашения у самок ЛПС группы в ответ на контекст и звук.

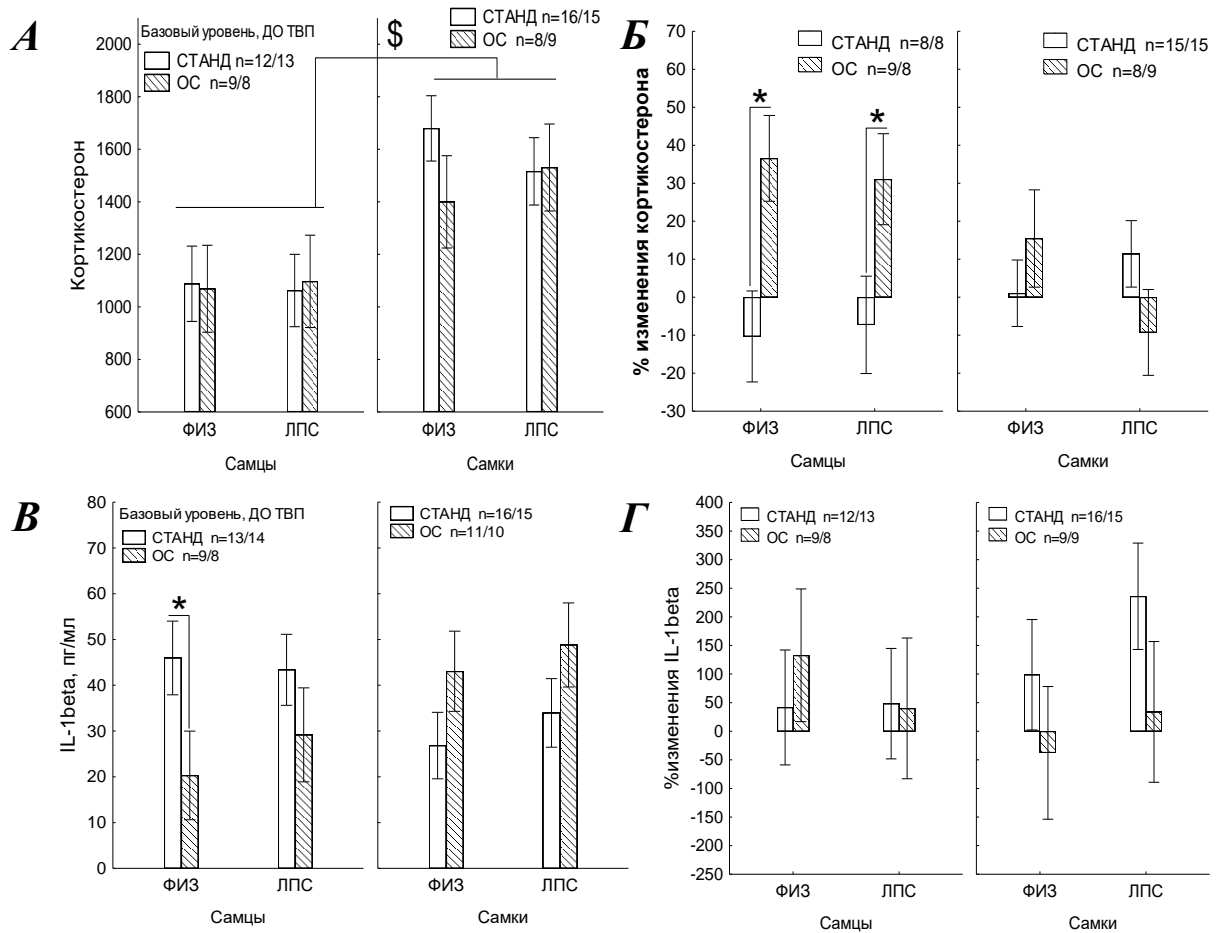
### **7.5. Влияние содержания в условиях обогащенной среды на уровень кортикостерона и ИЛ-1бета в сыворотке крови.**

Уровень кортикостерона в сыворотке крови до стрессирующего воздействия (базовый уровень) не отличался после ОС по сравнению со стандартными условиями как у самцов, так и самок (рис. 34, А), в целом у самок уровень кортикостерона был выше, чем у самцов. После теста вынужденного плавания у самцов, содержащихся в ОС, уровень кортикостерона повышался в большей степени по сравнению с базовым уровнем, чем у самцов в стандартных условиях (рис. 34, Б).

Базовый уровень интерлейкина у самцов ФИЗ группы после ОС был ниже ( $U=125$ ,  $p=0.012$ ), чем у самцов в стандартных условиях (рис. 34, В). После теста вынужденного плавания не было различий в процентах изменений ИЛ-1бета у самцов и самок после ОС по сравнению со стандартными условиями (рис. 34, Г).

Таким образом, содержание в ОС приводило к снижению базового уровня ИЛ-1бета у самцов ФИЗ группы и к увеличению реактивности в ответ на стрессирующее воздействие по уровню кортикостерона у самцов ФИЗ и ЛПС групп. У самок содержание в ОС не меняло существенным образом биохимические показатели крови.





**Рис. 34.** Сопоставление уровня кортикостерона (А, Б) и ИЛ-1бета (В, Г) в сыворотке крови у крыс до (А, В) и после теста вынужденного плавания (Б, Г), содержащихся в обогащенной среде (ОС) и в стандартных условиях (СТАНД). \* - статистически значимые различия между крысами в ОС и СТАНД условиях ( $p < 0.05$ ), # - тенденция ( $0.05 < p < 0.1$ ).  $\uparrow\downarrow$  - увеличение/снижение уровня кортикостерона или ИЛ-1бета после теста вынужденного плавания по сравнению с базовым уровнем. \$ - различия между самцами и самками, содержащихся в одинаковых условиях. n - число самцов/самок.

## 7.6. Обсуждение результатов.

Проведенное тестирование крыс на тревожность в ОП и ПКЛ после длительного содержания в обогащенной среде выявило снижение уровня тревожности у самцов, но не самок. Двигательная активность могла увеличиваться после ОС, что проявлялось у самцов в обоих тестах, а у самок - только в ПКЛ. Показатели исследовательской активности (стойки, свешивания) после ОС увеличивались практически у всех групп крыс. Изменения уровня тревожности и двигательной активности в большей степени происходили у крыс ФИЗ группы, по сравнению с ЛПС группой. Полученные

результаты согласуются с данными литературы. В большинстве работ показано, что ОС вызывает уменьшение тревожности у крыс (Mora-Callegos et al., 2019; Leger et al., 2015; Grippo et al., 2014; Pritchard et al., 2013; Hellemans et al., 2004; Hendershott et al., 2016). Показано, что ОС, предпринятое после СИ, способно ослабить его негативные последствия (Hellemans et al., 2004; Cao et al., 2017; Brenes et al., 2020 Grippo et al., 2014). В опытах на мышах было установлено, что трехнедельное ОС является оптимальным временем для улучшения когнитивных функций и проявления антитревожных эффектов (Leger et al., 2015). Однако в ряде работ ОС не вызывало анксиолитических влияний (Mileva, Bielajew 2015; Yildirim et al., 2012), а в других, наоборот, приводило к увеличению тревожности. Например, ОС в течение 2-х месяцев у самок-мышей приводило к увеличению тревожности (Pietropaolo et al., 2006). Возможно, что эффекты от ОС на тревожность зависят от вида экспериментального животного, для мышей характерны в отличие от крыс анксиогенные влияния. Известно также, что физические упражнения на беговой дорожке или бег в «беличьем колесе» приводят к увеличению двигательной активности и снижению уровня тревожности (Mazur et al., 2017). Что касается влияний ОС на тревожное поведение в условиях раннего ЛПС стресса, то подобных работ в литературе нам не известно.

В нашей работе было показано уменьшение времени зависания у самок в тесте вынужденного плавания после ОС, что может свидетельствовать об антидепрессивном эффекте данного воздействия. Однако, учитывая данные об увеличении двигательной активности крыс после ОС в тестах на тревожность, уменьшение времени зависания могло быть связано с ростом двигательной активности. На время зависания самцов ОС не оказало существенного влияния, что, возможно, связано с тем, что у самцов в отличие от самок иммобильность проявляется в большей степени (Павлова с соавт., 2020). В тесте на ангедонию, наиболее значимом тесте для выявления депрессивно-подобного поведения, не было выявлено изменений в предпочтении сахарозы,

что можно объяснить очень высоким уровнем предпочтения сахарозы у крыс в стандартных условиях (95-97%), сдвиг в сторону еще большего предпочтения был невозможен. Таким образом, в нашей работе не было получено убедительных доказательств изменения уровня депрессивно-подобного поведения под влиянием ОС. По данным литературы содержание в ОС все же могло вызывать увеличение предпочтения сахарозы (Wukitsch et al., 2020). Животные, помещенные в ОС, проявляли меньше депрессивно-подобного поведения, чем животные, содержащиеся в стандартных условиях или в СИ, что могло выявляться как в тесте вынужденного плавания, так и в тесте предпочтения сахарозы (Mileva, Bielajiw, 2015; Brenes et al., 2020; Wukitsch et al., 2020). Однако в некоторых работах не было выявлено влияния ОС на депрессивно-подобное поведение (Leger et al., 2015). Содержание в ОС до или после СИ было способно предотвратить либо, соответственно, ослабить эффекты изоляции на депрессивно-подобное поведение (Grippe et al., 2014).

В нашей работе после содержания в ОС самцы ФИЗ группы показали более быстрое обучение при выработке условнорефлекторного страха, чем животные, содержащиеся в стандартных условиях, на обучение других групп ОС не оказало влияния. Из данных литературы известно, что ОС оказывает положительное действие на когнитивные способности животных. ОС улучшало пространственную и непространственную память в тесте на распознавание новых объектов, а также память об аверсивных стимулах в модели условного рефлекса пассивного избегания (Leger et al., 2015). В водном лабиринте после ОС наблюдали улучшение обучения (Pietropaolo et al., 2006). У мышей ОС приводило к более быстрому обучению активному избеганию (Pietropaolo et al., 2014). После ОС крысы больше замирали на контекст при условнорефлекторном страхе, чем крысы с СИ (Mora-Callegos, Fornaguera, 2019). Вместе с тем, после ОС происходило замедление угашения условнорефлекторного страха на звук, но не на контекст у мышей (Pietropaolo et al., 2006). Влияние на когнитивные способности связывают с увеличением

веса коры головного мозга под влиянием ОС, объема гиппокампа (Leger et al., 2015; Hellemans et al., 2004). Улучшение обучения/пространственной памяти и усиление длительной потенциации гиппокампа под влиянием ОС происходит за счет усиления нейрогенеза субгранулярного слоя зубчатой фасции гиппокампа, усиления пролиферации новорожденных клеток и улучшения их выживаемости (Григорьян, 2021). Большая роль отводится увеличению уровня BDNF, а также увеличению синаптогенеза, что проявляется в возрастании числа синаптических контактов, разветвленности дендритного дерева и плотности дендритных шипиков в гиппокампе (Григорьян, 2021).

В нашей работе в тесте через 24 часа после обучения самцы и самки продемонстрировали меньшее время замирания на контекст после ОС. Время замирания на условный стимул уменьшалось только у самцов ФИЗ группы после ОС. Возможно, уменьшение замирания на контекст связано с увеличением двигательной активности и уменьшением уровня тревожности после ОС, что можно было наблюдать в наших экспериментах в ОП и ПКЛ. О связи уровня тревожности и замирания в ответ на контекст свидетельствуют ранее полученные данные (Павлова, Рысакова, 2015). Можно также предположить, что после ОС животные начинают предпочитать активно-оборонительные реакции на угрожающие стимулы, что подтверждают данные об улучшении выработки активного избегания или обучения в водном лабиринте (Pietropaolo et al., 2006; 2014).

Согласно нашим данным, угашение страха на контекст ускорялось под влиянием ОС у самцов ФИЗ группы, но угашение страха на контекст и звук замедлялось у самок ЛПС группы. Ранее замедление угашения страха на звук наблюдали у мышей после содержания в ОС (Pietropaolo et al., 2006).

Содержание в ОС не влияло на базовый уровень кортикостерона в наших опытах, но приводило к снижению уровня ИЛ-1бета у самцов ФИЗ группы. Ранее наблюдали уменьшение экспрессии провоспалительных цитокинов

(TNF- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ ) и увеличение противовоспалительного цитокина (ИЛ-10) в мозге после ОС (Gong et al., 2018). После ОС наблюдали также снижение уровня ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови (Mileva et al 2017).

Наибольший эффект ОС оказало на крыс ФИЗ группы по сравнению с животными ЛПС группы, это проявлялось при анализе поведения в тестах на тревожность, при обучении 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. Противоположную картину мы наблюдали после СИ, в том случае наблюдалось суммирование двух эффектов.

**Выводы.**

1. Длительное содержание в условиях ОС приводило к снижению уровня тревожности, увеличению двигательной и исследовательской активности в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта. Наибольшие изменения в уровне тревожности наблюдались у самцов группы ФИЗ.
2. Содержание в ОС вызывало уменьшение признаков депрессивно-подобного поведения у самок ФИЗ и ЛПС групп, что проявлялось в уменьшении времени зависания в тесте вынужденного плавания.
3. Содержание в ОС ускоряло выработку классического оборонительного условного рефлекса у самцов ФИЗ группы. Проявление условнорефлекторного страха на контекст при тестировании через 24 часа после обучения уменьшалось у большинства групп крыс.
4. Угашение условнорефлекторного страха на контекст после содержания в ОС ускорялось у самцов ФИЗ группы, но замедлялось у самок ЛПС группы.
5. Животные ФИЗ группы показали наибольшую чувствительность к воздействию обогащенной среды, судя по поведенческим и биохимическим показателям крови.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

---

В данной работе было показано влияние раннего провоспалительного стресса на различные аспекты поведения взрослых животных. Животные, 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. По ряду признаков самцы ЛПС группы могут служить в качестве экспериментальной модели посттравматических стрессовых расстройств 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, получаемых при пренатальном введении 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 УОР, 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 ГН 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 ГН 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 (глава 3), 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, ускоряло обучение, 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.

Если сравнить эффективность трех используемых в работе воздействий (введение ЛПС в раннем онтогенезе, обогащение среды, социальная

изоляция), то наиболее выраженное увеличение уровня тревожности происходило под влиянием социальной изоляции, эффект от введения ЛПС проявлялся только в подростковом возрасте. Увеличение уровня страха на контекст в то же время происходило только под влиянием раннего провоспалительного стресса, а социальная изоляция нарушала сам процесс выработки условного рефлекса. Для уменьшения тревожности и страха оказалось наиболее эффективным содержание в обогащенной среде.

## **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 замиранья,

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.

б. Длительное проживание в условиях обогащенной среды вызывало снижение уровня тревожности в ОП и ПКЛ, увеличение двигательной и исследовательской активности, 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, самцы ЛПС группы были наименее подвержены влиянию ОС по показателям тревожности и страха.

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ 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

7. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В. Влияние раннего провоспалительного стресса на оборонительное поведение взрослых крыс. Сборник тезисов XVI Международного Междисциплинарного Конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ.» 2020. – 115 с. DOI: <https://doi.org/10.29003/m966.sudak.ns2020-16/115>
8. Павлова И.В., Брошевицкая Н. Д., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В. Половые различия в тревожно-депрессивном и оборонительном поведении крыс Вистар. Сборник тезисов XVI Международного Междисциплинарного Конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ.» 2020. - 361 с. <https://doi.org/10.29003/m1193.sudak.ns2020-16/361>
9. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Григорьян Г.А. Влияние социальной изоляции и обогащенной среды на тревожность и депрессивно-подобное поведение крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса. Сборник тезисов XVII Международного Междисциплинарного Конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ.» 2021. – 89 с. <https://doi.org/10.29003/m2066.sudak.ns2021-17/89-90>
10. Павлова И.В., Брошевицкая Н. Д. Влияние обогащенной среды и социальной изоляции на условнорефлекторный страх у крыс, перенесших ранний провоспалительный стресс. Сборник тезисов XVII Международного Междисциплинарного Конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ.» 2021. – 290 с. <https://doi.org/10.29003/m2264.sudak.ns2021-17/290-291>
11. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И. Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых крыс Вистар. Сборник тезисов XVIII Международного Междисциплинарного Конгресса «НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ.» 2022. – 81 с. <https://doi.org/10.29003/m2700.sudak.ns2022-18/81-82>

12. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Григорьян Г.А. Влияние обогащенной среды и социальной изоляции на последствия раннего провоспалительного стресса у взрослых крыс. Сборник тезисов XXIV Научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. 2020. DOI: 10.31857/S0044452921040057
13. Брошевицкая Н. Д., Павлова И. В. Влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых крыс. Сборник трудов XXV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. Материалы школы-конференции. Москва, 2021. - 37-43 с. DOI: 10.24412/cl-36601-2021-1-37-43
14. Broshevitskaya N.D., Pavlova I.V., Zaichenko M.I., Onufriev M.V., Moiseeva J.V. Sex differences in fear conditioning and delay discounting in response to early life stress induced by lipopolysaccharide intoxication in rats. *European Neuropsychopharmacology*. 2019. 29: ss365-366 <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.09.524>
15. Broshevitskaya N.D., Pavlova I. P., Zaichenko M.I., Gruzdeva V.A., Grigoryan G.A. Sex differences in depressive-like behavior in adult rats subjected to early life stress. *European Neuropsychopharmacology*. 2019. 29: 405 <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.09.578>
16. Broshevitskaya N., Pavlova I., Zaichenko M., Grigoryan G. Effects of ovariectomy on anxious and depressive-like behavior and conditioned fear in females rats with early proinflammatory stress. *European Neuropsychopharmacology*. 2021. 53: ss615-616 <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.10.700>
17. Broshevitskaya Nadezda D., Pavlova Irina V., Zaichenko Maria I., Onufriev Mihail V., Moiseeva Yulia V, Grigoryan Grigoriy A. The influence of early proinflammatory stress on anxiety, depressive-like and defensive behavior in

rats. FENS Forum Копия программы: [https://forum2020.fens.org/wp-content/uploads/sites/51/2020/07/913657\\_FENS2020\\_PROGRAMME-AT-A-GLANCE.pdf](https://forum2020.fens.org/wp-content/uploads/sites/51/2020/07/913657_FENS2020_PROGRAMME-AT-A-GLANCE.pdf) Ссылка на сайт конференции: <https://forum2020.fens.org/>



## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

---

*ИЛ-1бета* – интерлейкин-1 бета;

*ГГН ось* – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось;

*ИНТ* – интактные, группа интактных крыс;

*ИФА* – иммунноферментный анализ;

*ЛПС* – липополисахарид, группа с введением липополисахарида;

*МС* – межсигнальный интервал;

*ОП* – открытое поле;

*ОР* – открытые рукава ПКЛ;

*ОС* – обогащенная среда;

*ПКЛ* – приподнятый крестообразный лабиринт;

*ПНД* – постнатальный день;

*Р-И* – тест «Резидент-Интродер»;

*СИ* – социальная изоляция;

*СТАНД* – стандартные условия содержания;

*ТВП* – тест вынужденного плавания;

*ТПС* – тест предпочтения сахарозы;

*УОР* – классический условный оборонительный рефлекс;

*УРАИ* – условный рефлекс активного избегания;

*УРПИ* – условный рефлекс пассивного избегания;

*ФИЗ* – физиологический раствор, группа с введением физиологического р-ра.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

---

1. *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 с.
2. *Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П.* Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., // Высшая школа. 1991. 399.
3. *Григорьян Г.А.* Молекулярно-клеточные механизмы пластических перестроек, вызванных обогащением среды. влияние на обучение и память. // Нейрохимия. 2021. 38 (3): 205-220 с.
4. *Григорьян Г.А., Мержанова Г.Х.* Индивидуальное поведение при ошибках прогноза подкрепления и неопределенности среды. // Журн.высш.нервн.деят. 2008. 58 (4): 408-422 с.
5. *Григорьян Г.А., Мержанова Г.Х.* Отражение индивидуально-психологических различий в разных фазах обучения и сопутствующие им изменения передачи дофамина в мезолимбической системе мозга. // Журн.высш.нервн.деят. 2006. 56 (1): 22-37 с.
6. *Григорьян Г.А.* Половые различия в поведении и биохимических маркерах у животных в ответ на нейровоспалительный стресс. // Успехи Физиол. Наук. 2020. 51 (1): 18-32 с.
7. *Григорьян Г.А., Гуляева Н.В.* Стресс-реактивность и стресс-устойчивость в патогенезе депрессивно-подобных расстройств. Роль эпигенетических механизмов. // Журн.высш.нервн.деят. 2015. 65 (1): 19-32 с.
8. *Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В.* Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. // Журн. высш. нервн. деят. 2014. 65 (1): 19-32 с.
9. *Жуков Д.А.* Психогенетика стресса. Поведенческие и эндокринные корреляты генетических детерминант стресс-реактивности при неконтролируемой ситуации. С-Пб.: СПбЦНТИ, 1997. 176 с.

10. *Зайченко М.И., Мержанова Г.Х., Демина А.В.* Исследование поведения «импульсивных» и «самоконтролирующих» животных методом «эмоционального резонанса». // Журн. высш. нервн. деят. 2010. 60 (2): 192-200 с.
11. *Калуев А.В.* Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных). Киев: CSF, 1998. 98 с.
12. *Квичанский А.А.* Возрастная динамика экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением и реакцией на стресс, у крыс в модели неонатального провоспалительного стресса. Автореферат диссертации ... к.б.н. 2022. 11-21 с.
13. *Кудрявцева Н.Н.* Нейробиология агрессии: мыши и люди. Новосибирск, Наука-Центр, 2013. 272 с.
14. *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 с.
15. *Павлова И.В., Брошевицкая Н.Д., Зайченко М.И., Григорьян Г.А.* Влияние рациона питания крыс во время беременности на поведение потомства после раннего провоспалительного стресса. // Журн. высш. нервн. деят. 2020. 70 (6): 807-824 с.
16. *Павлова И.В., Рысакова М.П.* Влияние введения агониста и антагониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов в базолатеральное ядро миндалины на проявление и угашение страха у крыс с разной длительностью затаивания. // Журн. высш. нервн. деят. 2014. 54 (4): 460-473 с.
17. *Павлова И.В., Рысакова М.П.* Особенности проявления условно-рефлекторного страха у активных и пассивных кроликов // Рос. физиол. журн. Им. И.М. Сеченова. 2013. 99 (11): 1250-1264 с.
18. *Павлова И.В., Рысакова М.П.* Проявление тревожности крыс вистар при выработке условнорефлекторного страха. // Журн. высш. нервн. деят. 2015. 55 (4): 720-734.

19. Павлова И.В., Рысакова М.П., Зайченко М.И. Брошевицкая Н.Д. Поведение крыс с высоким и низким уровнем замирания в оборонительных ситуациях и при выборе пищевого подкрепления. // Рос.физиол.журн. им.И.М.Сеченова. 2018. 104 (7). 780-796 с.
20. Симонов П.В. Избранные труды: В 2 т. / П.В. Симонов; Отв. Ред. И.А. Шевелев; Ин-т высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. – М.: Наука, 2004. 266-288 с.
21. Степаничев М.Ю. Цитокины как нейромодуляторы в центральной нервной системе // Нейрохимия. 2005. 22 (1). 6-11 с.
22. Хоничева Н.М., Чабак-Гарбач Р., Крупина Н.А. Поведенческие последствия изоляции в раннем онтогенезе у крыс: селективность тревожных состояний. // Журн. высш. нервн.деят. 2002. 52 (6): 743-749 с.
23. Adzic M., Djordjevic J., Mitic M., Brkic Z., Lukic I., Radojicic M. The contribution of hypothalamic neuroendocrine, neuroplastic and neuroinflammatory processes to lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in female and male rats: Involvement of glucocorticoid receptor and C/EBP- $\beta$ . // Behav. Brain. Res. 2015. 291: 130-139.
24. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. // Cell 2006. 124: 783–801.
25. Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J. Endotoxin. Res. 2001. 7 (3): 167-202.
26. Alperina E., Idova G., Zhukova E., Zhanaeva S., Kozhemyakina R. Cytokine variations within brain structures in rats selected for differences in aggression. // Neurosci. Lett. 2019. 692:193-198.
27. Alshammari T.K., Alghamdi H., Alkhader L.F., Alqahtani Q., Alrasheed N.M., Yacoub H., Alnaem N., AlNakiyah M., Alshammari M.A. Analysis of the molecular and behavioral effects of acute social isolation on rats. // Behav. Brain Res. 2020. 377: 112191.

28. *An X.L., Zheng X.G., Liang J., Bai Y.J.* Corticosterone combined with intramedial prefrontal cortex infusion of SCH 23390 impairs the strong fear response in high-fear-reactivity rats. // *Psych. J.* 2013. 2 (1): 1-10.
29. *Andero R., Choi D.C., Ressler K.J.* BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2014. 122: 169–192.
30. *Arai K., Matsuki N., Ikegaya Y., Nishiyama N.* Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. // *Jpn. J. Pharmacol.* 2001. 87 (3): 195-201.
31. *Audet M.C., Mangano E.N., Anisman H.* Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. // *Front. Behav. Neurosci.* 2010 4: 156.
32. *Azogu I., Liang J., Plamondon H.* Sex-specific differences in corticosterone secretion, behavioral phenotypes and expression of TrkB.T1 and TrkB.FL receptor isoforms: Impact of systemic TrkB inhibition and combinatory stress exposure in adolescence. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2018. 86: 10-23.
33. *Badowska D.M., Brzozka M.M., Chowdhury A., Malzahn D., Rossner M.J.* Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice towards clinical domains. // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2015. 165 (6): 483-496.
34. *Baharnoori M., Bhardwaj S.K., Srivastava L.K.* Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. // *Schizophr. Bull.* 2012. (3): 444-56.
35. *Barabas A.J., Lucas J.R., Erasmus M.A., Cheng H.W., Gaskill B.N.* Who's the Boss? Assessing Convergent Validity of Aggression Based Dominance Measures in Male Laboratory Mice, *Mus Musculus*. // *Front. Vet. Sci.* 2021. 8: 695948.

36. *Belviranlı M., Atalık K.E., Okudan N., Gokbel H.* Age and sex affect spatial and emotional behaviors in rats: the role of repeated elevated plus maze test. // *Neuroscience*. 2012. 227: 1-9.
37. *Belzung C., Le Pape G.* Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. // *Physiol. Behav.* 1994. 56: 623-8.
38. *Berardelli R., Karamouzis I., D'Angelo V., Zichi C., Fussotto B., Giordano R., Ghigo E., Arvat E.* Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. // *Endocrine*. 2013. 43 (1): 51-8.
39. *Berghöfer B., Frommer T., Haley G., Fink L., Bein G., Hackstein H.* TLR7 ligands induce higher IFN- $\alpha$  production in females. // *J. Immunol.* 2006. 177 (4): 2088-96.
40. *Berkiks I., Garcia-Segura L.M., Nassiri A., Mesfioui A., Ouichou A., Boulbaroud S., Bahbiti Y., Lopez-Rodriguez A.B., Hasnaoui E., El Hessni A.* The sex differences of the behavior response to early Life immune stimulation: Microglia and astrocytes involvement. // *Physiol. Behav.* 2019. 199: 386-394.
41. *Biesmans S, Matthews LJ, Bouwknecht JA, De Haes P, Hellings N, Meert TF, Nuydens R, Ver Donck L.* Systematic Analysis of the Cytokine and Anhedonia Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration in Rats. // *Biomed. Res. Int.* 2016. 2016: 9085273.
42. *Bilbo S.D., Newsom N.J., Sprunger D.B., Watkins L.R., Rudy J.W., Maier S.F.* Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. // *Brain. Behav. Immun.* 2007. 21 (3): 332-342.
43. *Bilbo S.D., Rudy J.W., Watkins L.R., Maier S.F.* A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. // *Behav. Brain Res.* 2006. 169(1): 39-47.
44. *Bilbo S.D., Schwarz J.M.* The immune system and developmental programming of brain and behavior. // *Front. Neuroendocrinol.* 2012. 33: 267-286.

45. *Bilbo S.D., Yirmiya R., Amat J., Paul E.D., Watkins L.R., Maier, S.F.* Bacterial infection early in life protects against stressor-induced depressive-like symptoms in adult rats. // *Psychoneuroendocrinology*. 2008. 33: 261–269.
46. *Bilbo SD, Levkoff LH, Mahoney JH, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF.* Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. // *Behav Neurosci*. 2005. 119 (1): 293-301.
47. *Biro L., Toth M., Sipos E., Bruzsik B., Tulogdi A., Bendahan S., Sandi C., Haller J.* Structural and functional alterations in the prefrontal cortex after post-weaning social isolation: relationship with species-typical and deviant aggression. // *Brain. Struct. Funct*. 2017. 222 (4): 1861-1875.
48. *Blanchard D.C., Shepherd J.K., De Padua Carobrez A., Blanchard R.J.* Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions. // *Neurosci. Biobehav. Rev*. 1991 15 (4): 461-8.
49. *Bledsoe A.C., Oliver K.M., Scholl J.L., Forster G.L.* Anxiety states induced by post-weaning social isolation are mediated by CRF receptors in the dorsal raphe nucleus. // *Brain. Res. Bull*. 2011. 85 (3-4): 117-22.
50. *Bodhankar S, Lapato A, Chen Y, Vandenbark AA, Saugstad JA, Offner H.* Role for microglia in sex differences after ischemic stroke: importance of M2. // *Metab. Brain. Dis*. 2015. 30 (6): 1515-29.
51. *Boero G., Pisu M.G., Biggio F., Muredda L., Carta G., Banni S., Paci E., Follesa P., Concas A., Porcu P., Serra M.* Impaired Glucocorticoid-mediated HPA axis negative feedback induced by juvenile social isolation in male rats. // *Neuropharmacology*. 2018. 133: 242-253.
52. *Borbelyova V., Domonkos E., Babickova J., Totnova L., Bosy M., Hodosy J., Celec P.* No effect of testosterone on behavior in aged Wistar rats. // *Aging (Albany N.Y.)* 2016. 8 (11): 2848-2861.
53. *Breivik T., Stephan M., Brabant G.E., Straub R.H., Pabst R., von Horsten B.* Postnatal lipopolysaccharide-induced illness predisposes to periodontal disease in adulthood. // *Brain. Behav. Immun*. 2002. 16 (4): 421-438.

54. *Brenes J.C., Fornaguera J., Sequeira-Cordero A.* Environmental enrichment and physical exercise attenuate the depressive-like effects induced by social isolation stress in rats. // *Front. Pharmacol.* 2020. 11: 804.
55. *Brenes Sáenz J.C., Villagra O.R., Fornaguera Trías J.* Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. // *Behav Brain Res.* 2006. 169 (1): 57-65.
56. *Bush D.E., Vaccarino F.J.* Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted progressive-ratio cocaine self-administration break points in Wistar rats. // *Psychopharmacology (Berl).* 2007. 194: 211-219.
57. *Cai K.C., van Mil S., Murray E., Mallet J.F., Matar C., Ismail N.* Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. // *Brain Behav. Immun.* 2016. 58: 327-337.
58. *Cain C.K.* Avoidance problems reconsidered. // *Opin. Behav. Sci.* 2019. 26: 9-17.
59. *Cao W-Y., Hu Z.L., Xu Y., Zhang W.J., Huang F.L., Qiao X.Q., Cui Y.H., Wan W., Wang X.Q., Liu D., Dai R.P., Li F., Li C.Q.* Role of early environmental enrichment on the social dominance tube test at adulthood in the rat. // *Psychopharmacology (Berl).* 2017. 234 (22): 3321-3334.
60. *Capuron L., Dantzer R.* Cytokines and depression: the need for a new paradigm // *Brain Behav. Immun.* 2003. 17 (1): 119-124.
61. *Carpenter S., O'Neill L.A.* How important are toll-like receptors for antimicrobial responses. // *Cell Microbiol.* 2007. 9: 1891–901.
62. *Carvalho L.A., Pariante C.M.* In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants. // *Stress.* 2008. 11 (6): 411-24.
63. *Chamera K., Szuster-Głuszczyk M., Trojan E., Basta-Kaim A.* Maternal Immune Activation Sensitizes Male Offspring Rats to Lipopolysaccharide-Induced Microglial Deficits Involving the Dysfunction of CD200-CD200R and CX3CL1-CX3CR1 Systems. // *Cells.* 2020. 9 (7): 1676.



64. *Cirulli F., Berry A., Bonsignore L.T., Capone F., D'Andrea I., Aloe L., Branchi I., Alleva E.* Early life influences on emotional reactivity: evidence that social enrichment has greater effects than handling on anxiety-like behaviors, neuroendocrine responses to stress and central BDNF levels. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2010. 34 (6): 808-20.
65. *Claypoole L.D., Zimmerberg B., Williamson L.L.* Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively bred for an infantile trait. // *Brain Behav. Immun.* 2017. 59: 135-146.
66. *Colom-Lapetina J., Begley S.L., Johnson M.E., Bean K.J., Kuwamoto W.N., Shansky R.M.* Strain-dependent sex differences in a long-term forced swim paradigm. // *Behav. Neurosci.* 2017. 131 (5): 428-36.
67. *Colon L., Odynocki N., Santarelli A., Poulos A.M.* Sexual differentiation of contextual fear responses. // *Learn. Mem.* 2018. 25 (5): 230-240.
68. *Cunningham C., Sanderson D.J.* Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL-1beta on learning and memory. // *Brain. Behav. Immun.* 2008. 22: 1117–1127.
69. *Custódio C.S., Mello B.S.F., Filho A.J.M.C., de Carvalho Lima C.N., Cordeiro R.C., Miyajima F., Réus G.Z., Vasconcelos S.M.M., Barichello T., Quevedo J., de Oliveira A.C., de Lucena D.F., Macedo D.S.* Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. // *Mol. Neurobiol.* 2018. 55 (5): 3775-3788.
70. *Czerniawski J., Guzowski J.F.* Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. // *J. Neurosci.* 2014. 34: 12470–12480.
71. *Dalla C., Shors T.J.* Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. // *Physiol. Behav.* 2009. 97 (2): 229-238.

72. *Dallman M.F., Pecoraro N., Akana S.F., La Fleur S.E., Gomez F., Houshyar H., Bell M.E., Bhatnagar S., Laugero K.D., Manalo S.* Chronic stress and obesity: a new view of 'comfort food'. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. 100: 11696–11701.
73. *Dang R., Guo Y.Y., Zhang K., Jiang P., Zhao M.G.* Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. // *Mol. Brain.* 12 (1): 42. 2019.
74. *Das S., Deuri S.K., Sarmah A., Pathak K., Baruah A., Sengupta S., Mehta S., Avinash P.R., Kalita K.N., Hazarika J.* Aggression as an independent entity even in psychosis- the role of inflammatory cytokines. // *J Neuroimmunol.* 2016. 292: 45-51.
75. *Davis L.K., Bolton J.L., Hanson H., Guarraci F.A.* Modified limited bedding and nesting is a model of early-life stress that affects reproductive physiology and behavior in female and male Long-Evans rats. // *Physiol. Behav.* 2020. 224: 113037.
76. *Daviu N., Andero R., Armario A., Nadal R.* Sex differences in the behavioral and hypothalamic-pituitary-adrenal response to contextual fear conditioning in rats. // *Horm. Behav.* 2014. 66 (5): 713-723.
77. *de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E.* Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. // *Brain Res.* 2009. 1293: 129-41.
78. *de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M.* Brain corticosteroid receptorbalance in health and disease. // *Endocr Rev.* 1998. 19 (3): 269-301.
79. *Diamond M.C., Law F., Rhodes H., Lindner B., Rosenzweig M.R., Krech D., Bennett E.L.* Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. // *J. Comp. Neurol.* 1966. 128 (1): 117-26.
80. *Dinel A.L., Joffre C., Trifilieff P., Aubert A., Foury A., Le R.P., Laye S:* Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at

adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. // *J. Neuroinflammation*. 2014. 11: 155.

81. *Doenni V.M., Song C.M., Hill M.N., Pittman Q.J.* Early-life inflammation with LPS delays fear extinction in adult rodents. // *Brain Behav. Immun*. 2017. 63: 176-185.

82. *Domonkos E., Borbelyova V., Csongova M., Bosy M., Kacmarova M., Ostatnokova D., Hodosy J., Celec P.* Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. // *Horm. Behav*. 2017. 93: 159-165.

83. *Doosti M.H., Bakhtiari A., Zare P., Amani M., Majidi-Zolbanin N., Babri S., Salari A.A.* Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2013. 43: 55-65.

84. *Echeverria V., Grizzell J.A., Barreto G.E.* Neuroinflammation: A Therapeutic Target of Cotinine for the Treatment of Psychiatric Disorders? // *Curr Pharm Des*. 2016. 22 (10): 1324-33.

85. *Ennaceur A.* Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. // *Physiol Behav*. 2014. 135: 55-71.

86. *Fan L.W., Pang Y., Lin S., Tien L.T., Ma T., Rhodes P.G., Cai Z.* Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. // *J Neurosci Res*. 2005. 82 (1): 71-82.

87. *Fan Z., Zhu H., Zhou T., Wang S., Wu Y., Hu H.* Using the tube test to measure social hierarchy in mice. // *Nat. Protoc*. 2019. 14 (3): 819-831.

88. *Finger B.C., Dinan T.G., Cryan J.F.* High-fat diet selectively protects against the effects of chronic social stress in the mouse. // *Neuroscience*. 2011. 192: 351-360.

89. *Foley K.A., MacFabe D.F., Vaz A., Ossenkopp K.P., Kavaliers M.* Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. // *Int. J. Dev. Neurosci*. 2014. 39: 68-78.

90. Fonken L.K., Frank M.G., Gaudet A.D., D'Angelo H.M., Daut R.A., Hampson E.C., Ayala M.T., Watkins L.R., Maier S.F. Neuroinflammatory priming to stress is differentially regulated in male and female rats. // *Brain. Behav. Immun.* 2018. 70:257-267.
91. Gaburro S., Stiedl O., Giusti P., Sartori S. B., Landgraf R., Singewald N. A mouse model of high trait anxiety shows reduced heart rate variability that can be reversed by anxiolytic drug treatment. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2011. 14 (10): 1341-55.
92. Galanos C., Lüderitz O., Rietschel E.T., Westphal O., Brade H., Brade L. *et al.* Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. // *Eur. J. Biochem.* 1985. 148: 1–5.
93. Girard-Joyal O., Faragher A., Bradley K., Kane L., Hrycyk L., Ismail N. Age and sex differences in c-Fos expression and serum corticosterone concentration following LPS treatment. // *Neuroscience.* 2015. 305: 293-301.
94. Gong Y., Tong L., Yang R., Hu W., Xu X., Wang W., Wang P., Lu X., Gao M., Wu Y., Xu X., Zhang Y., Chen Z., Huang C. Dynamic changes in hippocampal microglia contribute to depressive-like behavior induced by early social isolation. // *Neuropharmacology.* 2018. 135: 223-233.
95. Gorlova A.V., Pavlov D.A., Zubkov E.A., Morozova A.Y., Inozemtsev A.N., Chekhonin V.P. Three-week isolation does not lead to depressive-like disorders in rats. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. 165 (2): 181-183.
96. Graham B.M., Daher M. Estradiol and progesterone have opposing roles in the regulation of fear extinction in female rats. // *Neuropsychopharmacology.* 2016. 41 (3): 774–780.
97. Graham B.M., Scott E. Effects of systemic estradiol on fear extinction in female rats are dependent on interactions between dose, estrous phase, and endogenous estradiol levels. // *Horm. Behav.* 2018. 97: 67–74.
98. Granger D.A., Hood K.E., Ikeda S.C., Reed C.L., Block M.L. Neonatal endotoxin exposure alters the development of social behavior and the hypothalamic-

pituitary-adrenal axis in selectively bred mice. // *Brain Behav Immun.* 1996. 10 (3): 249-59.

99. *Green M.R., McCormick C.M.* Effects of social instability stress in adolescence on Long-Term, Not short-term, spatial memory performance. // *Behav. Brain Res.* 2013. 256: 165-171.

100. *Greisen M.H., Bolwig T.G., Husum H., Nedergaard P., Wortwein G.* Maternal separation affects male rat copulatory behaviour and hypothalamic corticotropin releasing factor in concert. // *Behav. Brain. Res.* 2005. 158: 367-375.

101. *Grippe A.J., Ihm E., Wardwell J., McNeal N., Scotti M.A., Moenk D.A., Chandler D.L., LaRocca M.A., Preihs K.* The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. // *Psychosom. Med.* 2014. 76 (4): 277-284.

102. *Gualtieri F., Brégère C., Laws G.C., Armstrong E.A., Wylie N.J., Moxham T.T., Guzman R., Boswell T., Smulders T.V.* Effects of Environmental Enrichment on Doublecortin and BDNF Expression along the Dorso-Ventral Axis of the Dentate Gyrus. // *Front. Neurosci.* 2017. 11: 488.

103. *Guarnieri L.O., Pereira-Caxeta A.R., Medeiros D.C., Aquino N.S.S., Szawka R.E., Mendes E.M.A., Moraes M.F.D., Pereira G.S.* Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. // *Transl. Psychiatry.* 2020. 10 (1): 33.

104. *Gulevich R. G., Shikhevich S. G., Konoshenko M. Y., Kozhemyakina R. V.* Intermale interactions on neutral territory and subsequent dynamics of blood corticosterone and testosterone levels in tame and aggressive Norway rats (*Rattus norvegicus*). // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2021. 57 (2): 260–269.

105. *Hamasato E.K., Lovelock D., Palermo-Neto J., Deak T.* Assessment of social behavior directed toward sick partners and its relation to central cytokine expression in rats. // *Physiol Behav.* 2017. 182: 128-136.

106. *Hao Y., Jing H., Bi Q., Zhang J., Qin L., Yang P.* Intra-amygdala microinfusion of IL-6 impairs the auditory fear conditioning of rats via JAK/STAT activation. // *Behav. Brain Res.* 2014. 275: 88–95.
107. *Harre E.M., Galic M.A., Mouihate A., Noorbakhsh F., Pittman Q.J.* Neonatal inflammation produces selective behavioral deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. // *Eur. J. Neurosci.* 2008. 27 (3): 644-653.
108. *Harrison E.L., Baune B.T.* Modulation of early stress-induced neurobiological changes: a review of behavioural and pharmacological interventions in animal models. // *Translational Psychiatry.* 2014. 4: 390.
109. *Heidbreder C.A., Weiss I.C., Domeney A.M., Pryce C., Homberg J., Hedou G., Feldon J., Moran M.C., Nelson P.* Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. // *Neuroscience.* 2000. 100 (4): 749-768.
110. *Hellemans K.G., Benge L.C., Olmstead M.C.* Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. // *Brain. Res. Dev. Brain Res.* 2004. 150 (2): 103-15.
111. *Hendershott T.R., Cronin M.E., Langella S., McGuinness P.S., Basu A.C.* Effects of environmental enrichment on anxiety-like behavior, sociability, sensory gating, and spatial learning in male and female C57BL/6J mice. // *Behav. Brain Res.* 2016. 314: 215-225.
112. *Hiadlovská Z., Mikula O., Macholán M., Hamplová P., Vošlajerová Bímová B., Daniszová K.* Shaking the myth: Body mass, aggression, steroid hormones, and social dominance in wild house mouse. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015. 223: 16-26.
113. *Hodgson D.M., Coe C.L.* Perinatal programming: early life determinants of adult health and disease. // Taylor and Francis, UK. 2006.

114. *Holsboer-Trachsler E., Stohler R., Hatzinger M.* Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression. // *Psychiatry Res.* 1991. 38(2): 163-71.
115. *Hong S., Flashner B., Chiu M., ver Hoeve E., Luz S., Bhatnagar S.* Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. // *Physiol. Behav.* 2012. 105 (2): 269-275.
116. *Hori H., Kim Y.* Inflammation and post-traumatic stress disorder. // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2019. 73 (4): 143-153.
117. *Hori M., Yamada K., Ohnishi J., Sakamoto S., Furuie H., Murakami K., Ichitani Y.* Tickling during adolescence alters fear-related and cognitive behaviors in rats after prolonged isolation. // *Physiol. Behav.* 2014. 131: 62-67.
118. *Hsiao Y.H., Kuo J.R., Chen S.H., Gean P.W.* Amelioration of social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit by N-acetylcysteine in a transgenic mouse model. // *Neurobiol. Dis.* 2012. 45 (3): 1111-1120.
119. *Huang C.F., Du J.X., Deng W., Cheng X.C., Zhang S.Y., Zhao S.J., Tao M.J., Chen G.Z., Hao X.Q.* Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre- and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. // *Neuroscience.* 2015. 286: 364-70.
120. *Huang Q., Zhou Y., Liu L.Y.* Effect of post-weaning isolation on anxiety- and depressive-like behaviors of C57BL/6J mice. // *Experimental Brain Research.* 2017. 235: 2893–2899.
121. *Huang T.Y., Lin C.H.* A comparison between chronic exercise training and desipramine as treatments for the depression-like behavior of early-life maternal deprivation rats. // *Neurosci. Lett.* 2010. 480: 201–205.
122. *Huber S.A., Pfaeffle B.* Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. // *J. Virol.* 1994. 68 (8): 5126-32.

123. *Idova G.V., Markova E.V., Gevorgyan M.M., Alperina E.L., Zhukova E.N.* Changes in Production of Cytokines by C57Bl/6J Mouse Spleen during Aggression Provoked by Social Stress. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. 160 (5): 679-82.
124. *Jahng J.W., Yoo S.B., Ryu V., Lee, J.H.* Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2012. 30: 47–53.
125. *Johnston A.L., File S.E.* Sex differences in animal tests of anxiety. // *Physiol. Behav.* 1991. 49 (2): 245-250.
126. *Kashefi A., Rashidy-Pour A.* Effects of corticosterone on contextual fear consolidation in intact and ovariectomized female rats. // *Neurobiol. Learn Mem.* 2014. 114: 236-41.
127. *Keiser A.A., Turnbull L.M., Darian M.A., Feldman D.E., Song I., Tronson N.C.* Sex differences in context fear generalization and recruitment of hippocampus and amygdale during retrieval. // *Neuropsychopharmacology.* 2017. 42 (2): 397-407.
128. *Keller-Wood M.E., Dallman M.F.* Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. // *Endocr Rev.* 1984. 5 (1): 1-24.
129. *Kempermann G., Gage F.H.* Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. // *Hippocampus.* 1999. 9 (3): 321-32.
130. *Kempermann G.* Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. 20 (4): 235-245.
131. *Kentner A.C., Khan U., MacRae M., Dowd S.E., Yan S.* The effect of antibiotics on social aversion following early life inflammation. // *Physiol. Behav.* 2018. 194: 311-318.
132. *Kessler R.C., Petukhova M., Sampson N.A., Zaslavsky A.M., Wittchen H.-U.* Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. // *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 2012. 21 (3): 169–184.



133. *Kirsten T.B., Taricano M., Maiorka P.C., Palermo-Neto J., Bernardi M.M.* Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. // *Neuroimmunomodulation*. 2010. 17: 240-251.
134. *Kirsten T.B., Casarin R.C., Bernardi M.M., Felicio L.F.* Pioglitazone abolishes autistic-like behaviors via the IL-6 pathway. // *PLoS One*. 2018. 13 (5): e0197060.
135. *Klein S.L., Flanagan K.L.* Sex differences in immune responses. // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. 16(10): 626-638.
136. *Klein S.L., Marriott I., Fish E.N.* Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2015. 109 (1): 9-15.
137. *Klomberg K.F., Garland T.Jr., Swallow J.G., Carter P.A.* Dominance, plasma testosterone levels, and testis size in house mice artificially selected for high activity levels. // *Physiol Behav.* 2002. 77 (1): 27-38.
138. *Kohman R.A., Tarr A.J., Sparkman N.L., Bogale T.M., Boehm G.W.* Neonatal endotoxin exposure impairs avoidance learning and attenuates endotoxin-induced sickness behavior and central IL-1beta gene transcription in adulthood. // *Behav. Brain Res.* 2008. 194 (1): 25-31.
139. *Kohman R.A., Tarr A.J., Byler S.L., Boehm G.W.* Age increases vulnerability to bacterial endotoxin-induced behavioral decrements. // *Physiol Behav.* 2007. 91 (5): 561-5.
140. *Krupina N.A., Shirenova S.D., Khlebnikova N.N.* Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex. // *Brain sciences*. 2020. 10: 799.
141. *Kudryashova I., Tishkina A., Stepanichev M., Gulyaeva N.V.* Individual variability of synaptic depression in the hippocampus of young male and female rats after neonatal pro-inflammatory stress. // *European Neuropsychopharmacology* 2019. 29: 216-217.

142. *Kuleskaya N., Rauvala H., Voikar V.* Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. // *PLoS One*. 2011. 6 (9): e24755.
143. *Kunkel T., Wang H.* Socially dominant mice in C57BL6 background show increased social motivation. // *Behav. Brain. Res.* 2018. 336: 173-176.
144. *Kvichansky A.A., Tret'yakova L.V., Volobueva M.N., Manolova A.O., Stepanichev M.Y., Onufriev M.V., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Bolshakov A.P., Gulyaeva N.V.* Neonatal Proinflammatory Stress and Expression of Neuroinflammation-Associated Genes in the Rat Hippocampus. // *Biochemistry (Mosc)*. 2021. 86 (6): 693-703.
145. *Lalonde R., Strazielle C.* Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests as displayed by C57/BL6J and BALB/c mice. // *J. Neurosci. Methods*. 2008. 171 (1): 48-52.
146. *Landgraf R., Wigger A.* Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. // *Stress*. 2003. 6 (2): 111-9.
147. *Landgraf R., Wigger A.* High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. // *Behav. Genet.* 2002. 32. (5): 301-14.
148. *Ledoux J.E., Sakaguchi A., Reis D.J.* Strain differences in fear between spontaneously hypertensive and normotensive rats. // *Brain Res.* 1983 277 (1): 137-43.
149. *Lee G.A., Lin Y.K., Lai J.H., Lo Y.C., Yang Y.S.H., Ye S.Y., Lee C.J., Wang C.C., Chiang Y.H., Tseng S.H.* Maternal Immune Activation Causes Social Behavior Deficits and Hypomyelination in Male Rat Offspring with an Autism-Like Microbiota Profile. // *Brain Sci.* 2021. 11 (8): 1085.
150. *Leger M., Paizanis E., Dzahini K., Quiedeville A., Bouet V., Cassel J.C., Freret T., Schumann-Bard P., Boulouard M.* Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. // *Cereb. Cortex.* 2015. 25 (11): 4048-4061.

151. *Lehner M.H., Taracha E., Kaniuga E., Wisłowska-Stanek A., Wróbel J., Sobolewska A., Turzyńska D., Skórzewska A., Płaźnik A.* High-anxiety rats are less sensitive to the rewarding affects of amphetamine on 50kHz USV. // *Behav Brain Res.* 2014. 275: 234-242.
152. *Loftis J.M., Huckans M., Morasco M.J.* Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies // *Neurobiol. Dis.* 2010. 37: 519-533
153. *Lukkes J.L., Engelman G.H., Zelin N.S., Hale M.W., Lowry C.A.* Post-weaning social isolation of female rats, anxiety-related behavior, and serotonergic systems. // *Brain Res.* 2012. 1443: 1–17.
154. *Lukkes J.L., Watt M.J., Lowry C.A., Forster G.L.* Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. // *Front. Behav. Neurosci.* 2009. 3:18.
155. *MacRae M., Kenkel W.M., Kentner A.C.* Social rejection following neonatal inflammation is mediated by olfactory scent cues. // *Brain Behav Immun.* 2015. 49: 43-8.
156. *Maniam J., Morris M.J.* Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. // *Psychoneuroendocrinology.* 2009. 35 (5): 717-28.
157. *Maniam J., Antoniadis C.P., Le V., Morris M.J.* A diet high in fat and sugar reverses anxiety-like behaviour induced by limited nesting in male rats: Impacts on hippocampal markers. // *Psychoneuroendocrinology.* 2016. 68: 202-209.
158. *Maren S., De Oca B., Fanselow M.S.* Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. // *Brain Res.* 1994. 24; 661 (1-2): 25-34.
159. *Martin A.L., Brown R.E.* The lonely mouse: verification of separation-induced model of depression in female mice. // *Behav. Brain Res.* 2010. 207 (1): 196-207.

160. *Martinez F.O., Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. // *F1000Prime Rep.* 2014. 6: 13.
161. *Mayila Y., Matsuzaki T., Iwasa T., Tungalagsuvd A., Munkhzaya M., Yano K., Yanagihara R., Tokui T., Kato T., Kuwahara A., Irahara M.* The reduction in sexual behavior induced by neonatal immune stress is not related to androgen levels in male rats. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2018. 71: 163-171.
162. *Mayila Y., Matsuzaki T., Iwasa T., Tungalagsuvd A., Munkhzaya M., Yano K., Yanagihara R., Tokui T., Minato S., Takeda A., Sachiko Endo S., Maeda T., Irahara M.* The reduction in sexual behavior of adult female rats exposed to immune stress in the neonatal period is associated with reduced hypothalamic progesterone receptor expression. // *Gen Comp Endocrinol.* 2020. 288: 113360.
163. *Maynard T.M., Sikich L., Lieberman J.A., Lamantia A.S.* Neural development, cell—cell signaling, and the “Two-Hit” hypothesis of schizophrenia. // *Schizophr. Bull.* 2001. 27: 457—476.
164. *Mazur F.G., Oliveira L.F.G., Cunha M.P., Rodrigues A.L.S., Pértile R.A.N., Vendruscolo L.F., Izídio G.S.* Effects of physical exercise and social isolation on anxiety-related behaviors in two inbred rat strains. // *Behav Processes.* 2017. 142: 70-78.
165. *Milad M.R., Igoe, S.A., Lebron-Milad, K., Novales, J.E.* Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. // *NSC.* 2009. 164: 887–895.
166. *Mileva G.R., Bielajew C.* Environmental manipulation affects depressive-like behaviours in female Wistar-Kyoto rats. // *Behav. Brain Res.* 2015. 293: 208-216.
167. *Mileva G.R., Rooke J., Ismail N., Bielajew C.* Corticosterone and immune cytokine characterization following environmental manipulation in female WKY rats. // *Behav. Brain Res.* 2017. 316: 197-204.

168. *Miller A.H., Maletic V., Raison C.L.* Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression // *Biol. Psychiatry*. 2009. 65: 732-741.
169. *Molewijk H.E., van der Poel A.M., Olivier B.* The ambivalent behavior “stretched approach posture” in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. // *Psychopharmacology*. (Berl). 1995. 121 (1): 81–90.
170. *Mora-Gallegos A, Fornaguera J.* The effects of environmental enrichment and social isolation and their reversion on anxiety and fear conditioning. // *Behav. Processes*. 2019. 158: 59-69.
171. *Najjar F., Ahmad M., Lagace D., Leenen F.H.H.* Sex differences in depression-like behavior and neuroinflammation in rats post-MI: role of estrogens. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2018. 315 (5): 1159-1173.
172. *Nilsson C., Jennische E., Ho H.P., Eriksson E., Bjorntorp P., Holmang A.* Postnatal endotoxin exposure results in increased insulin sensitivity and altered activity of neuroendocrine axes in adult female rats. // *Eur. J. Endocrinol.* 2002. 146 (2): 251-60.
173. *Noble L.J., Gonzalez I.J., Meruva V.B., Callahan K.A., Belfort B.D., Ramanathan K.R., Meyers E., Kilgard M.P., Rennaker R.L., McIntyre C.K.* Effects of vagus nerve stimulation on extinction of conditioned fear and post-traumatic stress disorder symptoms in rats. // *Transl. Psychiatry*. 2017. 7 (8): e1217.
174. *Okada R., Marsumoto K., Tsushima R., Fujiwara H., Tsuneyama K.* Social isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neuro-signaling system and Egr-1 expression in the brain. // *Neurochem. Res.* 2014. 39 (5): 875-882.
175. *Oliveira V.E.M., Neumann I.D., de Jong T.R.* Post-weaning social isolation exacerbates aggression in both sexes and affects the vasopressin and oxytocin system in a sex-specific manner. // *Neuropharmacology*. 2019. 156: 107504.
176. *Onufriev M.V., Freiman S.V., Peregud D.I., Kudryashova I.V., Tishkina A.O., Stepanichev M.Y., Gulyaeva N.V.* Neonatal proinflammatory stress induces

accumulation of corticosterone and interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: potential mechanism of synaptic plasticity impairments. // *Biochemistry (Mosc)*. 2017. 82 (3): 275-281.

177. *Osborne B. F., Caulfield J.I., Solomotis S.A., Schwarz J.M.* Neonatal infection produces significant changes in immune function with no associated learning deficits in juvenile rats. // *Dev. Neurobiol.* 2017. 77 (10): 1221-1236.

178. *Ou C., Dringenberg H.C., Souter C.N.* Is hippocampal theta frequency related to individual and sex differences in anxiety-like behavior? An analysis in male and female Long-Evans rats. // *Behav. Brain. Res.* 2019. 364: 366-373.

179. *Ouchi H., Ono K., Murakami Y., Matsumoto K.* Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. // *Behav. Brain Res.* 2013. 238: 146-153.

180. *Pallé A., Zorzo C., Luskey V.E., McGreevy K.R., Fernández S., Trejo J.L.* Social dominance differentially alters gene expression in the medial prefrontal cortex without affecting adult hippocampal neurogenesis or stress and anxiety-like behavior. // *FASEB J.* 2019. 33 (6): 6995-7008.

181. *Park C.H.J., Ganella D.E., Kim J.H.* Juvenile female rats, but not male rats, show renewal, reinstatement, and spontaneous recovery following extinction of conditioned fear. // *Learn. Mem.* 2017. 24 (12): 630-636.

182. *Park M.J., Seo B.A., Lee B., Shin H.S., Kang M.G.* Stress-induced changes in social dominance are scaled by AMPA-type glutamate receptor phosphorylation in the medial prefrontal cortex. // *Sci Rep.* 2018. 8 (1): 15008.

183. *Parker G., Brotchie H.* Gender differences in depression. // *Int Rev Psychiatry.* 2010. 22 (5): 429-36.

184. *Peña C.J., Smith M., Ramakrishnan A., Cates H.M., Bagot R.C., Kronman H.G., Patel B., Chang A.B., Purushothaman I., Dudley J., Morishita H., Shen L., Nestler E.J.* Early life stress alters transcriptomic patterning across reward circuitry in male and female mice. // *Nat. Commun.* 2019. 10 (1): 5098.

185. *Penteado S.H., Teodorov E., Kirsten T.B., Eluf B.P., Reis-Silva T.M., Acenjo M.K., de Melo R.C., Suffredini I.B., Bernardi M.M.* Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups, and induces anxiety: studies of F1 and F2 generations. // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. 738: 342-351.
186. *Pettersson R., Hagsater S.M., Eriksson E.* Serotonine depletion eliminates sex differences with respect to context-conditioned immobility in rat. // *Psychopharmacology.* 2016. 233 (8): 1513-1521.
187. *Pietropaolo S., Feldon J., Yee B.K.* Environmental enrichment eliminates the anxiety phenotypes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. // *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 2014. 14 (3): 996-1008.
188. *Pietropaolo S., Feldon J., Alleca E., Cirulli F., Yee B.K.* The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis. // *Behav. Neurosci.* 4: 787-803. 2006.
189. *Pietropaolo S., Feldon J., Yee B.K.* Nonphysical contact between cagemates alleviates the social isolation syndrome in C57BL/6 male mice. // *Behav Neurosci.* 2008.122 (3): 505-515.
190. *Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. // *Science.* 1998. 282 (5396): 2085-2088.
191. *Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M.* Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. // *Europ. J. Pharmacology.* 1978. 47: 379-391.
192. *Pritchard L.M., Van Kempen T.A., Zimmerberg B.* Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. // *Neurosci. Lett.* 2013. 536: 47-51.

193. *Pugh C.R., Kumagawa K., Fleshner M., Watkins L.R., Maier S.F., Rudy J.W.* Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. // *Brain Behav. Immun.* 1998. 12: 212–229.
194. *Quinn J.J., Skipper R.A., Claflin D.I.* Infant stress exposure produces persistent enhancement of fear learning across development. // *Dev. Psychobiol.* 2014. 56 (5): 1008-1016.
195. *Raetz C.R.H., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E.* Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. 76: 295–329.
196. *Raetz C.R.H., Whitfield C.* Lipopolysaccharide endotoxins. // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. 71: 635–700.
197. *Ragu Varman D., Rajan K.E.* Environmental Enrichment Reduces Anxiety by Differentially Activating Serotonergic and Neuropeptide Y (NPY)-Ergic System in Indian Field Mouse (*Mus booduga*): An Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder. // *PLoS One.* 2015. 10 (5): e0127945.
198. *Rampon C., Jiang C.H., Dong H., Tang Y.P., Lockhart D.J., Schultz P.G., Tsien J.Z., Hu Y.* Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97 (23): 12880-12884.
199. *Rattazzi L., Piras G., Brod S., Smith K., Ono M., d'Acquisto F.* Impact of Enriched Environment on Murine T-Cell Differentiation and Gene Expression Profile. // *Front. Immunol.* 2016. 7: 381.
200. *Rau A.R., Chappell A.M., Butler T.R., Ariwodola O.J., Weiner J.L.* Increased basolateral amygdale pyramidal cell excitability may contribute to the anxiogenic phenotype induced by chronic early-life stress. // *J. Neurosci.* 2015. 35 (26): 9730-9740.
201. *Rhees R.W., Lephart E.D., Eliason D.* Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. // *Behav Brain Res.* 2001. 123 (1): 1-10.



202. *Rincel M., Lépinay A.L., Delage P., Fioramonti J., Théodorou V.S., Layé S., Darnaudéry M.* Maternal high-fat diet prevents developmental programming by early-life stress. // *Transl. Psychiatry*. 2016. 6 (11): 966.
203. *Roberts J.M., Graham L.L., Quinn B., Pink D.A.* Modeling the surface of *Campylobacter fetus*: protein surface layer stability and resistance to cationic antimicrobial peptides. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. 1828 (3):1143-1152.
204. *Rodgers R.J., Johnson N.J.T.* Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995. 52: 297–3.
205. *Roekner A.R., Bowling A., Butler T.R.* Chronic social instability increases anxiety-like behavior and ethanol preference in male Long Evans rats. // *Physiol. Behav.*, 2017. 73: 179-187.
206. *Rosenzweig M.R., Krech D., Bennett E.L., Diamond M.C.* Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. // *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1962. 55: 429-37.
207. *Scharfman H.E., MacLusky N.J.* Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats. // *Neuropharmacology*. 2014. 76 (Pt C): 696–708.
208. *Scotland R.S., Stables M.J., Madalli S., Watson P., Gilroy D.W.* Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. // *Blood*. 2011. 118 (22): 5918-27.
209. *Semple B.D., Canchola S.A., Noble-Haeusslein L.J.* Deficits in social behavior emerge during development after pediatric traumatic brain injury in mice. // *J. Neurotrauma*. 2012. 29 (17): 2672-83.
210. *Shanks N., Windle R.J., Perks P.A., Harbuz M.S., Jessop D.S., Ingram C.D., Lightman S.L.* Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. 97 (10): 5645-50.

211. *Singhal G., Jaehne E.J., Corrigan F., Baune B.T.* Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. // *Front. Cell Neurosci.* 2014. 8: 97.
212. *Skelly M.J., Chapell A.E., Carter E., Weiner J.L.* Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: possible role of disrupted noradrenergic signaling. // *Neuropharmacology.* 2015. 97: 149-159.
213. *Skórzewska A., Lehner M., Wisłowska-Stanek A., Turzyńska D., Sobolewska A., Krząścik P., Płaźnik A.* Midazolam treatment before re-exposure to contextual fear reduces freezing behavior and amygdala activity differentially in high- and low-anxiety rats. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015. 129: 34-44.
214. *Sorge R.E., Totsch S.K.* Sex differences in pain. // *J. Neurosci. Research.* 2017. 95 (6): 1271-1281.
215. *Sparkman N.L., Kohman R.A., Garcia A.K., Boehm G.W.* Peripheral lipopolysaccharide administration impairs two-way active avoidance conditioning in C57BL/6J mice. // *Physiol. Behav.* 2005. 85: 278–288.
216. *Stepanichev M.Y., Tishkina A.O., Novikova M.R., Levshina I.P., Freiman S.V., Onufriev M.V., Levchenko O.A., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V.* Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. // *Acta. Neurobiol. Exp.* 2016. 76 (4): 324-333.
217. *Stolp H.B., Johansson P.A., Habgood M.D., Dziegielewska K.M., Saunders N.R., Ek C.J.* Effects of neonatal systemic inflammation on blood-brain barrier permeability and behaviour in juvenile and adult rats. // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2011. 2011: 469046.
218. *Sylvia K.E., Demas G.E.* Overcoming neonatal sickness: Sex-specific effects of sickness on physiology and social behavior. // *Physiol. Behav.* 2017. 179: 324-332.

219. *Sztainberg Y., Kuperman Y., Tsoory M., Lebow M., Chen A.* The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. // *Mol. Psychiatry.* 2010. 15 (9): 905-17.
220. *Takahashi A., Flanigan M.E., McEwen B.S., Russo S.J.* Aggression, Social Stress, and the Immune System in Humans and Animal Models. // *Front. Behav. Neurosci.* 2018. 22 (12): 56.
221. *Takatsu-Coleman A.L., Patti C.L., Zanin K.A., Zager A., Carvalho R.C., Borçoi A.R., Ceccon L.M., Berro L.F., Tufik S., Andersen M.L., Frussa-Filho R.* Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? // *J. Psychiatry Neurosci.* 2013. 38 (4): 259-268.
222. *Tansley S.N., Tuttle A.H., Wu N., Tohyama S., Dossett K., Gerstein L., Ham B., Austin J.S., Sotocinal S.G., Mogil J.S.* Modulation of social behavior and dominance status by chronic pain in mice. // *Genes Brain Behav.* 2019. 18 (1): e12514.
223. *Tasker JG, Herman JP.* Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. // *Stress.* 2011. 14 (4): 398-406.
224. *Tchessalova D., Tronson N.C.* Memory deficits in males and females long after subchronic immune challenge. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2019. 158: 60-72.
225. *Tenk C.M., Kavaliers M., Ossenkopp K.P.* Neonatal treatment with lipopolysaccharide differentially affects adult anxiety responses in the light-dark test and taste neophobia test in male and female rats. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2013. 31 (3): 171-180.
226. *Thorsell A., Slawecki C.J., El Khoury A., Mathe A. A., Ehlers C. L.* The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006. 83: 28–34.
227. *Tishkina A., Stepanichev M., Kudryashova I., Freiman S., Onufriev M., Lazareva N., Gulyaeva N.* Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats:

Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. // *Behav. Brain Res.* 2016. 304: 1-10.

228. *Toledo-Rodriguez M., Sandi C.* Stress before puberty exerts a sex- and age-related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat. // *Neural Plast.* 2007. 2007: 71203.

229. *Tonelli L.H., Stiller J., Rujescu D., Giegling I., Schneider B., Maurer K., Schnabel A., Möller H.J., Chen H.H., Postolache T.T.* Elevated cytokine expression in the orbitofrontal cortex of victims of suicide. // *Acta. Psychiatr. Scand.* 2008. 117 (3):198-206.

230. *Toth M., Tulogdi A., Biro L., Soros P., Mikics E., Haller J.* The neural background of hyper-emotional aggression induced by post-weaning social isolation. // *Behav. Brain Res.* 2012. 233 (1): 120-9.

231. *Ariza Traslaviña G.A., de Oliveira F.L., Franci C.R.* Early adolescent stress alters behavior and the HPA axis response in male and female adult rats: the relevance of the nature and duration of the stressor. // *Physiol. Behav.* 2014. 133: 178-89.

232. *Triantafilou M., Triantafilou K.* Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS activation cluster. // *Trends. Immunol.* 2002. 23: 301-4.

233. *Trofimov A., Strekalova T., Mortimer N., Zubareva O., Schwarz A., Svirin E., Umriukhin A., Svistunov A., Lesch K.P., Klimenko V.* Postnatal LPS challenge impacts escape learning and expression of plasticity factors Mmp9 and Timp1 in rats: effects of repeated training. // *Neurotox. Res.* 2017. 32 (2): 175-186.

234. *Tronson N.C., Collette K.M.* (Putative) sex differences in neuroimmune modulation of memory. // *J. Neurosci. Res.* 2017. 95 (1-2): 472-486.

235. *Uchida S., Kitamoto A., Umeeda H., Nakagawa N., Masushige S., Kida S.* Chronic reduction in dietary tryptophan leads to changes in the emotional response to stress in mice. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 2005. 51 (3): 175-81.

236. *Van Haaren F., Hest A., Heinsbroek R. P. W.* Behavioral differences between male and female rats: effects of gonadal hormones on learning and memory. // *Neurosci. Biobehav. Reviews.* 1990. 14: 23-33.
237. *Vega-Rivera N.M., Ortiz-López L., Gómez-Sánchez A., Oikawa-Sala J., Estrada-Camarena E.M., Ramírez-Rodríguez G.B.* The neurogenic effects of an enriched environment and its protection against the behavioral consequences of chronic mild stress persistent after enrichment cessation in six-month-old female Balb/C mice. // *Behav. Brain. Res.* 2016. 301: 72-83.
238. *Vegeto E., Bonincontro C., Pollio G., Sala A., Viappiani S., Nardi F., Brusadelli A., Viviani B., Ciana P., Maggi A.* Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. // *J. Neurosci.* 2001. 21 (6): 1809-1818.
239. *Villa A., Rizzi N., Vegeto E., Ciana P., Maggi A.* Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. // *Sci. Rep.* 2015. 5: 15224.
240. *Villa A., Vegeto E., Poletti A., Maggi A.* Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. // *Endocr. Rev.* 2016. 37 (4): 372-402.
241. *Villapol S., Faivre V., Joshi P., Moretti R., Besson V.C., Charriaut-Marlangue C.* Early Sex differences in the immune-inflammatory responses to neonatal ischemic stroke. // *Int J Mol Sci.* 2019. 20 (15): E3809.
242. *Võikar V., Polus A., Vasar E., Rauvala H.* Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. // *Genes. Brain. Behav.* 2005. 4 (4): 240-252.
243. *Walasek G., Wesierska M., Werka T.* Effects of social rearing conditions on conditioned suppression in rats. // *Acta. Neurobiol. Exp. (Wars).* 2002. 62 (1): 25-31.
244. *Walker A.K., Nakamura T., Byrne R.J., Naicker S., Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M.* Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: Implications for the double-hit hypothesis. // *Psychoneuroendocrinology.* 2009. 34 (10): 1515–1525.

245. Walker F.R., Knott B., Hodgson D.M. Neonatal endotoxin exposure modifies the acoustic startle response and circulating levels of corticosterone in the adult rat but only following acute stress. // *J. Psychiatr. Res.* 2008. 42 (13): 1094-1103.
246. Walker F.R., Brogan A., Smith R., Hodgson D.M. A profile of the immediate endocrine, metabolic and behavioural responses following a dual exposure to endotoxin in early life. // *Physiol Behav.* 2004. 83 (3): 495-504.
247. Wang F., Kessels H.W., Hu H. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. // *Trends. Neurosci.* 2014. 37 (11): 674-82.
248. Wang H.T., Huang F.L., Hu Z.L., Zhang W.J., Qiao X.Q., Huang Y.Q., Dai R.P., Li F., Li C.Q. Early-life social isolation-induced depressive-like behavior in rats results in microglial activation and neuronal histone methylation that are mitigated by minocycline. // *Neurotox Res.* 2017. 31 (4): 505-520.
249. Wang K.C., Fan L.W., Kaizaki A., Pang Y., Cai Z., Tien L.T. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. // *Neuroscience.* 2013. 27 (234):146-57.
250. Wang X., Quinn P.J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. // *Prog. Lipid. Res.* 2009. 49 (2): 97-107.
251. Weintraub A., Singaravelu J., Bhatnagar S. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. // *Brain. Res.* 2010. 1343: 83-92.
252. Weiss I. C., Pryce C. R., Jongen-Relo A. L., Nanz-Bahr N. I., Feldon, J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. // *Behav. Brain Res.* 2004.152: 279–295.
253. Williamson L.L., Sholar P.W., Mistry R.S., Smith S.H., Bilbo S.D. Microglia and memory: modulation by early-life infection. // *J. Neurosci.* 2011. 31 (43): 15511-15521.

254. Wukitsch T.J., Brase E.C., Moser T.J., Kiefer S.W., Cain M.E. Differential rearing alters taste reactivity to ethanol, sucrose, and quinine. // *Psychopharmacology (Berl)*. 2020. 237 (2): 583-597.
255. Xu X., Wu D., Hou S., Zhu J., Li J., Tang J. Prenatal exposure to TAK242 affects the childhood autism in offspring in animal models of autism spectrum disorder. // *Iran. J. Basic. Med. Sci.* 2017. 20 (9): 1016-1020.
256. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. // *Nature*. 2002. 420: 324–9.
257. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Hoshino K., Kaisho T., Takeuchi O., Takeda K., Akira S. TRAM is specifically involved in the toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. // *Nat. Immunol.* 2003. 4: 1144–50.
258. Yang C.R., Bai Y.Y., Ruan C.S., Zhou H.F., Liu D., Wang X.F., Shen L.J., Zheng H.Y., Zhou X.F. Enhanced aggressive behaviour in a mouse model of depression. // *Neurotox. Res.* 2015. 27 (2): 129-42.
259. Yildirim E., Erol K., Ulupinar E. Effects of sertraline on behavioral alterations caused by environmental enrichment and social isolation. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012. 101 (2): 278-287.
260. Zelikowsky M., Hui M., Karigo T., Gradinaru V., Deverman B.E., Anderson D.J. The neuropeptide Tac2 controls a distributed brain state induced by chronic social isolation stress. // *Cell*. 2018. 173 (5): 1265-1279.
261. Zhang F., Szeto K.C., Taoufik M., Delevoye L., Gauvin R.M., Scott S.L. Enhanced Metathesis Activity and Stability of Methyltrioxorhenium on a Mostly Amorphous Alumina: Role of the Local Grafting Environment. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. 140 (42): 13854-13868.
262. Zhang F.X., Kirschning C.J., Mancinelli R., Xu X.P., Jin Y., Faure E., Mantovani A., Rothe M., Muzio M., Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates

nuclear factor-Kappa B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. // *J. Biol. Chem.* 1999. 274: 7611–4.

263. *Zhang Q., Zhang P.W., Cai Y.D.* The Use of Protein-Protein Interactions for the Analysis of the Associations between PM2.5 and Some Diseases. // *Biomed. Res. Int.* 2016. 2016: 4895476.

264. *Zhang Y., Zu X., Luo W., Yang H., Luo G., Zhang M., Tang S.* Social isolation produces anxiety-like behaviors and changes PSD-95 levels in the forebrain. // *Neurosci. Lett.* 2012. 514: 27–30.

265. *Zhao X., Sun L., Jia H., Meng Q., Wu S., Li N., He S.* Isolation rearing induces social and emotional function abnormalities and alters glutamate and neurodevelopment-related gene expression in rats. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009. 3: 1173–1177.

266. *Zhao Y., Bijlsma E.Y., Verdouw M.P., Groenink L.* No effect of sex and estrous cycle on the fear potentiated startle response in rats. // *Behav. Brain. Res.* 2018. 351: 24-33.

267. *Zheng R., Pan G., Thobe B.M., Choudhry M.A., Matsutani T., Samy T.S., Kang S.C., Bland K.I., Chaudry I.H.* MyD88 and Src are differentially regulated in Kupffer cells of males and proestrus females following hypoxia. // *Mol. Med.* 2006. 12 (4-6): 65-73.

268. *Zhu F., Zhang L., Ding Y.Q., Zhao J., Zheng Y.* Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. // *Brain. Behav. Immun.* 2014. 38: 166-74.