

СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные статьи

Сочетание стрессовых воздействий в критические периоды развития повышает устойчивость к стрессу воспалительной боли у взрослых крыс <i>И. П. Буткевич, В. А. Михайленко, Е. А. Вершинина</i>	267
Влияние пептидов АКТГ ₆₋₉ -PGP и АКТГ ₄₋₇ -PGP на уровень тревожности у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении <i>С. А. Додонова, И. И. Бобынцев, А. Е. Бельх, И. А. Телегина, Ю. А. Музалева, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов</i>	283
Насосная функция желудочка сердца у радужной форели <i>Oncorhynchus mykiss</i> при предсердной электрической стимуляции в условиях низкой температуры <i>Н. А. Киблер, В. П. Нужный, С. Н. Харин, Д. Н. Шмаков</i>	294
Микроэлектрофизиологическое изучение соотношения возбуждательных и тормозных синаптических процессов в кортико-нигральной проекции на модели болезни Паркинсона <i>М. В. Погосян, Л. М. Хачатрян, М. А. Даниелян, З. А. Аветисян, Дж. С. Саркисян</i>	301
Кросскорреляционный и когерентный анализ электрокортикограмм крыс, перенесших черепно-мозговую травму <i>Ю. И. Сысоев, В. А. Пьянкова, К. А. Крошкина, В. Е. Карев, С. В. Оковитый</i>	315
Acoustic and Perceptual Features of the Emotional Speech of Adolescents Aged 14–16 Years <i>A. S. Grigorev, V. A. Gorodnyi, O. V. Frolova, A. M. Kondratenko, V. D. Dolgaya, and E. E. Lyakso</i>	329
Характеристики ЭЭГ в процессе кратковременных самопроизвольных пробуждений разной длительности при изменениях в психомоторной деятельности, вызванных засыпанием <i>Е. А. Черемушкин, Н. Е. Петренко, М. С. Генджалиева, Д. Г. Малахов, В. Б. Дорохов</i>	342
Изменение поведения и экспрессии генов ионотропных рецепторов глутамата в мозге взрослых крыс после неонатальных введений бактериального липополисахарида <i>А. Н. Трофимов, А. Ю. Ротов, Е. А. Вениаминова, К. Фомалонт, А. П. Шварц, О. Е. Зубарева</i>	356
Особенности поведенческого фенотипа мышей линии BALB/c <i>И. Г. Капица, Е. А. Иванова, Т. А. Воронина, С. Б. Середенин</i>	373
Влияние точечных мутаций в гене <i>Disc 1</i> у мышей линий L100P и Q31L на формирование поведения, подобного обсессивно-компульсивному <i>К. В. Смирнова, М. В. Морозова, С. А. Татаурова, Т. Г. Амтиславская, Е. А. Литвинова, Е. Н. Кожевникова</i>	384

C O N T E N T S

Experimental Articles

Combination of Stressful Influences during Critical Periods of Development Increases Resistance to Stress of Inflammatory Pain in Adult Rats <i>I. P. Butkevich, V. A. Mikhailenko, and E. A. Vershinina</i>	267
Influence of ACTH ₆₋₉ -PGP and ACTH ₄₋₇ -PGP Peptides on Anxiety in Rats under Punished and Unpunished Behavior <i>S. A. Dodonova, I. I. Bobyntsev, A. E. Belykh, I. A. Telegina, Yu. A. Muzaleva, L. A. Andreeva, and N. F. Myasodov</i>	283
Pumping Function of the Heart Ventricle in Rainbow Trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> under Atrial Electric Stimulation at Low Temperature <i>N. A. Kibler, V. P. Nuzhny, S. N. Kharin, and D. N. Shmakov</i>	294
The Microelectrophysiological Study of the Proportion of Synaptic Potentiation and Depression at Cortico-Nigral Projection in a Model of Parkinson's Disease <i>M. V. Poghosyan, L. M. Khachatryan, M. A. Danielyan, Z. A. Avetisyan, and J. S. Sarkissian</i>	301
Crosscorrelation and Coherent Analysis of Ecog in Rats with Traumatic Brain Injury <i>Yu. I. Sysoev, V. A. Pyankova, K. A. Kroshkina, V. E. Karev, and S. V. Okovityi</i>	315
Acoustic and Perceptual Features of the Emotional Speech of Adolescents Aged 14–16 Years <i>A. S. Grigorev, V. A. Gorodnyi, O. V. Frolova, A. M. Kondratenko, V. D. Dolgaya, and E. E. Lyakso</i>	329
EEG Characteristics in the Process of Short-Time Spontaneous Wakes of Different Duration at Changes in Psychomotor Activity Caused by Falling Asleep <i>E. A. Cheremushkin, N. E. Petrenko, M. S. Gendzhaliyeva, D. G. Malakhov, and V. B. Dorokhov</i>	342
Behavioral Alterations of Adult Rats Evoked by Neonatal Lps Injections Are Associated with Changes of Ionotropic Glutamate Receptors Gene Expression in the Brain <i>A. N. Trofimov, A. Yu. Rotov, E. A. Veniaminova, K. Fomalont, A. P. Schwarz, and O. E. Zubareva</i>	356
Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of BALB/c Mice <i>I. G. Kapitsa, E. A. Ivanova, T. A. Voronina, and S. B. Seredenin</i>	373
The Effect of Point Mutations in the <i>Disc1</i> Gene in L100P and Q31L Mice on the Development of the OCD-Like Behavior <i>K. V. Smirnova, M. V. Morozova, S. A. Tataurova, T. G. Amstislavskaya, E. A. Litvinova, and E. N. Kozhevnikova</i>	384
Innessa B. Kozlovskaya (02.06.1927–19.02.2020)	395

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СОЧЕТАНИЕ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ В КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ
РАЗВИТИЯ ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ К СТРЕССУ
ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ БОЛИ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС**

© 2020 г. И. П. Буткевич^{1, 2, *}, В. А. Михайленко¹, Е. А. Вершинина¹

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова, РАН, Санкт-Петербург, Россия*

²*Педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: irinabutkevich@yandex.ru*

Поступила в редакцию 26.11.2019 г.

После доработки 24.12.2019 г.

Принята к публикации 25.12.2019 г.

Исследовали долговременное влияние сочетания стресса в пренатальный и препубертатный периоды развития на показатели тонической воспалительной боли в формалиновом тесте и уровня выраженности депрессивноподобного поведения, а также на стрессовую реактивность гормонального ответа у взрослых крыс. Кроме того, у крыс обоего пола было оценено влияние ингибитора обратного захвата серотонина (5-НТ) флуоксетина и агониста 5-НТ1А-рецептора буспилона, хронически вводимых их стрессированным матерям в период беременности, на исследованные типы адаптивного поведения, нарушенного пренатальным стрессом. Обнаружено, что у крыс обоего пола пренатальный стресс усилил болевой ответ, организованный на спинальном и супраспинальном уровнях центральной нервной системы, флуоксетин и буспирон нормализовали их. Стресс в препубертатный период развития нивелировал у взрослых крыс влияние пренатального стресса на воспалительный болевой ответ, интегрированный на супраспинальном уровне; в этих условиях флуоксетин и буспирон не действовали в отличие от их антиноцицептивного влияния на болевой ответ, интегрированный на спинальном уровне. Стресс в препубертатном возрасте нивелировал половые различия, обнаруженные при депрессивно-подобном поведении у пренатально не стрессированных и пренатально стрессированных с введением физиологического раствора крыс. У контрольных взрослых самок и взрослых самок с пренатальными воздействиями стресс в препубертатном возрасте повысил уровень кортикостерона в плазме крови после принудительного плавания по сравнению с базальным уровнем гормона, но достоверных различий в уровне стрессовой реактивности гормонального ответа после принудительного плавания обнаружено не было. Таким образом, идентифицированы условия стрессовых воздействий, которые повышают устойчивость к стрессу у взрослых крыс. Стресс в критические периоды развития формирует фенотип с повышенной стрессоустойчивостью к воспалительному болевому воздействию, что обнаружено в ответе, организованном на супраспинальном уровне у взрослых особей.

Ключевые слова: стресс в пренатальный и препубертатный периоды, взрослые самцы и самки крыс, воспалительная боль, депрессивное поведение, кортикостерон

DOI: 10.31857/S0869813920030024

Стрессовые события в ранние периоды индивидуального развития нарушают функциональную активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систе-

мы (ГГНС), морфофункциональное развитие головного мозга и, как следствие, изменяют формирование поведения [1, 2]. Подтверждением этому являются многочисленные данные, полученные как на человеке [3, 4], так и в экспериментах на животных [1, 2] при исследовании краткосрочных и долгосрочных влияний стресса в перинатальный период развития на психоэмоциональное поведение. Стресс в препубертатный период развития, характерной особенностью которого является высокая пластичность, обуславливающая повышенную чувствительность к внешним и внутренним раздражителям [5], рассматривают, наряду со стрессом в перинатальном возрасте, как фактор риска для развития тревожных и депрессивных состояний и отклонений в функциональной активности ГГНС [6–8]. Уделяется внимание половым различиям у взрослых животных во влиянии стресса в препубертатном возрасте [9] на поведение. При исследовании на животных в качестве стресса наиболее часто применяют пренатальный стресс (стресс матери во время гестации), стресс изоляции новорожденных от матери, хронический умеренный стресс и неблагоприятные условия жизни [7, 10, 11]. Влияние стресса в раннем возрасте изучают преимущественно на стрессоустойчивость к эмоциональному и социальному типам стресса [11]. Доминирующее число работ было посвящено негативным последствиям стресса в критические периоды развития, к которым относятся и пренатальный и препубертатный периоды [8, 9, 12]. Одной из самых важных мишеней пренатального стресса является 5-HT_{1A}-рецептор [13]. Ранее нами было показано, что повторные инъекции ингибитора обратного захвата серотонина (5-HT) флуоксетина и агониста 5-HT_{1A}-рецептора буспирона беременным самкам крыс, стрессированным в период беременности, нормализовали адаптивное поведение, нарушенное пренатальным стрессом, у молодого потомства [14]. Оба препарата действуют через 5-HT_{1A}-рецептор, вовлеченный в психоэмоциональное поведение и ноцицепцию и влияют на уровень 5-HT в головном мозге [15]. Серотонин в пренатальный период онтогенеза выполняет роль развивающего сигнала и ответственен, при тесном взаимоотношении с ГГНС, за высокую нейропластичность, которая позволяет клеткам мозга в ответ на изменения окружающей среды корректировать развитие центральной нервной системы и адаптироваться к ним [16]. Перечисленные факты привлекли наше внимание к серотонинергической системе при исследовании влияния сочетания стрессовых воздействий в пре- и постнатальном развитии на адаптивное поведение крыс в разные возрастные периоды.

В последние годы все чаще появляются данные о возможном благоприятном влиянии повторного стресса во время критических периодов развития на чувствительность к стрессу во взрослом возрасте [17, 18], притом большое внимание обращается на половые различия. Неоднородность результатов, полученных в разных экспериментальных условиях, включая тип и последовательность стрессовых воздействий, их интенсивность и длительность, а также пол животных и возраст в период воздействия стрессом и во время оценки его последствий, сдерживает исследование механизмов этого феномена. В настоящее время актуальным является идентификация разнообразных стрессовых условий, сочетание которых в критические периоды развития повышает адаптацию к будущим стрессам, а также проведение исследований на особях обоего пола, так как имеющиеся данные получены преимущественно на самцах [11]. На основании данных литературы, включающих и различную индивидуальную особенность к развитию стрессоустойчивости к одинаковым стрессовым условиям, была выдвинута гипотеза об уязвимости и устойчивости индивидуумов, подвергнутых стрессовым событиям в критические периоды жизни, к стрессу в последующем онтогенезе [17, 19, 20]. Основное внимание в этой гипотезе уделяется условиям, в которых осуществляется стресс на ранних этапах жизни и стресс во взрослом состоянии. При совпадении этих условий стресса можно ожидать положительный результат – устойчивость к стрессу, в противном

случае организм оказывается уязвимым к чрезмерным нагрузкам, что приводит к развитию тревожно-депрессивных проявлений и различных заболеваний.

Ранее нами было обнаружено, что стресс в перинатальном периоде повышает способность противостоять стрессу у самцов крыс в препубертатном возрасте [21]. В упомянутой работе мы впервые использовали сочетание стресса самки крысы в период беременности, являющегося фактором риска для развития депрессии у потомства, и стресса воспалительной боли у новорожденных, встречающегося в неонатальной клинике. Оказалось, что у взрослых самцов, испытывавших подобные события в перинатальном возрасте, интенсивность тонического болевого ответа была достоверно ниже, чем у контрольных самцов. Поведенческие исследования на животных определяют направление для изучения механизмов этого парадоксального явления на молекулярном уровне [22].

Цель настоящей работы состояла в исследовании влияния сочетания пренатального стресса и стресса в препубертатном возрасте на интенсивность тонического воспалительного болевого ответа, степень выраженности депрессивноподобного поведения, а также на стрессовую реактивность гормонального ответа у пренатально стрессированных взрослых крыс. Ранее мы показали, что стресс в перинатальном возрасте может изменить активность применяемых антидепрессантов [21], поэтому в настоящей работе исследовали еще и влияние ингибитора обратного захвата серотонина (5-НТ) флуоксетина и агониста 5-НТ1А-рецептора буспирона, которые вводились стрессированным матерям в период беременности, на изучаемые типы адаптивного поведения, нарушенного пренатальным стрессом, у потомства обоего пола.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования было потомство крыс линии Вистар, полученных из биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург) и доставленных в виварий лаборатории. Все процедуры работы с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [23]. Протоколы опытов утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все животные содержались в стандартных условиях (свободный доступ к воде и пище, 12-часовой день, свет с 8.00). Самки до беременности ($n = 50$) и самцы ($n = 30$) были помещены в стандартные клетки (в каждой клетке 5 самок и 3 самца). Беременность определяли по мазку из влагалища, наличие сперматозоидов в мазке обозначали как нулевой день беременности. С 9-х суток беременности до родов самки получали ежедневную внутривнутреннюю инъекцию флуоксетина (10 мг/кг, Sigma), буспирона (3.5 мг/кг, Sigma) или физиологического раствора, контрольные самки, подвергнутые только взятию в руки, оставались без воздействий. Ранее нами было показано, что пренатальный стресс вызывал достоверно более сильное увеличение воспалительного болевого ответа в формалиновом тесте ($p < 0.05$) и депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания ($p < 0.001$) у взрослых крыс по сравнению с болевым ответом и ответом депрессивно-подобного поведения у пренатально не стрессированных взрослых крыс, рожденных самками с введением физиологического раствора в период беременности [24], поэтому в качестве контроля в настоящей работе использовали пренатально не стрессированных крыс без введения физиологического раствора. Дозы препаратов были апробированы нами ранее [24] и соответствовали данным, имеющимся в литературе [25]. С 15-х суток беременности до родов самок с введением препаратов или физиологического раствора утром и вечером в течение 60 мин при ярком свете подвергали иммобилизационному стрессу, помещая их в цилиндры, резко ограничивающие движение

крыс. Стресс беременной самки используют в качестве модели пренатального стресса для потомства: стресс в последнюю неделю беременности самки, вызывая у плода чрезмерное повышение уровня кортикостерона, приводит в дальнейшем к развитию депрессивноподобного поведения у потомства [7]. Введение стрессированным беременным крысам антидепрессанта флуоксетина или анксиолитика буспирона нивелирует негативное влияние стресса [21]. Рождение потомства проверяли каждые четыре часа (с 8 до 20 ч). На следующие сутки после рождения в каждом помете оставляли по 4 разнополых особи. Крысята находились в гнезде с матерью до 30-дневного возраста. Затем разнополых животных рассаживали в разные клетки. В исследование были включены следующие группы крыс: пренатально не стрессированные (контрольные), пренатально стрессированные с введением физиологического раствора, пренатально стрессированные с введением флуоксетина, пренатально стрессированные с введением буспирона.

На крысах обоего пола с перечисленными выше пренатальными воздействиями и на контрольных животных было проведено две серии экспериментов. В серии I (самки $n = 38$, самцы $n = 38$) при достижении крысами 90-дневного возраста у них оценивали интенсивность воспалительного болевого ответа в формалиновом тесте (подкожная инъекция 2.5%-ного раствора формалина, 50 мкл в подошву левой задней конечности) и через трое суток — уровень выраженности депрессивноподобного поведения в тесте принудительного плавания. В серии II (самки $n = 44$, самцы $n = 40$), животные в возрасте 25 дней были подвергнуты стрессу воспалительной боли (подкожная инъекция 10 мкл 2.5%-ного раствора формалина в подошву левой задней конечности) и через три дня — стрессу принудительного плавания. При достижении 90-дневного возраста у этих животных исследовали адаптивное поведение, как и у крыс серии I.

В формалиновом тесте, который широко используется для оценки антиноцицептивного действия препаратов на интенсивность воспалительной боли, регистрировали в течение 60 мин число сгибаний + встряхиваний (реакция, интегрированная на спинальном уровне) и продолжительность реакции вылизывания (супраспинальный уровень) в ответ на подкожную инъекцию формалина в подошву левой задней конечности в тоническую фазу двухфазного поведенческого ответа [26]. В тесте принудительного плавания каждую крысу на 5 мин помещали в цилиндр с водой (диаметр 25 см, высота 60 см, температура воды 24–25°C) и регистрировали время, проведенное крысой в неподвижном состоянии (время иммобильности — показатель депрессивноподобного поведения). Через 30 мин после завершения теста принудительного плавания у самок крыс серии II декапитацией собирали кровь. Самки в день эксперимента находились в стадии диэструса. Для определения базального уровня кортикостерона были использованы самки ($n = 43$), подвергнутые всем воздействиям, как и самки серии II, кровь у них собирали в 9 ч утра. Кровь центрифугировали, плазму крови хранили при температуре –20°C. Содержание кортикостерона в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы (Xema-Medica Co Cat No: K210R).

Анализ данных проводился с использованием трехфакторной модели дисперсионного анализа ANOVA. Факторы: серия (I, II), пол (самцы, самки) и воздействие (пренатально не стрессированные/физиологический раствор + пренатальный стресс/флуоксетин+пренатальный стресс/буспирон + пренатальный стресс) с последующими множественными апостериорными сравнениями по Бонферрони. В качестве зависимых переменных выступали: сгибание + встряхивание, продолжительность вылизывания, время иммобильности. Сила связи фактора и зависимой переменной измерялась при помощи величины η^2 (Partial Eta Squared). Для кортикостерона применяли дисперсионный двухфакторный анализ ANOVA. Факторы: серия (базальный, серия II), и воздействие (пренатально не стрессирован-

ные/физиологический раствор + пренатальный стресс/флуоксетин + пренатальный стресс/буспирон + пренатальный стресс) с последующими сравнениями по Бонферрони. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка. Принятый уровень значимости составлял 5%. При анализе данных использовался программный комплекс SPSS Inc.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В *формалиновом тесте* для сгибания + встряхивания во второй тонической фазе ответа получено значимое влияние серии $F(1,144) = 42.238$, $***p < 0.001$, $\eta^2 = 0.222$ и влияние воздействия $F(3,144) = 18.384$, $***p < 0.001$, $\eta^2 = 0.277$. Для продолжительности вылизывания во второй тонической фазе ответа получено значимое влияние серии $F(1,444) = 148.796$, $***p < 0.001$, $\eta^2 = 0.508$, воздействия $F(3,144) = 8.227$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.146$, пола $F(1,14) = 5.481$, $*p = 0.021$, $\eta^2 = 0.037$, также значимо взаимодействие серии и воздействия $F(3,144) = 3.317$, $*p = 0.022$, $\eta^2 = 0.065$.

Тест Бонферрони обнаружил, что в серии I пренатальный стресс увеличил болевой ответ в показателях как спинального, так и супраспинального уровней у взрослых самцов ($p < 0.01$ в обоих случаях) (рис. 1A, C), у самок — на супраспинальном уровне ($p = 0.004$) (рис. 1D) по сравнению с идентичными показателями болевого воспалительного ответа у пренатально не стрессированных взрослых крыс. Флуоксетин уменьшил показатели болевого ответа у самцов на спинальном ($p = 0.042$) и супраспинальном ($p = 0.021$) уровнях (рис. 1A, C), а у самок — только на супраспинальном уровне ($p = 0.034$) (рис. 1D) по сравнению с показателями ответа у пренатально стрессированных крыс. Буспирон уменьшил показатели болевого ответа у самцов на спинальном ($p = 0.043$) и супраспинальном уровнях ($p = 0.030$) (рис. 1C), а у самок — на спинальном ($p = 0.021$) и супраспинальном уровнях ($p = 0.018$) (рис. 1B, D) по сравнению с показателями ответа у пренатально стрессированных крыс. Таким образом, в серии I повторное введение флуоксетина и буспилона беременным самкам крыс вызывало у взрослого потомства снижение усиленного пренатальным стрессом воспалительного болевого ответа, организованного на спинальном и супраспинальном уровнях.

Тест Бонферрони обнаружил, что в серии II пренатальный стресс увеличил число сгибаний + встряхиваний у самцов ($p = 0.011$) и на уровне тенденции у самок ($p = 0.063$) (рис. 1A, B), но не изменил продолжительность вылизывания у крыс обоего пола (рис. 1C, D). Флуоксетин и буспирон уменьшили влияние пренатального стресса на болевой ответ в показателях спинального уровня у самцов ($p = 0.020$, $p = 0.002$) (рис. 1A) и самок ($p = 0.006$, $p = 0.002$) (рис. 1B) по сравнению с пренатально стрессированными крысами. Тест Бонферрони обнаружил следующие различия между сериями I и II в тоническом болевом ответе. Более высокие значения ответа были обнаружены в серии II в показателях спинального уровня у пренатально не стрессированных и пренатально стрессированных самцов ($p = 0.009$, $p = 0.025$) (рис. 1A) и пренатально стрессированных самок ($p = 0.007$) (рис. 1B). Важно, что в показателях супраспинального уровня более высокие показатели были обнаружены в серии I у пренатально не стрессированных самцов ($p = 0.004$) (рис. 1C) и самок ($p = 0.005$) (рис. 1D) и пренатально стрессированных самцов и самок ($p < 0.001$ в обоих случаях). Кроме того, в серии II по сравнению с серией I величина болевого ответа на супраспинальном уровне была меньше у пренатально стрессированных самцов с флуоксетином и буспионом ($p < 0.001$ и $p = 0.002$) (рис. 1C) и самок ($p < 0.001$ в обоих случаях) (рис. 1D), а на спинальном уровне — у пренатально стрессированных самцов с флуоксетином ($p = 0.003$) (рис. 1A). Таким образом, в серии II влияние сочетания стрессоров неодинаково проявилось в болевом ответе, организованном на

спинальном и супраспинальном уровнях. Так, число сгибаний + встряхиваний у пренатально стрессированных крыс было увеличено, флуоксетин и буспирон нормализовали этот показатель. Продолжительность вылизывания, показатель болевого ответа, организованного на супраспинальном уровне, снизилась более чем на 50% у пренатально не стрессированных крыс и крыс с пренатальными воздействиями, притом различий в ответе между группами крыс не было обнаружено.

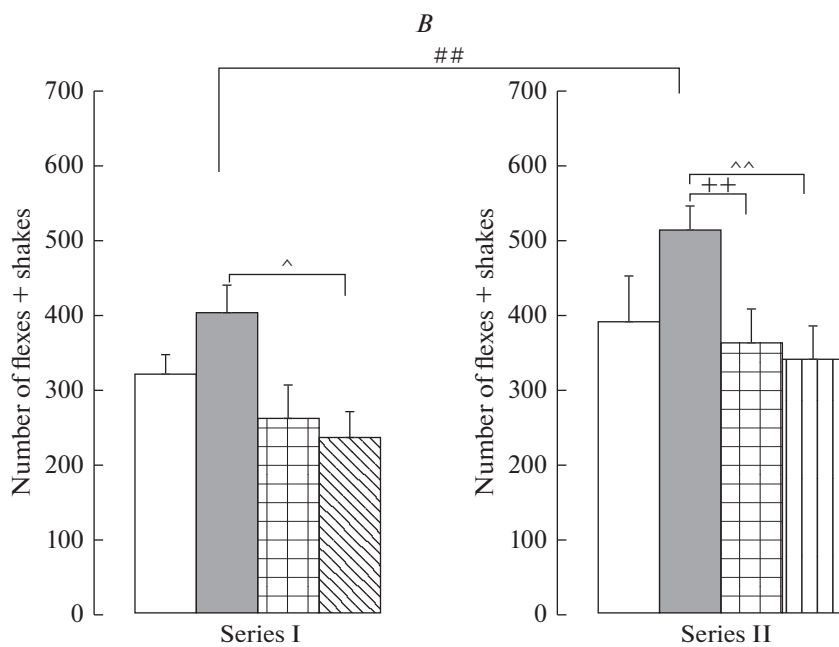
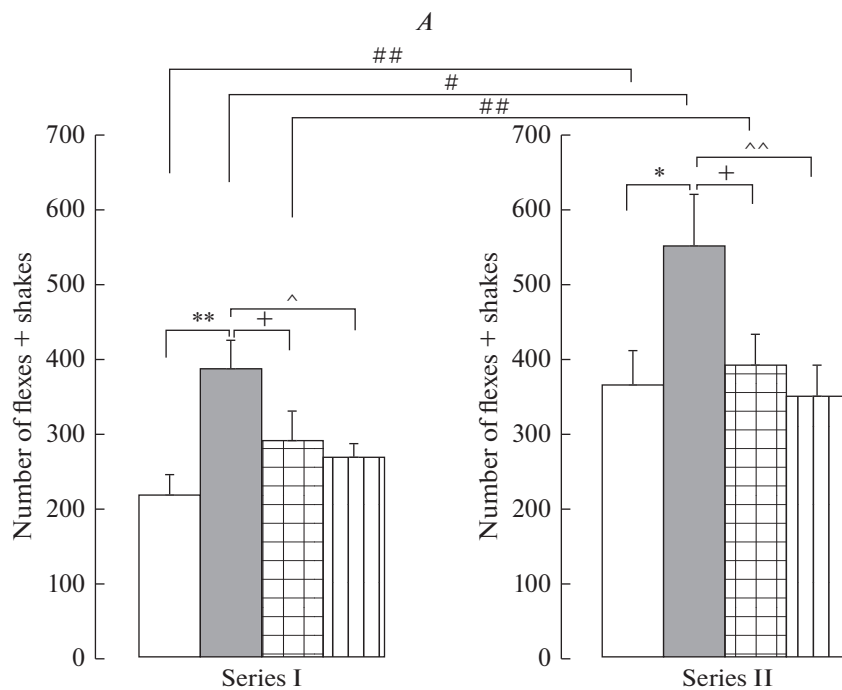
В тесте принудительного плавания для времени иммобильности получено значимое влияние воздействия $F(3,144) = 51.853$, $***p < 0.001$, $\eta^2 = 0.519$, пола $F(1,144) = 7.429$, $**p = 0.007$, $\eta^2 = 0.049$, значимо взаимодействие серии и пола $F(1,144) = 9.706$, $**p = 0.002$, $\eta^2 = 0.063$ и в тенденции взаимодействие серии, пола и воздействия $F(3,144) = 2.239$, $p = 0.086$, $\eta^2 = 0.045$. Тест Бонферрони обнаружил, что в сериях I и II пренатальный стресс увеличил время иммобильности у самцов ($p = 0.002$, $p < 0.001$) (рис. 2А) и у самок ($p = 0.004$, $p < 0.001$) (рис. 2В) по сравнению с этим показателем у пренатально не стрессированных животных. В серии I флуоксетин и буспирон уменьшили время иммобильности у самцов ($p < 0.001$ в обоих случаях) (рис. 2А) и самок ($p = 0.003$, $p = 0.001$) (рис. 2В) по сравнению с этим показателем у пренатально стрессированных крыс. В серии II флуоксетин уменьшил время иммобильности у самцов ($p = 0.02$) и самок ($p = 0.006$) (рис. 2А, В), буспирон уменьшил этот показатель у крыс обоего пола ($p = 0.002$ в обоих случаях) (рис. 2А, В). Обнаружено достоверное различие между сериями во времени иммобильности у пренатально стрессированных самок ($p < 0.001$), с более высоким показателем депрессии в серии II (рис. 2В). Половые различия обнаружены только в серии I у пренатально не стрессированных ($p < 0.01$) и пренатально стрессированных ($p < 0.001$) крыс с более высокими показателями у

Рис. 1. Влияние пренатальных воздействий (пренатальное введение флуоксетина, буспилона, пренатальный стресс) (Серия I) и их сочетания со стрессом в препубертатный период развития (Серия II) на воспалительный болевой ответ в формалиновом тесте у взрослых самцов (А, В) и самок (С, D) крыс.

По вертикали — число сгибаний + встряхиваний (спинальный уровень) (А, В) и продолжительность реакции вылизывания (супраспинальный уровень) (с) (С, D). Белые столбики — пренатально не стрессированные (контроль), серые столбики — пренатально стрессированные с физиологическим раствором, квадратная штриховка — пренатально стрессированные с флуоксетином, продольная штриховка — пренатально стрессированные с буспионом. Уровень значимости: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ между пренатально стрессированными с физиологическим раствором и контролем; $^+p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ — между пренатально стрессированными с физиологическим раствором и пренатально стрессированными с флуоксетином; $^{\wedge}p < 0.05$, $^{\wedge\wedge}p < 0.01$ — между пренатально стрессированными с физиологическим раствором и пренатально стрессированными с буспионом; $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ — между серией I и серией II пренатально стрессированными с физиологическим раствором и пренатально стрессированными с флуоксетином. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка.

Fig. 1. Effect of prenatal effects (prenatal administration of fluoxetine, bupirone, prenatal stress) (Series I) and their combination with the stress during the prepubertal period (Series II) on the inflammatory pain response in the formalin test in adult male (A, B) and female (C, D) rats.

Vertically — the number of flexes + shakes (the spinal level) (A, B) and the licking duration (the supraspinal level) (s) (C, D). White columns — non-prenatally stressed (the control), gray columns — prenatally stressed with saline solution, square hatch — prenatally stressed with fluoxetine, the lengthwise hatch — prenatally stressed with bupirone. Significance level: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ between the prenatally stressed with saline and control; $*p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ — between the prenatally stressed with saline and the prenatally stressed with fluoxetine; $*p < 0.05$, $^{\wedge\wedge}p < 0.01$ — between the prenatally stressed with saline and the prenatally stressed with bupirone; $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ — between the series I and series II prenatally stressed with saline and the prenatally stressed with fluoxetine. Data are presented as mean $\pm$ standard error.



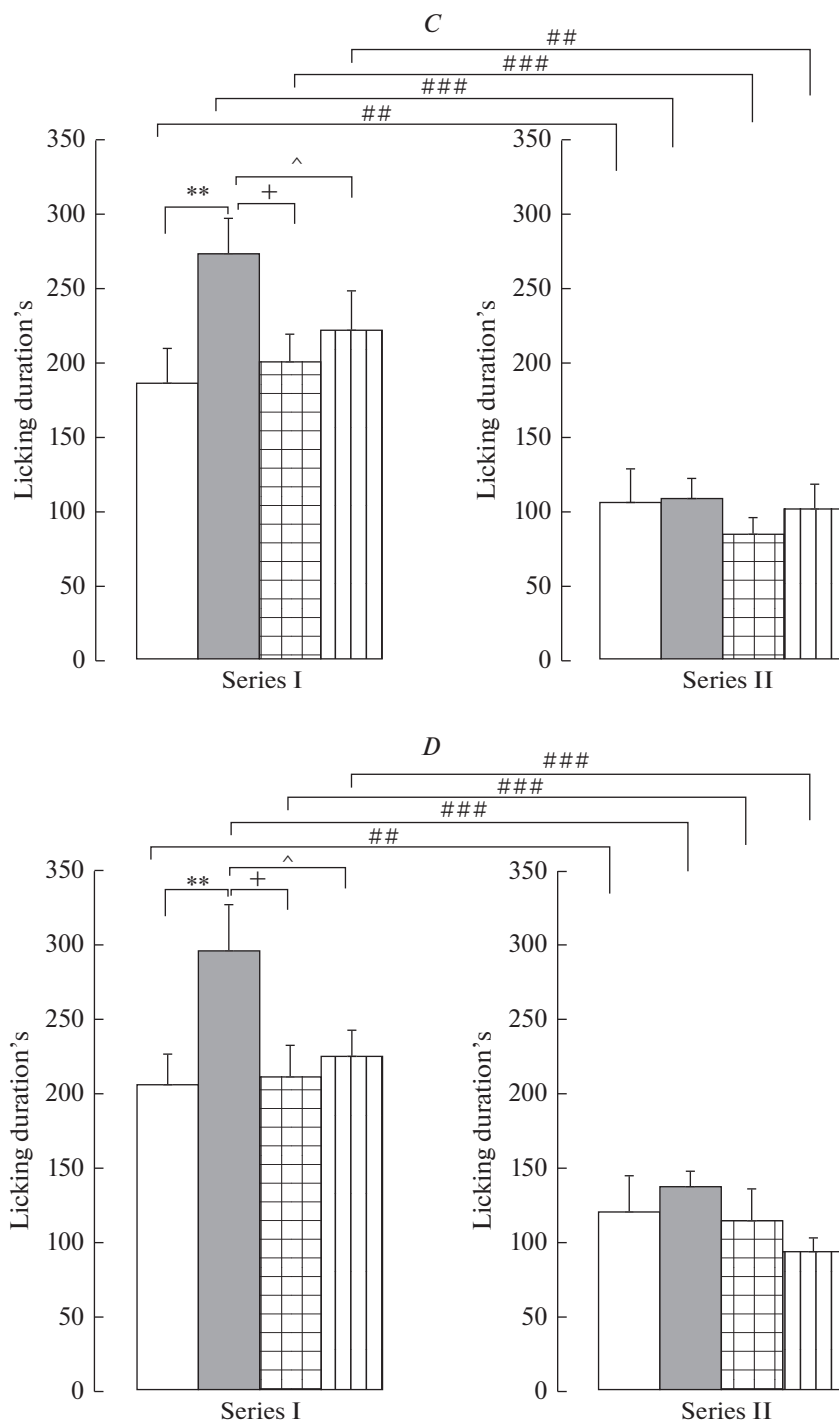


Рис. 1. Окончание

самцов (рис. 2А, В). Таким образом, в серии I пренатальный стресс увеличил уровень выраженности депрессивноподобного поведения у взрослых крыс по сравнению с контролем, флуоксетин и буспирон нормализовали психоэмоциональное поведение. Стресс в препубертатном возрасте увеличил уровень депрессивноподобного поведения у пренатально стрессированных самок, но не изменил у пренатально стрессированных самцов. Половые различия, обнаруженные в серии I у пренатально не стрессированных и пренатально стрессированных животных, с более высоким показателем депрессивноподобного поведения у самцов, были нивелированы стрессом в препубертатный период развития.

При исследовании уровня кортикостерона обнаружен значимый главный эффект для фактора серия $F(1,75) = 25.1$, $*** p < 0.001$, $\eta^2 = 0.25$, а также выявлена тенденция для фактора воздействие $F(3,75) = 2.6$, $p = 0.056$, $\eta^2 = 0.096$. Post hoc анализ обнаружил снижение уровня кортикостерона у пренатально стрессированных самок с введением буспилона ($p = 0.011$) по сравнению с уровнем гормона пренатально стрессированных с физиологическим раствором крыс, уровня флуоксетина — на уровне тенденции ($p = 0.069$). Post hoc анализ показал, что после теста принудительного плавания уровень кортикостерона повысился у пренатально не стрессированных крыс ($p = 0.049$) по сравнению с их базальным уровнем гормона, у пренатально стрессированных с физиологическим раствором крыс ($p = 0.021$) по сравнению с их базальным уровнем гормона, а также у пренатально стрессированных крыс с флуоксетином ($p = 0.024$) и пренатально стрессированных крыс с буспионом ($p = 0.003$) по сравнению с базальным уровнем кортикостерона у крыс этих групп. Не было выявлено достоверных различий в уровне кортикостерона между крысами пренатально не стрессированными, пренатально стрессированными с физиологическим раствором, пренатально стрессированными с флуоксетином и пренатально стрессированными с буспионом (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании мы идентифицировали условия стрессовых воздействий, которые повышают устойчивость к стрессу у взрослых крыс. Показано, что сочетание пренатальных воздействий (введение флуоксетина или буспилона стрессированным в период беременности самкам) и стресса в препубертатном возрасте (воспалительная боль и принудительное плавание) вызывало у взрослых крыс обоего пола достоверное снижение тонического болевого воспалительного ответа, интегрированного на супраспинальном уровне, по сравнению с соответствующим ответом у контрольных взрослых крыс. Сочетание стресса в пренатальный и препубертатный периоды развития нивелировало половые различия, обнаруженные в уровне психоэмоционального поведения у пренатально не стрессированных и пренатально стрессированных крыс. У самок, подвергнутых сочетанию пренатальных воздействий и стресса в препубертатном возрасте, уровень кортикостерона в плазме крови после принудительного плавания был достоверно выше базального уровня гормона у самок во всех исследованных группах, но достоверных различий в уровне стрессовой реактивности гормонального ответа после принудительного плавания обнаружено не было.

Пренатальный стресс вызвал у взрослых крыс увеличение продолжительности вылизывания в тоническую фазу формалинового теста и времени иммобильности (показатель депрессивноподобного поведения) в тесте принудительного плавания, что подтвердило наши ранее опубликованные данные на взрослых крысах [26]. Многочисленные данные литературы, полученные как на человеке [2, 4], так и на животных [7, 10, 11], указывают на негативные последствия в поведении, вызванные пренатальным стрессом, в частности, на усиление тревожно-депрессивного

поведения. В настоящем исследовании впервые представлены данные о снижении, вызванном пренатальным введением флуоксетина, интенсивности воспалительного болевых ответа и уровня выраженности депрессивноподобного поведения у пренатально стрессированного женского взрослого потомства. Этот результат указывает на способность антидепрессанта флуоксетина вызывать антиноцицептивное влияние, что расширяет имеющиеся немногочисленные, часто противоречивые, данные о роли флуоксетина в ноцицепции [27, 28]. Хроническое введение буспилона стрессированным беременным самкам вызывало также снижение показателей исследованного адаптивного поведения у потомства, что подтвердило наши данные, полученные ранее на взрослых крысах [24] и пренатально стрессированных крысах препубертатного возраста, подвергнутых в пренатальный период развития действию буспилона и флуоксетина [14]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что антидепрессант флуоксетин и анксиолитик буспирон при определенных условиях способны вызывать антидепрессивный и антиноцицептивный эффекты.

Стресс в препубертатный период развития вызвал усиление болевых ответа, интегрированного на спинальном уровне, только у самцов. В литературе сообщается о последствиях стресса в препубертатный период развития (хронический комбинированный стресс или социальный стресс), обнаруженных в психоэмоциональном поведении и когнитивной сфере взрослых крыс [29, 30]. Неидентичность результатов определяется многими факторами, включая и половые различия.

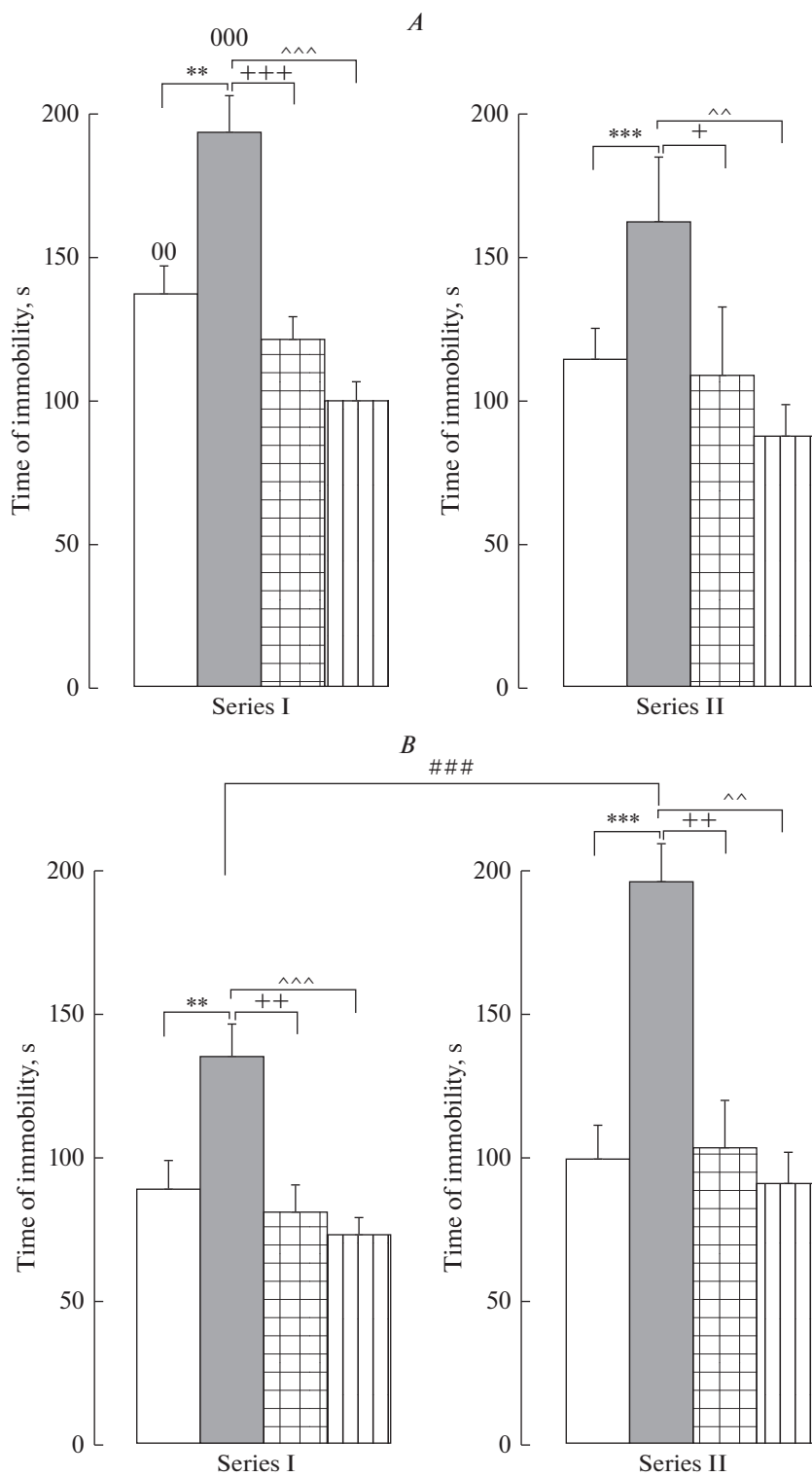
В настоящей работе при исследовании интенсивности воспалительного болевых ответа в формалиновом тесте нами был обнаружен важный факт, свидетельствующий о зависимости результата влияния сочетания примененных стрессоров на интенсивность ответа от уровня интеграции болевой реакции. Так, продолжительность реакции вылизывания, интегрированной на супраспинальном уровне, со-

Рис. 2. Влияние пренатальных воздействий (пренатальное введение флуоксетина, буспилона, пренатальный стресс) (Серия I) и их сочетания со стрессом в препубертатный период развития (Серия II) на время иммобильности в тесте принудительного плавания у взрослых самцов (А) и самок (В) крыс.

По вертикали — время иммобильности (с). Белые столбики — пренатально не стрессированные (контроль), серые столбики — пренатально стрессированные с физиологическим раствором, квадратная штриховка — пренатально стрессированные с флуоксетином, продольная штриховка — пренатально стрессированные с буспионом. Уровень значимости: $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ между пренатально стрессированными с физиологическим раствором и контролем; $^+p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$, $^{+++}p < 0.001$ — между пренатально стрессированными с физиологическим раствором и пренатально стрессированными с флуоксетином; $^{\wedge}p < 0.01$, $^{\wedge\wedge}p < 0.001$ — между пренатально стрессированными с физиологическим раствором и пренатально стрессированными с буспионом; $^{###}p < 0.001$ — между серией I и серией II пренатально стрессированными с физиологическим раствором и пренатально стрессированными с флуоксетином; $^{00}p < 0.01$, $^{000}p < 0.001$ — половые различия между пренатально не стрессированными и пренатально стрессированными крысами в серии I. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка.

Fig. 2. Effect of prenatal effects (prenatal administration of fluoxetine, buspirone, prenatal stress) (Series I) and their combination with the stress during the prepubertal period (Series II) on immobility in the forced swimming test in adult males (A) and female (B) rats.

Vertically — immobility time (s). White columns — non-prenatally stressed (the control), gray columns — prenatally stressed with saline solution, square hatch — prenatally stressed with fluoxetine, the lengthwise hatch — prenatally stressed with buspirone. Significance level: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ between the prenatally stressed with saline and control; $*p < 0.05$, $^{++}p < 0.01$ — between the prenatally stressed with saline and the prenatally stressed with fluoxetine; $*p < 0.05$, $^{\wedge}p < 0.01$ — between the prenatally stressed with saline and the prenatally stressed with buspirone; $^{\#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ — between the series I and series II prenatally stressed with saline and the prenatally stressed with fluoxetine. Data are presented as mean $\pm$ standard error.



кратилась (более чем на 50%) во всех группах самцов и самок крыс, подвергнутых стрессовым воздействиям в пренатальный и препубертатный периоды развития, что указывает на повышение стрессоустойчивости к воспалительной боли у взрослых крыс. В этих условиях влияние флуоксетина и буспирона не проявилось, различий в величине болевого ответа у крыс в разных группах не было выявлено, тогда как у крыс, не подвергнутых стрессу в препубертатном возрасте (серия I), флуоксетин и буспирон у пренатально стрессированных животных обоего пола вызывали антиноцицептивный эффект, подавляли проноцицептивное влияние пренатального стресса. Совсем другой эффект — увеличение интенсивности болевого ответа — был обнаружен в числе сгибаний + встряхиваний у самцов всех исследованных групп и только у пренатально стрессированных самок. Таким образом, последствия сочетания стрессоров в разные возрастные периоды проявились у взрослых крыс по-разному в реакциях, интегрированных на разных уровнях ЦНС: в повышенной чувствительности, то есть уязвимости, к стрессу воспалительной боли в реакциях спинального уровня и в устойчивости к стрессу в реакциях супраспинального уровня. Формалиновый тест, как известно, широко используется для оценки влияния разных препаратов на ноцицептивную систему [31]. Результаты нашей работы подтверждает информативность формалинового теста при оценке влияния стрессовых событий на болевую систему.

Мы не можем сравнить наши результаты с данными литературы, так как не обнаружили работ, в которых использовали стресс воспалительной боли в качестве стрессового воздействия в раннем возрасте в сочетании с каким-либо другим стрессом, хотя воспалительная боль часто встречается в неонатальной клинике. Каким образом сочетание стрессовых воздействий в критические периоды индивидуального развития вызывает усиление интегрированного на спинальном уровне воспалительного болевого ответа и снижение его на супраспинальном уровне у крыс во взрослом состоянии? На поставленный вопрос мы можем только сделать предположение: увеличение числа сгибаний и встряхиваний, вызванное сочетанием стрессоров, обусловлено возбуждающей глутаматергической системой, а сокращение продолжительности реакции вылизывания — усилением тормозного ГАМКергического влияния на супраспинальном уровне. Действительно, боль, вызванная формалином, активирует интенсивные реакции сгибания, встряхивания и вылизывания поврежденной воспалительным агентом конечности, сопровождающиеся доминирующим действием возбуждающей глутаматергической системы на спинальном уровне [32]. Известно, что в механизмах формирования ноцицептивного возбуждения в ответ на инъекцию формалина принимают участие разные уровни ЦНС, включая кору головного мозга [33]. По имеющимся данным, нисходящая из ядер шва моноаминергическая система регулирует ноцицептивный сигнал на уровне задних рогов спинного мозга; показаны как афферентные пути от нейронов спинного мозга к ядрам шва, так и эфферентные пути из ядер шва на спинальные нейроны [34]. Известно, что серотонинергическая, ГГНС, глутаматергическая, ГАМКергическая системы вовлечены в ноцицепцию и подвержены влиянию стресса [35–38]. Стресс нарушает баланс процессов возбуждения и торможения в ЦНС и функциональную активность ГГНС, которая влияет на системы контроля болевой нисходящей серотонинергической системы, и, таким образом, на нейрофизиологические механизмы, лежащие в основе восприятия боли. Принимая во внимание разную роль метаботропных и иотропных как глутаматергических [39], так и ГАМКергических [35] рецепторов во влиянии стресса на ноцицепцию, а также механизм котрансмиссии глутамата с серотонинергическими и ГАМКергическими нейронами [40], можно предположить, что эти факторы вовлечены в обнаруженные нами различия во влиянии стресса в разные периоды развития крысы на

воспалительный болевой ответ, интегрированный на спинальном и супраспинальном уровнях ЦНС.

Надо отметить, что влияние препубертатного стресса, проявившееся в увеличении интенсивности болевого ответа спинального уровня, обнаружено у пренатально не стрессированных, пренатально стрессированных с физиологическим раствором и пренатально стрессированных с введением флуоксетина самцов, тогда как у самок — только в группе пренатально стрессированных с введением физиологического раствора. Однако не было обнаружено половых различий в интенсивности болевого ответа в обеих сериях экспериментов.

У взрослых пренатально стрессированных крыс как подвергнутых, так и не подвергнутых стрессированию в препубертатном возрасте, уровень выраженности депрессивноподобного поведения был повышен по сравнению с уровнем депрессивного поведения у контрольных крыс в соответствующих группах. Хроническое введение флуоксетина и бупропиона стрессированным беременным самкам нормализовало этот тип поведения у взрослого потомства обоего пола. Различие между сериями I и II были выявлены в усилении времени иммобильности только у пренатально стрессированных самок. Несмотря на отсутствие в серии I достоверности во времени иммобильности у пренатально стрессированных с препаратами самцов и самок, степень выраженности депрессивноподобного поведения у самок как с флуоксетином, так и бупропином, была ниже, чем у самцов. Половые различия, обнаруженные в уровне депрессивноподобного поведения у пренатально не стрессированных и пренатально стрессированных крыс с введением физиологического раствора (серия I) были нивелированы стрессом в препубертатном возрасте (серия II). В литературе есть данные, что самки в препубертатном возрасте более чувствительны к стрессу, чем самцы [30], однако эти данные касаются только социального стресса. Итак, результаты, полученные как при исследовании воспалительного болевого ответа, так и уровня выраженности депрессивноподобного поведения, свидетельствуют о сложности механизмов длительного влияния сочетания стресса в разные критические периоды развития на гормональные и нейротрансмиттерные системы. Хотя механизм этого важного адаптивного явления изучается на молекулярно-генетическом уровне, нерешенными остаются многие вопросы, включая вопрос: на каком этапе развития происходит трансформация нарушений в нейрогуморальной регуляции, вызванных стрессом в раннем возрасте, в адаптивный процесс.

Таким образом, полученные данные позволили идентифицировать условия стрессовых воздействий, повышающих устойчивость к стрессу у взрослых крыс. Установлено, что стресс в критические периоды развития формирует фенотип с повышенной стрессоустойчивостью к воспалительному болевому воздействию, что обнаружено в ответе, организованном на супраспинальном уровне у взрослых особей. Влияние стресса на депрессивно-подобное поведение проявляется в зависимости от пола животных. Важность положительного результата при взаимодействии двух негативных стрессоров очевидна: повышается стрессоустойчивость и появляется возможность отмены антидепрессантов, применение которых становится уже не эффективным. Полученные новые данные расширяют представление об уязвимости и устойчивости индивидуумов, подвергнутых стрессовым событиям в критические периоды жизни, к стрессу в последующем онтогенезе [17, 19, 20] и имеют практическое значение.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 17-04-00214а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matthews S.G., McGowan P.O.* Developmental programming of the HPA axis and related behaviours: epigenetic mechanisms. *J. Endocrinol.* 242(1): T69–T79. 2019.
<https://doi.org/10.1530/JOE-19-0057>
2. *Monk C., Lugo-Candelas C., Trumpff C.* Prenatal developmental origins of future psychopathology: mechanisms and pathways. *Ann. Rev. Clin. Psychol.* 15: 317–344. 2019.
3. *LeMoult J., Humphreys K.L., Tracy A., Hoffmeister J.A., Ip E., Gotlib I.H.* Meta-Analysis: Exposure to Early Life Stress and Risk for Depression in Childhood and Adolescence. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* pii: S0890-8567(19)32111-2.
<https://doi.org/10.1016/j.jaac.2019.10.011>
4. *Targum S.D., Nemeroff C.B.* The effect of early life stress on adult psychiatric disorders. *Innov. Clin. Neurosci.* 16(1–2): 35–37. 2019.
5. *Tirelli E., Laviola G., Adriani W.* Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27 (1–2): 163–178. 2003.
6. *Spear L.P.* The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24(4): 417–463. 2000.
7. *Weinstock M.* Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiology of stress.* 6: 3–13. 2017.
8. *Gomes F.V., Zhu X., Grace A.A.* Stress during critical periods of development and risk for schizophrenia. *Schizophr Res.* 2019. pii: S0920-9964(19)30020-9.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.01.030>
9. *Bourke C.H., Neigh G.N.* Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Horm. Behav.* 60(1): 112–20. 2011.
10. *Chen L., Jackson T.* Early maternal separation and responsiveness to thermal nociception in rodent offspring: A meta-analytic review. *Behav. Brain. Res.* 299: 42–50. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.022>
11. *Peña C.J., Nestler E.J., Bagot R.S.* Environmental programming of susceptibility and resilience to stress in adulthood in male mice. *Front. Behav. Neurosci.* 13: 40. 2019.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00040>
12. *Lipner E., Murphy S.K., Ellman L.M.* Prenatal maternal stress and the cascade of risk to schizophrenia spectrum disorders in offspring. *Curr. Psychiatry. Rep.* 21(10): 99. 2019.
<https://doi.org/10.1007/s11920-019-1085-1>
13. *Kiryanova V., Smith V.M., Antie M. C., Dyck R.H.* Behavior of adult 5-HT1A receptor knockout mice exposed to stress during prenatal development. *Neuroscience.* 371: 16–28. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.039>
14. *Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Vershinina E.A., Barr G.A.* Differences between the prenatal effects of fluoxetine or bupropion alone or in combination on pain and affective behaviors in prenatally stressed male and female rats. *Front. Behav. Neurosci.* 13(125): 16. 2019.
doi: 103389/fnbeh.2019.00125
15. *Hervás I., Artigas F.* Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 358(1): 9–18. 1998.
16. *Brummelte S., Mc Glanaghy E., Bonnin A., Oberlander T.F.* Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience.* 342: 212–231. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.037>
17. *Van Camp G., Cigalotti J., Bouwalder H., Mairesse J., Gatta E., Palanza P., Maccari S., Morley-Fletcher S.* Consequences of a double hit of stress during the perinatal period and midlife in female rats: Mismatch or cumulative effect? *Psychoneuroendocrinology.* 93: 45–55. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.04.004>
18. *Verstraeten B.S.E., McCreary J., Weyers S., Metz G.A.S., Olson D.M.* Prenatal two-hit stress affects maternal and offspring pregnancy outcomes and uterine gene expression in rats: match or mismatch? *Biol. Reprod.* 100(1): 195–207. 2019.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iory166>
19. *Nederhof E., Schmidt M.V.* Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol. Behav.* 106: 691–700. 2012.
20. *Daskalakis N.P., Bagot R.C., Parker K.J., Vinkers C.H., Kloet E.R.* The three-hit concept of vulnerability and resilience: towards understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 38(9): 1858–1873. 2013.
21. *Михайленко В.А., Буткевич И.П., Вершинина Е.А.* Влияние перинатального стресса и антидепрессантов на воспалительный болевой ответ и психоэмоциональное поведение у молодых самцов крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(7): 888–901. 2019.
[Mikhailenko V.A., Butkevich I.P., Vershinina E.A. Influence of perinatal stress and antide-

- pressants on the acute and tonic pain responses and psycho-emotional behavior in young male rats. *Russ. J. Physiol.* 105(7): 880–901. 2019. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919070057>
22. Marrocco J., Gray J.D., Kogan J.F., Einhorn N.R., O'Kinneide E.M., Rubin T.D., Carroll T.S., Schmidt E.F., McEwen B.S. Early life stress restricts translational reactivity in CA3 neurons associated with altered stress responses in adulthood. *Front. Behav. Neurosci.* 13: 157. 2019.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00157>
 23. Kilkeny C., Browne W.J., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal res. *PLoS. Biol.* 8(6): e1000412. 2010.
 24. Butkevich I., Mikhailenko V., Vershinina E., Semionov P., Makukhina G., Otellin V. Maternal buspirone protects against the adverse effects of in utero stress on emotional and pain-related behaviors in offspring. *Physiol. Behav.* 2011; 102(2): 137–42.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.10.023>
 25. Glover M.E., Clinton S.M. Of rodents and humans: A comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research. *Int. J. Dev. Neurosci.* 51: 50–72. 2016.
 26. Butkevich I.P., Vershinina E. A. Maternal stress differently alters nociceptive behaviors in the formalin test in adult female and male rats. *Brain Res.* 961: 159–165. 2003.
 27. Barakat A., Hamdy M.N., Elbadr M.M. Uses of fluoxetine in nociceptive pain management: A literature overview. *Eur. J. Pharmacol.* 829: 12–25. 2018.
 28. Riediger C., Schuster T., Barlinn K., Maier S., Weitz J., Siepmann T. Adverse effects of antidepressants for chronic pain: a systematic review and meta-analysis. *Front Neurol.* 8: 307. 2017.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00307>
 29. Burke A.R., McCormick C. M., Pellis S.M., Lukkes J.L. Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76 (Pt B): 280–300. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.018>
 30. McCormick C.M., Green M.R. From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: investigations in rodent models. *Neuroscience.* 249: 242–57. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.063>
 31. Dulu T.D., Kanui T.I., Towett P.K., Maloiy G.M., Abelson K.S. *In Vivo*. The effects of oxotremorine, epibatidine, atropine, mecamylamine and naloxone in the tail-flick, hot-plate, and formalin tests in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *In Vivo.* 28(1): 39–48. 2014.
 32. Vidal-Torres A., Carceller A., Zamanillo D., Merlos M., Vela J.M., Fernandez-Pastor B. Evaluation of formalin-induced pain behavior and glutamate release in the spinal dorsal horn using in vivo microdialysis in conscious rats. *J. Pharmacol. Sci.* 120: 129–132. 2012.
 33. Morrow T.J., Paulson P.E., Danneman P.J., Casey K.L. Regional changes in forebrain activation during the early and late phase of formalin nociception: analysis using cerebral blood flow in the rat. *Pain.* 75(2–3): 355–365. 1998.
 34. Braz J.M., Enquist L.W., Basbaum A.I. Inputs to serotonergic neurons revealed by conditional viral transneuronal tracing. *J. Comp. Neurol.* 514(Iss.2): 145–160. 2009.
 35. Goudet C., Magnaghi V., Landry M., Nagy F., Gereau R.W., Pin J-P. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain. Res. Rev.* 60: 43–56. 2009.
 36. Quintero L., Cardenas R., Suarez-Roca H. Stress-induced hyperalgesia is associated with a reduced and delayed GABA inhibitory control that enhances post-synaptic NMDA receptor activation in the spinal cord. *Pain.* 152(8): 1909–22. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.04.017>
 37. Bannister K., Lockwood S., Goncalves L., Patel R., Dickenson A.H. An investigation into the inhibitory function of serotonin in diffuse noxious inhibitory controls in the neuropathic rat. *Eur. J. Pain.* 2017 Apr; 21(4): 750–760.
<https://doi.org/10.1002/ejp.979>
 38. Hernández-Vázquez F., Garduño J., Hernández-López S. GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Rev. Neurosci.* 30(3): 289–303. 2019.
Doi: 10.1515/revneuro-2018-0014
 39. Lian Y.N., Lu Q., Chang J.L., Zhang Y. The role of glutamate and its receptors in central nervous system in stress-induced hyperalgesia. *Int. J. Neurosci.* 128(3): 283–290. 2018
<https://doi.org/10.1080/00207454.2017.1387112>
 40. Trudeau L.E., Mestikawy S. Glutamate Cotransmission in Cholinergic, GABAergic and Monoamine Systems: Contrasts and Commonalities. *Front. Neural. Circuits.* 12: 113. 2018.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00113>

Combination of Stressful Influences during Critical Periods of Development Increases Resistance to Stress of Inflammatory Pain in Adult Rats

I. P. Butkevich^{a, b, *}, V. A. Mikhailenko^a, and E. A. Vershinina^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Rus. Acad. Sci., St. Petersburg, Russia*

^b*Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: irinabutkevich@yandex.ru*

We studied the long-term effect of the combination of stress in the prenatal and prepubertal periods of development on indicators of tonic inflammatory pain in the formalin test and the depressive-like behavior, as well as on the stress reactivity of the hormonal response in adult rats. In addition, in rats of both sexes, the effect of serotonin reuptake inhibitor (5-HT) fluoxetine and 5-HT1A agonist buspirone, chronically administered to their stressed mothers during pregnancy, on the studied types of adaptive behavior disturbed by prenatal stress was evaluated. It was found that in rats of both sexes, prenatal stress intensified the pain response organized at the spinal and supraspinal levels of the central nervous system, fluoxetine and buspirone normalized them. Stress in the prepubertal period of development leveled the effect of prenatal stress on the inflammatory pain response integrated at the supraspinal level in adult rats; under these conditions, fluoxetine and buspirone did not act, unlike their antinociceptive effect on the pain response integrated at the spinal level. Stress in prepubertal age leveled the sex differences found in the depressive-like behavior in prenatally non-stressed and prenatally stressed rats with saline. In control adult females and adult females with prenatal effects, prepubertal stress increased plasma corticosterone after forced swimming compared to basal hormone levels, but no significant differences in the level of stress reactivity of the hormonal response after forced swimming were found. Thus, the conditions of stressful impacts that increase resistance to stress in adult rats are identified. Stress in critical periods of development forms a phenotype with increased stress resistance to inflammatory pain, which was found in the response organized at the supraspinal level in adults.

Keywords: stress in the prenatal and prepubertal periods, adult male and female rats, inflammatory pain, depressive behavior, corticosterone

ЦИТИРОВАТЬ:

Буткевич И.П., Михайленко В.А., Вершинина Е.А. Сочетание стрессовых воздействий в критические периоды развития повышает устойчивость к стрессу воспалительной боли у взрослых крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 267–282.

DOI: 10.31857/S0869813920030024

TO CITE THIS ARTICLE:

Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Vershinina E.A. Combination of Stressful Influences during Critical Periods of Development Increases Resistance to Stress of Inflammatory Pain in Adult Rats. Russian Journal of Physiology. 106(3): 267–282.

DOI: 10.31857/S0869813920030024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ АКТГ_{6–9}-PGR И АКТГ_{4–7}-PGR НА УРОВЕНЬ
ТРЕВОЖНОСТИ У КРЫС ПРИ НАКАЗУЕМОМ
И НЕНАКАЗУЕМОМ ПОВЕДЕНИИ**

© 2020 г. С. А. Додонова^{1, *}, И. И. Бобынцев¹, А. Е. Белых¹, И. А. Телегина¹,
Ю. А. Музалева¹, Л. А. Андреева², Н. Ф. Мясоедов²

¹Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

*E-mail: dodonovasveta@mail.ru

Поступила в редакцию 17.12.2019 г.

После доработки 11.01.2020 г.

Принята к публикации 13.01.2020 г.

Одним из активно исследуемых в настоящее время классов регуляторных пептидов являются меланокортины, включающие в себя такие биологически-активные вещества, как адренокортикотропный гормон (АКТГ), α -, β - и γ -меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ). Фрагменты АКТГ, как и другие пептиды семейства меланокортинов, обладают выраженными нейротропными эффектами, направленными, в частности, на стимуляцию процессов обучения, памяти и внимания. При этом активным центром АКТГ, необходимым для активации всех видов меланокортиновых рецепторов, является последовательность His-Phe-Arg-Trp, соответствующая фрагменту АКТГ_{6–9}. В настоящей работе нами были исследованы синтетический пептид — АКТГ_{6–9}-PGR, содержащей в своей структуре природный фрагмент АКТГ_{6–9}, стабилизированный с С-конца последовательностью аминокислот пролил-глицил-пролин (PGR) с целью повышения устойчивости к действию карбоксипептидаз. Изучены эффекты внутрибрюшинного введения АКТГ_{6–9}-PGR в дозах 0.5; 5; 50; 150 и 450 мкг/кг однократно за 15 мин до начала опыта по изучению уровня тревожности у крыс с использованием теста конфликтной ситуации по Вогелю (наказуемое поведение) и теста “приподнятый крестообразный лабиринт” (ненаказуемое поведение). Проведено сравнение эффектов АКТГ_{6–9}-PGR и его структурного аналога — АКТГ_{4–7}-PGR в дозах 50; 150 и 450 мкг/кг с использованием указанных тестов. Установлено, что АКТГ_{6–9}-PGR в тесте конфликтной ситуации по Вогелю вызывал повышение уровня тревожности у крыс, которое проявлялось в сокращении времени питья (во всех дозах) и в уменьшении количества облизываний (в дозах 0.5 и 150 мкг/кг ($p < 0.01$)). В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” АКТГ_{6–9}-PGR не оказывал существенного влияния на поведение крыс. В моделях наказуемого и ненаказуемого поведения эффектов АКТГ_{4–7}-PGR выявлено не было. Таким образом, установлено, что АКТГ_{6–9}-PGR, в отличие от АКТГ_{4–7}-PGR, влияет на уровень тревожности у крыс в зависимости от дозы пептида и исследуемой модели поведения.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, АКТГ, тревожность, тест Вогеля, приподнятый крестообразный лабиринт, крысы

DOI: 10.31857/S0869813920030048

В настоящее время меланокортины являются одними из наиболее интенсивно изучаемых классов регуляторных пептидов. Широкий спектр их физиологических

эффектов, открытие семейства меланокортиновых рецепторов (MC1R–MC5R) [1, 2] в различных структурах головного мозга, а также возможность прохождения коротких пептидных последовательностей через гематоэнцефалический барьер, позволяет рассматривать фрагменты аденокортикотропного гормона (АКТГ) как перспективные молекулы для дальнейшего изучения и клинического применения в виде фармакологических препаратов [2–4].

Известно, что N-концевые фрагменты АКТГ обладают нейротрофическим, анальгетическим и ноотропным эффектами [3]. Доказано влияние меланокортинов на регуляцию эмоционального состояния и реакции организма при стрессе [5]. При этом известно, что последовательность His-Phe-Arg-Trp (HFRW), соответствующая фрагменту АКТГ_{6–9}, является активным центром молекулы АКТГ, необходимым для активации всех видов MCR [6–9]. Показано, что His-Phe-Arg-Trp служит критическим фармакофором [10–12] всех эндогенных агонистов MCR, т.е. проявляет себя как структура, необходимая для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий с определенной биологической мишенью. При этом последовательность His-Phe-Arg-Trp является абсолютно необходимой и достаточной для активации всех типов MCR за исключением MC2R, включение которых опосредовано наличием двух связывающих доменов: His-Phe-Arg-Trp и Lys-Lys-Arg-Arg (АКТГ_{15–18}) [7, 9].

Модификация данного фрагмента в виде присоединения к C-концу последовательности трипептида Pro-Gly-Pro (PGP) с целью повышения устойчивости к действию карбоксипептидаз также оказывает нейротропное действие [12]. Показано, что структурно близкий ему синтетический фрагмент АКТГ_{4–7}-PGP (активная субстанция фармакологического препарата “семакс”), обладает ноотропной, анксиолитической, нейротрофической и анальгетической активностями [13]. При этом известно, что N-концевые фрагменты АКТГ лишены гормональной активности, что позволяет отделить свойства исходной пептидной последовательности от эффектов, обусловленных действием гормонов надпочечников [3]. Важным вопросом при изучении пептидных соединений с нейротропной активностью является возможность их проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) — для АКТГ_{4–7}-PGP, как и для АКТГ_{6–9}-PGP, установлена способность проникать через ГЭБ и взаимодействовать со структурами головного мозга [14, 15].

Учитывая наличие широкого спектра нейротропных эффектов у меланокортинов, их фрагментов и синтетических аналогов, а также перспективы их применения для коррекции различных патологических состояний, представляется целесообразным изучение влияния АКТГ_{6–9}-PGP, включающего в себя аминокислотную последовательность His-Phe-Arg-Trp (активный центр молекулы АКТГ), на такие поведенческие реакции животных, как страх и тревога.

Целью данной работы являлось изучение влияния АКТГ_{6–9}-PGP на уровень тревожности у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении в сравнении с эффектами с АКТГ_{4–7}-PGP.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 180 крысах-самцах Вистар массой 250–300 г. Животные содержались в клетках по 10 особей в стандартных условиях вивария и получали стандартный гранулированный корм и воду в свободном доступе при 12-часовом световом режиме (12 ч — свет, 12 ч — темнота) и контролируемой температуре ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Исследования проводили в промежуток времени с 9 до 15 ч. С целью предотвращения стрессорной реакции на взятие в руки экспериментатора животных ежедневно подвергали процедуре хэндинга. Все процедуры проводили в соот-

ветствии с Директивой ЕС о защите животных, используемых в научных целях — EU Directive 2010/63/EU, принятой 22 сентября 2010 г., “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г., и под контролем Этического комитета ФГБОУ ВО “Курский государственный медицинский университет” Минздрава России (Протокол заседания № 3 от 27 октября 2015 г.).

В работе применяли физиологический раствор 0.9% натрия хлорида, а также пептиды АКТГ₆₋₉-PGR и АКТГ₄₋₇-PGR, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентриально однократно за 15 мин до начала опыта. АКТГ₆₋₉-PGR применялся в той или иной опытной группе в дозах 0.5; 5; 50; 150 и 450 мкг/кг, АКТГ₄₋₇-PGR — в дозах 50; 150 и 450 мкг/кг. Выбор доз был основан на данных литературы об эффективном диапазоне доз для структурно схожей молекулы АКТГ₄₋₇-PGR [12, 13]. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора из расчета 1 мл на 1 кг массы.

Тестирование животных в каждой серии экспериментов проводили в несколько последовательных дней, исходя из дизайна исследования: **1 день:** 1 группа (АКТГ₆₋₉-PGR — 0.5 мкг/кг); 2 группа (АКТГ₆₋₉-PGR — 50 мкг/кг); 3 группа (АКТГ₆₋₉-PGR — 450 мкг/кг). **2 день:** 4 группа (АКТГ₆₋₉-PGR — 5 мкг/кг); 5 группа (контроль — физиологический раствор); 6 группа (АКТГ₆₋₉-PGR — 150 мкг/кг). **3 день:** 7 группа (АКТГ₄₋₇-PGR — 50 мкг/кг); 8 группа (АКТГ₄₋₇-PGR — 150 мкг/кг); 9 группа (АКТГ₄₋₇-PGR — 450 мкг/кг).

Уровень тревожности оценивали в двух сериях экспериментов: 1 серия с использованием теста “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (1 контрольная и 8 опытных групп по 10 животных в каждой ($n = 90$)); 2 серия — тест конфликтной ситуации по Вогелю (аналогично: 1 контрольная и 8 опытных групп по 10 крыс ($n = 90$)) [16].

Тест конфликтной ситуации по Вогелю. Установка конфликтной ситуации включала в себя три части: экспериментальную камеру, шокер и счетное устройство (PanLab Harvard Apparatus, Испания). Экспериментальная камера представляла собой клетку размерами 180 × 220 × 420 мм с решетчатым полом и поилкой, наполненной водой. Пол в экспериментальной камере и сосок поилки присоединяли к шокеру. Эксперимент проводился в течение 3 дней. Первые 24 ч животные полностью лишались воды. На следующий день, т.е. после 24-часовой депривации, проводили выработку навыка взятия воды из поилки: животных помещали в экспериментальную камеру на 5 мин. В течение этого времени крысы обследовали установку, находили поилку. По истечении 5 мин обучения животных сажали в клетки со свободным доступом к воде в течение 20 мин. На третий день эксперимента крыс снова на 5 мин помещали в экспериментальную установку. В ходе эксперимента после первых 20 свободных облизываний соска поилки крыса получала удар током силой 0.3 мА и продолжительностью 5 с. В последующем после каждых 20 облизываний животных наказывались аналогичным электрическим раздражителем [17]. Критериями для оценки тревожности служили следующие параметры: количество наказуемых взятий воды из поилки (количество облизываний соска поилки во время электрической стимуляции); количество электрических шоков; время (продолжительность) питья.

Тест приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Исследование уровня тревожности у крыс в тесте ПКЛ проводили с использованием экспериментальной установки (PanLab Harvard Apparatus, Испания), состоящей из 4 рукавов (два противоположных открытых без стенок и два закрытых со стенками высотой 300 мм) длиной 500 мм и шириной 140 мм, крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом. Крестообразный лабиринт был приподнят на высоту

500 мм от уровня пола. Эксперименты проводились при искусственном освещении: 300 люкс — для открытых рукавов, 240 люкс — для центральной площадки, 45 люкс — для закрытых рукавов. В отличие от теста конфликтной ситуации по Вогелю, указанные условия характеризуются низким стрессорным воздействием на животных. Непосредственно перед началом эксперимента крыс выдерживали по 5 мин в темных боксах. Затем животное помещали в ПКЛ на центральную площадку, головой к открытому рукаву и в течение 5-минутного интервала регистрировали: время пребывания животных в открытых, закрытых рукавах, а также на центральной площадке; количество заходов в открытые и закрытые рукава, центральную площадку; груминг и свешивания в открытых рукавах. Регистрацию и анализ параметров осуществляли с помощью системы видео-трекинга “SMART Video Tracking System” (PanLab Harvard Apparatus, Испания).

Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения “MS Excel 2016”, программы “Statistic 13.3” и программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, оценку равенства дисперсий — с помощью критерия Левене. Значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического однофакторного дисперсионного анализа с помощью критерия Краскела–Уоллиса, для выявления межгрупповых различий в качестве *post-hoc* анализа использовали критерий Манна–Уитни (U-test) с поправкой Бенджамини–Хохберга. В связи с неправильным распределением признаков полученные результаты выражали в виде медианы (Me), нижнего (25) и верхнего (75) перцентилей (Q1 и Q3). Результаты считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест конфликтной ситуации по Вогелю

Как видно из табл. 1, введение АКТГ_{6–9}-PGR оказывало выраженное дозозависимое влияние на показатели, регистрируемые в тесте Вогеля. Во всех опытных группах отмечено достоверное снижение продолжительности питья: в дозе 0.5 мкг/кг — на 72% ($p = 0.02$), в дозе 5 мкг/кг — на 62% ($p = 0.03$), 50 мкг/кг — на 54% ($p = 0.04$), 150 мкг/кг — на 75% ($p = 0.01$) и в дозе 450 мкг/кг — на 59% ($p = 0.03$). Данные факты свидетельствуют о наличии у пептида анксиогенного эффекта.

В пользу анксиогенного эффекта АКТГ_{6–9}-PGR также свидетельствует снижение количества облизываний. Так, при использовании пептида в дозе 0.5 мкг/кг наблюдалось сокращение количества наказуемых взятий воды из поилки в 6 раз ($p < 0.01$), а в дозе 150 мкг/кг — в 1.5 раза ($p < 0.01$). Кроме того, имело место достоверное снижение количества полученных электрических шоков в указанных дозах соответственно на 200% ($p = 0.02$) и 50% ($p = 0.03$). Необходимо отметить, что при введении АКТГ_{6–9}-PGR в дозе 5 мкг/кг статистически значимых различий в количестве указанных поведенческих актов по сравнению с контрольной группой обнаружено не было, однако наблюдалась тенденция к сокращению количества облизываний (на 50%, $p = 0.09$) и числа полученных электрических шоков (на 50%, $p = 0.1$).

При этом АКТГ4–7-PGR во всех использованных дозах по сравнению с контрольной группой не оказывал статистически значимых влияний ни на один из показателей, исследуемых в тесте Вогеля.

Приподнятый крестообразный лабиринт

Введение АКТГ_{6–9}-PGR не оказывало существенного воздействия на уровень тревожности крыс в тесте ПКЛ (табл. 2), в отличие от теста конфликтной ситуации по Вогелю. Так, только в дозе 150 мкг/кг отмечено достоверное увеличение коли-

Таблица 1. Показатели тревожности в тесте Вогеля после внутрибрюшинного введения АКТГ₆₋₉-PGP и АКТГ₄₋₇-PGP ($n = 90$, Ме [Q1; Q3])**Table 1.** Anxiety indicators in the Vogel test after intraperitoneal administration of ACTH₆₋₉-PGP and ACTH₄₋₇-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])

Показатель Index Доза Dose	Число облизываний Number of licks	Число шоков Number of shocks	Время питья, с Drinking time, s
Контроль Control ($n = 10$)	40 [39; 41]	2 [1; 2]	7.62 [4.82; 28.87]
АКТГ ₆₋₉ -PGP (ACTH ₆₋₉ -PGP)			
0.5 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	3.0 [0.0; 20.0]*	0.0 [0.0; 1.0]*	2.1 [0.0; 4.9]*
5 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	20.0 [20.0; 23.0]	1.0 [1.0; 1.0]	2.9 [1.7; 5.8]*
50 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [0.0; 60.0]	2.0 [0.0; 3.0]	3.5 [0.0; 5.1]*
150 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	15.0 [0.0; 20.0]*	1.0 [0.0; 1.0]*	1.9 [0.2; 3.6]*
450 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [20.0; 40.0]	2.0 [1.0; 2.0]	3.2 [1.4; 10.1]*
АКТГ ₄₋₇ -PGP (ACTH ₄₋₇ -PGP)			
50 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [20.0; 44.0]	2.0 [1.0; 2.0]	4.1 [2.0; 8.8]
150 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	50.0 [15.0; 31.0]	2.0 [2.0; 3.0]	4.6 [3.3; 24.8]
450 мкг/кг (mcg/kg) ($n = 10$)	40.0 [40.0; 60.0]	2.0 [2.0; 3.0]	7.2 [3.3; 21.8]

Примечание: * – достоверные различия ($p \leq 0.05$) с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга по сравнению с контрольной группой.

чество заходов в открытые рукава ($p = 0.04$), а в дозах 50 и 450 мкг/кг наблюдалась лишь тенденция к возрастанию указанного параметра ($p = 0.09$). На остальные исследуемые показатели (время пребывания животных в открытых и закрытых рукавах, а также на центральной площадке; на количество заходов в закрытые рукава, центральную площадку; груминг и свешивания в открытых рукавах) АКТГ₆₋₉-PGP во всех использованных дозах не оказывал статистически значимого влияния.

Аналогично, введение АКТГ₄₋₇-PGP во всех использованных дозах также не оказывало по сравнению с контрольной группой статистически значимых влияний на показатели, характеризующие поведение животных в ПКЛ (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование уровня тревожности в тесте конфликтной ситуации по Вогелю характеризуется значительной степенью стрессорного воздействия на организм экспериментальных животных за счет продолжительной (на протяжении двух суток) питьевой депривации, а также эмоционально-болевого фактора. Известно, что под действием разного рода стрессоров в головном мозге наблюдается усиление экспрессии ряда меланокортиновых рецепторов, в частности, мРНК MC4R в миндале и гипоталамусе [5, 18], играющих, в свою очередь, важную роль в формирова-

Таблица 2. Показатели тревожности в тесте ПКЛ после внутрибрюшинного введения АКТГ₆₋₉-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])**Table 2.** Anxiety indicators in EPM after intraperitoneal administration of ACTH₆₋₉-PGP ($n = 90$, Me [Q1; Q3])

Доза Dose Показатель Index	Контроль Control ($n = 10$)	0.5 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	5 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	50 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	150 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	450 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)
Время в открытых рукавах, с Time in open arms, s	56.1 [41.7; 140.6]	57.6 [25.2; 77.0]	88.8 [53.9; 112.4]	28.3 [15.5; 51.12]	63.9 [39.9; 150.9]	67.5 [35.7; 113.1]
Время в закрытых рукавах, с Time in closed arms, s	173.2 [95.4; 246.2]	212.9 [189.6; 243.3]	138.4 [109.5; 203.1]	226.3 [205.0; 271.7]	151.7 [88.7; 232.1]	194.52 [139.6; 240.4]
Время на центральной площадке, с Time in central platform, s	30.61 [7.6; 60.6]	25.64 [18.6; 35.5]	53.8 [34.3; 75.6]	27.9 [23.0; 43.6]	46.1 [33.5; 64.8]	37.8 [19.1; 54.2]
Заходы в открытые рукава Entries in open arms	3.0 [3.0; 5.0]	5.5 [4.0; 8.0]	7.0 [5.0; 9.0]	1.0 [0.0; 2.0]	7.0 [1.0; 10.0]*	9.0 [7.0; 15.0]
Заходы в закрытые рукава Entries in closed arms	6.0 [3.0; 12.0]	5.0 [4.0; 6.0]	5.0 [3.0; 10.0]	7.0 [3.0; 8.0]	5.0 [3.0; 18.0]	9.0 [5.0; 15.0]
Заходы на центральную площадку Entries in central platform	9.5 [6.0; 16.0]	10.0 [5.0; 13.0]	13.0 [8.0; 18.0]	7.0 [5.0; 11.0]	13.0 [5.0; 25.0]	19.5 [9.0; 26.0]
Количество свешиваний Number of head dips	11.0 [6.0; 15.0]	8.50 [6.0; 11.0]	9.0 [9.0; 17.0]	6.0 [5.0; 8.0]	7.0 [6.0; 17.0]	11.5 [9.0; 13.0]
Груминг Grooming	0.5 [0; 1.0]	1.0 [0; 2.0]	1.0 [0; 1.0]	1.0 [0; 2.0]	0.0 [0; 1.0]	0.0 [0; 1.0]

Примечание: * — достоверные различия ($p \leq 0.05$) с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хохберга по сравнению с контрольной группой.

нии реакций страха и тревоги [19]. В связи с этим, агонисты указанного рецептора способны обладать анксиогенными эффектами [18], повышая уровень цАМФ в клетках, экспрессирующих MC4R [5, 18]. Учитывая, что АКТГ₆₋₉-PGP является минимальной требуемой последовательностью для проявления биологической активности эндогенных агонистов меланокортиновых рецепторов [6–10], можно предположить, что повышение уровня тревожности в условиях наказуемого поведения при внутрибрюшинном введении исследуемого гептапептида (проявляющееся во всех используемых дозах снижением общей продолжительности питья у крыс в тесте Вогеля) является отражением взаимодействия последовательности His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro с MC4R и, соответственно, их активацией [20].

Напротив, внутрибрюшинное введение АКТГ₆₋₉-PGP в условиях ненаказуемого поведения не оказывало влияния на поведенческие реакции, отражающие уровень тревожности экспериментальных животных. Вероятно, это связано с минимальной степенью стрессорного воздействия при проведении теста ПКЛ, в отличие от теста конфликтной ситуации по Вогелю. В связи с этим можно предположить, что уровень стресс-индуцированной экспрессии меланокортиновых рецепторов в соответствующих структурах головного мозга был недостаточным для реализации анксиогенных эффектов АКТГ₆₋₉-PGP, установленных нами в условиях наказуемого поведения [20–22].

Таблица 3. Показатели тревожности в тесте ПКЛ после внутрибрюшинного введения АКТГ₄₋₇-PGR ($n = 90$, Me [Q1; Q3])**Table 3.** Anxiety indicators in EPM after intraperitoneal administration of ACTH₄₋₇-PGR ($n = 90$, Me [Q1; Q3])

Доза Dose Показатель Index	Контроль Control ($n = 10$)	50 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	150 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)	450 мкг/кг mcg/kg ($n = 10$)
Время в открытых рукавах, с Time in open arms, s	56.1 [41.7; 140.6]	61.6 [18.3; 119.2]	36.24 [32.6; 103.4]	29.8 [13.4; 100.7]
Время в закрытых рукавах, с Time in closed arms, s	173.2 [95.4; 246.2]	220.7 [108.6; 250.4]	228.7 [164.3; 259.8]	252.9 [181.9; 268.9]
Время на центральной площадке, с Time in central platform, s	30.6 [7.6; 60.6]	21.4 [16.8; 59.9]	24.4 [9.6; 39.1]	16.2 [4.1; 25.2]
Заходы в открытые рукава Entries in open arms	3.0 [3.0; 5.0]	4.0 [2.0; 7.0]	4.0 [2.0; 6.0]	4.5 [1.0; 6.0]
Заходы в закрытые рукава Entries in closed arms	6.0 [3.0; 12.0]	6.0 [2.0; 11.0]	4.0 [3.0; 11.0]	4.0 [2.0; 9.0]
Заходы на центральную площадку Entries in central platform	9.5 [6.0; 16.0]	8.0 [4.0; 18.0]	5.0 [4.0; 18.0]	7.0 [3.0; 11.0]
Количество свешиваний Number of head dips	11.0 [6.0; 15.0]	8.0 [4.0; 13.0]	7.0 [4.0; 18.0]	6.0 [4.0; 13.0]
Груминг Grooming	0.5 [0; 1.0]	1.0 [0.0; 1.0]	1.0 [1.0; 1.0]	1.0 [0.0; 1.0]

Примечание: * – достоверные различия ($p \leq 0.05$) с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бенджамини–Хошберга по сравнению с контрольной группой.

Учитывая сложность и множественность механизмов, как участвующих в формировании собственно поведенческих актов, так и запускающихся в ходе стресс-реакции, можно предположить, что неоднозначные эффекты АКТГ₆₋₉-PGR при наказуемом и ненаказуемом поведении так же потенциально могут быть связаны с аллостерическим взаимодействием между пептидом и рецепторами других медиаторных систем, например, ГАМК-ергической, серотонергической, дофаминергической, как это было показано для АКТГ₄₋₇-PGR. Известно, что последний способен индуцировать и изменять сигналы широкого спектра рецепторов, вызывая их конформационные изменения и функциональную реконструкцию [3]. Кроме того, существуют и свои собственные связывающие сайты пептидов, через взаимодействие с которыми имеется возможность тонкой настройки информационного сигнала [3] в случае адаптации к внешним условиям, механизмы которой активируются особенно явно при проведении теста Вогеля по сравнению с тестом ПКЛ. Можно предположить, что так как животные в проведенном тесте ПКЛ не получали интенсивного стрессорного воздействия, то они, соответственно, и не нуждались в активном включении адаптационных процессов, сопровождающихся активацией различных медиаторных систем.

Отмеченный выше нелинейный дозозависимый характер эффектов (например, отсутствие влияния АКТГ₆₋₉-PGR на “число облизываний” в дозах 5, 50 и 450 мкг/кг, на фоне его наличия в дозах 0.5 и 150 мкг/кг) может быть связан с характерными биологическими особенностями реализации эффектов регуляторных пептидов. Известно, что кинетические закономерности химических и биологических про-

цессов, возникающих в результате действия данного класса физиологически активных веществ, часто имеют “колоколообразный” или “U-образный” тип кривой “доза–эффект”. Указанное явление подразумевает под собой наличие выраженного эффекта в очень малых концентрациях пептида и отсутствие или извращение действия в больших или средних [23]. Направленность эффектов регуляторных пептидов в той или иной дозе во многом зависит от активации той или иной системы внутриклеточных вторичных мессенджеров. Так, высокие концентрации АКТГ активируют синтез ц-АМФ для передачи клеточного сигнала, а низкие – диацилглицеролинозитолфосфатный путь, что в последующем будет определять вид полученного эффекта [23].

В то же время необходимо отметить, что ранее в работах других авторов были описаны анксиолитические эффекты АКТГ_{6–9}-PGP в тесте ПКЛ [12], не подтвержденные настоящим исследованием. Одной из причин указанных различий может являться путь введения изучаемой субстанции. В нашей работе животные получали пептид внутрибрюшинно, тогда как отмеченный анксиолитический эффект был зафиксирован при интраназальном введении АКТГ_{6–9}-PGP. Известно, что способ введения определяет время доставки пептида, а также механизмы его распределения в тканях, пути метаболизма, уровень биодоступности, что в значительной мере влияет на конечную концентрацию пептида в структурах мозга [24, 25]. Например, при введении в желудочки мозга пептидные препараты кортексин и церебролизин оказывают умеренное анксиолитическое, а при системном введении – анксиогенное действие [26]. Различная выраженность и направленность нейротропных эффектов, определяемая способом введения, также показана для структурно близкого аналога АКТГ_{6–9}-PGP – АКТГ_{4–7}-PGP [3, 13].

Учитывая дозозависимый характер эффектов нейропептидов, использование нами внутрибрюшинного пути введения было связано с возможностью более точного дозирования исследуемого вещества, так как при интраназальном способе могут происходить потери препарата, связанные с неадекватной техникой введения, неправильным выбором буфера, а также в результате рефлекторной активации актов глотания и чихания [27]. Указанный факт является достаточно критичным, учитывая, что изменение концентрации АКТГ и его фрагментов определяет путь внутриклеточной передачи сигнала, что, в свою очередь, влияет на направленность и выраженность реализуемых эффектов [23].

Отсутствие влияния АКТГ_{4–7}-PGP на уровень тревожности животных в обоих используемых в исследовании тестах согласуется с данными литературы. Например, показано, что при однократном введении АКТГ_{4–7}-PGP за 15 мин до начала воздействия пептид не влияет на уровень тревожности животных [5]. Несмотря на структурную близость изучаемых в настоящем исследовании гептапептидов, различия в аминокислотной последовательности, а именно отсутствие в молекуле АКТГ_{4–7}-PGP активного центра АКТГ (в отличие от АКТГ_{6–9}-PGP), обуславливают лишение семакса анксиогенной активности, свойственной природным меланокортинам. Более того, АКТГ_{4–7}-PGP способен проявлять свойства антагониста MC4R, индуцируя анксиолитический и антидепрессантный эффекты [3, 5]. При этом указанные свойства отсутствуют в нормальных условиях и проявляются на фоне повышенного уровня тревожности и депрессивности за счет влияния АКТГ_{4–7}-PGP на функциональную активность серотонинергической системы [5]. Важно отметить, что пептид оказывает именно “восстанавливающее” воздействие в условиях повышенного уровня тревожности.

Подобные особенности регуляторных влияний, проявляющиеся в дифференцированной реализации эффектов в зависимости от уровня напряжения адаптивных систем организма, “сближают” АКТГ_{4–7}-PGP и АКТГ_{6–9}-PGP. Интересно, что

указанные свойства характерны и для других регуляторных пептидов, проявляющих свои эффекты тем ярче, чем интенсивнее влияет разного рода раздражитель на организм, и чем больше изменений претерпевает тот или иной показатель [28].

Таким образом, выраженность и направленность влияния изучаемых N-концевых фрагментов АКТГ на тревожность у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении зависят от использованной дозы пептидов и исследуемой модели поведения. При этом эффекты АКТГ₆₋₉-PGP носят анксиогенный характер в тесте конфликтной ситуации по Вогелю и отсутствуют в тесте ПКЛ, тогда как влияния АКТГ₄₋₇-PGP на уровень тревожности в обоих используемых тестах обнаружено не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M.* Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.* 56(1): 1–29. 2004.
2. *Catania A.* Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci.* 31(7): 353–360. 2008.
3. *Koroleva S.V., Myasoedov N.F.* Semax as a universal drug for therapy and research. *Biology Bulletin.* 45(6): 589–600. 2018.
4. *Yang Y., Hruby V.J., Chen M., Crasto Ch., Cai M., Harmon C.M.* Novel binding motif of ACTH analogues at the melanocortin receptors. *Biochem.* 48(41): 9775–9784. 2009.
5. *Levitskaya N.G., Vilenskii D.A., Sebensova E.A., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.* Influence of semax on the emotional state of white rats in the norm and against the background of cholecystokinin-tetrapeptide action. *Biol. Bull.* 37(2): 186–192. 2010.
6. *Holder J.R., Xiang Z., Bauzo R.M., Haskell-Luevano C.* Structure-activity relationships of the melanocortin tetrapeptide Ac-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂ at the mouse melanocortin receptors. 4. Modifications at the Trp position. *J. Med. Chem.* 45(26): 5736–5744. 2002.
7. *Dores R.M., Liang L., Davis P., Thomas A.L., Petko B.* 60 YEARS OF POMC: Melanocortin receptors: evolution of ligand selectivity for melanocortin peptides. *J. Mol. Endocrinol.* 56(4): T119–33. 2016.
<https://doi.org/10.1530/JME-15-0292>
8. *Hruby V.J., Wilkes B.C., Hadley M.E., Al-Obeidi F., Sawyer T.K., Staples D.J. et al.* Alpha-Melanotropin: the minimal active sequence in the frog skin bioassay. *J. Med. Chem.* 30(11): 2126–30. 1987.
9. *Clark A.J., Forfar R., Hussain M., Jerman J., McIver E., Taylor D., Chan L.* ACTH Antagonists. *Front Endocrinol (Lausanne).* 7: 101. 2016.
10. *Todorovic A., Lensing C.J., Holder J.R., Cott J.W., Sorensen N.B., Haskell-Luevano C.* Discovery of melanocortin ligands via a double simultaneous substitution strategy based on the Ac-His-DPhe-Arg-Trp-NH₂ template. *ACS Chem Neurosci.* 9(11): 2753–2766. 2018.
11. *Palmer D., Gonçalves J.P.L., V Hansen L., Wu B., Hald H., Schoffelen S. et al.* Click-Chemistry-Mediated Synthesis of Selective Melanocortin Receptor 4 Agonists. *J. Med. Chem.* 60(21): 8716–8730. 2017.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00353>
12. *Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Ноотропные и анксиолитические эффекты гептапептида АКТГ₆₋₉Pro-Gly-Pro. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(6): 761–770. 2019. [*Levitskaya N.G., Glazova N.Yu., Sebensova E.A., Manchenko D.M., Andreeva L.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F.* Nootropic And Anxiolytic Effects Of Heptapeptide ACTH₆₋₉Pro-Gly-Pro. *Russ. J. Physiol.* 105(6): 761–770. 2019. (In Russ)].
13. *Манченко Д.М., Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Ноотропные и анальгетические эффекты семакса при различных способах введения. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 96(10): 1014–1023. 2010. [*Manchenko D.M., Glazova N.I., Levitskaya N.G., Andreeva L.A., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F.* Nootropic and analgesic effects of Semax following different routes of administration. *Russ. J. Physiol.* 96(10): 1014–1023. 2010. (In Russ)].
14. *Shevchenko K.V., Nagaev I.Y., Babakov V.N., Andreeva L.A., Shevchenko V.P., Radilov A.S. et al.* Proteolysis of His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro in the blood and brain of rats *in vivo*. *Dokl Biochem Biophys.* 464: 301–304. 2015.
<https://doi.org/10.1134/S1607672915050087>
15. *Вьюнова Т.В., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Мясоедов Н.Ф.* Изучение особенностей связывания нейропептида семакс, меченного по концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами мозга крыс. *Нейрохимия.* 23(1): 57–62. 2006. [*V'unova T.V., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Bobrov M.Yu., Bezuglov V.V.,*

- Myasoedov N.F. Binding of Regulatory Neuropeptide [^3H] Semax, Labeled in Terminal Pro, to Plasma Membranes of the Rat Forebrain. *Neurochem. J.* 23(1): 57–62. 2006. (In Russ)].
16. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М. Гриф и К. 2012. [Mironov A.N. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. M. Grif i K. 2012. (in Russ)].
 17. Millan M.J., Brocco M. The Vogel conflict test: procedural aspects, g-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European J. Pharmacology.* 463: 67–96. 2002.
 18. Левицкая Н.Г., Каменский А.А. Меланокортиновая система. Успехи физиол. наук. 40(1): 44–65. 2009. [Levitskaya N.G., Kamensky A.A. Melanocortin system. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk.* 40(1): 44–65. 2009. (In Russ)].
 19. Duval E.R., Javanbakht A., Liberzon I. Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag.* 11: 115–126. 2015.
 20. Chaki S., Ogawa S., Toda Y., Funakoshi T., Okuyama S. Involvement of the melanocortin MC4 receptor in stress-related behavior in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 474(1): 95–101. 2003.
 21. Liu J., Garza J.C., Li W., Lu X.Y. Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16(1): 105–120. 2013.
 22. Karami Kheirabad M., Namavar Jahromi B., Tamadon A., Ramezani A., Ahmadloo S., Sabet Sarvestan F., Koohi-Hosseinabadi O. Expression of Melanocortin-4 Receptor mRNA in Male Rat Hypothalamus During Chronic Stress. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 4(3): 182–187. 2015.
 23. Ашмарин И.П. Биохимия мозга. СПб. 1999. [Ashmarin I.P. Biochemistry of the brain. *Biohimiya mozga.* SPb. 1999. (In Russ)].
 24. Yia X., Manickam D.S., Brynskikh A., Kabanova A.V. Agile delivery of protein therapeutics to CNS. *Journal of Controlled Release.* 190: 637–663. 2014.
 25. Chauhan M.B., Chauhan N.B. Brain Uptake of Neurotherapeutics after Intranasal versus Intraperitoneal Delivery in Mice. *J. Neurol. Neurosurg.* 2(1): 9. 2015.
 26. Шабанов П.Д. Фармакология лекарственных препаратов пептидной структуры. Психофармакология и биол. наркология. 8(3–4): 2399–2425. 2008. [Shabanov P.D. Pharmacology of Drugs of Peptide Structure. *Psychopharmacology and Biological Narcology.* 8(3–4): 2399–2425. 2008. (In Russ)].
 27. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным. Международный вестник ветеринарии. 3: 72–78. 2013. [Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanati G.V., Rybakova A.V., Khodko S.V., Makarova M.N., Makarov V.G. Possible ways of administration and standard drugs in laboratory animals. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii.* 3: 78–84. 2013. (In Russ)].
 28. Бельх А.Е., Бобынцев И.И. Дельта-сон индуцирующий пептид: отдельные биологические эффекты и механизмы их развития. Курский научно-практический вестник “Человек и его здоровье”. 1: 79–90. 2016. [Belykh A.E., Bobyntsev I.I. Delta sleep-inducing peptide: several biological effects and mechanisms of their development. *Kursk Scientific and Practical Bulletin “Man and His Health”.* 1: 79–90. 2016. (In Russ)].

Influence of ACTH_{6–9}-PGP and ACTH_{4–7}-PGP Peptides on Anxiety in Rats under Punished and Unpunished Behavior

S. A. Dodonova^{a,*}, I. I. Bobyntsev^a, A. E. Belykh^a, I. A. Telegina^a, Yu. A. Muzaleva^a,
L. A. Andreeva^b, and N. F. Myasoedov^b

^aKursk State Medical University, 305004, Kursk, Russia

^bInstitute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, 123182, Moscow, Russia

*e-mail: dodonovasveta@mail.ru

One of the currently studied classes of regulatory peptides is melanocortins (MCs), which include biologically active substances such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH), α -, β - and γ -melanocyte stimulating hormones (MSH). ACTH fragments, like other peptides of the MC family, have pronounced neurotropic effects aimed, in particular, at stimulating the processes of learning, memory and attention. Moreover, the active ACTH center necessary for the activation of all types of melanocortin receptors is the His-Phe-Arg-Trp sequence corresponding to the ACTH_{6–9} fragment. In the present work, we studied a synthetic peptide, ACTH_{6–9}-PGP, which contains a natural fragment ACTH_{6–9}-PGP stabilized from the C-terminus with the amino acid sequence prolyl-glycyl-proline (PGP) to increase resistance to the action of carboxypeptidases.

The effects of intraperitoneal administration of ACTH₆₋₉-PGP at doses of 0.5; 5; 50; 150 and 450 µg/kg were studied once 15 minutes before the start of the experiment on studying the level of anxiety in rats using the Vogel conflict test (punished behavior) and the elevated plus maze test (unpunished behavior). The effects of ACTH₆₋₉-PGP and its structural analogue, ACTH₄₋₇-PGP at doses of 50, 150 and 450 µg/kg were compared using these tests. It was found that ACTH₆₋₉-PGP in the Vogel conflict test led to an increase in the level of anxiety in rats, which manifested itself in a reduction in drinking time (in all doses) and a decrease in the number of licks (at doses of 0.5 and 150 µg/kg ($p < 0.01$)). In the elevated plus maze test, ACTH₆₋₉-PGP did not significantly affect rat behavior. In models of punished behavior and unpunished behavior, no effects of ACTH₄₋₇-PGP were detected. Thus, it was found that ACTH₆₋₉-PGP, in contrast to ACTH₄₋₇-PGP, affects the level of anxiety in rats depending on the dose of the peptide and the model of behavior studied.

Keywords: regulatory peptides, ACTH, anxiety, Vogel test, elevated plus maze, rats

ЦИТИРОВАТЬ:

Додонова С.А., Бобынцев И.И., Белых А.Е., Телегина И.А., Музалева Ю.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние пептидов АКТГ₆₋₉-PGP и АКТГ₄₋₇-PGP на уровень тревожности у крыс при наказуемом и ненаказуемом поведении. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 283–293.

DOI: 10.31857/S0869813920030048

TO CITE THIS ARTICLE:

Dodonova S.A., Bobyntsev I.I., Belykh A.E., Telegina I.A., Muzaleva Yu.A., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Influence of ACTH₆₋₉-PGP and ACTH₄₋₇-PGP Peptides on Anxiety in Rats under Punished and Unpunished Behavior. Russian Journal of Physiology. 106(3): 283–293.

DOI: 10.31857/S0869813920030048

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НАСОСНАЯ ФУНКЦИЯ ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА У РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ
ONCORHYNCHUS MYKISS ПРИ ПРЕДСЕРДНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ
СТИМУЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ**

© 2020 г. Н. А. Киблер¹, *, В. П. Нужный¹, С. Н. Харин¹, Д. Н. Шмаков¹

¹Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар,
Россия

*E-mail: natanadya@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2019 г.

После доработки 14.01.2020 г.

Принята к публикации 14.01.2020 г.

Исследована насосная функция желудочка сердца у акклиматизированной к температуре 5–7°C радужной форели *Oncorhynchus mykiss* при увеличении частоты сердечных сокращений. Динамику внутриполостного давления желудочка регистрировали путем трансмуральной катетеризации. Частоту сердечных сокращений изменяли посредством электрокардиостимуляции. Увеличение частоты сердечных сокращений у радужной форели от исходного ритма до 60 уд/мин привело к уменьшению максимального систолического давления в желудочке сердца, увеличению диастолического и конечно-диастолического давления, к снижению максимальных скоростей прироста и падению давления. Увеличение частоты стимуляции предсердия до 60 уд/мин вызывало значительное снижение сократимости миокарда и ухудшение насосной функции желудочка сердца. Частота сердечных сокращений 60 уд/мин оказалась верхней границей нормальной функциональной деятельности желудочка сердца у радужной форели, адаптированной к температуре среды обитания 5–7°C.

Ключевые слова: гемодинамика, частота сердечных сокращений, желудочек сердца, температура, радужная форель

DOI: 10.31857/S0869813920030061

В связи с гипотезой о глобальном потеплении большое внимание уделяется адаптации сердечно-сосудистой системы рыб к условиям окружающей среды, адаптация этой системы реализуется в первую очередь за счет увеличения частоты сердечных сокращений (ЧСС) и изменения сердечного выброса [1]. Частота сердечного ритма является одним из факторов, ограничивающих адаптацию к изменившимся потребностям организма к повышению температуры [2–4]. Во всем диапазоне от низких до высоких ЧСС у большинства видов млекопитающих происходит увеличение силы сокращения, т.е. наблюдается положительная корреляция между частотой и силой сокращений [5]. Вместе с тем, эти соотношения зависят от видов животных, так, в миокарде желудочков хомяка отрицательная корреляция последовательно наблюдается во всем диапазоне частот стимуляции, а у крысы и мыши – в низкочастотном диапазоне. На частотах, близких к физиологической частоте сердцебиений корреляция между частотой и силой сокращений с отрицательной изменяется на положительную [5]. В опытах *in vitro* на отдельных трабекулах показано [6–8], что у большинства видов рыб сила сокращения миокарда

уменьшается с увеличением частоты сокращения, что приводит к отрицательному отношению частота — сила. Установлено, что в отличие от млекопитающих основная роль в активации сокращения миокарда желудочка рыб принадлежит потоку внеклеточного Ca^{2+} через сарколемму, а не внутриклеточному Ca^{2+} саркоплазматического ретикулума [6–8].

Анализ работ [2–4] по изучению влияния ЧСС на сократимость миокарда у рыб показал, что исследования выполнены в основном при температуре водной среды в диапазоне от оптимальной до верхней температурной границы среды обитания рыб (15°C и выше). Так, на перфузируемых сердцах радужной форели установлено [9], что ударный объем желудочка достигает своего максимума при оптимальной для нее температуре среды 15°C, а при повышении температуры до 20°C наряду с увеличением ЧСС происходит его снижение. При исследовании механических и электрофизиологических свойств полосок миокарда желудочков у акклиматизированной к 10°C радужной форели не выявлено существенного влияния частоты стимуляции на сократимость миокарда при 4, 10 и 18°C [10]. Следует заметить, что перенос результатов, полученных на трабекулах миокарда и перфузируемых сердцах, на организм *in vivo* требует особой осторожности, так как в данных исследованиях используются физиологические растворы, отсутствует нервная и гуморальная регуляция сердечной деятельности и др. Поскольку частота сердечного ритма является одним из лимитирующих факторов адаптации организма рыб к условиям обитания, остается открытым вопрос о том, как влияет ЧСС на сократимость желудочка у рыб *in vivo* при низкой температуре окружающей среды.

Цель работы — исследование влияния увеличения ЧСС на сократительную функцию желудочка сердца радужной форели *Oncorhynchus mykiss* в условиях низкой температуры среды обитания *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено в соответствии с международными правилами обращения с экспериментальными животными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals — публикация the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, ред. 1996) и одобрено локальным этическим комитетом Института физиологии Коми НЦ УрО РАН.

Эксперименты проведены на 15 радужных форелях *Oncorhynchus mykiss* обоего пола массой тела 1.1 ± 0.2 кг (масса сердца — 2.1 ± 0.8 г; масса желудочка — 1.9 ± 0.8 г), адаптированных в садках прудового хозяйства к естественной температуре воды 5–7°C. Животных фиксировали в дорсальном положении тела в лотке, наполненном речной водой при температуре 5–7°C. В ротовую полость вставляли резиновый шланг, по которому для обеспечения искусственного дыхания через жабры под небольшим давлением непрерывно пропускали речную воду из пруда через аэрактор, также при температуре 5–7°C. Продольным разрезом вскрывали грудную полость и перикард, затем обнажали сердце. ЧСС изменяли посредством электрокардиостимуляции при помощи диагностического электрокардиостимулятора ЧЭЭКС п-3 “Вектор-МС”. На предсердие подавали электрические импульсы длительностью 2 мс и амплитудой 2–4 В с интервалами 10 уд/мин.

Динамику внутриполостного давления желудочка регистрировали путем трансмуральной катетеризации на установке Prucka Mac-Lab 2000, для этого заполненный гепаринизированным физиологическим раствором однопросветный катетер (внутренний диаметр 1 мм) вводили через стенку желудочка в полость сердца. Измеряли гемодинамические показатели: систолическое, диастолическое и конечно-диастолическое внутрижелудочковое давление, параметры изоволюмического сокращения (показатель сократимости) $dP/dt_{\max}$ и изоволюмического расслабления

$dP/dt_{\min}$. Для контроля электрофизиологического состояния сердца при измерении давления синхронно регистрировали ЭКГ в отведениях от конечностей (плавников). Температуру тела экспериментальных животных в процессе исследования поддерживали в пределах $5-7^{\circ}\text{C}$.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы BIOSTAT 4.03. с использованием критерия Уилкоксона и Манна–Уитни. Различия признавались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При синусовом ритме при температуре $5-7^{\circ}\text{C}$ ЧСС находилась в пределах от 18 до 27 (21.6 ± 4.9) уд/мин. При спонтанном синусовом ритме 21.6 ± 4.9 уд/мин в условиях низких температур ($5-7^{\circ}\text{C}$) максимальное систолическое давление желудочка составляло 35.2 ± 10.2 мм рт. ст.; диастолическое давление желудочка — 0.8 ± 0.7 мм рт. ст.; конечно-диастолическое давление желудочка — 2.1 ± 1.0 мм рт. ст.; максимальная скорость прироста давления (изоволюмический индекс сократимости) $dP/dt_{\max} - 161.2 \pm 98.9$ мм рт. ст./с; максимальная скорость падения давления (изоволюмический индекс расслабления) $dP/dt_{\min} - 151.0 \pm 103.1$ мм рт. ст./с (рис. 1).

При навязанных ритмах от 30 до 60 уд/мин происходило значительное изменение всех гемодинамических показателей желудочка сердца по отношению к синусовому ритму (рис. 1). Их максимальное изменение произошло при 60 уд/мин: максимальное систолическое давление желудочка уменьшилось с 35.2 ± 10.2 до 24.0 ± 11.5 мм рт. ст. ($p < 0.05$), конечно-диастолическое давление увеличилось с 2.1 ± 1.0 до 3.6 ± 0.5 мм рт. ст. ($p < 0.05$), показатель изоволюмического сокращения уменьшился с 161.2 ± 98.9 до 74.0 ± 43.2 мм рт. ст./с ($p < 0.05$) и изоволюмического расслабления — с 151.0 ± 103.1 до 74.2 ± 43.3 мм рт. ст./с ($p < 0.05$). В процентном отношении увеличение ЧСС у радужной форели *in vivo* привело к уменьшению $dP/dt_{\max}$ при ЧСС 30 уд/мин — на 20%; 40 уд/мин — на 35%; 50 уд/мин — на 40%; 60 уд/мин — на 54%. Уменьшение показателей $dP/dt_{\min}$ происходило приблизительно в той же пропорции: при ЧСС 30 уд/мин — на 19%; 40 уд/мин — на 30%; 50 уд/мин — на 36%; 60 уд/мин — на 51%. В результате изменения гемодинамических показателей произошло снижение сократимости миокарда и ухудшение насосной функции желудочка сердца радужной форели.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из критериев сократимости миокарда, характеризующим способность развивать определенные силу и скорость сокращений миокардиальных волокон является максимальная скорость нарастания внутрижелудочкового давления ($dP/dt_{\max}$). Увеличение ЧСС у радужной форели до 60 уд/мин привело к уменьшению $dP/dt_{\max}$ на 54%, по сравнению с исходным ритмом (21.6 ± 4.9) уд/мин. Полученные нами данные в экспериментах *in vivo* свидетельствуют о снижении сократимости миокарда, что подтверждает результаты исследований, полученных на полосках миокарда [7] и на перфузируемых изолированных сердцах [9]. Однако эти данные не согласуются с результатами M.D. Soupe с соавт. [10] об отсутствии влияния ЧСС на сократительную функцию миокарда радужной форели.

Повышение частоты сердечных сокращений по отношению к исходному ритму 21.6 ± 4.9 уд/мин привело к падению максимального систолического давления и повышению конечного диастолического давления. Повышение конечного диастолического давления свидетельствует об увеличении преднагрузки, которая возможно происходит за счет усиления вклада α -адренорецепторов, что компенсирует

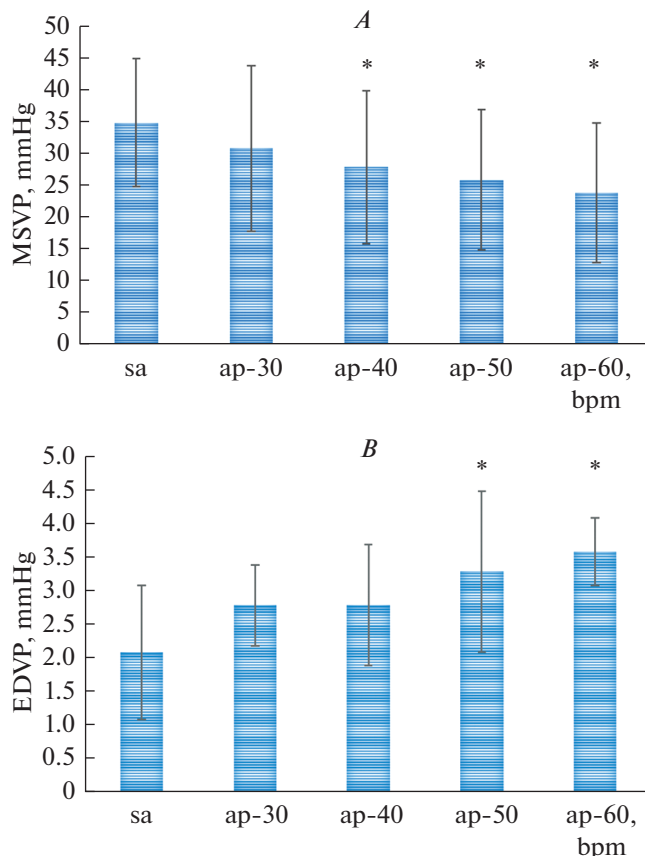


Рис. 1. Гемодинамические показатели сердца радужной форели при увеличении ЧСС: *A* – максимальное систолическое давление желудочка (МСДЖ); *B* – конечно-диастолическое давление желудочка (КДДЖ); *C* – максимальная скорость прироста давления в желудочке ($dP/dt_{\max}$); *D* – максимальная скорость падения давления в желудочке ($dP/dt_{\min}$). sa – синусовый ритм; ap – предсердная стимуляция.

* $p < 0.05$ – по отношению к синусовому ритму.

Fig. 1. Hemodynamic parameters of the heart of rainbow trout with an increase in heart rate: *A* – the maximum systolic pressure of the ventricle (MSVP); *B* – end-diastolic pressure of the ventricle (EDVP); *C* – the maximum rate of the ventricular pressure rise ($dP/dt_{\max}$); *D* – the maximum rate of the pressure fall ($dP/dt_{\min}$). sa – sinus rhythm; ap – atrium pacing rhythm. 30, ..., 60 – HR in beats/min, respectively. * $p < 0.05$ – in relation to the sinus-atrial rhythm.

время снижения наполнения желудочка [11]. Вероятно, при увеличенной преднагрузке и сниженной сократимости желудочка сердца включается механизм регулирования физиологических функций миокарда. В результате этого в наших экспериментах при температуре 5–7°C предельной оказалась частота 60 уд/мин, сверх которой возникали нарушения в функциональной деятельности желудочка сердца радужной форели. Снижение сократимости, систолического давления в желудочке и увеличение на этом фоне конечного диастолического давления можно считать проявлением признаков функциональной недостаточности желудочка сердца у радужной форели при высокой частоте стимуляции в условиях низкой температуры.

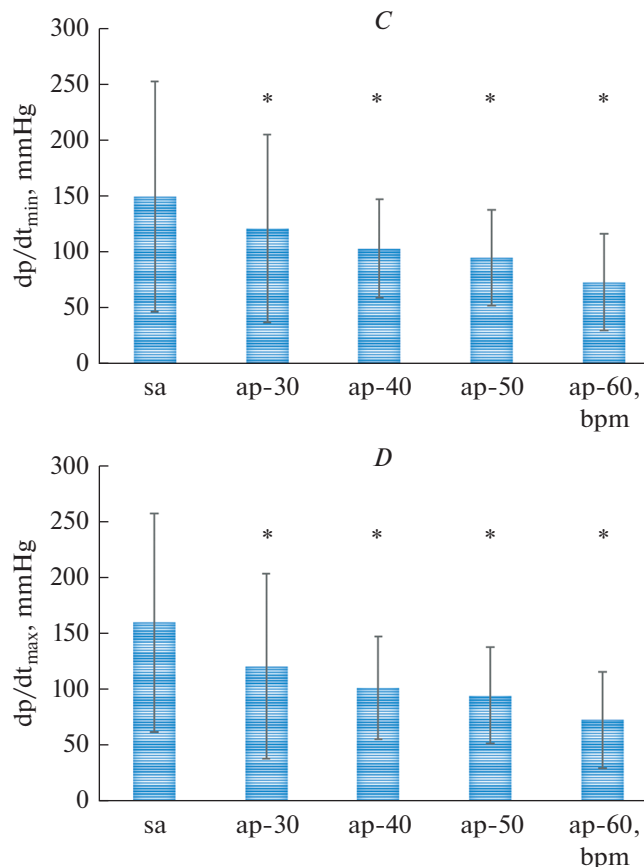


Рис. 1. Окончание

Последнее обусловлено нарушением функционирования губчатого миокарда в активной сократительной деятельности сердца в форме целенаправленных движений трабекул. Скорость и последовательность сокращений таких движений регулируется через ускоряющие адренергические нервы, тормозные холинергические нервы и проводящие пучки сердца [12], что обеспечивает тем самым адекватное внутривентрикулярное соотношение оксигенированной и деоксигенированной крови и эффективную сократительную деятельность сердца.

При адаптации организма к среде обитания немаловажное значение играет пространственно-временная организация процесса возбуждения миокарда, которая во многом определяет сократительную и насосную функцию сердца [13]. Ранее нами [14] было показано, что при предсердной электрической стимуляции у радужной форели при температуре водной среды 5–7°C при ЧСС свыше 60 уд/мин происходит нарушение электрофизиологических процессов в миокарде. Не исключено, что в другом диапазоне температур ЧСС и показатели насосной функции были бы другими, так как ионные токи в клетках миокарда рыб под воздействием температуры претерпевают значительные изменения [8, 9, 15, 16]. Возможно, дезорганизация функциональной деятельности сердца у радужной форели при ЧСС выше 60 уд/мин, как и при температурной адаптации [17], также была связана с нарушением функционирования натриевых каналов, ионные токи которых являются “самым слабым зве-

ном”, ограничивающим адаптацию к температуре среды [17]. Кроме того, на показатели сократимости и насосной функции сердца при температуре 5–7°C могло оказать возможное ремоделирование миокарда. Так, при исследовании влияния температуры на морфометрические показатели миокарда желудочка у радужной форели было установлено [18], что относительная масса желудочка у самцов рыб, акклиматизированных к 4°C, была значительно больше, чем у особей в контрольной группе, адаптированных к 12°C, а их компактный миокард был более тонким, и количество губчатого миокарда было увеличено. Вопрос о том, каким образом морфологическое ремоделирование миокарда влияет на сократимость и насосную функцию желудочка сердца рыб в зависимости от температуры окружающей среды, требует отдельного исследования.

У радужной форели, адаптированной к температуре 5–7°C при синусовом ритме в диапазоне частот (21.6 ± 4.9 уд/мин) насосная функция сердца находилась, вероятно, в пределах верхней границы физиологической нормы. Увеличение частоты сердечных сокращений у радужной форели от исходного ритма до 60 уд/мин привело к уменьшению максимального систолического давления в желудочке сердца, увеличению диастолического и конечно-диастолического давления, и к снижению максимальных скоростей прироста и падения давления.

Таким образом, повышение ЧСС для радужной форели *Oncorhynchus mykiss* при низкой температуре среды обитания не является приспособительным адаптационным механизмом, так как приводит к снижению сократимости миокарда и к ухудшению насосной функции желудочка сердца.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы “Сравнительно-физиологическое исследование пространственно-временной организации электрофизиологических процессов и сократимости миокарда позвоночных животных” (№ ГР АААА-А17-117012310154-6) по Программе ФНИ на 2013-2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farrell A.P., Eliason E., Sandblom E., Clark T.D. Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change. *Canad. J. Zool.* 87(10): 835–851. 2009.
2. Casselman M.T., Anttila K., Farrell A.P. Using maximum heart rate as a rapid screening tool to determine optimum temperature for aerobic scope in Pacific salmon *Oncorhynchus* spp. *J. Fish Biol.* 80: 358–377. 2012.
3. Anttila K., Couturier C.S., Overli O., Johnsen A., Marthinsen G., Nilsson G.E., Farrell A.P. Atlantic salmon show capability for cardiac acclimation to warm temperatures. *Nat. Commun.* 5: Article number 4252. 2014.
4. Gradall K.J., Shawn R., Garnerl S.R., Chris C., Wilson C.C., Anthony P., Farrell A.P., Neffl B.D. Relationship between cardiac performance and environment across populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*): a common garden experiment implicates local adaptation. *Evol. Ecol.* 30: 877–886. 2016.
5. Endoh M. Force–frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Europ. J. Pharmacol.* 500: 73–86. 2004.
6. Shiels H.A., Farrell A.P. The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing calcium to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 200: 1607–1621. 1997.
7. Shiels H.A., Vornanen M., Farrell A.P. The force–frequency relationship in fish hearts—a review. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 132: 811–826. 2002.
8. Vornanen M., Shiels H.A., Farrell A.P. Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 132: 827–846. 2002.
9. Farrell A.P., Gamperl A.K., Hicks J.M.T., Shiels H.A., Jain K.E. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. *J. Exp. Biol.* 199: 663–672. 1996.
10. Coyne M.D., Kim K.C., Cameron J.S., Gwathmey K. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278: R1535–R1544. 2000.

11. Sandblom E., Axelsson M. Baroreflex mediated control of heart rate and vascular capacitance in trout. J. Exp. Biol. 208: 821–829. 2005.
12. Sedmera D., Reckov M., DeAlmeida A., Sedmero M., Biermann M., Volejnik J., Sarre A., Raddat E., McCarthy R.A., Gourdie R.G., Thompson R.P. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284: 1152–1160. 2003.
13. Шмаков Д.Н., Рощевский М.П. Активация миокарда. Сыктывкар. Изд. ИФ КНЦ УрО РАН. 1997. [Shmakov D.N., Roshchevsky M.P. Aktivaciya miocarda [Myocardial activation]. Publishing house of the IP KSC UB RAS. Syktyvkar. 1997. (In Russ)].
14. Киблер Н.А., Нужный В.П., Харин С.Н., Шмаков Д.Н. Влияет ли предсердная электрическая стимуляция на последовательность деполяризации желудочка сердца радужной форели *Oncorhynchus mykiss*? Журн. эвол. Биохим. физиол. 56(1): 60–65. 2020. [N.A. Kibler, V.P. Nuzhny, S.N. Kharin, and D.N. Shmakov. Does Atrial Electrical Stimulation to the Sequence of Depolarization of the Ventricles of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*? Zn. Evol. Biokhim. Fiziol. 56(1): 60–65. 2020 (In Russ)].
15. Abramochkin D.V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac potassium currents (IK1 and IKr) in an arctic marine teleost, the navaga cod (*Eleginus navaga*). J. Comp. Physiol. B. 185: 883–890. 2015.
16. Haverinen J., Vornanen M. Significance of Na⁺ current in the excitability of atrial and ventricular myocardium of the fish heart. J. Exp. Biol. 209: 549–555. 2006.
17. Vornanen M., Haverinen J., Egginton S. Acute heat tolerance of cardiac excitation in the brown trout (*Salmo trutta fario*). J. Exp. Biol. 217(Pt 2): 299–309. 2014.
18. Klaiman J.M., Fenna A.J., Shiels H.A., Macri J., Gillis T.E. Cardiac remodeling in fish: strategies to maintain heart function during temperature Change. PLoS One 6: e24464. 2011.

Pumping Function of the Heart Ventricle in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* under Atrial Electric Stimulation at Low Temperature

N. A. Kibler^a, *, V. P. Nuzhny^a, S. N. Kharin^a, and D. N. Shmakov^a

^a*Institute of Physiology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*

*e-mail: natanadya@mail.ru

The pumping function of the ventricle of the heart was studied in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* acclimatized to a temperature of 5–7°C with an increase in heart rate. Dynamics of intra-cavity ventricular pressure were recorded. Heart rate was set using the electrocardiostimulation. An increase in the heart rate of rainbow trout from the initial rhythm to 60 bpm led to a decrease in the maximum systolic pressure in the ventricle of the heart, an increase in diastolic and end-diastolic pressures, a decrease in the maximum rates of increase and fall of pressures. An increase in the frequency of atrial stimulation to 60 bpm led to a significant decrease in ventricular myocardial contractility and to a deterioration in the pumping function of the ventricle of the heart. A heart rate of 60 bpm turned out to be the upper limit of the normal functional activity of the ventricle of the heart in rainbow trout, adapted to the temperature of the environment 5–7°C.

Keywords: hemodynamics, heart rate, ventricle, temperature, rainbow trout

ЦИТИРОВАТЬ:

Киблер Н.А., Нужный В.П., Харин С.Н., Шмаков Д.Н. Насосная функция желудочка сердца у радужной форели *Oncorhynchus mykiss* при предсердной электрической стимуляции в условиях низкой температуры. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 294–300.

DOI: 10.31857/S0869813920030061

TO CITE THIS ARTICLE:

Kibler N.A., Nuzhny V.P., Kharin S.N., Shmakov D.N. Pumping Function if the Heart Ventricle in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* under Atrial Electric Stimulation at Low Temperature. Russian Journal of Physiology. 106(2): 294–300.

DOI: 10.31857/S0869813920030061

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МИКРОЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ
ВОЗБУДИТЕЛЬНЫХ И ТОРМОЗНЫХ СИНАПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
В КОРТИКО-НИГРАЛЬНОЙ ПРОЕКЦИИ НА МОДЕЛИ
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

© 2020 г. М. В. Погосян¹, Л. М. Хачатрян¹, М. А. Даниелян¹,
З. А. Аветисян¹, Дж. С. Саркисян¹, *

¹*Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА, Ереван, Армения*

**E-mail: johnsarkissyan@gmail.com*

Поступила в редакцию 21.10.2019 г.

После доработки 06.12.2019 г.

Принята к публикации 16.01.2020 г.

В сериях экспериментов на 23 белых крысах самцах (250 гр.) проведен анализ импульсной активности одиночных нейронов Substantia Nigra pars compacta – SNc (242 нейрона, $n = 11$) и Substantia Nigra pars reticulata – SNr (289 нейронов, $n = 12$) при высокочастотной стимуляции первичной моторной коры мозга (M1) в норме и на ротеноновой модели болезни Паркинсона (БП). В нейронах SNc на модели БП полностью отсутствовали депрессорные эффекты, вызванные стимуляцией, но тетаническая потенция, сопровождаемая посттетанической потенцией и депрессией, 1.65 и 2.02-кратно превысила таковую в норме. В нейронах SNr в норме тетаническая потенция, сопровождаемая посттетанической потенцией и депрессией, оказалась 2.37-кратно выше тетанической депрессии, а на модели БП уровни как депрессорной, так и возбудительной активности, вызванной стимуляцией, оказались ниже нормы. В нейронах SNc и SNr на модели БП частота спайковой активности, предшествующая стимуляции и сопровождающая ее, значительно превысила норму. Это свидетельствует о эксайтотоксичности, сопровождаемой нейродегенеративным повреждением, завершаемым апоптозом и гибелью нейронов. В нейронах SNr как депрессорные, так и возбудительные реакции, сопровождающие стимуляцию, оказались резко преобладающими над таковыми в нейронах SNc, что свидетельствует о большей выраженности корковой проекции к SNr. Более того, выявлена большая подверженность патологическим изменениям постстимульных депрессорных эффектов нейронов SNc в сравнении с SNr, с формированием в них более выраженных возбудительных эффектов, что свидетельствует о большем вовлечении SNc в БП. На модели БП при отсутствии вызванных стимуляцией депрессорных эффектов и более выраженных возбудительных в нейронах SNc, нейроны SNr сохраняют депрессорные реакции и относительно сниженные возбудительные, что свидетельствует о меньшей подверженности нейронов SNr эксайтотоксичности, чрезмерного повышения возбудимости сохранившихся нейронов, компенсирующих отсутствие возбудимости погибших.

Ключевые слова: Substantia nigra compacta (SNc), Substantia Nigra reticulata (SNr), ротеноновая модель болезни Паркинсона (БП), первичная моторная кора мозга (M1), одиночная спайковая активность, программный математический анализ

DOI: 10.31857/S0869813920030073

Черная субстанция (Substantia nigra – SN) – важная нейрональная структура, осуществляющая регуляцию деятельности базальных ганглиев (БГ). Постеро-медиальная область SN – pars compacta (SNc), будучи в составе допаминергических (ДА) ядер мозга [1], главным образом связана с дорзальным стриатумом [2]. Антеро-латеральная зона SN – pars reticulata (SNr) – состоит из ГАМКергических нейронов, воспринимающих афференты от стриатума и субталамического ядра и, в свою очередь, проецирующихся к вентральному переднему таламическому ядру [3]. SN, осуществляя регуляцию БГ [4], в условиях патологии содействует развитию различных неврологических болезней, в частности, болезни Паркинсона (БП) [5], шизофрении [6], патологические склонности и пагубные пристрастия [7]. Продемонстрирована обширная подкорковая сеть для SNc и SNr [8–10]. Согласно данным на грызунах, SNr – большая выходная инстанция БГ, воспринимающая информацию от мозговой коры через прямой тормозный, непрямой возбудительный, вовлекающий паллидум и субталамус и прямой возбудительный – через субталамус [11]. Недавно доказано существование кортико-нигральной проекции у людей. Магнитно-резонансной томографией, с целью дифференциации взаимоотношений SNc и SNr с мозговой корой посредством таламуса, показана связь SNc с префронтальной корой (ПФК), а SNr – преимущественно с моторной и премоторной корой [9]. Описана связь SN с различными структурами мозга (мозолистое тело, первичная сенсорная кора, премоторная кора, хвостатое ядро, скорлупа, прилегающее ядро перегородки, височно-затылочные доли, вентральная часть моста, передняя доля мозжечка, наружная капсула) [12]. Согласно ранним работам, одностороннее удаление фронтальной коры сопровождается истощением глутаминовой кислоты в ипсилатеральной SN, при неизменном содержании ГАМК, что свидетельствует о глутамате в качестве передатчика в кортико-нигральном тракте [13]. Несмотря на относительную недостаточную выраженность коркового входа к среднему мозгу у приматов, он оказался богатым глутаматными рецепторами [14]. Корковый контроль среднего мозга – важный механизм, которым глутаматергический вход управляет ДА клетками [15]. Обнаружено, что связи SN с мозговой корой у человека вовлекают префронтальную кору (ПФК), пре- и постцентрально извилины и верхнюю париетальную долю, что позволяет проникнуть в механизм развития патофизиологии таких неврологических болезней, как БП, шизофрения, патологическая зависимость. Тем самым, подкреплена гипотеза, что SN не только часть сети подкорковых БГ, но также связана с корой, посредством дополнительного кортико-нигрального пути у людей, подтверждая предварительно существующие данные на животных [16]. Таким образом, продемонстрировано наличие прямой кортико-нигральной связи, детально описанной у кошек, грызунов и приматов, но лишь предполагаемой у людей. Эта связь может служить основанием для последующих биохимических и физиологических исследований корковой регуляции базальных ганглиев. Продолжает оставаться недостаточно доказанной большая выраженность связей моторной и премоторной коры с SNr, по сравнению с SNc, на основе вышеотмеченного современного трактографического изучения у людей. Предметом настоящего изучения явилось дальнейшее исследование, в норме и на модели БП, сравнительной степени выраженности кортико-нигральных связей в микроэлектрофизиологическом исследовании на примере соотношения возбудительных и тормозных процессов в нейронах SNc и SNr, в условиях активации первичной моторной коры мозга (M1), что может содействовать новому пониманию механизмов контроля моторики и когнитивных функций мозга на уровне ствола мозга, в условиях изменения его пластичности при нейродегенеративных болезнях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проводили электрофизиологические исследования на 23 белых беспородных крысах-самцах (230 ± 30 г) в двух сериях экспериментов: интактных ($n = 11$) и на модели БП, индуцированной унилатеральным введением ротенона на 4 нед. выдерживания животных ($n = 12$). Введение ротенона осуществляли в условиях нембуталового наркоза (40 мг/кг, в/б) из расчета 12 μ г в 0.5 μ л Димексида (со скоростью 0.1 μ л/мин) в “medial forebrain bundle” по координатам стереотаксического атласа [17] (AP + 0.2; L $\pm$ 1.8; DV + 8 мм). Исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями руководства ARRIVE [18]. В стереотаксическом аппарате производили трепанацию черепа от брегмы до лямбды и вскрывали твердую мозговую оболочку. После краниотомии, раздражающий электрод вживляли в ипсилатеральную М1 по стереотаксическим координатам (AP + 2.1, L $\pm$ 2.6, DV + 1.6 мм), а стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика 1–2 μ М, заполненные 2М NaCl, вводили в SNc (AP-5.0; L $\pm$ 2.0; DV + 8.1 мм) и SNr (AP-5.1, L $\pm$ 2.0, DV + 8.6 мм) для экстраклеточной регистрации спайковой активности одиночных нейронов. Осуществляли высокочастотную стимуляцию (ВЧС) М1 посредством прямоугольных толчков тока (длительностью 0.05 мс, амплитудой 0.12–0.18 мВ, силой тока 0.32 мА и частотой 100 Гц в течение 1 с). Операции осуществляли на наркотизированных уретаном животных (urethane 1.5 г/кг и/п) в следующей очередной последовательности: фиксация черепа в стереотаксическом аппарате, краниотомия с удалением костей от брегмы до лямбды и отсепаровкой твердой мозговой оболочки. Предварительно животные обездвигивались 1% дитилином (Dithylin – *Suxamethonium iodide*, 25 мг/кг в/б) и переводились на искусственное дыхание. В целом, была зарегистрирована активность 531 нейрона.

Активность нейронов проявлялась в виде тетанической депрессии и потенциации (ТД и ТП), сопровождаемых посттетанической депрессией и потенциацией (ПТД и ПТП). Проводили анализ одиночной спайковой активности 531 нейрона SNc и SNr. Применен специальный алгоритм для расчета средней частоты спайков. Производили далее многоуровневую статистическую обработку для пре- и постстимульного отрезков времени. Для избираемых сравниваемых групп спайковой активности строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average). Анализ полученных данных производили по специально разработанному алгоритму. Однородность двух независимых выборок контролировалась t -критерием Стьюдента. Поскольку число спайков превышало 30, распределение можно считать асимптотически нормальным, следовательно применение критерия Стьюдента оправдано и по нему показано, что в представленных нами графиках изменение средней величины спайков достоверно. Учет критических значений в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях значимости 0.05, 0.01 и 0.001 показывает, что в большинстве случаев статистически значимое изменение достигало как минимум уровня 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов SNc и SNr на ВЧС М1 в норме (107 нейронов, $n = 4$ и 135 нейронов, $n = 7$ соответственно) и на модели БП (105 нейронов, $n = 5$ и 184 нейрона, $n = 7$). В указанных условиях были обнаружены следующие изменения тормозных и возбуждающих

тетанических и посттетанических реакций в обеих постстимульных последовательностях (ТД ПТД, ТД ПТП и ТП ПТП, ТП ПТД).

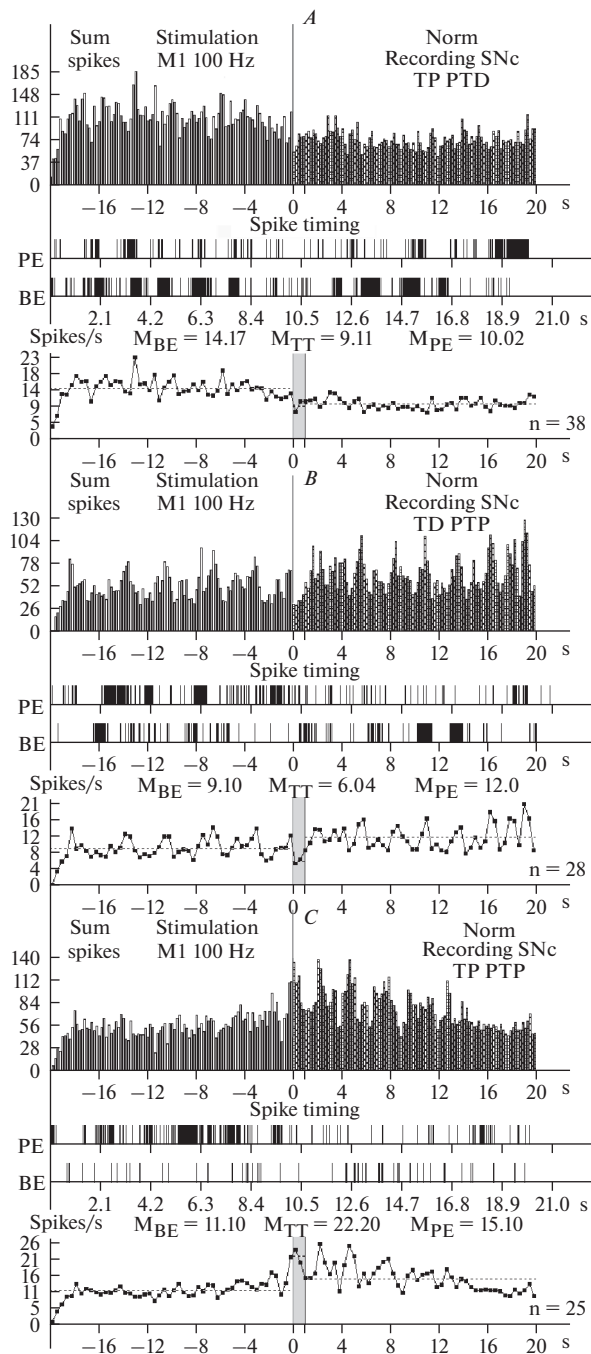
При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растеров пре — и постстимульных разнонаправленных проявлений спайковой активности нейронов SNc при ВЧС М1 в норме, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 с до и после стимуляции, включая время ВЧС, получены значения (рис. 1—3), представленные в виде дисковых диаграмм для оценки степени выраженности в процентах (рис. 4, 5).

В нейронах SNc на ВЧС М1 в норме значения занижения (ТД) и завышения (ТП) престимульной активности, в одно- и разнонаправленных постстимульных последовательностях, исчислялись в следующих пределах. В депрессорной последовательности ТД достигало 1.55-кратного занижения престимульной активности, в депрессорно-возбудительной — 1.5-кратного занижения (рис. 1А, В; 4А); в возбудительной последовательности ТП завышала престимульную активность и выявлялась в пределах 2.05-кратного, а в возбудительно-депрессорной — 1.58-кратного (рис. 1С, D; 4А).

На модели БП постстимульные проявления депрессорной активности в нейронах SNc полностью отсутствовали. В возбудительной постстимульной активности ТП в двух последовательностях достигала 3.31 и 3.05-кратности превышения престимульной активности (рис. 1Е, F; 4В—D). Очевидна эксайтотоксичность в SNc нейронах на модели БП, свидетельствующая о их нейродегенеративном поражении. В нейронах SNr на ВЧС М1 в норме значения занижения (ТД) и завышения (ТП) престимульной активности, в одно- и разнонаправленных постстимульных последовательностях, исчислялись в следующих пределах. В депрессорной последовательности ТД достигало 2.05-кратного занижения, в депрессорно-возбудительной — 2.07-кратного (рис. 2А, В; 5А). В возбудительной последовательности ТП исчислялась в пределах 5.07-кратного завышения, а в возбудительно-депрессорной — 2.20-кратного (рис. 2С, D; 5А). Иными словами, ТП в нейронах SNr оказалось выше ТД, преимущественно в однонаправленной последовательности. На модели БП в нейронах SNr ТД в обеих последовательностях достигала лишь 1.21- и 1.23-кратного занижения престимульной активности (рис. 3А, В; 5В—D). Однако, ТП в обеих последовательностях также исчислялись в небольших пределах, порядка 1.40- и 1.60-кратного превышения (рис. 3С, D; 5В, Е, F). Иными словами, в нейронах SNr

Рис. 1. А—F — гистограммы суммы спайков предшествующих и сопровождающих постстимульные проявления активности: депрессорные — ТД ПТД (А), депрессорно-возбудительные — ТД ПТП (В), возбудительные ТП ПТП (С, Е), в сочетании с депрессорными — ТП ПТД (D, F), в реальном времени 20 с (до и после стимуляции) нейронов SNc, вызванных ВЧС М1 в норме (А—D) и на модели БП (Е, F). Здесь и в остальных рисунках: диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до стимуляции (BE — before event), на время тетанизации (ТТ — time tetanization) и после стимуляции (PE — post event). Справа от диаграмм — количество испытаний (n).

Fig 1. А—F — histograms of the sum of spikes, prior and accompanying post-stimulus manifestations of activity: depressor — TD PTD (A), depressor-excitatory — TD PTP (B), excitatory — TP PTP (C, E), combined with depressor — TP PTD (D, F), in real time 20 s (before and after stimulation) of neurons SNc, evoked by HFS M1 in norm (A—D) and on the model of PD. Here and in the rest of the figures: spike frequency diagrams, presented in histograms, with averaged meanings (M) for time segments before stimulation ((BE — before event), at the time of tetanization (TT — time tetanization) and after stimulation (PE — post event). To the right of the diagrams — number of tests (n).



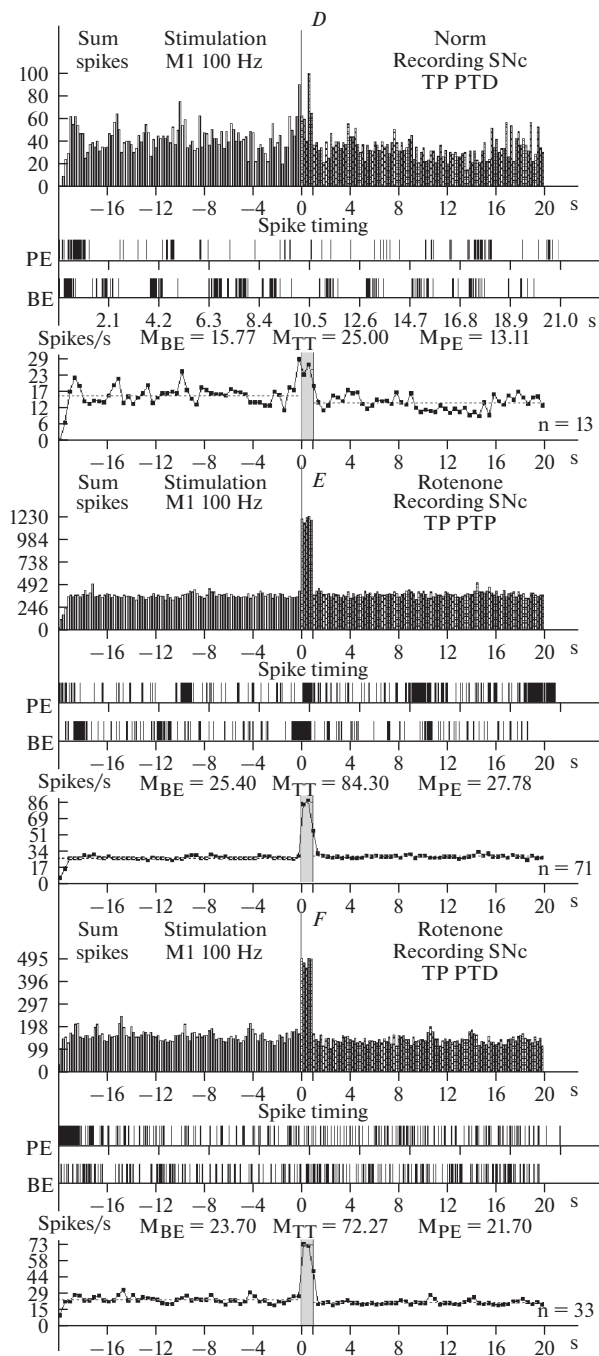


Рис. 1. Окончание

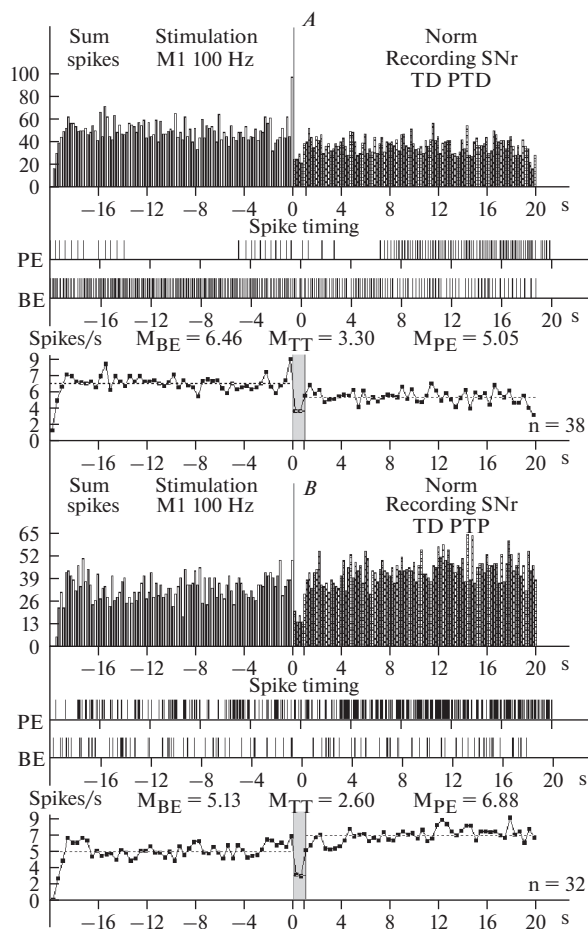


Рис. 2. *A–D* – гистограммы суммы спайков предшествующих и сопровождающих постстимульные проявления активности: депрессорные (*A*), депрессорно-возбудительные (*B*), возбудительные (*C*), в сочетании с депрессорными – ТП ПТД (*D*), в реальном времени 20 с (до и после стимуляции) нейронов SNr, вызванных ВЧС М1 в норме. Справа от диаграмм – количество испытаний (*n*).

Fig. 2. *A–D* – histograms of the sum of spikes, prior and accompanying post-stimulus manifestations of activity: depressor – TD PTD (*A*), depressor-excitatory – TD PTP (*B*), excitatory – TP PTP (*C*), combined with depressor – TP PTD (*D*), in real time 20 s (before and after stimulation) of neurons SNr, evoked by HFS MI in norm. To the right of the diagrams – number of tests (*n*).

уровни как депрессорной, так и возбудительной постстимульной активности на модели БП оказались ниже нормы. В нейронах SNc на ВЧС М1 уровни частоты престимульной активности, предшествующие двум возбудительным постстимульным проявлениям активности на модели БП, в сравнении с нормой, достигали значений превышающих таковые в норме, в пределах 25.4 и 23.7 против 11.10 и 15.77, т.е. 2.30- и 1.50-кратно (рис. 1; 4*G*, *H*). Что же касается постстимульной частоты активности нейронов SNc, сопровождающей постстимульные возбудитель-

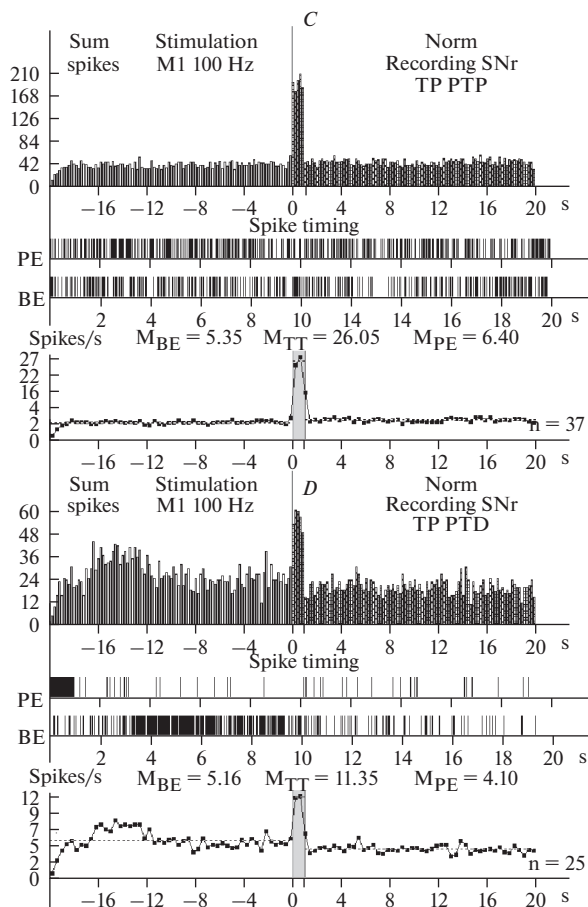


Рис. 2. Окончание

ные проявления активности, то они исчислялись порядка 84.3 и 72.27 и против 22.2 и 25.0, т.е. она достигла в патологии значительных уровней, превышающих норму 3.25- и 3.37-кратно (рис. 1; 4*G, H*). Таким образом, сравнительный анализ пре- и постстимульной частоты активности нейронов SNc на модели БП, в сравнении с нормой, привел к заключению о эксайтотоксичности, сопровождаемой неизбежным и значительным нейродегенеративным повреждением.

В нейронах SNr на ВЧС М1 уровни частоты престимульной активности, предшествующие двум постстимульным депрессорным последовательностям, на модели БП в сравнении с нормой, определялись в пределах 30.34 и 38.5 против 6.46 и 5.13, тем самым превысив норму порядка 4.7- и 7.5-кратно (рис. 2; 3; 5*G, H*). Частота активностинейронов SNr, предшествующая двум возбудительным последовательностям на модели БП, в сравнении с нормой достигала 67.25 и 48.74 против 5.35 и 5.16, т.е. 12.57- и даже 9.44-кратного превышения нормы (рис. 2, 3; 5*I, J*). Постстимульная частота активности нейронов SNr, сопровождаемая двумя соот-

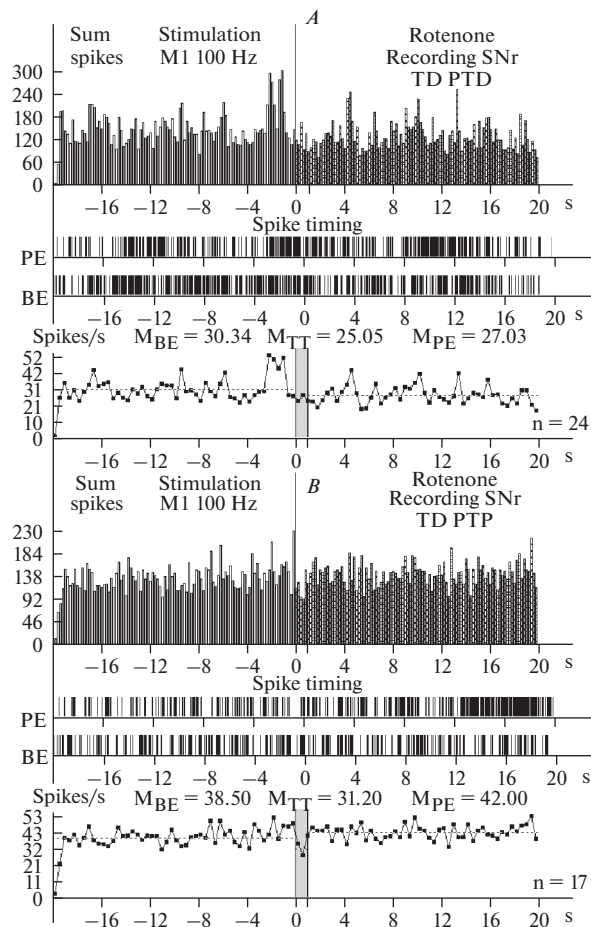


Рис. 3. *A–D* – гистограммы суммы спайков, предшествующих и сопровождающих постстимульные проявления активности: депрессорные (*A*), депрессорно-возбудительные (*B*), возбудительные (*C*), в сочетании с депрессорными (*D*), в реальном времени 20 с (до и после стимуляции) нейронов SNr, вызванных ВЧС М1 на модели БП. Справа от диаграмм – количество испытаний (*n*).

Fig. 3. *A–D* – histograms of the sum of spikes, prior and accompanying post-stimulus manifestations of activity: depressor – TD PTD (*A*), depressor-excitatory – TD PTP (*B*), excitatory – TP PTP (*C*), combined with depressor – TP PTD (*D*), in real time 20 s (before and after stimulation) of neurons SNr, evoked by HFS MI on the model of PD. To the right of the diagrams – number of tests (*n*).

ветствующими депрессорными последовательностями на модели БП, в сравнении с нормой, исчислялась в пределах 25.05 и 31.2 против 3.3 и 2.6 (7.6- и 12-кратно выше нормы), а частота, сопровождаемая возбудительными последовательностями, соответственно 92.63 и 77.34 против 26.05 и 11.35 (3.55- и 6.81-кратно выше нормы) (рис. 5*G–J*). Иными словами, уровни как пре-, так и постстимульной частоты активации нейронов SNr в патологии показали мощное превышение, по сравнению с нормой, больше со стороны престимульной фоновой активности, что свидетельствует о компенсаторной эксайтотоксичности, способствующей выраженной нейродегенерации, содействующей апоптозу и гибели нейронов.

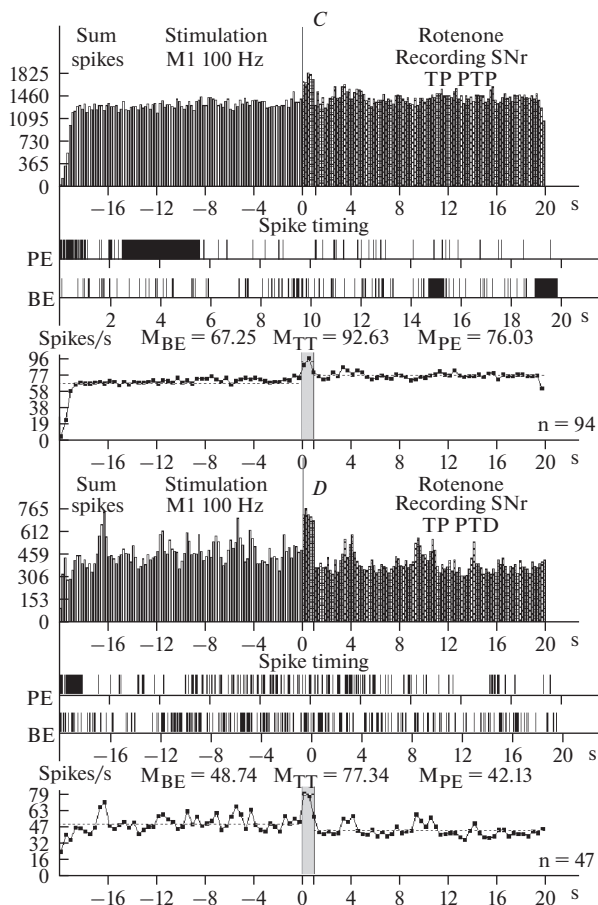


Рис. 3. Окончание

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, ротенон вызывает селективную дегенерацию nigrostriatalного дофаминергического пути, избирательное окислительное повреждение полосатого тела и образование убиквитин- и а-синуклеин-позитивных включений в nigralных клетках, которые сходны с тельцами Леви при БП [19]. В свою очередь, “эксайтотоксичность” при нейродегенеративных болезнях, в том числе при БП, является результатом сверхактивации глутаматных NMDA и AMPA рецепторов, приводящей к серьезному повреждению нейронов [20], с их гибелью [21, 22]. Возникает она в результате неизбежного развития целого ряда отрицательных явлений, включающих нарушение кальциевой “буферизации”, генерацию свободных радикалов, активацию митохондриальной проницаемости и вторичной эксайтотоксичности [23]. Выступая в качестве компенсации возбуждения сниженного в результате гибели нейронов, она сохранившихся нейронов, в конечном счете, приводит к их апоптозу и гибели. С целью предотвраще-

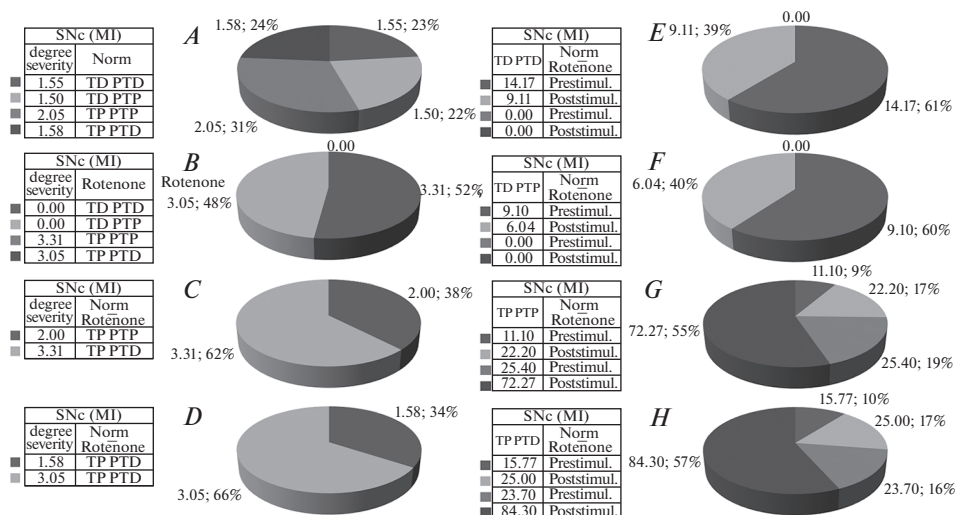


Рис. 4. *A–H* – процентное соотношение степени выраженности депрессорных (*A*), депрессорно-возбудительных (*B*), возбудительных (*C*) и возбудительно-депрессорных (*D*) изменений усредненной частоты импульсной активности в одиночных нейронах SNc, предшествующих и сопровождающих ВЧС М1 на модели БП, в сравнении с нормой. Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности, престим. – престимульный, постстим. – постстимульный.

Fig. 4. *A–H* – the percentage of degree of evidence of depressor (*A*), depressor-excitatory (*B*), excitatory (*C*) and excitatory-depressor (*D*) changes of average frequency in single neurons of SNc, previous and accompanying HFS of M1 at the rotenone model of PD, in comparison with the norm. Designations: degree of evidence, degree of evidence, Prestimul. – Prestimulus, Poststimul. – Post stimulus.

ния неизбежной эксайтотоксичности необходимо восстановление и углубление постстимульных депрессорных эффектов, несущих протекторную нагрузку, и снижения чрезмерных возбудительных [24].

В настоящих экспериментах проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов SNc и SNr на ВЧС М1 в норме и на модели БП. Анализ относительной степени частотной выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбудительных эффектов, на основе диаграмм усредненной частоты спайков, представленных в виде дисковых диаграмм (в %), привел к следующим заключениям. В нейронах SNr при активации М1 коры мозга, в целом, как депрессорные, так и возбудительные постстимульные реакции оказались резко преобладающими, над таковыми в нейронах SNc (2.05, 2.07, 4.87, 2.21 против 1.55, 1.5, 2.0, 1.58), что свидетельствует о большей выраженности корковой проекции к SNr, в сравнении с SNc. Более того, выявлена большая недостаточность депрессорных постстимульных проявлений активности нейронов SNc в сравнении с SNr, в условиях патологии, с формированием чрезмерной возбудительной активности (эксайтотоксичности). На модели БП, в сравнении с нормой, при полном отсутствии депрессорных постстимульных эффектов и более выраженных возбудительных в нейронах SNc (3.05, 3.32 против 2.0, 1.58), нейроны SNr сохраняют депрессорные постстимульные реакции, хотя и сниженные, но снижены и возбудительные (1.21,

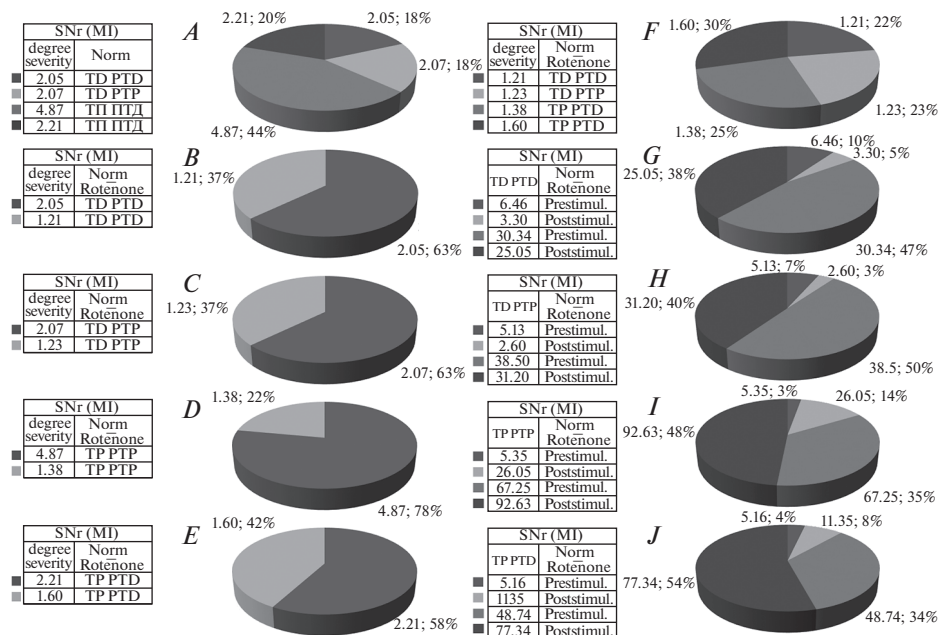


Рис. 5. A–J – процентное соотношение степени выраженности депрессорных (A), депрессорно-возбудительных (B), возбудительных (C) и возбудительно-депрессорных (D) изменений усредненной частоты импульсной активности в одиночных нейронах SNr, предшествующих и сопровождающих ВЧС М1 на модели БП, в сравнении с нормой. Обозначения: степ. выраж. – степень выраженности, престим. – престимульный, постстим. – постстимульный.

Fig. 5. A–J – the percentage of degree of evidence (on average frequency) of depressor (A), depressor-excitatory (B), excitatory (C) and excitatory-depressor (D) changes of average frequency in single neurons of SNr, previous and accompanying HFS of M1 at the rotenone model of PD, in comparison with the norm.. Designations: degree of evidence. – degree of evidence, Prestimul. – Prestimulus, Poststimul. – Post stimulus.

1.23, 1.38, 1.6 в патологии против 2.05, 2.07, 4.87, 2.21 в норме), что свидетельствует также о меньшей подверженности нейронов SNr эксайтотоксичности, в сравнении с таковыми SNC.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R.C. Molecular Neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience. New York, NY: McGraw-Hill Medical. 2009.
2. Voorn P., Vanderschuren L.J., Groenewegen H.J., Robbins T.W., Pennartz C.M. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. Trends Neurosci. 27: 468–474. 2004.
3. Zhou F.M., Lee C.R. Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. Neuroscience. 198: 69–94. 2011.
4. Guattee E., Cucchiaroni M.L., Mercuri N.B. Substantia nigra control of basal ganglia nuclei. J. Neural Transm. Suppl. 73: 91–101. 2009.
5. Carman J.B. Anatomic basis of surgical treatment of Parkinson's disease. N. Engl. J. M. 17: 919–930. 1968.
6. Weinberger, D.R. Implications of the normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry. 44: 660–669. 1987.
7. Wise R.A. Trends Roles for nigrostriatal—not just mesocorticolimbic—dopamine in reward and addiction. Neurosci. 32: 517–524. 2009.

8. Düzél E., Bunzeck N., Guitart-Masip M., Wittmann B., Schott B.H., Tobler P.N. Functional imaging of the human dopaminergic midbrain. *Trends Neurosci.* 32: 321–328. 2009.
9. Menke R.A., Jbabdi S., Miller K.L., Matthews P.M., Zarei M. Connectivity-based segmentation of the substantia nigra in human and its implications in Parkinson's disease. *Neuroimage.* 52: 1175–1180. 2010.
10. Chowdhury R., Lambert C., Dolan R.J., Düzél E. Parcellation of the human substantia nigra based on anatomical connectivity to the striatum. *Neuroimage.* 81: 191–198. 2013.
11. Kolomiets B.P., Deniau J.M., Glowinski J., Thierry A.M. Basal ganglia and processing of cortical information: functional interactions between trans-striatal and trans-subthalamic circuits in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience.* 117 (Issue 4): 931–938. 2003.
12. Kwon H.G., Jang, S.H. Differences in neural connectivity between the substantia nigra and ventral tegmental area in the human brain. *Front. Hum. Neurosci.* 8: 41. 2014.
13. Kornhuber J. The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantia nigra following frontal cortex ablation in the rat. *Brain Res.* 322: 124–126. 1984.
14. Frankle W.G., Laruelle M., Haber S.N. Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. *Neuropsychopharmacology.* 31: 1627–1636. 2006.
15. Sesack S.R., Carr D.B. Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol. Behav.* 77: 513–517. 2002.
16. Cacciola, A., Milardi, D., Quartarone, A. Role of cortico-pallidal connectivity in the pathophysiology of dystonia. *Brain*, 2016.
17. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Academic Press, 5th ed. 2005.
18. Kilkeny C., Browne W.J., Cuthill I.C., Emerson M., Altman D.G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 8(6): e1000412. 2010.
19. Schmidt W., Alam M.J. Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J. Neural Transmission. Supplementum* 70: 273–276. 2006.
20. Matthew R.H., Heather L.S., Peter R.D. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *NCI.* 45(Iss. 5): 583–595. 2004.
21. Lucas D.R., Newhouse J.P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Archives of ophthalmology* 58(2): 193–201. 1957.
22. Olney J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 164 (3880): 719–721. 1969.
23. Xiao-xia Dong, Yan Wang, Zheng-hong Qin. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica.* 30: 379–387. 2009. Саркисян Дж.С., Погосян М.В., Даниелян М.А., Степанян А.Ю., Варданян А.В. Назначение депрессорных синаптических процессов в условиях специфической нейродегенеративной патологии и протекции. LAP LAMBERT Academic Publishing RU. 2018. [Sarkissian J.S., Poghosyan M.V., Danielyan M.A., Stepanyan H.Y., Vardanyan A.V. The assign of depressor synaptic processes in condition of specific neurodegenerative pathology and protection. LAP LAMBERT Academic Publishing RU. 2018. (in Russ.)]

The Microelectrophysiological Study of the Proportion of Synaptic Potentiation and Depression at Cortico-Nigral Projection in a Model of Parkinson's Disease

M. V. Poghosyan^a, L. M. Khachatryan^a, M. A. Danielyan^a,
Z. A. Avetisyan^a, and J. S. Sarkissian^{a,*}

^aOrbeli Institute of physiology NAS RA, Yerevan, Armenia

*E-mail: johnsarkissyan@gmail.com

The impulse activity of single neurons in substantia nigra pars compacta – SNc (242 neurons, $n = 11$) and substantia nigra pars reticulata – SNr (289 neurons, $n = 12$) under high frequency stimulation of primary motor cortex (M1) was analyzed on 23 white male rats in control and rotenone model of Parkinson's disease (PD). In SNc neurons in PD model there was no stimulation-induced depression, however, the posttetanic potentiation and depression following the tetanic potentiation, were 1.65 and 2.02 times higher than in control. In control SNr neurons the tetanic potentiation followed by the posttetanic potentiation and depression was 2.37 times higher than the tetanic depression, whereas in the PD model both depression and potentiation levels were subnormal. In PD model, both SNc and SNr neurons exhibited significantly higher

spike frequency before and during the stimulation in comparison with control. This indicates the presence of the excitotoxicity accompanied by the neurodegenerative damage followed by the apoptosis and the neuronal death. In SNr neurons both depression and potentiation after the stimulation were much more prominent than in SNc neurons, which indicates that the cortical projections on the SNr are more pronounced. Moreover, the SNc neurons demonstrated higher susceptibility to the pathological changes in the poststimulus depression, leading to the more pronounced potentiation in those neurons in comparison with the SNr neurons, which indicates the more prominent involvement of the former in the PD pathogenesis. In the PD model, with no stimulation-induced depression and more prominent potentiation in the SNc neurons, the SNr neurons maintain the depression and show relatively lowered potentiation, which indicates their lower susceptibility to the excitotoxicity, and the excessive excitability of the remaining neurons as a compensation for the dead ones.

Keywords: Substantia nigra compacta (SNc), Substantia Nigra reticulata (SNr), rotenone model of Parkinson's disease (PD), primary motor cortex of the brain, (MI), single spike activity, software mathematical analysis

ЦИТИРОВАТЬ:

Погосян М.В., Хачатрян Л.М., Даниелян М.А., Аветисян З.А., Саркисян Дж.С. Микроэлектрофизиологическое изучение соотношения возбуждательных и тормозных синаптических процессов в кортико-нигральной проекции на модели болезни паркинсона. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 301–314.

DOI: 10.31857/S0869813920030073

TO CITE THIS ARTICLE:

Poghosyan M.V., Khachatryan L.M., Danielyan M.A., Avetisyan Z.A., Sarkissian J.S. The Microelectrophysiological Study of the Proportion of Synaptic Potentiation and Depression at Cortico-Nigral Projection in a Model of Parkinson's Disease. Russian Journal of Physiology. 106(3): 301–314.

DOI: 10.31857/S0869813920030073

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КРОССКОРРЕЛЯЦИОННЫЙ И КОГЕРЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
ЭЛЕКТРОКОРТИКОГРАММ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ
ЧЕРЕПНО-МОЗГОВУЮ ТРАВМУ**

© 2020 г. Ю. И. Сысоев^{1, 2, *}, В. А. Пьянкова¹, К. А. Крошкина¹,
В. Е. Карев³, С. В. Оковитый¹

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

³Детский научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: susoyev92@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 16.01.2020 г.

Принята к публикации 17.01.2020 г.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и стойкой утраты трудоспособности молодым населением как в РФ, так и за рубежом. Разработка адекватных и воспроизводимых моделей ЧМТ у лабораторных животных, а также объективных методов оценки степени возникающих неврологических нарушений позволит оптимизировать поиск и изучение новых эффективных нейрореабилитационных лекарственных средств. Цель исследования заключалась в проведении сравнительного кросскорреляционного и когерентного анализа электрокортикограмм условно здоровых крыс и животных, перенесших ЧМТ. После предварительной трепанации открытую проникающую ЧМТ моделировали методом контролируемого кортикального удара по области двигательной коры левого полушария. Регистрирующие нихромовые кортикографические электроды имплантировали билатерально в области первичной и вторичной двигательной коры, а также в область первичной соматосенсорной коры (над гиппокампом). Запись электрокортикограмм осуществляли на 3-и и 7-е сутки после операции в условии домашней клетки и состояния покоя. Кросскорреляционный анализ включал в себя расчет коэффициента кросскорреляции, средней частоты и максимального размаха кросскорреляционной функции. Для пар регистрируемых отведений рассчитывали среднюю мощность когерентности дельта-, тета-, альфа- и бета-ритмов. Одностороннее травматическое повреждение двигательной коры и нижележащих структур приводит к нарушению работы межполушарных и внутриполушарных связей, эти изменения фиксируются не только в области удара, но и в отдаленных участках коры на 3-и и на 7-е сутки после травмы. Выявленные изменения параметров кросскорреляции и когерентности ЭКоГ, возникающие у крыс в результате ЧМТ, сходны с таковыми, наблюдаемыми у пациентов в клинической практике, поэтому можно предположить, что данная экспериментальная модель может быть использована для нейрофизиологических и фармакологических исследований.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, контролируемый кортикальный удар, электрокортикограмма, кросскорреляционный анализ, когерентный анализ

DOI: 10.31857/S0869813920030085

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) традиционно является одной из самых частых патологий ЦНС и охватывает наиболее социально активную часть общества — лиц молодого и среднего возраста, приводя к потере трудоспособности, инвалидизации или гибели [1]. Медикаментозное лечение при тяжелой ЧМТ в острый период направлено на устранение отека мозга, внутричерепной гипертензии, а также на предотвращение развития ранних судорожных припадков. Диуретики, глюкокортикоиды и противосудорожные препараты успешно применяются для купирования вышеуказанных осложнений и являются стандартом клинических рекомендаций [2]. Однако неврологические расстройства, среди которых часто встречаются, например, двигательные нарушения и/или ухудшение когнитивных функций, слабо поддаются медикаментозному лечению. Средства с нейропротекторным (церебропротекторным) действием, направленные на снижение выраженности неврологического дефицита, редко включаются в существующие стандарты лечения вследствие недостаточного уровня доказанности клинического эффекта [3]. Исходя из этого, поиск новых средств, способных увеличивать выживаемость нейронов после перенесенной ЧМТ, и тем самым улучшать функциональное состояние пациентов, является важной задачей нейрофармакологии. Для успешного поиска и изучения новых перспективных нейропротекторных средств необходимы адекватные экспериментальные модели ЧМТ и других патологий ЦНС, которые будут иметь патогенетическое сходство с реальной клинической ситуацией. Кроме того, важно наличие методик и критериев, по которым можно объективно оценивать эффективность использования того или иного лекарственного средства в условиях эксперимента.

Оценивать тяжесть возникающих неврологических нарушений у экспериментальных животных, а также эффективность использования того или иного нейропротекторного средства можно с помощью поведенческих/функциональных тестов [4–6], биохимических [4, 7] и гистологических методик [8]. Все перечисленное широко используется в нейрофармакологических исследованиях, однако, каждый из подходов имеет свои недостатки. Например, поведенческие/функциональные тесты часто субъективны, во многом зависят от внешних факторов, а полученные результаты бывает сложно интерпретировать. Биохимические и гистологические исследования требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов, кроме того, обычно в данном случае испытуемое животное можно обследовать только один раз.

В клинической практике при ведении пациентов, перенесших ЧМТ, крайне важна полная и точная диагностика, затрагивающая как нейровизуализационные методы (магнитно-резонансная томография, компьютерная томография, позитронно-эмиссионная томография), так и нейрофизиологические (электроэнцефалография (ЭЭГ) и метод вызванных потенциалов) [9]. ЭЭГ позволяет определить нарушения при легкой ЧМТ, когда незаметны морфологические нарушения, предсказать исход для больных в состоянии комы и подходит для обследования детей [10]. Данный метод отличается простотой, неинвазивностью и позволяет оценивать течение заболевания в динамике. В экспериментальных исследованиях на лабораторных животных более распространен метод регистрации биологической активности мозга непосредственно “с коры” — электрокортикография (ЭКоГ) [11–13].

Математический анализ ЭЭГ/ЭКоГ позволяет получить и оценить различные электрофизиологические параметры мозга. Одним из ведущих методов является корреляционный анализ ЭЭГ, который применялся еще для анализа первых бумажных ЭЭГ, когда расчеты проводились вручную. Он включает в себе автокорреляцию (анализ взаимосвязи участков одного сигнала) и кросскорреляцию (анализ взаимосвязи разных сигналов). Кросскорреляционная функция отражает степень связи процессов в разных точках мозга путем выделения периодических составляющих, общих для двух ЭЭГ. Степень корреляции выражается коэффициентом

корреляции в диапазоне от -1 (ЭЭГ противофазны) до $+1$ (ЭЭГ идентичны) [14]. С развитием компьютерной техники корреляционный анализ ЭЭГ значительно потеснил когерентный анализ, который позволяет определить степень схожести колебательных электрофизиологических процессов двух или более участков головного мозга [15]. Коэффициенты корреляции и когерентности меняют свои значения при различной патологии (например, болезнь Альцгеймера, депрессия, ЧМТ) и могут опосредованно характеризовать умственные способности [16]. Это позволяет использовать корреляционный и когерентный анализ как для диагностики ЧМТ, так и для прогнозирования ее течения, а также для оценки влияния различных лекарственных препаратов на динамику заболевания. Мы предполагаем, что корреляционный и когерентный анализ на экспериментальной модели ЧМТ у крыс может быть использован для выявления потенциального нейропротекторного эффекта новых лекарственных средств на доклиническом этапе исследований. Однако для проверки данной гипотезы необходимо предварительно определить, насколько значения параметров кросскорреляции и когерентности ЭКоГ могут свидетельствовать об органических поражениях головного мозга у крыс с ЧМТ. Кроме того, необходимо оценить, являются ли эти изменения аналогичными тем, что наблюдают у пациентов в клинической практике.

В связи с вышесказанным, целью данной работы было определение характерных изменений параметров кросскорреляции и когерентности электрокортикограмм крыс, перенесших ЧМТ, по сравнению с условно здоровыми животными в рамках пилотного эксперимента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили в соответствии с принципами Базельской декларации, Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и рекомендациями биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14 сут.

Эксперименты были выполнены на 10-ти белых беспородных крысах самцах массой 250–300 г, полученных из ФГУП ПЛЖ “Рапполово” (Ленинградская область). Каждому животному присваивали свой идентификационный номер и проводили разделение на две группы – условно здоровые (норма) и ЧМТ, путем рандомизации методом случайных чисел. В обеих экспериментальных группах было по 5 животных.

Кортикографические электроды изготавливали из нихромовой проволоки диаметром 0.5 мм (для регистрирующих и референтного электродов) и диаметром 0.16 мм – для заземляющего электрода. Изоляцию осуществляли термоусадочной трубкой, длина регистрирующей (неизолированной) части ≈ 1 мм. Все электроды объединялись в гнездо на кабель BLS-8 с шагом 2.54 мм.

Для проведения хирургических манипуляций животных предварительно наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). Перед проведением операции на глаза животных наносился офтагель (Santen OY, Финляндия) для предотвращения пересыхания роговицы глаз. После подготовки поверхности черепа (удаление мышечно-фасциального слоя, надкостницы и коагуляции кровоточащих участков) просверливали отверстия соответствующих диаметров для электродов и фиксирующих винтов (глубина погружения сверла – до 1 мм). Для предупреждения нагревания головного мозга сверление осуществляли короткими интервалами. Далее у крыс условно здоровой группы осуществляли имплантацию кортикографических

электродов и вкручивание фиксирующих винтов в соответствующие отверстия, а у животных второй группы предварительно моделировали черепно-мозговую травму в соответствии с описанной ранее методикой [6, 17]. У животных проводили трепанацию черепа в левой лобной части над зоной сенсомоторной коры. Центр трепанационного отверстия находился на 2.0 мм роstralнее и 1.5 мм медиальнее брегмы. После этого в трепанационное отверстие помещали подвижный стальной поршень диаметром 3 мм с ходом 4 мм, по которому с высоты 10 см ударял скользящий в стальной трубке груз массой 50 г. Высверленную пластину возвращали на место, имплантировали электроды и вкручивали фиксирующие винты. Координаты расположения электродов определяли с помощью стереотаксического атласа мозга крысы Paxinos и Watson [18]. Электроды FP1 и FP2 располагались в области, иннервирующей передние конечности (вторичная двигательная кора, AP = +2.0, ML = 1.5, DV = 1.0), C3 и C4 – иннервирующей задние конечности (первичная двигательная кора, AP = –1.0, ML = 2.0, DV = 1.0), а O1 и O2 – над гиппокампом (первичная соматосенсорная кора, AP = –4.0, ML = 2.0, DV = 1.0) (рис. 1B). Выбор конкретных точек регистрации сигнала обусловлен тем, что дополнительно мы регистрировали и анализировали соматосенсорные вызванные потенциалы у данных животных (электроды FP1, FP2 и C3, C4 при стимуляции срединного и седалищного нервов соответственно), а также гиппокампальную активность при исследовательском поведении (электроды O1 и O2). Референтный электрод устанавливали в носовую кость, заземляющий – под кожу в области шеи. Дополнительную фиксацию конструкций в черепе осуществляли с помощью стоматологической пластмассы Виллакрил С (Zhermack, Италия). После этого ушивали разрез кожи, проводили антисептическую обработку швов и прилежащей области.

После оперативного вмешательства крыс содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к воде и корму в течение всего периода исследования. Состояние животных отслеживали сразу после выхода из наркоза и далее ежедневно утром и вечером, по необходимости обрабатывали швы раствором йода. Во избежание обезвоживания крысам вводили подкожно физиологический раствор в течение первых 3-х дней после операции. Мы осознанно отказались от использования антибиотиков, анальгетиков и противовоспалительных средств, поскольку большинство из них в той или иной степени могут влиять на течение патологических процессов при травматическом поражении головного мозга, тем самым искажая результаты исследования.

Запись кортикографической активности животных осуществляли на 3-и и 7-е сутки после операции с помощью 8-канального энцефалографа Нейрон-Спектр-1 (Нейрософт, Россия) с полосой пропускания 0.5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц. Выбор временных точек тестирования был обусловлен тем, что представлялось интересным оценить функциональное состояние головного мозга травмированных крыс в острый (3-и сутки) и промежуточный период (7-е сутки) после ЧМТ.

Из полученных 5-минутных кортикограмм отбирали участки записи, во время которых тестируемые животные находились в спокойном бодрствующем состоянии (отсутствие двигательной или исследовательской активности, а также груминга). Далее проводили кросскорреляционный и когерентный анализы, после чего сравнивали результаты двух экспериментальных групп. Длина эпохи анализа – 5 с. Кросскорреляционный анализ включал в себя расчет коэффициента кросскорреляции (Ккр) пар электродов FP1–C3, FP2–C4, C3–O1, C4–O2, FP1–FP2, C3–C4 и O1–O2, а также средней частоты (Гц) и максимального размаха кросскорреляционной функции (ККФ, мкВ). Для этих же пар отведений рассчитывали среднюю мощность когерентности дельта- (0.5–4.0 Гц), тета- (4.0–8.0 Гц), альфа- (8.0–14.0 Гц) и бета-ритмов (низкочастотных, НЧ – 14.0–20.0 Гц и высокочастотных, ВЧ – 20.0–35.0 Гц).

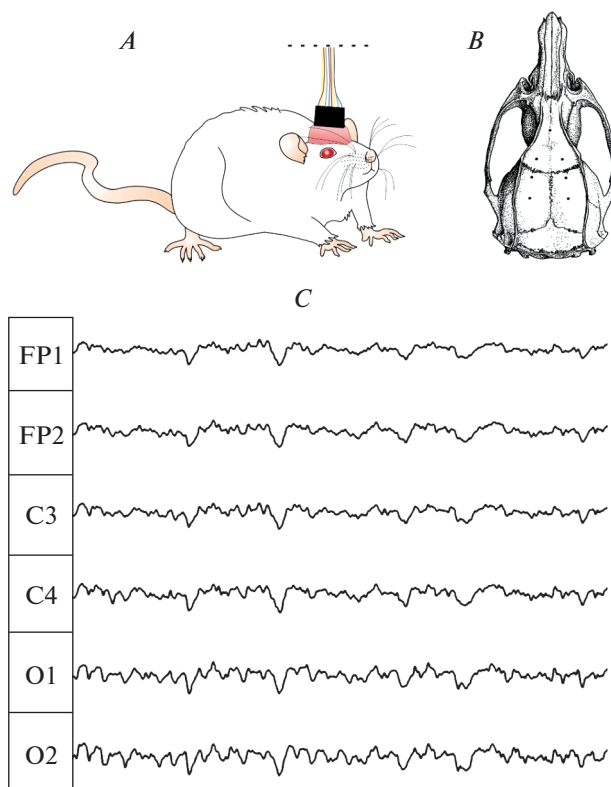


Рис. 1. *A* – Внешний вид крысы с имплантированными электродами во время записи ЭКоГ. *B* – схематичное расположение регистрирующих (FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2) и референтного (Ref) электродов. *C* – пример записи электрокортикограммы здоровой крысы в спокойном состоянии.

Fig. 1. *A* – Rat with implanted EEG electrodes during the ECoG recording. *B* – schematic situation of recording (FP1, FP2, C3, C4, O1 and O2) and reference (Ref) electrodes. *C* – example of ECoG record in non-injured rat during resting state condition.

На 7-й день после проведения всех экспериментов животных эвтаназировали углекислым газом. Извлеченный головной мозг фиксировали 10%-ным нейтральным формалином в течение 24-х ч. Для гистологического исследования фиксированный головной мозг вскрывался таким образом, чтобы вертикальный разрез проходил через середину очага травматического повреждения и через соответствующие отделы контрлатерального полушария. Вырезались образцы ткани в виде пластин толщиной 0.2–0.3 см. Полученные образцы ткани подвергали гистологической проводке, пропитыванию и заливке в парафин по общепринятой методике. Из парафиновых блоков при помощи ротационного микротомы изготавливали срезы ткани, размещали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином, после чего обезвоживали и заключали под покровные стекла. Гистологические препараты подвергали тотальному сканированию при помощи сканирующей системы для лабораторных исследований с комплектом программ для обработки изображений Pannoramic MIDI (3D Histech Kft, Венгрия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы GraphPad Prism 7.00. Данные представлены в виде: среднее $\pm$ стандарт-

ная ошибка среднего. Мы использовали классический вариант кросскорреляционного анализа, базирующийся на вычислении коэффициентов кросскорреляции Пирсона с последующим усреднением полученных результатов [19, 20], несмотря на то, что есть другие подходы к анализу [21]. Значимость различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенных экспериментов было установлено, что у условно здоровых крыс имеется высокая степень взаимосвязи ритмически протекающих биоэлектрических процессов между различными отделами коры головного мозга. Наиболее высокий Ккр, т.е. величина, количественно характеризующая величину функциональной связи между двумя любыми отведениями, наблюдался между парами электродов FP1–FP2, C3–C4, O1–O2, FP1–C3 и FP2–C4. В среднем для указанных пар данный показатель варьировал от 0.87 до 0.92 как на 3-и, так и на 7-е сутки после операции. Несколько меньший Ккр был выявлен между парами электродов C3–O1 и C4–O2: от 0.77 до 0.8 (рис. 3B). Аналогичным образом менялась величина средней мощности когерентности дельта-, тета-, альфа- и бета-ритмов – у пар с наименьшим Ккр данный показатель был также меньше. Патоморфологические изменения в зоне повреждения (рис. 2) на 3-и сутки после травмы представлены преимущественно процессами повреждения в виде формирования зоны некроза с выраженным перифокальным отеком, распространенной экссудативной клеточной реакцией и распространенной глиальной реакцией мозговой ткани вокруг фокуса повреждения. На 7-е сутки после травмы отмечено значительное снижение содержания некротического детрита в зоне повреждения, развитие выраженной экссудативной клеточной реакции в ней, уменьшение отека и формирование перифокальной зоны выраженного глиоза мозговой ткани. При этом ткань контрлатерального полушария головного мозга не претерпевала структурных изменений.

Травматическое повреждение зоны двигательной коры и нижележащих отделов у крыс приводило к статистически значимому снижению Ккр пар электродов FP1–FP2, C3–C4 и O1–O2 (межполушарные связи) в среднем на 33% ($p < 0.05$ и $p < 0.01$) на 3-и сутки и на 19% ($p < 0.05$ и $p < 0.01$) на 7-е сутки. Также у животных с ЧМТ Ккр у пары C4–O2 был ниже по сравнению с условно здоровыми животными: на 21% ($p < 0.01$) на 3-й и на 23% ($p < 0.05$) на 7-й день после травмы (рис. 3A, B). Средняя частота ККФ также отличалась у крыс с ЧМТ: наблюдали уменьшение величины данного показателя в среднем на треть ($p < 0.05$, $p < 0.01$) для пар электродов FP1–FP2, C3–O1 и C4–O2 на 3-и сутки с постепенным восстановлением до величины условно здоровых животных к 7-м суткам после травмы (рис. 3C). Другим показателем кросскорреляции, который также изменялся у крыс в результате ЧМТ, был максимальный размах ККФ. У травмированных животных этот показатель был ниже по сравнению с нормой как на 3-и (в среднем на 67% для всех отведений, соответственно $p < 0.05$ и $p < 0.01$) и на 7-е сутки (на 45% для всех отведений, $p < 0.05$ и $p < 0.01$) после травмы (рис. 3D).

Схожим образом черепно-мозговая травма влияла на когерентности анализируемых ритмов. Например, у группы ЧМТ на 3-и сутки после операции наблюдалось статистически значимое снижение средней мощности когерентности дельта-, тета- и альфа- ритмов на 12% ($p < 0.05$, $p < 0.01$) для пар отведений FP1–FP2, C3–C4 и O1–O2 (межполушарные связи). Аналогичные изменения работы межполушарных связей, однако, уже менее выраженные в области травмы, были зафиксированы и в отношении бета-НЧ и ВЧ-ритмов (рис. 4). Средние мощности когерентностей ритмов, характеризующие внутриполушарные связи (FP1–C3, FP2–C4, C3–O1 и C4–O2)

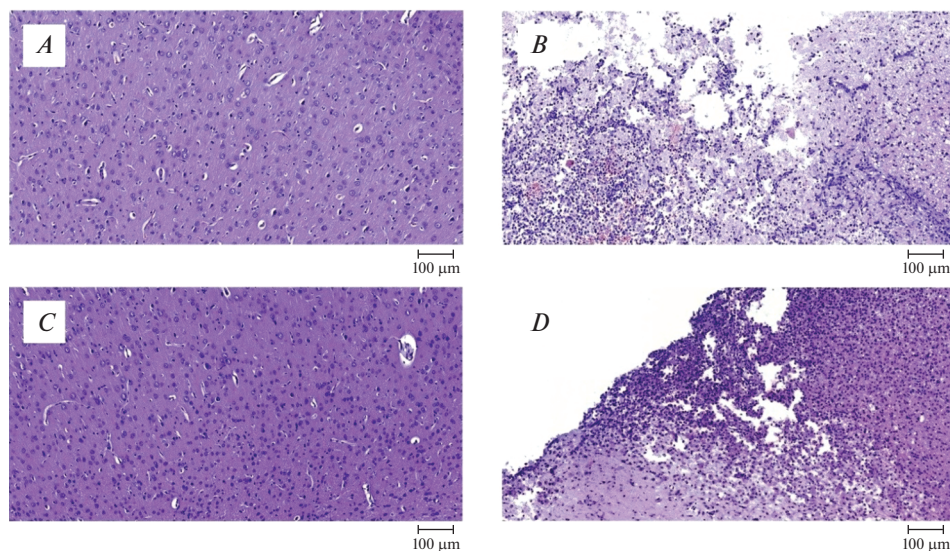


Рис. 2. Патоморфологическая картина очага повреждения головного мозга крыс на 3-и и 7-е сутки после ЧМТ. *A* — головной мозг здорового полушария травмированного животного на 3-и сутки после травмы; *B* — головной мозг здорового полушария травмированного животного на 7-е сутки после травмы; *C* — головной мозг травмированного полушария на 3-и сутки после травмы; *D* — головной мозг травмированного полушария на 7-е сутки после травмы. Объяснения в тексте.

Fig. 2. Pathomorphological picture of brain lesion in rats on the 3rd and 7th day after TBI. *A* — brain tissue of non-injured hemisphere on the 3rd day after the trauma; *B* — brain tissue of non-injured hemisphere on the 7th day after the trauma; *C* — brain tissue of traumatized hemisphere on the 3rd day after the trauma; *D* — brain tissue of traumatized hemisphere on the 7th day after the trauma. Explanations in the text.

также снижались, а наиболее выраженные изменения касались когерентностей дельта-ритмов (рис. 4). Описанные изменения регистрировали у травмированных крыс и на 7-е сутки после операции, при этом наблюдалась тенденция к медленно произвольному восстановлению значений средней мощности когерентностей к значениям нормы (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использованная модель ЧМТ вызывает у крыс повреждение как двигательной коры, так и нижележащих отделов головного мозга, в частности, стриатума и мозолистого тела [22]. На сегодняшний день для экспериментальных моделей ЧМТ нет общепринятого способа классификации тяжести травмы (легкая, средняя, тяжелая), однако, в клинической практике ушиб мозга тяжелой степени (сопровождающийся разрушением мозговой ткани и разрывами мягкой мозговой оболочки) принято рассматривать как тяжелую ЧМТ [23]. Кроме того, ранее было показано, что у крыс с данной моделью травмы возникает тяжелая степень неврологического дефицита, проявляющаяся в выраженном снижении общей двигательной и поисково-исследовательской активности в тесте Открытое поле на 3-и сутки после повреждения [5, 6]. Также у этих крыс наблюдали стойкие двигательные нарушения, выявляемые в тестах Цилиндр, Сужающаяся дорожка, Staircase test и Постановка конечности на опору и на 3-и, и на 7-е сутки после травмы [4–6]. Кроме того, ана-

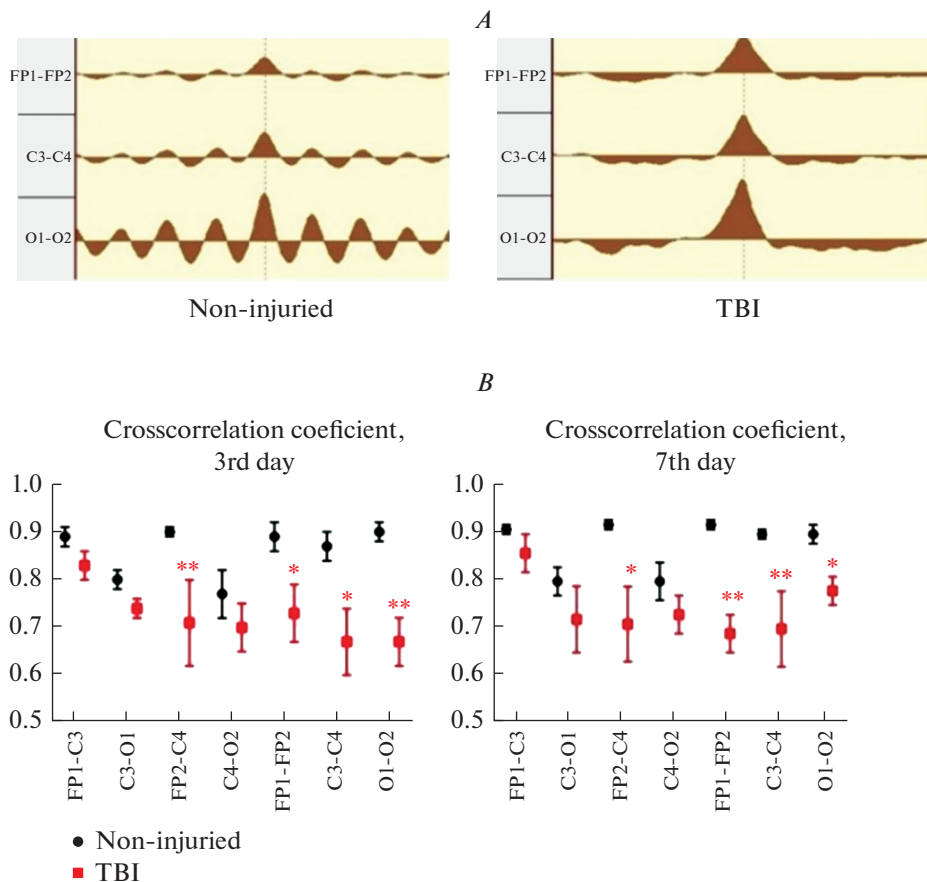


Рис. 3. А – пример графиков кросскорреляционных функций пар электродов FP1-FP2, C3-C3 и O1-O2 условно здоровой (норма) и травмированной (ЧМТ) крыс. В, С, D – коэффициенты кросскорреляции (Ккр), средняя частота ККФ и максимальный размах ККФ пар электродов крыс условно здоровой (норма) и травмированной (ЧМТ) групп на 3-и и 7-е сутки после операции. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ – статистически значимое отличие по сравнению с условно здоровой группой.

Fig. 3. А – graphs of crosscorrelation functions of pairs FP1-FP2, C3-C3 and O1-O2 of non-injured rat (норма) and rat with TBI (ЧМТ). В, С, D – crosscorrelation function parameters in FP1-C3, FP2-C4, C3-O1, C4-O2, FP1-FP2, C3-C4 and O1-O2 in non-injured and TBI rats on the 3rd and 7th day after the operation. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ – significant difference in comparison with non-injured rats.

лиз общего белка спинномозговой жидкости показал, что у таких животных имеется выраженное нарушение барьерной функции гематоэнцефалического барьера [6]. Следовательно, на основании проведенных ранее экспериментов можно сделать вывод, что в проведенных исследованиях мы используем модель тяжелой ЧМТ.

В рамках настоящей работы оценивали состояние головного мозга травмированных крыс в острый (3-и сутки) и промежуточный период (7-е сутки) после ЧМТ. Клинически для острого периода характерно выпадение мозговых функций, сопровождающееся нарушением сознания и снижением психической деятельности. Кроме того, церебральный отек, образование детрита, крупно- и мелкоочаговые

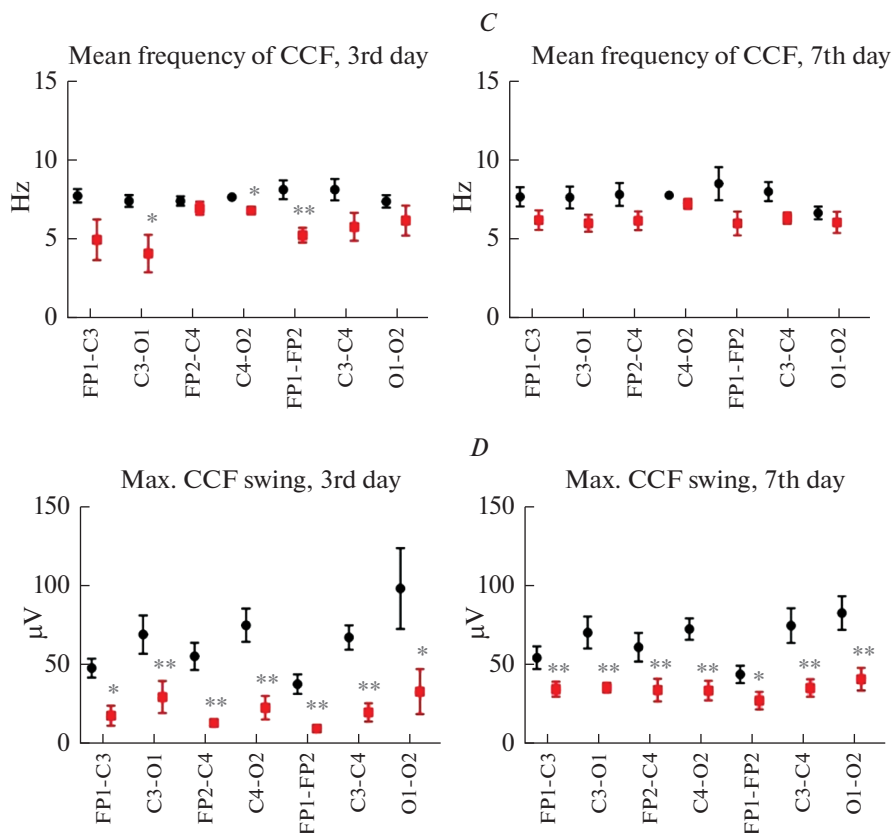


Рис. 3. Окончание

кровоизлияния, а также нарастание аутоиммунных реакций — типичная патоморфологическая картина данного периода [24].

Промежуточный период характеризуется частичным восстановлением обще-мозговых функций, хотя такие нарушения как двигательные и статокординационные все еще могут выявляться. В области очага повреждения обнаруживаются очаговые и диффузные посттравматические процессы с разнонаправленными изменениями вещества головного мозга (регенеративные процессы/фагоцитоз мертвой ткани). Также происходит регрессия церебрального отека [24].

Для используемой нами модели характерно снижение (вплоть до полного отсутствия) общей двигательной активности у травмированных крыс на 3-и сутки после травмы с постепенным восстановлением данного показателя к 7-му дню [6]. Патоморфологически картина очага повреждения у таких животных характеризуется преобладанием процессов альтерации с сохранением в зоне повреждения некротического детрита, выраженного перифокального отека, формированием умеренной экссудативной клеточной реакции и распространенной перифокальной глиальной реакции на 3-и сутки и значительным преобладанием экссудативной клеточной реакции, текущей элиминацией некротического детрита из очага повреждения, снижением выраженности отека и формированием выраженной ограниченной перифокальной глиальной реакции на 7-е сутки после ЧМТ (рис. 2). Мы не анализи-

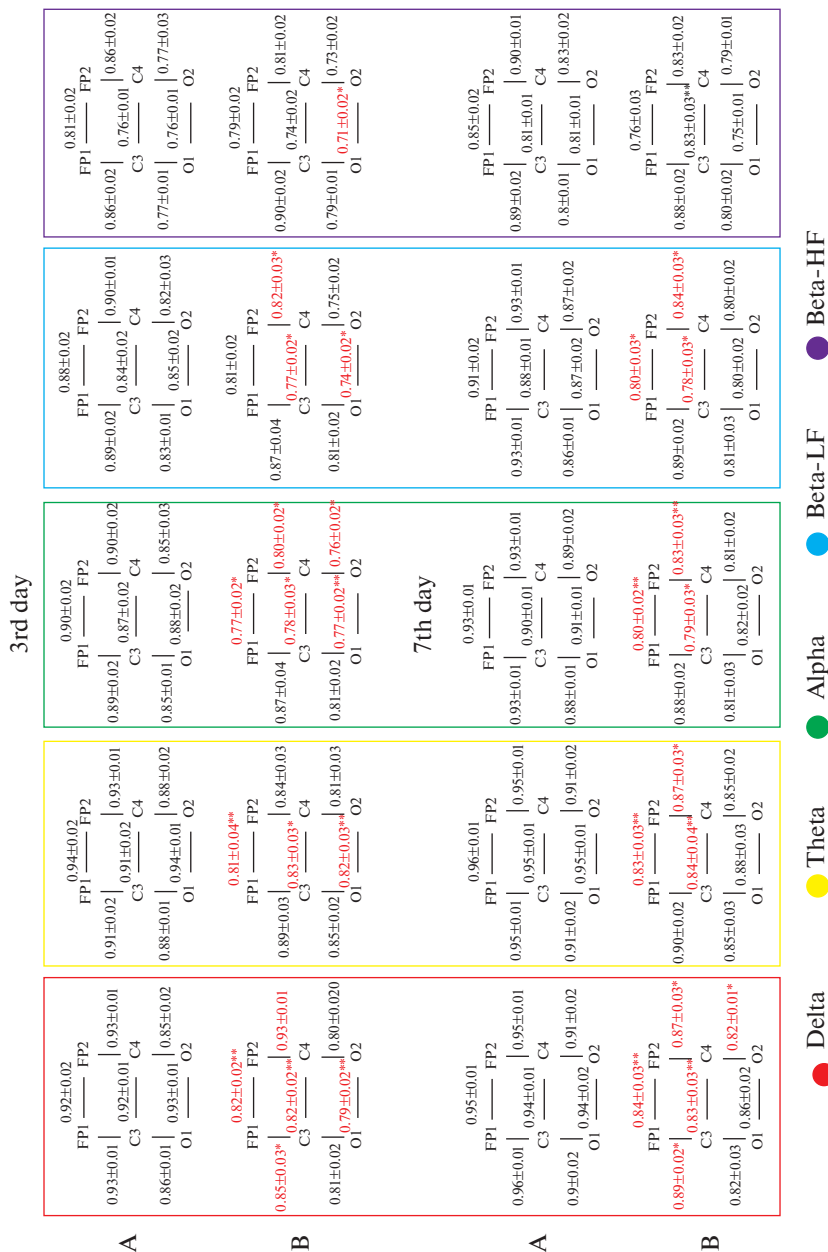


Рис. 4. Средние мощности когерентностей пар электродов тестируемых животных (*A* – условно здоровая группа, *B* – ЧМТ) на 3-и и 7-е сутки после операции. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – статистически значимое отличие по сравнению с условно здоровой группой.

Fig. 4. Coherence of electrodes in tested animals (*A* – non-injured rats, *B* – rats with TBI) on the 3rd and the 7th day after the operation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – significant difference in comparison with non-injured rats;

ровали степень церебрального отека на данной модели, однако данные других авторов свидетельствуют, что у крыс он развивается в первые два дня, разрешаясь к пятому–седьмому дню [25]. Таким образом, на данной модели выбранные временные точки тестирования можно рассматривать как острый и подострый период после травмы.

В настоящем исследовании показано, что одностороннее травматическое повреждение зоны двигательной коры и нижележащих отделов у крыс приводит к нарушению межполушарных и внутримушарных функциональных связей как в области травмы, так и в отдаленных отделах головного мозга. Эти негативные изменения могут быть выявлены посредством кросскорреляционного и когерентного анализов на 3-и и на 7-е сутки после ЧМТ. При проведении кросскорреляционного анализа характерными проявлениями указанных нарушений являются уменьшение коэффициента кросскорреляции и средней частоты ККФ, а также увеличение максимального размаха ККФ пар регистрируемых отведений. Последний параметр является наиболее чувствительным к ЧМТ, поскольку он статистически значимо изменялся у всех пар отведений. Стоит отметить, что средняя частота ККФ может косвенно свидетельствовать о динамике патологических процессов, происходящих в головном мозге после ЧМТ, так как на 7-е сутки данный показатель у травмированных крыс приближался к показателям здоровых животных. Когерентный анализ демонстрирует, что у крыс с ЧМТ снижается средняя мощность когерентности дельта-, тета-, альфа- и бета-ритмов, при этом, когерентности высокочастотных бета-ритмов наименее чувствительны к травматическому воздействию.

Снижение степени кросскорреляции и средней мощности когерентности пар регистрируемых отведений неоднократно было отмечено не только у людей с ЧМТ, но и с другими очаговыми органическими повреждениями головного мозга. Исследования кросскорреляционных функции ЭЭГ при разной локализации очага показали, что в зависимости от зоны поражения мозга устанавливаются различные патологические взаимоотношения между областями коры. Оказалось, что корреляционные связи зоны непосредственного поражения мозга с отдельными участками коры резко снижаются. В то же время в зоне поражения возникают особые патологические корреляции с другими отделами мозга и устанавливаются патологические связи между отдаленными от очага, первично не поврежденными зонами коры [26].

В исследовании Е.В. Шаровой и соавт. было показано, что у людей с посткоматозным бессознательным состоянием, перенесших тяжелую ЧМТ, большинство когерентных связей в основных частотных диапазонах ЭЭГ статистически значимо снижены по сравнению с нормой. Авторы особо подчеркивают факт резкого ослабления межполушарного взаимодействия, варьирующего от 30 до 80% относительно нормы и связывают его не только с непосредственным повреждением лобных долей и комиссуральных трактов, но также и поражением (дисфункцией) регуляторных структур разного уровня [19]. В похожем исследовании А.В. Климаша и соавт. у пациентов наблюдалось снижение когерентности в диапазонах альфа- и бета-ритмов [20].

Таким образом, использованная нами модель ЧМТ вызывает у крыс изменения параметров ККФ и когерентности электрокортикограмм, сходные с наблюдаемыми у пациентов с фокальными повреждениями головного мозга и, в особенности, с тяжелой черепно-мозговой травмой. Это позволяет предположить, что оценку параметров ККФ и когерентности на модели ЧМТ у крыс можно использовать как объективный показатель эффективности проводимой фармакотерапии при изучении потенциальных нейропротекторных средств. Однако в связи с тем, что исследование носит пилотный характер, полученные в рамках данной работы результаты нельзя с достаточной уверенностью транслировать на большие группы животных

или людей. Для валидации предлагаемой нами модели необходимо проведение подтверждающих экспериментов с большим количеством крыс в группах. Представленные нами данные могут быть использованы для расчета оптимального объема выборки в больших исследованиях, например, методом анализа мощности или другими методами, основанными на предварительных результатах [27].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corrigan J.D., Selassie A.W., Orman J.A. The epidemiology of traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 25(2): 72–80. 2010.
2. Тяжелая черепно-мозговая травма. Клинические рекомендации. Ассоциация нейрохирургов России. 2017. [Traumatic brain injury. Clinical recommendations. Russian neurosurgeons' association. 2017. (In Russ)].
3. Потапов А.А., Крылов В.В., Гаврилов А.Г., Кравчук А.Д., Лихтерман Л.Б., Петриков С.С., Талыпов А.Э., Захарова Н.Е., Ошоров А.В., Сычев А.А., Александрова Е.В., Солодов А.А. Рекомендации по диагностике и лечению тяжелой черепно-мозговой травмы. Часть 2. Интенсивная терапия и нейромониторинг. *Вопр. нейрохирургии.* 1: 98–106. 2016. [Potapov A.A., Krylov V.V., Gavrilov A.G., Kravchuk A.D., Likhтерman L.B., Petrikov S.S., Talypov A.E., Zaharova N.E., Oshorov A.V., Sychev A.A., Alexandrova E.V., Solodov A.A. Guidelines for the diagnosis and treatment of severe traumatic brain injury. Part. Intensive care and neuromonitoring. *Voprosy neirokhirurgii.* Burdenko's J. Neurosurgery. 1: 98–106. 2016. (In Russ)].
4. Isaev N.K., Novikova S.V., Stelmashook E.V., Barskov I.V., Silachev D.N., Khaspekov L.G., Skulachev V.P., Zorov D.B. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant skqr1 decreases trauma-induced neurological deficit in rat. *Biochemistry (Moscow).* 77(9): 996–999. 2012.
5. Сысоев Ю.И., Оковитый С.В., Уззегбунам Б. Влияние нового производного диэтилaminоэтанола на выраженность неврологического дефицита у крыс после черепно-мозговой травмы. *Биомедицина.* 14(2): 95–105. 2018. [Sysoev Yu.I., Okovityi S.V., Uzuegbunam B. The influence of new diethylaminoethanol compound on the neurologic deficit in rats after traumatic brain injury. *Biomedicina.* 14(2): 95–105. 2018. (In Russ)].
6. Сысоев Ю.И., Дагаев С.Г., Кубарская Л.Г., Гайкова О.Н., Уззегбунам Б.Ч., Модисе К., Маквана Л.Т., Оковитый С.В. Нейропротекторная активность агониста альфа-2 адренорецепторов мафедина на модели черепно-мозговой травмы у крыс. *Биомедицина.* 15(1): 62–77. 2019. [Sysoev Yu.I., Dagaev S.G., Kubarskaja L.G., Gaikova O.N., Uzuegbunam B.C., Modise K., Makwana T.L., Okovityi S.V. Neuroprotective activity of alpha-2 adrenoreceptor agonist mafedine in the rat traumatic brain injury model. *Biomedicina.* 15(1): 62–77. 2019. (In Russ)].
7. Chen X., Wu S., Chen C., Xie B., Fang Z., Hu W., Chen J., Fu H., He H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF-κB pathway following experimental traumatic brain injury. *J. Neuroinflammation.* 14(1): 143. 2017.
8. Chen S.F., Hsu C.W., Huang W.H., Wang J.Y. Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* 155(8): 1279–1296. 2008.
9. Зенков Л.Р. Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии). Руководство для врачей. 8-е изд. М. МЕДпрессинформ. 2017. [Zenkov L.R. Klinicheskaya elektroencefalografiya (s elementami epileptologii). *Rukovodstvo dlya vrachej.* [Clinical electroencephalography (with elements of epileptology). Guidelines for doctors.] 8th ed. Moscow. MEDpressinform. 2017. (In Russ)].
10. Карпов С.М., Шарай Е.А. Электроэнцефалографические показатели у детей с разными формами закрытой черепно-мозговой травмы. *Пробл. эксперимент. мед.* 8(1): 15–17. 2008. [Karpov S.M., Sharay E.A. Electroencephalographic factors beside children with different forms locked skull-brain trauma. *Problemy` eksperimentizy` v medicine.* 8(1): 15–17. 2008. (In Russ)].

11. *Авалиани Т.В., Константинов К.В., Сизов В.В., Цикунов С.Г.* Особенности пространственно-временной организации биоэлектрической активности мозга у потомства от крыс латерализованной травмой мозга. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 99 (10): 1149–1159. 2013. [*Avaliani T.V., Konstantinov K.V., Sizov V.V., Tsikunov S.G.* Features of an existential organization of an bioelectric activity of the brain at posterity from rats with a lateral injury of the brain. *Russ. J. Physiol.* 99(10): 1149–1159. 2013. (In Russ)].
12. *Калинина Д.С., Вольнова А.Б., Алексеева О.С., Журавин И.А.* Электрическая активность неокортекса у взрослых крыс после пренатальной гипоксии и при моделировании эпилепсии. *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 52(5): 321–327. 2016. [*Kalinina D.S., Alekseeva O.S., Zhuravin I.A., Vol'nova A.B.* Electrical activity of the neocortex in adult rats after prenatal hypoxia and in epilepsy model. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 52(5): 321–327. 2016. (In Russ)].
13. *Costecalde T., Aksenova T., Torres-Martinez N., Eliseyev A., Mestais C., Moro C., Benabid A.L.* A Long-Term BCI Study With ECoG Recordings in Freely Moving Rats. *Neuromodulation.* 21(2): 149–159. 2018.
14. *Русинов В.С., Гриндель О.М., Болдырева Г.Н., Вакар Е.М.* Биопотенциалы мозга человека. М. Медицина. 1987. [*Rusinov V.S., Grindel O.M., Boldyreva G.N., Vakar E.M.* Biopotencialy mozga cheloveka. [Biopotentials of the human brain.] Moscow. Medicina. 1987. (In Russ)].
15. *Bowyer S.M.* Coherence a measure of the brain networks: past and present. *Neuropsychiatr. Electrophysiol.* 2: 1. 2016.
16. *Thatcher R.W., North D., Bivera C.* EEG and intelligence: Relations between EEG coherence, EEG phase delay and power. *Clin. Neurophysiol.* 116(9): 2129–2141. 2005.
17. *Dixon C.E., Clifton G.L., Lighthall J.W., Yaghai A.A., Hayes R.L.* Controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 39(3): 253–262. 1991.
18. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th edition. Acad. Press. 2013.
19. *Шарова Е.В., Челябинца М.В., Коробкова Е.В., Куликов М.А., Зайцев О.С.* ЭЭГ-корреляты восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы. *Вопр. нейрохирургии.* 1: 14–18. 2014. [*Sharova E.V., Cheljapina M.V., Korobkova E.V., Kulikov M.A., Zajcev O.S.* EEG-correlates of consciousness recovery after severe traumatic brain injury. *Vopr. neurokhirurgii.* (1): 14–18. 2014. (In Russ)].
20. *Климаш А.В., Цицерошин М.Н., Шеповальников А.Н., Зайцева Л.Г., Кондаков Е.Н., Боровикова В.Н.* Нарушения пространственной организации биоэлектрической активности мозга у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой при различной выраженности угнетения сознания. *Физиология человека.* 35(5): 49–65. 2010. [*Klimash A.V., Ciceroshin M.N., Shepovainikov A.N., Zajceva L.G., Kondakov E.N., Borovikova V.N.* Disorders of the spatiotemporal organization of the brain's bioelectrical activity in patients with different depressions of consciousness after severe head injury. *Fiziologiya cheloveka.* 35(5): 49–65. 2010. (In Russ)].
21. *Трифонов М.И., Панасевич Е.А.* Методические аспекты кросскорреляционного анализа ЭЭГ. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 104(7): 856–871. 2018. [*Trifonov M.I. Panasevich E.A.* Methodological aspects of cross-correlation analysis of EEG data. *Russ. J. Physiol.* 104(7): 856–871. 2018. (In Russ)].
22. *Сысоев Ю.И., Крошкина К.А., Оковитый С.В.* Особенности соматосенсорных вызванных потенциалов у крыс после черепно-мозговой травмы. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 105(6): 749–760. 2019. [*Sysoev Yu.I., Kroshkina K.A., Okovityi S.V.* Characteristic of somatosensory evoked potentials in rats after traumatic brain injury. *Russ. J. Physiol.* 105(6): 749–760. 2019. (In Russ)].
23. *Коновалов А.Н., Лихтерман Л.Б., Потапов А.А.* Клиническое руководство по черепно-мозговой травме. Т. 1. М. Антидор. 1998. [*Kononov A.N., Lihtherman L.B., Potapov A.A.* Klinicheskoe rukovodstvo po cherepno-mozgovoј travme. [Traumatic brain injury clinical recommendations.] V. 1. Moscow. Antidor. 1998. (In Russ)].
24. *Лихтерман Л.Б.* Черепно-мозговая травма. Диагностика и лечение. М. ГЭОТАР-Медиа. 2014. [*Likhterman L.B.* Cherepno-mozgovaya travma. Diagnostika i lechenie. [Traumatic brain injury. Diagnosis and treatment.] Moscow. GEOTAR-Media. 2014. (In Russ)].
25. *Bareyre F., Wahl F., McIntosh T.K., Stutzmann J.M.* Time course of cerebral edema after traumatic brain injury in rats: effects of riluzole and mannitol. *J. Neurotrauma.* 14(11): 839–849. 1997.
26. *Русинов В.С., Майорчик В.Е., Гриндель О.М.* Клиническая электроэнцефалография. М. Медицина. 1973. [*Rusinov V.S., Majorchik V.E., Grindel O.M.* Klinicheskaya elektroencefalografiya. [Clinical encephalography.] Moscow. Medicina. 1973. (In Russ)].
27. *Исламов Р.А.* Методология эксперимента с использованием лабораторных животных. *Вестник КазНМУ.* 1: 489–492. 2016. [*Islamov R.A.* The methology of the experiment using laboratory animals. *KazNMU J.* 1: 489–492. 2016. (In Russ)].

Crosscorrelation and Coherent Analysis of Ecog in Rats with Traumatic Brain Injury**Yu. I. Sysoev^{a, b, *}, V. A. Pyankova^a, K. A. Kroshkina^a, V. E. Karev^a, and S. V. Okovityi^a**^a*Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint-Petersburg, Russia*^b*Institute of Translational Biomedicine, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*^{*}*e-mail: susoyev92@mail.ru*

Traumatic brain injury (TBI) is a leading cause of disability and mortality among young population both in Russian Federation and abroad. The development of adequate and reproducible models of TBI in laboratory animals as well as precise methods for assessment of neurological disorders degree will optimize investigation of new effective neuro-protective drugs. Aim of the study: to perform the comparative crosscorrelation and coherent analysis of ECOG signal in non-injured rats and rats with TBI rats. The open penetrating brain injury was modeled following the craniotomy over the motor cortex of the left hemisphere by controlled cortical impact injury method (CCI). The recording nichrome ECoG electrodes were implanted bilaterally in the primary and secondary motor cortex areas and also in the area of primary somatosensory cortex (over the hippocampus). ECoG recordings were performed on the 3rd and 7th day after the operation in condition of the home cage at resting state. Crosscorrelation analysis comprised the calculation of crosscorrelation coefficient, mean frequency and maximum span of cross-correlation function (CCF). Also the calculated mean coherence power of delta-, theta-, alpha- and beta-rhythms. Unilateral traumatic damage of motor cortex and near situated brain areas lead to disturbances of inter- and intrahemispheric connections, these changes are recorded not only in the damaged area, but also in the remote areas of the cortex on the 3rd and 7th day after the injury. The obtained results are similar to those observed in patients with TBI, which suggests that this experimental it can be assumed that this model can be relevant for neurophysiological and pharmacological studies.

Keywords: traumatic brain injury, controlled cortical impact injury, ECoG, crosscorrelation analysis, coherent analysis

ЦИТИРОВАТЬ:

Сысоев Ю.И., Пьянкова В.А., Крошкина К.А., Карев В.Е., Оковитый С.В. Кросскорреляционный и когерентный анализ электрокортикограмм крыс, перенесших черепно-мозговую травму. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 315–328.

DOI: 10.31857/S0869813920030085

TO CITE THIS ARTICLE:

Sysoev Yu.I., Pyankova V.A., Kroshkina K.A., Karev V.E., Okovityi S.V. Crosscorrelation and Coherent Analysis of ECOG in Rats with Traumatic Brain Injury. Russian Journal of Physiology. 106(3): 315–328.

DOI: 10.31857/S0869813920030085

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ACOUSTIC AND PERCEPTUAL FEATURES OF THE EMOTIONAL SPEECH
OF ADOLESCENTS AGED 14–16 YEARS

© 2020 A. S. Grigoriev^{1, *}, V. A. Gorodnyi¹, O. V. Frolova¹, A. M. Kondratenko¹,
V. D. Dolgaya¹, and E. E. Lyakso^{1, **}

¹*The Child Speech Research Group, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

**E-mail: a.s.grigoriev89@gmail.com*

***E-mail: lyakso@gmail.com*

Received August 13, 2019; after revision January 17, 2020; accepted for publication January 20, 2020

The goal of the study was to describe perceptual and acoustic characteristics of emotional spontaneous speech of adolescents aged 14–16 years. 18 adolescents aged 14–16 years (9 boys and 9 girls, three people in each age) were participants. Perceptual analysis of speech of children by adults (70 Russian speakers and 70 speakers of other languages) was conducted to define the emotional state via voice and speech characteristics. Instrumental and linguistic analysis was used to determine acoustic features and linguistic information on which listeners rely while recognizing the adolescents' state. It was shown that listeners had difficulty in recognizing the emotional state of adolescents, but Russian-speaking listeners recognized the emotional state better (26% of phrases recognized with probability 0.75–1.0) than speakers of other languages. Adults recognized comfort better than discomfort, Russian listeners better than foreigners. Russian listeners are likely to rely on acoustic and linguistic information, speakers of other languages – on acoustic features of adolescents' speech. Phrases uttered in comfort are characterized by a wider pitch range vs. phrases uttered in the neutral state. It was revealed that the phrases of girls uttered in comfort have significantly higher average pitch values vs. discomfort. There were no significant differences between boys and girls in acoustic characteristics of emotional speech. Phrase duration and pitch range values can be included in automatic recognition systems of the speaker's emotional state via speech as additional informative features. The paper discusses the specificity of emotion manifestation in adolescents and the possibility of further use of the results.

Keywords: speech, emotions, acoustical features, adolescents, typical development, perceptual analysis

DOI: 10.31857/S086981392003005X

Emotional manifestations and states of children and adolescents are studied at different levels of the organization – from cellular to system-behavioral, which requires the use of different analysis methods. The electrophysiological (EEG and EP indicators) [for example, 1] and hormonal [2] mechanisms of different emotional states are widely studied.

We addressed the problem of reflecting the emotional state in the characteristics of voice and speech, which has a long history starting with the works of Ch. Darwin [3], and chose two main approaches to research it – methods of auditory perceptual and instrumental spectrographic analysis.

The ability to recognize the speaker's state according to voice characteristics is shown on the material of different languages [4–6]. It is known that the assignment of speech patterns to different emotional states is affected by duration and pitch (F0) of the speech sig-

nal. It has been found on the material of the English language that emotional speech can be characterized by changes in the speech rate compared with calm speech [7]. A number of studies indicate that cultural and language peculiarities of a person who perceives emotions influence the emotional state perception [8, 9]. It was shown that values of the pitch, phrase duration, and speech rate affect the efficiency of recognition of the emotional state [10, 11]. Cross-linguistic studies revealed that listeners are able to recognize emotions spoken in a non-native language, but the recognition of emotions in their native language is more effective than in other languages [4–6, 12]. However, in most studies, speech uttered by professional actors is used as emotional speech. There are a few works in which colloquial language is used as emotional speech.

Our work is part of research aimed at studying the formation of the emotional sphere in ontogenesis and the reflection of the emotional state in child speech. The research conducted in the Child Speech Research group of St. Petersburg university showed that adults are able to recognize the state of infants by characteristics of their vocalizations from the first months of life [13, 14]. With the age of children, lexical information contained in a speech message has an increasing influence on the child's emotional state recognition [15, 16]. We have created the first database of emotional child speech for the Russian language [17]. We have revealed that adult Russian native speakers can correctly recognize the emotional state of children aged 4–7 years, with the recognition efficiency increasing with the child's age.

This study is dedicated to the problem of determining the emotional state of adolescents aged 14–16 years by Russian native speakers and speakers of other languages. In this study, we used spontaneous speech of typically developing adolescents. We chose a very contradictory age of 14–16 years to study the emotional state reflection in the child speech characteristics. At this age, adolescents often restrain their emotions while their ability to manifest and recognize emotional states does not always reach the adult level [18]. Emotions of adolescents of this age are mobile, changeable, imagination is actively developing [19]. Changes in the emotional sphere of teens are noted to continue until late adolescence [6]. The adolescent's emotional sphere is under the strong influence of neurohumoral processes linked with puberty, which proceeds under the control of the central nervous system and endocrine glands. In girls, puberty ends, and they demonstrate an "adult" type of behavior. In boys, under the influence of testosterone, the larynx grows, the vocal folds become longer and thicker, leading to voice changes [20]. This physiological process is referred to as a voice mutation (or a voice break) [19]. We previously showed that by the age of 14 years, the duration of stressed and unstressed vowels stabilizes, pitch values decrease, the vowel articulation index also becomes stable [21].

This work is part of the research of the emotional state reflection in the voice and speech characteristics of children [14, 22–24] and covers the period of 14–16 years.

The goal of the study is to describe perceptual and acoustic characteristics of emotional spontaneous speech of adolescents aged 14–16 years.

METHODS

The participants in the study were 18 typically developing adolescents aged 14–16 years (9 boys and 9 girls) attending a high school in St. Petersburg. For all adolescents, we checked thresholds of hearing using clinical audiometry (the automated AA-02 audiometer) and the formation of phonemic hearing. According to the pediatricians, children did not have chronic diseases, neurological or psychiatric disorders. The speech material of children was recorded in the standardized situation of the dialogue between the experimenter and the child. All speech material was annotated by gender, age and emotional state of the adolescent and included in the created database "AD-Child.Ru" [25].

The study included a perceptual experiment and an instrumental analysis. The main purpose of the perceptual experiment was to determine the emotional state of adolescents by adults while listening to speech material. The instrumental analysis of speech was conducted to identify acoustic characteristics, based on which listeners classified speech material into three emotional states.

On the base of listening to audio recordings and watching video materials and research protocol, three experts carried out selecting phrases uttered by adolescents in different emotional states. The material was annotated on three states: “comfort — neutral (calm) — discomfort”, previously used when studying the reflection of the emotional state of 4–7-year-old children in the characteristics of their voice and speech [15]. For each adolescent, 5 phrases were selected (2 in the state of comfort, 2 in discomfort, 1 in the neutral state), the total number of phrases is 90. The phrases did not contain linguistic information clearly indicating the speaker’s gender or age.

The phrases were included in three test sequences, each test sequence contained 30 phrases. Each phrase was presented once, the interval between the phrases was 5 s. The presentation of test sequences was carried out in an open field to groups of listeners, the number of listeners in each group was no more 10 people.

The listeners were adult Russian native speakers ($n = 70$, 18.2 ± 1.0 years old) and speakers of other languages who are not Russian native speakers (foreigners) ($n = 70$, 21.0 ± 2.9 years old). All the listeners did not have diagnosed hearing impairment, and some ($n = 20$) were checked thresholds of hearing using tonal audiometry.

The speech intensity level during playback was 60–70 dB. The experiment was carried out in a classroom, the noise level in which did not exceed 20 dB, in an open field through LOGITECH S120 speaker set (power 2.3 W, frequency range 50 Hz–20 kHz). There were no significant differences between male and female listeners in recognizing in accordance with the objectives, and therefore the data are presented together.

The task to the listeners was to recognize the speaker’s emotional state, determine the meaning of what the adolescent said, the speaker’s gender and age.

Mimic facial movements of adolescents manifested during the verbal response were analyzed in the FaceReader 8.0 software (Noldus Information Technology, the Netherlands). The results obtained for every adolescent were summed and averaged, then the emotional states presented in the software were resolved into 4 states — comfort, neutral, discomfort, and other.

Analysis of speech material was carried out in the Cool Edit Pro sound editor. The phrase duration, the pause before the child’s response to the experimenter’s question, the pause in the phrase, average pitch values in the phrase, minimum and maximum pitch values, the number of words and syllables in the phrase, speech rate were determined for each phrase. Speech rate was determined as the number of syllables uttered per second without excluding pauses in speech [26].

Linguistic analysis of dialogues between adolescents and the experimenter was conducted. In the speech of every adolescent, the frequency of words reflecting comfort and discomfort was calculated. The ratio of words reflecting comfort and discomfort to the total number of words with emotional coloring was defined.

Statistical data analysis was performed in the STATISTICA 10.0 software using the non-parametric Mann–Whitney test and Discriminant analysis.

All procedures were approved by the Health and Human Research Ethics Committee (HHS, IRB 00003875, St. Petersburg State University) and written informed consent was obtained from parents of the child participant.

Table 1. Confusion matrices for the recognition of the emotional state of adolescents by native Russian-speaking and foreign listeners, % correct answers

	Russian speakers			Speakers of other languages		
	comfort	neutral	discomfort	comfort	neutral	discomfort
Comfort	62	22	16	48	33	19
Neutral	46	37	17	44	41	15
Discomfort	8	41	51	17	36	47

Table 2. Confusion matrices for the recognition of the emotional state of girls and boys by Russian and foreign listeners, % correct answers

	Russian speakers					
	girls			boys		
	comfort	neutral	discomfort	comfort	neutral	discomfort
Comfort	69	21	10	55	22	23
Neutral	45	36	19	47	38	15
Discomfort	10	34	56	7	52	41
	Speakers of other languages					
	girls			boys		
	comfort	neutral	discomfort	comfort	neutral	discomfort
Comfort	56	29	15	41	37	22
Neutral	52	34	14	35	48	17
Discomfort	18	37	45	15	36	49

RESULTS

The perceptual experiment showed that native Russian speakers and speakers of other languages were able to assess correctly the emotional state of the adolescent. The success in recognizing emotional states was higher among Russian speakers compared to speakers of other languages. Russian-speaking listeners defined correctly the state of comfort in 62% (speakers of other languages in 48%), the state of discomfort in 51% (speakers of other languages in 47%). The neutral state of the adolescent was better recognized by the speakers of other languages – 41% (Russian speakers – 37%) (Table 1).

Russian listeners recognized the state of comfort and discomfort in girls better than in boys: 69 and 56% of correct answers for phrases uttered by girls in the state of comfort and discomfort, respectively; 55 and 41% – by boys. There were no differences in recognizing the neutral state; the listeners correctly identified the neutral state in 36% in girls and 38% of cases in boys. Speakers of other languages better recognized the state of comfort in girls (56%, boys – 41%); the discomfort and neutral state – in boys (49 and 48% respectively, girls – 45 and 34%) (Table 2).

Analysis of mimic facial movements of children showed that all children most often demonstrated the neutral state (Table 3). There were no significant differences between adolescents depending on gender and age.

In this study, listeners identified only three speaker's states via speech – comfort, neutral, and discomfort. Therefore, the results of analysis of mimic facial movements are also presented for three states: comfort–neutral–discomfort. The states “sad”, “scared”, “angry”, and “disgusted” are combined into the state of discomfort, the state “happy” is selected as the state of comfort. The state “surprised” is assigned to the other group as surprise can accompany both the comfort and discomfort state (Fig. 1).

Table 3. Definition of the emotional state of adolescents by their mimic facial movements, %

	Neutral	Happy	Sad	Scared	Angry	Surprised	Disgusted	Other
Female	68.7	7.5	5.9	4.7	1.8	2.0	0.8	8.7
Male	67.3	7.0	5.7	4.2	5.2	2.6	0.0	8.0

Table 4. Recognition of age of adolescents by native Russian-speaking and foreign listeners

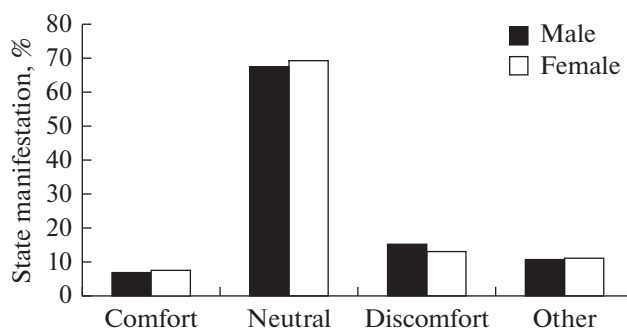
Gender	Girls			Boys		
real age	14	15	16	14	15	16
Russian speakers	14.7 ± 0.6	15.1 ± 0.4	15.0 ± 0.4	15.0 ± 0.4	15.4 ± 0.2	15.4 ± 0.3
Speakers of other languages	14.6 ± 0.5	15.0 ± 0.3	14.9 ± 0.4	14.7 ± 0.4	15.1 ± 0.3	15.2 ± 0.4

The speaker's emotional state is recognized by listeners via speech more effectively than via mimic facial movements. This may indicate that data on mimic facial movements are not enough to recognize the emotional state and they should be added by a speech message.

In addition to recognizing the emotional state, the listeners were given the task of recognizing the adolescent's gender and age. All the listeners with probability 0.75–1.0 were revealed to recognize correctly the adolescent's gender for all phrases used in the test, but in general, Russian speakers identified the gender better ($p < 0.0001$, Mann–Whitney test) than speakers of other languages – 97.2 ± 5.0 and $91.6 \pm 5.9\%$, respectively. When recognizing the adolescent's age, there were no differences between Russian speakers and speakers of other languages, there was no relationship between the adolescent's state and age determined by the listeners (Table 4). Meanwhile, it was shown that speakers of other languages more often found it difficult to choose the adolescent's age (13.8%) vs. Russian speakers (3%).

Additionally, Russian-speaking listeners had to indicate whether they understood the lexical meaning of the phrase. With probability of 0.75–1.0, listeners correctly recognized 88.9% of the phrases contained in the test sequences.

Instrumental analysis showed that there were no significant differences in duration of phrases uttered by adolescents in different emotional states and in duration of phrases uttered by boys and girls. The duration of phrases uttered by boys aged 14–16 years is 3454 ms in the state of comfort, 3907 ms in the neutral state, 5041 ms (median values) in the state of discomfort; by girls aged 14–16 years is 3920.5 ms in comfort, 3544 ms in the neutral state, 6974 ms in discomfort (Fig. 2).

**Fig. 1.** Manifestation of the emotional state in mimic facial movements of adolescents, % Horizontal axis – state, vertical – state manifestation, %. Black columns – data for boys, white – girls.

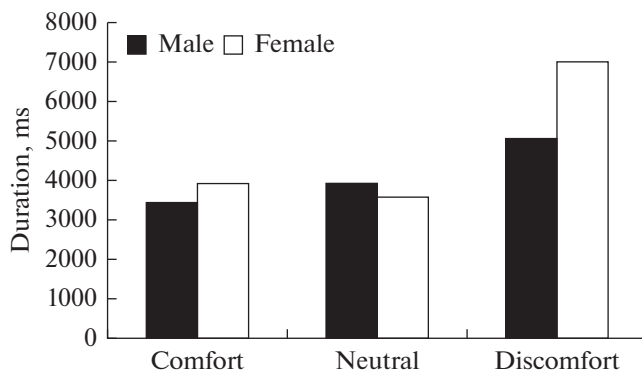


Fig. 2. Duration of phrases uttered by boys and girls in different emotional states. Horizontal axis – state, vertical – phrase duration, ms. Black columns – data for boys, white – for girls.

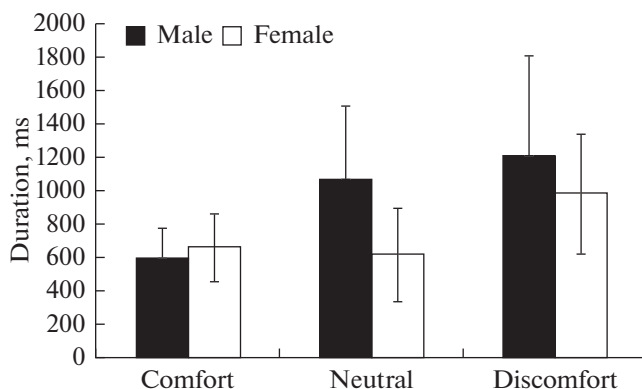


Fig. 3. Pause duration in phrases uttered by boys and girls in different emotional states. Horizontal axis – state, vertical – pause duration, ms. Black columns – data for boys, white – for girls.

Pause duration in phrases uttered by adolescents in different emotional states was determined. The pauses in the phrases uttered by boys are 597 ± 173 ms in comfort, 1063 ± 442 ms in the neutral state, 1213 ± 594 ms in discomfort. The pauses in the phrases uttered by girls are 654 ± 204 ms in comfort, 616 ± 280 ms in the neutral state, 981 ± 359 ms in discomfort. There were no significant differences in the pause duration in boys and girls, in the pause duration in the phrases uttered by adolescents in different emotional states (Fig. 3).

Speech rate, which is defined as the number of syllables uttered per second, in boys was 4.69 syllables per second for phrases spoken in the state of comfort, 5.25 syllables per second in the neutral state, and 4.87 syllables per second in the state of discomfort. In girls, speech rate was 5.24 syllables per second for phrases uttered in comfort, 5.54 syllables per second in the neutral state, 5.53 syllables per second in discomfort. When comparing the speech rate, no significant differences were revealed between boys and girls, between different emotional states, and between adolescents of different ages (Fig. 4).

Average, minimum, and maximum pitch values for the phrase were determined. It was found that average pitch values in the phrases uttered by boys are 212 ± 48 Hz in comfort, 187 ± 53 Hz in the neutral state, 187 ± 59 Hz in discomfort; by girls – 229 ± 33 Hz in comfort, 217 ± 23 Hz in the neutral state, 209 ± 23 Hz in discomfort. The average pitch values in

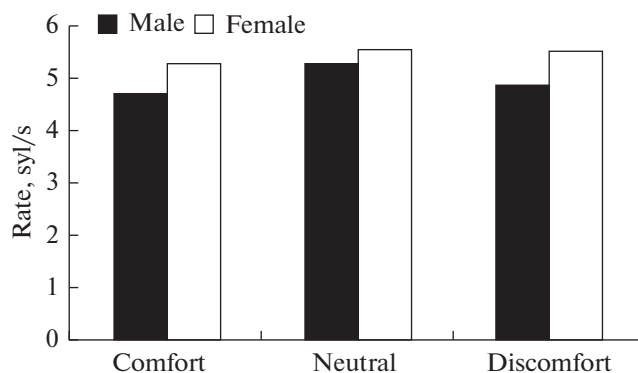


Fig. 4. Speech rate in phrases uttered by boys and girls in different emotional states. Horizontal axis – state, vertical – speech rate, syllables per second (syl/s). Black columns – data for boys, white – for girls.

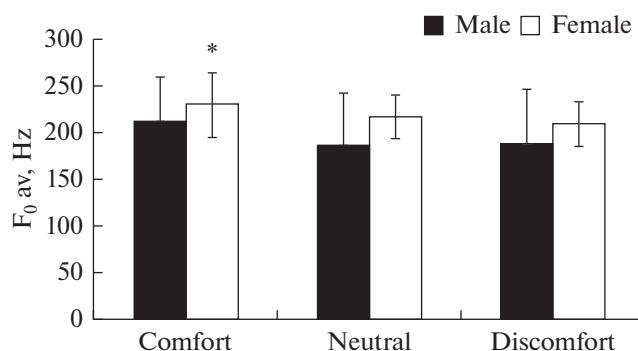


Fig. 5. Average pitch values in phrases uttered by boys and girls in different emotional states. Horizontal axis – state, vertical – pitch, Hz. Black columns – data for boys, white – for girls. * $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

phrases uttered by girls in the state of comfort are revealed to be significantly higher ($p < 0.05$) than the average pitch values in phrases uttered in discomfort. No significant differences in pitch values in boys and girls, in pitch values in the phrases uttered by boys in different emotional states were found (Fig. 5).

The pitch range values in phrases uttered by boys and girls in different emotional states were calculated. In boys, the pitch range values are 180 ± 19 Hz in comfort, 70 ± 31 Hz in the neutral state, 132 ± 33 Hz in discomfort. In girls, the pitch range values are 138 ± 25 Hz in comfort, 59 ± 13 Hz in the neutral state, and 96 ± 19 Hz in discomfort.

It was found that, in both boys and girls, the pitch range values in phrases uttered in the state of comfort are significantly higher ($p < 0.01$ in boys, $p < 0.05$ in girls – Mann–Whitney test) than in the neutral state. There were no significant differences between the states of comfort and discomfort, between discomfort and the neutral state, between boys and girls (Fig. 6).

Discriminant analysis revealed the relationship between the emotional state and minimum pitch values $F(32,144) = 2.7350$ $p < 0.001$ (Wilks' Lambda: 0.386 $p < 0.00001$): in the states of comfort and discomfort, minimum pitch values are higher than in the neutral state; between gender and minimum pitch values $F(16,73) = 4.2881$ $p < 0.0001$ (Wilks' Lambda: 0.515 , $p < 0.00001$): minimum pitch values in girls are higher than in boys.

Acoustic features of emotionally colored phrases recognized by listeners with low (0–0.49) and high probability (0.5–1.0) were determined. Significant differences ($p < 0.05$,

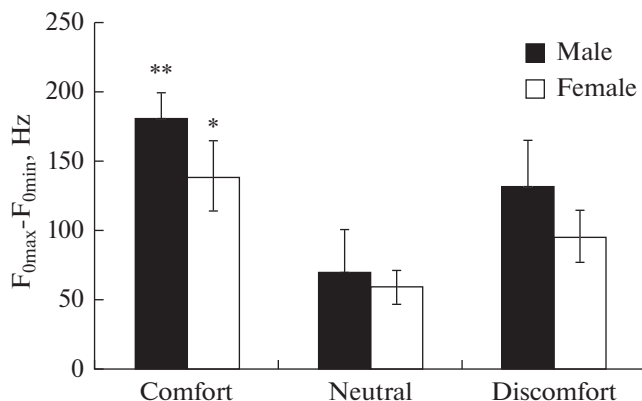


Fig. 6. Pitch range in phrases uttered by boys and girls in different emotional states. Horizontal axis – state, vertical – pitch, Hz. Black columns – data for boys, white – for girls. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, Mann–Whitney test.

Mann–Whitney test) in duration of phrases recognized with low and high probability were found. In boys, the duration of phrases uttered in discomfort and the neutral state and recognized with high probability is lower ($p < 0.05$) than the duration of phrases recognized with low probability; no significant differences for the state of comfort were found. In girls in the state of comfort, the phrases recognized with high probability were longer ($p < 0.05$) than the phrases recognized with low probability; no significant differences for discomfort and the neutral state were found (Fig. 7).

Significant differences in average pitch values, pitch range values, speech rate, and the sum of pauses in phrases between phrases recognized by listeners with high and low probability were not found.

Linguistic analysis of utterances of adolescents included in test sequences for the perceptual experiment was conducted to select emotionally colored words. It was shown that words reflecting the state of comfort prevailed in the speech of adolescents of all ages (Fig. 8). In the speech of boys, the number of words reflecting the state of comfort was 65.2% of the total number of emotionally colored words, the state of discomfort – 34.8%. In the speech of girls, the number of words reflecting the state of comfort was 53.8%, the state of discomfort – 46.2%. The most frequent words reflecting the state of comfort in adolescents of both genders were “like” (with frequency 1.34 and 2.14 in boys and girls, respectively), “love” (1.11 and 0.66), “good” (0.89 and 0.66), “favorite” (0.45 and 0.33). The most frequent words reflecting the state of discomfort were “dislike” (with frequency 0.67 and 0.82 in boys and girls, respectively), “hate” (0.45 and 0.33).

DISCUSSION

In this study, for the first time, the data on peculiarities of recognition of the emotional state of adolescents aged 14–16 years via speech features were obtained. The situation of a dialogue with the experimenter was used in the work to compare the speech material of adolescents of different age and gender. Participants in the study were two groups of listeners – native Russian speakers and speakers of other languages. This was done in order to assess the contribution of linguistic and acoustic information in the recognition of the emotional state of adolescents. The Russian-speaking listeners recognize the emotional state of adolescents better than speakers of other languages. It may indicate that, while recognizing the emotional state, they are likely to rely on acoustic and linguistic information vs. speakers of other languages who rest only on acoustic information. Our findings that listeners recog-

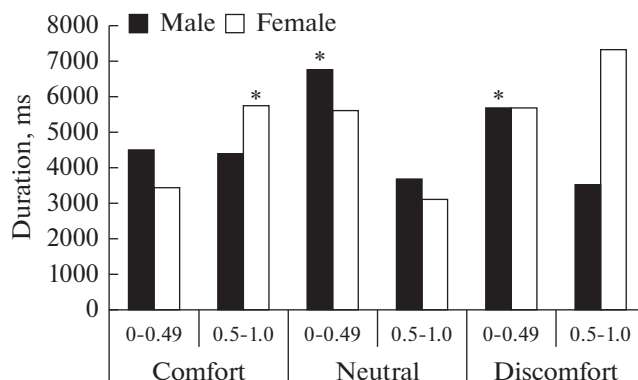


Fig. 7. Duration of phrases recognized by listeners with high and low probability. Horizontal axis – speaker's state and recognition probability, vertical – duration, ms. Black columns – data for boys, white – for girls. * – $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

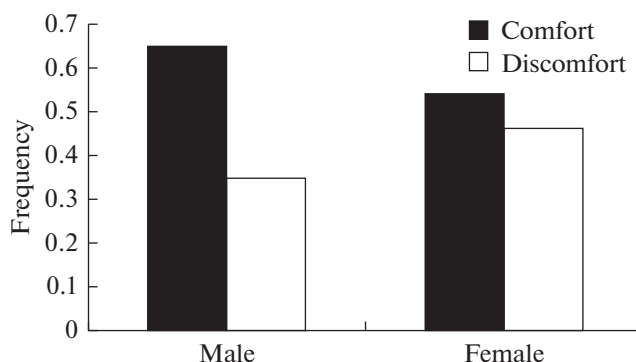


Fig. 8. Frequency of words with different emotional coloring in the speech of boys and girls. Black columns – the state of comfort, white – discomfort. Horizontal axis – adolescents' gender, vertical – frequency.

nize the emotional state in the native language better than speakers of other languages are confirmed by the literature data [5, 12].

The results obtained in the work about the level of recognition of the emotional state of children correlate to the results obtained for 4–7-year-old children [15]. However, in the speech of adolescents, the neutral state is recognized worse than in the speech of 4–7-year-old children. Our results on the speaker's emotional state recognition level are correlated with the results obtained on the material of the English and Swedish languages, for which the recognition probability of the emotional state in speech is about 60% [27] – in our work, the recognition probability of the state of comfort was 61%, discomfort – 51%. The Russian-speaking listeners unambiguously (with probability 0.75–1.0) recognize the emotional state in 26% of the phrases uttered by adolescents. The speakers of other languages with probability 0.75–1.0 did not recognize a single phrase. These difficulties can be explained, on the one hand, by the peculiarities of culture and education of Russian-speaking adolescents [18] who try to restrain their emotions in the dialogue with the experimenter, on the other hand, by the inability of speakers of other languages to recognize linguistic information, contained in a speech message.

Listeners better recognize the gender while listening to the phrases of adolescents than listening to the speech of 4–7-year-old children (with recognition probability of 64–71% for different emotional states). However, our study revealed no influence of the adolescent's emotional state on the recognition of gender. An increase in the recognition accuracy of age compared with the results of recognition of the age of preschoolers has been shown.

Recognizing the emotional state by mimic facial movements revealed that the majority of emotional states in adolescents are recognized as a neutral emotional state. The absence of vivid emotion manifestations may indicate the peculiarities of the behavior of adolescents due to the social environment or specificities of the experiment (the recordings were carried out in the school building) [14].

In our earlier works, we showed the dynamics of changes in duration and pitch with the age of children [28]. It was shown that the duration of stressed and unstressed vowels in children does not significantly change, starting from the age of 13 years [21]. The acoustic parameters of vowels from a neutral (calm) speech of 14–16-year-old teens are described [29]. We found that phrases uttered in the state of discomfort are characterized by a longer duration than phrases uttered in comfort and the neutral state, but these differences are not significant. For the Swedish and Spanish languages, it was shown [7] that emotional speech differed from speech uttered in the neutral state in the speech rate; our study did not reveal this correlation. It was found that, for adult speech, there were differences in the speech rate between men and women depending on their emotional state [10]. We did not identify these distinctions for speech of adolescents. Our findings correspond to the speech rate values, which are described for adult Russian speech [30]. Significant differences in the average pitch values, observed in the speech of younger children, between phrases uttered by adolescents in different emotional states were not found. The correlation between the emotional and neutral speech of adolescents according to pitch range values was revealed, which is confirmed by the results previously obtained for child speech [15]. These results correspond to the results on the material of the Japanese language. It is shown that both pitch parameters and parameters of the vowel formant frequencies F1 and F2 influence the speaker's emotion perception, but pitch range provides key input; the formant frequencies values affect the emotional coloring perception in case of fixed pitch values. It is also indicated that emotion perception can be influenced by the individual characteristics of the speaker, but even in this case pitch and its range make a statistically more significant contribution to the emotion determination than the variability of formant frequencies or vowel duration [31].

The determination of characteristics that are sufficient for recognition of the emotional state is necessary to develop automatic speech recognition systems [11], to study recognition of the emotional state of people with developmental disabilities [32]. Automatic recognition of emotions is important for creating human-computer interfaces, the learning process, monitoring for older adults, interactive entertainment [33]. Artificial intelligence systems based on various parameters of a speech message (for example, pitch, spectral characteristics, linguistic information) are extensively used in automatic speech recognition systems [34]. Different approaches to machine learning of emotion recognition only according to the paralinguistic information contained in speech are exploited [35]. It is shown as well that not all of the existing corpora of sounding emotional speech are suitable for learning artificial intelligence systems.

It was shown that, for the English language, the particular difficulty in recognizing the speaker's emotions is the distinction of those emotional states that have similar acoustic features [34]. The use of a comprehensive assessment of the speaker's acoustic characteristics is thought to be necessary for assessing the emotional state [11]. Some works [36] indicate that Russian speakers use verbal means of expressing emotions in combination with non-verbal ones.

Most of the works are now dedicated to the problems of emotions formation and manifestation in adolescents with various disorders, for example, with obsessive-compulsive

disorder [37], manifestations of depression [38], and experiencing the difficulties with control and emotions manifestations [39].

Therefore, the obtained results may be useful for studying the development of emotions in ontogenesis in typical (control) and atypical development.

CONCLUSIONS

In the work, original data on the recognition of the emotional state of adolescents via their speech characteristics by Russian native speakers and speakers of other languages were obtained. Listeners have difficulty in recognizing the emotional state of adolescents. Nevertheless, Russian-speaking listeners recognize the emotional state better than foreigners. It is shown that adults recognize the state of comfort better than discomfort. Russian listeners cope with the emotion recognition better than foreigners. In recognizing, Russian listeners are likely to rely on acoustic and linguistic information, speakers of other languages rest on acoustic features of adolescents' speech. Phrases uttered in comfort are characterized by a wider pitch range vs. phrases uttered in the neutral state. It was revealed that the phrases of girls uttered in comfort have significantly higher average pitch values vs. discomfort. The phrases for which the emotional state is recognized with high probability differ in duration from phrases recognized with low probability. Phrases uttered by boys, for which the emotional state is recognized with high probability, are shorter, phrases uttered by girls are longer. The Russian-speaking listeners recognize the emotional state of girls better than the emotional state of boys. It was revealed that all the listeners recognize correctly the gender of adolescents.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study is financially supported by the Russian Science Foundation (project № 18-18-00063).

REFERENCES

1. Barker R.M., Bialystok E. Processing differences between monolingual and bilingual young adults on an emotion n-back task. *Brain Cogn.* 134: 29–43. 2019.
2. Bernhard A., van der Merwe C., Ackermann K., Martinelli A., Neumann I.D., Freitag C.M. Adolescent oxytocin response to stress and its behavioral and endocrine correlates. *Horm. Behav.* 105: 157–165. 2018.
3. Darwin Ch., Ekman P., Prodger P. *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. 3rd edn. London. Harper Collins. 1998.
4. Thompson W.F., Balkwill L.-L. Decoding speech prosody in five languages. *Semiotica*. 407–424. 2006.
5. Paulmann S., Uskul A. K. Cross-cultural emotional prosody recognition: Evidence from Chinese and British listeners. *Cognition and Emotion*. 28: 230–244. 2014.
6. Chronaki G., Wigelsworth M., Pell M.D., Kotz S.A. The development of cross-cultural recognition of vocal emotion during childhood and adolescence. *Scient. Rep.* 8(1): 8: 8659. 2018.
7. Abelin Å., Allwood J. Cross linguistic interpretation of emotional prosody. *ISCA workshop on Speech and Emotion*. Newcastle. Northern Ireland. 110–113. 2000.
8. Matsumoto D., Franklin B., Choi J.-W., Rogers D., Tatani H. Cultural influences on the Expression and Perception of Emotion. In: W.B. Gudykunst, B. Moody (eds.) *Handbook of International and Intercultural Communication*. Sage Publications. 2002.
9. Abelin Å. Cross-cultural multimodal interpretation of emotional expressions—an experimental study of Spanish and Swedish. In: *Proc. Speech Prosody*. ISCA. March 23–26. Naran. 2004.
10. Ververidis D., Kotropoulos C. Emotional speech recognition: Resources, features, and methods. *Speech Commun.* 48 (9): 1162–1181. 2006.
11. Yamazaki T., Nakayama M. Extracting acoustic features of Japanese speech to classify emotions. *Communication papers of the Federated Conference on Computer Science and Information Systems*. ACSIS. 13: 141–145. 2017.
12. Jiang X., Paulmann S., Robin J., Pell M.D. More than accuracy: Nonverbal dialects modulate the time course of vocal emotion recognition across cultures. *J. Exp. Psychol.: Human Perception and Performance*. 41: 597–612. 2015.
13. Lyakso E. Characteristics of infant's vocalizations during the first year of life. *International J. Psychophysiol.* 30: 150–151. 1998.
14. Lyakso E., Frolova O. Emotion state manifestation in voice features: chimpanzees, human infants, children, adults. *Lecture Notes in Computer Science*. 9319. 201–208. 2015.

15. Kaya H., Salah A.A., Karpov A., Frolova O., Grigorev A., Lyakso E. Emotion, age, and gender classification in children's speech by humans and machines. *Comput. Speech Lang.* 46: 268–283. 2017.
16. Yildirim S., Narayanan S., Potamianos A. Detecting emotional state of a child in a conversational computer game. *Comput. Speech Lang.* 25 29–44. 2011.
17. Lyakso E., Frolova O., Dmitrieva E., Grigorev A., Kaya H., Salah A.A., Karpov A. EMOCHILDRU: emotional child russian speech corpus. *Lecture Notes in Computer Science.* 9319: 144–152. 2015.
18. Иванова Е.С. Половозрастные особенности эмоционального интеллекта и его структурных компонентов. Образование и наука. 7(86): 65–74. 2011. [Ivanova E.S. Gender and age characteristics of emotional intelligence and its structural components. *Education and sci.* 7(86): 65–74. 2011. (In Russ)].
19. Ляксо Е.Е., Ноздрачев А.Д., Соколова Л.В. Возрастная физиология и психофизиология: учебник для среднего профессионального образования. М. Юрайт. 2016. [Lyakso E.E., Nozdrachev A.D., Sokolova L.V. *Vozrastnaya fiziologiya i psihofiziologiya: uchebnik dlya srednego professional'nogo obrazovaniya*. [Age physiology and psychophysiology: the textbook for undergraduate academic. Moscow. Urait. 2016. (In Russ)].
20. Markova D., Richer L., Pangelian M., Schwartz D., Leonard G., Perron M., Pike G.B., Veillette S., Chakravarty M., Pausova Z., Paus T. Age- and sex-related variations in vocal-tract morphology and voice acoustic during adolescence. *Hormones and Behavior.* 84–96. 2016.
21. Grigorev A., Frolova O., Lyakso E. Acoustic features of speech of typically developing children aged 5–16 years. *Communic. Comput. Informat. Sci. AINL.* 930: 152–163. 2018.
22. Ляксо Е.Е. Вокально-речевое развитие ребенка в первый год жизни. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 89(2): 207–218. 2003. [Lyakso E.E. Vocal and speech development of a child in the first year of life. *Russ. J. Physiol.* 89(2): 207–218. 2003. (In Russ)].
23. Pavlikova M.I., Makarov A.K., Lyakso E.E. Acoustic characteristics of vocalization reflecting the states of discomfort and comfort in babies aged three and six months *Neurosci. Behav. Physiol.* 47. (1): 40–46. 2017.
24. Ляксо Е.Е., Фролова О.В., Григорьев А.С., Соколова В.Д., Яроцкая К.А. Распознавание взрослыми эмоционального состояния типично развивающихся детей и детей с расстройствами аутистического спектра. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 102(6): 729–741. 2016. [Lyakso E.E., Frolova O.V., Grigorev A.S., Sokolova V.D., Yarotskaya K.A. Recognition by adults of emotional condition of typically developing children and children with autism spectrum disorders. *Russ. J. Physiol.* 102(6): 729–741. 2016. (In Russ)].
25. Lyakso E., Frolova O., Karpov A. A new method for collection and annotation of speech data of atypically developing children. In: *Proc. of Internat. IEEE Conference on Sensor Networks and Signal Processing (SNSP 2018).* 175–180. Xi'an. China. 2018.
26. Goldman-Eisler F. Speech Analysis and Mental Processes. *Language and Speech.* 1(1): 59–75. 1958.
27. Juslin P.N., Laukka P. Impact of intended emotion intensity on cue utilization and decoding accuracy in vocal expression of emotion. *Emotion.* 1(4): 381–412. 2001.
28. Lyakso E.E., Grigor'ev A.S. Dynamics of the duration and frequency characteristics of vowels during the first seven years of life in children. *Neurosci. Behav. Physiol.* 45 (5): 558–567. 2015.
29. Григорьев А.С., Ляксо Е.Е. Акустические характеристики гласных из слов детей 14–16 лет. Учен. зап. физического факультета московского университета. 5: 1750202. 2017. [Grigorev A.S., Lyakso E.E. Acoustic features of vowels from the words of children 14–16 years. *Sci. notes Phys. Dep. Mosc. University.* 5: 1750202. 2017. (In Russ)].
30. Stepanova S. Russian spontaneous speech – based on the speech corpus of Russian everyday interaction. In: *ICPhS XVII. Hong Kong.* 17–21 August 2011. 1902–1905. 2011.
31. Li Y., Li J., Akagi M. Contributions of the glottal source and vocal tract cues to emotional vowel perception in the valence-arousal space. *J. Acoust. Soc. Am.* 144(2): 908. 2018.
32. Schelinski S., von Kriegstein K. The relation between vocal pitch and vocal emotion recognition abilities in people with autism spectrum disorder and typical development. *J. Autism and Development. Disorders.* 68–82. 2018.
33. Papakostas M., Siantikos G., Giannakopoulos T., Spyrou E., Sgouropoulos D. Recognizing Emotional States Using Speech Information. *GeNeDis 2016.* 155–164. 2017.
34. Jin Q., Li C., Chen S., & Wu H. Speech emotion recognition with acoustic and lexical features. In: *2015 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP),* 4749–4753. 2015.
35. Stolar M., Lech M., Bolia R., Skinner M. Acoustic characteristics of emotional speech using spectrogram image classification. *12th Internat. Conference on Signal Proc. Commun. Systems (ICSPCS).* Cairns. Australia. 17–19 December 2018. 1–6. 2018.
36. Коновалова Ю.О. Вьетнамцы и русские: отношение к эмоциям как проявление национальной культуры. *Язык и культура.* 38: 51–69. 2017. [Konovalova Y.O. Vietnamese and Russian: related to emotions as an expression of national culture. *Lang. and Culture.* 38: 51–69. 2017. (In Russ)].
37. Yazici K.U., Yazici I.P. Decreased theory of mind skills, increased emotion dysregulation and insight levels in adolescents diagnosed with obsessive compulsive disorder. *Nord. J. Psychiatry.* 73(7): 462–469. 2019.
38. Durbeej N., Sörman K., Norén Selinus E., Lundström S., Lichtenstein P., Hellner C., Halldner L. Trends in childhood and adolescent internalizing symptoms: results from Swedish population based twin cohorts. *BMC Psychol.* 2;7(1): 50. 2019.

39. Zheng Y., Asbury K. Genetic and Environmental Influences on Adolescent Emotional Inertia in Daily Life. *J. Youth Adolesc.* 48(9): 1849–1860. 2019.

АКУСТИЧЕСКИЕ И ПЕРЦЕПТИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ РЕЧИ ПОДРОСТКОВ 14-16 ЛЕТ

А. С. Григорьев^{а, *}, В. А. Городный^а, О. В. Фролова^а, А. М. Кондратенко^а,
В. Д. Долгая^а, Е. Е. Ляксо^{а, **}

^а*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

^{*}*E-mail: a.s.grigoriev89@gmail.com*

^{**}*E-mail: lyakso@gmail.com*

Цель исследования — описание перцептивных и акустических характеристик эмоциональной спонтанной речи подростков 14–16 лет. В исследовании приняли участие 18 подростков 14–16 лет (9 мальчиков и 9 девочек, по три человека в каждый возрастной срез). Проведен перцептивный анализ речи детей взрослыми (70 носителей русского языка и 70 носителей других языков) с целью определения эмоционального состояния по характеристикам голоса и речи. Инструментальный и лингвистический анализ использован для определения акустических признаков и лингвистической информации, на которые опираются слушатели при распознавании состояния подростков. Показано, что слушатели испытывают трудности в распознавании эмоционального состояния подростков, но при этом русскоговорящие слушатели распознают эмоциональное состояние лучше (26% фраз, распознанных с вероятностью 0.75–1), чем носители других языков. Взрослые лучше распознают состояние комфорта, чем дискомфорта, русские слушатели лучше, чем иностранные. При распознавании русские аудиторы опираются на акустическую и лингвистическую информацию, носители других языков — на акустические параметры речи подростков. Фразы, произнесенные в комфортном состоянии, характеризуются большей вариативностью частоты основного тона по сравнению с фразами, произнесенными в нейтральном состоянии. Выявлено, что фразы девочек, произнесенные в комфортном состоянии, имеют значимо более высокую среднюю частоту основного тона по сравнению с дискомфортным состоянием. Не выявлено значимых различий между мальчиками и девочками по акустическим характеристикам эмоциональной речи. Значения длительности фраз и вариативности частоты основного тона могут быть заложены в системы автоматического распознавания эмоционального состояния говорящего по речи в качестве дополнительных информативных признаков. В работе обсуждается специфика проявления эмоциональных состояний подростками и возможности дальнейшего использования полученных результатов.

Ключевые слова: речь, эмоции, акустические характеристики, типичное развитие, перцептивный анализ

ЦИТИРОВАТЬ:

Григорьев А.С., Городный В.А., Фролова О.В., Кондратенко А.М., Долгая В.Д., Ляксо Е.Е. Акустические и перцептивные характеристики эмоциональной речи подростков 14–16 лет. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(3): 329–341.

DOI: 10.31857/S086981392003005X

TO CITE THIS ARTICLE:

Grigorev A.S., Gorodnyi V.A., Frolova O.V., Kondratenko A.M., Dolgaya V.D., Lyakso E.E. Acoustic and Perceptual Features of the Emotional Speech of Adolescents Aged 14–16 Years. *Russian J. of Physiology.* 106(3): 329–341.

DOI: 10.31857/S086981392003005X

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЭГ В ПРОЦЕССЕ КРАТКОВРЕМЕННЫХ
САМОПРОИЗВОЛЬНЫХ ПРОБУЖДЕНИЙ РАЗНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ
ПРИ ИЗМЕНЕНИЯХ В ПСИХОМОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ,
ВЫЗВАННЫХ ЗАСЫПАНИЕМ**

© 2020 г. Е. А. Черемушкин^{1, *}, Н. Е. Петренко¹, М. С. Генджалиева²,
Д. Г. Малахов³, В. Б. Дорохов¹

¹*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

²*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия*

³*НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия*

**E-mail: ivnd@mail.ru*

Поступила в редакцию 23.12.2019 г.

После доработки 20.01.2020 г.

Принята к публикации 21.01.2020 г.

Во время дневного сна у 17 здоровых испытуемых изучали изменения спектральных характеристик ЭЭГ в периоды восстановления выполнения психомоторного теста при спонтанных кратковременных пробуждениях. Тест содержит два последовательно чередующихся задания: счет “про себя” от 1 до 10, сопровождаемый синхронными нажатиями на кнопку, и только счет “про себя”. Монотонный характер теста ведет к быстрому снижению уровня бодрствования и в большинстве случаев вызывает засыпание. Появление нажатий является поведенческим показателем возобновления когнитивных процессов, заторможенных во время сна. Сравнивали ситуации с малым (2–5) и относительно большим (6–10) числом нажатий на кнопку. Началу нажатий предшествует появление генерализованного альфа-ритма, который снижается в процессе выполнения психомоторной деятельности. Его мощность при этом всегда больше в ситуации с более длительными периодами наблюдаемой поведенческой активности. Окончание нажатий возвращает значения мощностных показателей альфа-активности к тем, которые наблюдались до пробуждения. Альфа-ритм ЭЭГ при сниженном уровне бодрствования во время кратковременных пробуждений, по-видимому, характеризует действие таламо-кортикального активирующего механизма и является необходимым условием для моторного взаимодействия организма с внешней средой. Отсутствие различий в лобных областях на начальном этапе при осуществлении кратковременной и более длительной деятельности, приближающейся к выполнению полного цикла нажатий, позволяет предположить, что в этот период они задействованы в одинаковой степени, независимо от числа нажатий. Этот результат может служить косвенным подтверждением того, что наблюдаемая психомоторная активность, даже при малом числе нажатий, не является автоматической, бессознательной, а сопровождается сниженным, фрагментарным сознанием.

Ключевые слова: дневной сон, психомоторный тест, спонтанное пробуждение, инерция сна, ЭЭГ, альфа-ритм, сознание

DOI: 10.31857/S0869813920030036

Исследования переходных состояний цикла “сон–бодрствование” в основном касаются процессов засыпания и в существенном меньшей степени — пробужде-

ния. Последнее изучается преимущественно в опытах с ночным сном и только в редких случаях, по условиям эксперимента — существенно позже самого момента пробуждения, сопровождается когнитивной активностью испытуемого.

Показаны особенности активации различных структур мозга при пробуждении из разных стадий сна [1]. По сравнению с состоянием покоя перед засыпанием, дефолтные (default-mode network) и гиппокампальные нейронные сети при пробуждении сохраняли одинаковый уровень связности и спектральную мощность; в сенсорно-моторной сети эти показатели снижались, а связь таламуса с неокортексом существенно усиливалась. Самые существенные изменения при этом наблюдались тогда, когда просыпанию предшествовал глубокий сон [1]. Ведущая роль таламуса при пробуждении, а также наличие регионарной специфики в зависимости от того, было ли оно самопроизвольным или вызванным условиями эксперимента, выявлена при исследовании ночного сна у больных эпилепсией [2]. Зависимость частоты альфа-ритма от длительности пробуждений во время ночного сна показана в работе [3]. Краткие просыпания (менее 5 мин) сопровождались более низкими частотами альфа-активности по сравнению с длительными. При этом и в том, и в другом случае у здоровых испытуемых частота альфа-ритма была снижена по сравнению с состоянием спокойного бодрствования.

Особенности выполнения когнитивных задач после пробуждения исследуется преимущественно в парадигме “инерции сна”. Было показано, что после ночного сна его влияние на функциональное состояние головного мозга сохранялось по разным данным от 10 мин до нескольких часов. Оно отражалось в увеличении мощности низкочастотных составляющих ЭЭГ (1–9 Гц) и снижении мощности высоких частот — по сравнению с периодом перед засыпанием [4–7]. Самые существенные изменения в поведенческих показателях, умственной деятельности и функциональной связности мозга были отмечены при пробуждении из глубокого сна [7]. Уменьшение мощности ЭЭГ в процессе выполнения когнитивных задач после пробуждения по сравнению с их выполнением перед сном показано японскими исследователями [8]. Отметим, что сам переход от состояния сна к деятельности никто из этих авторов не исследовал.

Ранее в опытах с дневным сном мы исследовали активность мозга в периоды, предшествующие спонтанному пробуждению и восстановлению выполнения психомоторной деятельности [9]. В процессе пробуждения показан рост мощности ЭЭГ в дельта- и альфа-диапазонах, который, по всей вероятности, отражает действие таламо-кортикального активирующего механизма [1, 2, 10].

Целью нашей работы было исследование ЭЭГ-коррелятов, непосредственно предшествующих и сопровождающих короткие периоды поведенческой активности при пробуждении во время дневного сна. В задачи входил анализ амплитудно-частотных характеристик дельта- и альфа- ритмов ЭЭГ перед началом и в кратковременные периоды когнитивной деятельности, различающиеся по длительности восстановления психомоторного теста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые. 34 человека (26 женщин и 8 мужчин, возраст от 19 до 22 лет), практически здоровые люди, правши, студенты московских вузов. Все были ознакомлены с процедурой опыта и дали согласие на участие в нем. Исследование соответствовало этическим нормам Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000 г.

Процедура исследования. Время эксперимента: с 13.00 до 16.00. Продолжительность — от 55 мин до 1 ч 10 мин. Перед опытом для оценки параметров сна в ночь, которая предшествовала обследованию, испытуемый заполняли дневник сна, а для самооценки дневной сонливости — опросник KSS (Каролинскую шкалу сонливости).

Испытуемый располагался на кушетке в затемненном и звукоизолирующем помещении с комфортной температурой. В течение 5 мин проводилась запись ЭЭГ в состоянии спокойного бодрствования при закрытых глазах. Чтобы получить ряд последовательных периодов засыпания—пробуждения использовали непрерывно-дискретный психомоторный тест, предложенный нами ранее [9, 11, 12]. Испытуемый считал “про себя” от 1 до 10, при этом одновременно при каждом счете он нажимал на кнопку большим пальцем правой руки (1-я фаза теста), которая была закреплена на указательном пальце. Далее он продолжал считать “про себя” от 1 до 10, но уже без нажатий (2-я фаза). Чередование счета с нажатиями и без нажатий (1-я и 2-я фазы) длилось до тех пор, пока исследуемый не засыпал, или же до конца опыта. В случае засыпания и последующего самопроизвольного пробуждения он должен был возобновить выполнение заданий психомоторного теста. В инструкции, которая давалась после записи ЭЭГ с закрытыми глазами, подчеркивалось, что при просыпании необходимо сначала выполнять счет с нажатием на кнопку (1-я фаза) и только потом без нажатия.

В течение опыта с поверхности головы регистрировали ЭЭГ от 17 отведений, расположенных в соответствии со схемой 10–20% (F3, F4, F7, F8, Fz, C3, C4, Cz, T3, T4, P3, P4, Pz, T5, T6, O1, O2). Отведение было монополярным, референтный электрод — объединенный ушной. Также записывалась электроокулограмма (ЭОГ), миограмма (ЭМГ) и механограмма нажатий на кнопку. Регистрацию всех показателей проводили с помощью системы Neocortex-Pro (Neurobotics, Россия). Частота дискретизации — 250 Гц. Полоса пропускания частот: 0.5–70 Гц. ЭЭГ регистрировали с помощью шлема с хлорсеребряными электродами с сопротивлением, не превышающим 5 КОм.

Отбор и анализ данных. Выделяли испытуемых, которые при самопроизвольном пробуждении из второй стадии сна хотя бы по одному разу воспроизводили задание 1-й фазы психомоторного теста с меньшим (2–5) и большим (6–10) числом нажатий. Использование приема повторных наблюдений у одного и того же субъекта при сопоставлении характеристик альфа-ритма, сопровождающего эти разные по длительности поведенческие паттерны, позволяет избежать влияния на получаемые результаты различий в его мощности, которые присутствуют в ЭЭГ испытуемых. Этот прием также позволяет сопоставлять промежутки времени от появления широко распространенного по коре альфа-ритма до момента начала нажатий, которые варьируют от испытуемого к испытуемому и зависят от числа нажатий.

Рассматривали ситуации, при которых очередная последовательность нажатий фиксировалась в механограмме через минуту и более. Исключали тех, у кого разница между короткими и более продолжительными эпизодами реализации 1-й фазы теста после пробуждения была меньше 3 нажатий. Далее для последующего анализа у каждого испытуемого брали по одной реализации с меньшим и большим числом нажатий так, чтобы упомянутая разница была максимальной. Таким образом, мы в определенной мере разделяли уровни активации субъекта в эпизодах восстановления деятельности после пробуждения. В результате отобрали 17 человек (13 женщин и 4 мужчин, возраст от 19 до 22 лет). Средняя продолжительность ночного сна накануне опыта — 6.0 ± 0.5 ч, его качество и самочувствие после утреннего пробуждения оценивались испытуемыми как хорошее и удовлетворительное (3.8 ± 0.3 и 3.2 ± 0.3 соответственно, 5-балльные шкалы, 5 — наилучшая оценка). Уровень сон-

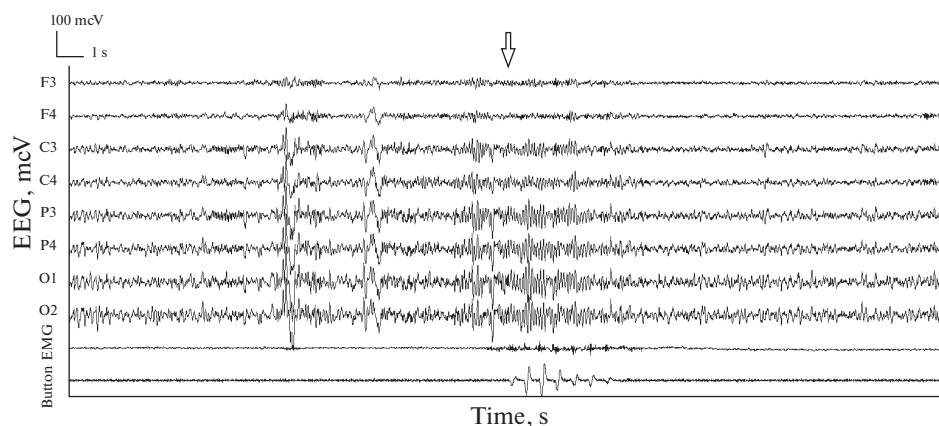


Рис. 1. Пример ЭЭГ, ЭМГ и механограммы при пробуждении и возобновлении выполнения психомоторного теста. Сверху вниз: отведения ЭЭГ, ЭМГ и механограмма. Вертикальными линиями отмечены 1-секундные интервалы времени. Стрелка — начало фиксации нажатий.

Fig. 1. An example of an EEG, EMG, and mechanograms on waking up and resuming a psychomotor test. From top to bottom: EEG, EMG and mechanogram leads. Vertical lines indicate 1-second time intervals. Arrow — the clicks fixation beginning.

ливости перед опытом — повышенный (5.3 ± 0.5 , 7-балльная шкала, 7 — самая высокая сонливость).

Анализировали 40-секундные отрезки записи ЭЭГ, на середину которых приходилось возобновление нажатий на кнопку. Для оценки амплитудных изменений электрических колебаний применяли метод анализа вариационных кривых [13]. Предварительно на основе Фурье-преобразования фильтровали отобранные отрезки в диапазонах 0.5–3.5, 4–7.5, 8–10.5 и 11–13.5 Гц (дельта-, тета-, низкочастотный и высокочастотный альфа-ритмы). Далее на 1-секундных интервалах со скользящим окном 100 мс и сдвигом 10 мс для каждого отведения ЭЭГ определяли функцию вариации и усредняли ее значения. По определению вариационная кривая является произведением амплитуды потенциала на его частоту. Однако, учитывая малые изменения частотной структуры электрических колебаний на относительно небольшом отрезке времени (1 с), можно говорить о ней как о показателе мощностного, амплитудного типа [13]. Впоследствии оказалось, что выбор относительно коротких 1-секундных временных интервалов в качестве эпохи анализа при статистической оценке изменений амплитудных характеристик ЭЭГ для данного исследования являлся избыточным. В связи с этим полученные значения функции вариации мы усредняли по 2 с. На результатах это не сказалось, зато на иллюстрирующих их рисунках сглаженные таким образом кривые стали лучше отражать тренды этих изменений. Полученные величины по каждому выделенному частотному диапазону анализировали с помощью дисперсионного анализа методом повторных измерений (ANOVA RM). При этом мы фокусировали внимание на интервале времени, сопоставимом с длительностью выполнения 1 фазы теста (10 с, или пять 2-секундных интервалов), т.е. периоде нажатий на кнопку после пробуждения. Рассматривали влияние на амплитудно-мощностные характеристики ЭЭГ факторов “психомоторная активность” (2 уровня: до начала нажатий и после), “длитель-

ность нажатий” (2 уровня: 2–5 и 6–10 нажатий), и “время” (5 уровней: пять 2-секундных временных отрезков). Анализ проводили как по усредненным амплитудным значениям всех отведений ЭЭГ для каждого отсчета (т.е. суммарно), так и по отдельности для каждого отведения. После анализа полученных результатов в данном дизайне дисперсионного анализа возникла необходимость дополнительной обработки с учетом их региональных особенностей. Дополнительно рассматривали влияние на вычисленные мощностные характеристики ЭЭГ факторов “регион отведения” (2 уровня: передне-центральный и каудальный) и “отведение ЭЭГ” (6 уровней: для передне-центрального региона – F3, F4, F7, F8, C3, C4; для каудального – P3, P4, T5, T6, O1, O2). Статистические результаты получали с использованием поправки Гринхауза—Гессера. На каждом интервале времени с помощью парного критерия Вилкоксона сравнивали характеристики исследуемых ритмов ЭЭГ. Все статистические вычисления проводили с помощью пакета программ SPSS 13.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В целом по всем отведениям показано влияние фактора “психомоторная активность” на мощность дельта-ритма ($F(1;16) = 20.0, p < 0.001$) и на уровне тенденции – на мощность альфа-ритмов обоих исследуемых диапазонов ($F(1;16) = 3.7, p = 0.07$ и $F(1;16) = 3.7, p = 0.07$ соответственно); фактора “длительность нажатий” на мощность низкочастотного и высокочастотного альфа-ритма ЭЭГ ($F(1;16) = 11.0, p = 0.004$ и $F(1;16) = 9.4, p = 0.007$ соответственно). Также для низкочастотного альфа-ритма на уровне тенденции показано влияние на его мощность сочетания факторов “психомоторная активность” и “длительность нажатий” ($F(1;16) = 3.8, p = 0.07$). Средние значения мощности ЭЭГ суммарно по всем отведениям для исследуемых поддиапазонов альфа-ритма приведены на рис. 2А, а для дельта-ритма – на рис. 3А. Мы не получили достоверного влияния исследуемых факторов на мощностные характеристики тета-ритма и поэтому исключили их из дальнейшего анализа.

Результат влияния факторов “психомоторная активность” и “длительность нажатий”, а также их взаимодействия на характеристики спектральной мощности отдельных отведений ЭЭГ приведены на рис. 2В и рис. 3В.

Показано влияние на мощностные характеристики низкочастотного альфа-ритма сочетания факторов “психомоторная активность” и “регион отведения” ($F(1;16) = 14.1, p = 0.002$), “длительность нажатий” и “регион отведения” ($F(1;16) = 7.6, p = 0.014$), а также “психомоторная активность”, “длительность нажатий” и “регион отведения” ($F(1;16) = 6.7, p = 0.02$). Для высокочастотного альфа-ритма показано влияние на мощность сочетания факторов “длительность нажатий” и “регион отведения” ($F(1;16) = 35.3, p = 0.0001$). Для дельта-ритма показано влияние сочетания факторов “психомоторная активность”, “длительность нажатий” и “регион отведения” ($F(1;16) = 8.7, p = 0.01$).

Отметим, что при данном дизайне дисперсионного анализа была показана значимость влияния на мощность низкочастотного и высокочастотного альфа-ритма изолированного фактора “длительность нажатий” ($F(1;16) = 13.4, p = 0.002$ и $F(1;16) = 11.1, p = 0.004$).

Начало выполнения психомоторного теста приходится на широко распространенный по коре альфа-ритм, который в процессе деятельности снижается. Существуют данные, что альфа-ритм появляется в энцефалограмме во время кратких эпизодов бодрствования, прерывающих сон (WASOs) и во время пробуждения от сна [2, 3, 14, 15]. Можно предполагать, что альфа-ритм ЭЭГ при сниженном уровне

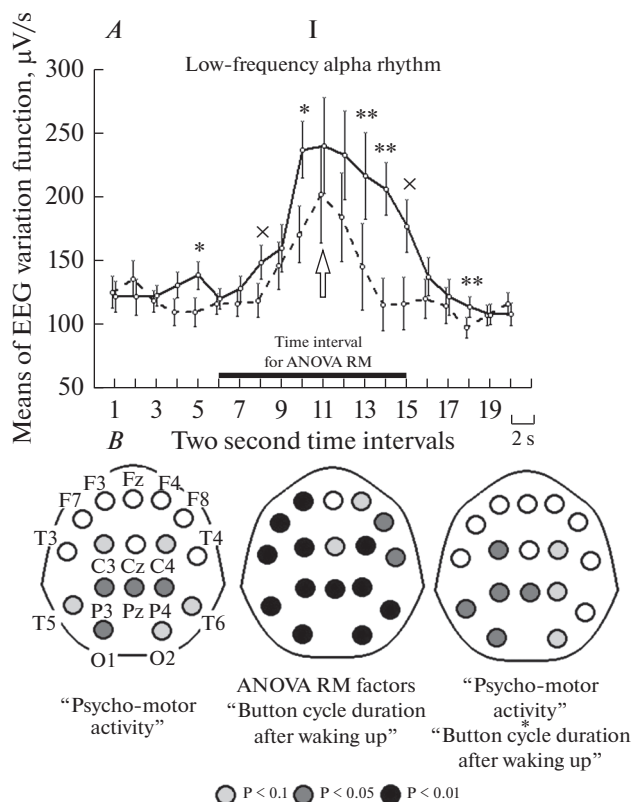


Рис. 2. Спектральные характеристики низкочастотного и высокочастотного альфа-ритма при разной длительности периода нажатий на кнопку во время восстановления выполнения психомоторного теста после спонтанного пробуждения. I – низкочастотный альфа-ритм, II – высокочастотный; A – суммарно по всем отведениям ЭЭГ; пунктирная линия – 2–5 нажатий, сплошная – 6–10; по вертикали – величина спектральной оценки, мкВ/с, по горизонтали – время, 2-секундные отрезки; стрелка – начало нажатий после пробуждения; “х”, “*” и “***” – различия ($p < 0.1$, 0.05 и 0.01 соответственно); показан интервал, на котором проводился дисперсионный анализ; показана ошибка среднего; B – результаты дисперсионного анализа по отдельным отведениям ЭЭГ; приведены карты с достоверными различиями для отдельных факторов и их сочетания; светло-серый, темно-серый и черный цвет отведений – $p < 0.1$, 0.05 и 0.01 соответственно.

Fig. 2. The spectral characteristics of the low-frequency and high-frequency alpha rhythm with different lengths of the period the button is pressed during the restoration of the psychomotor test after spontaneous awakening. I – low-frequency alpha rhythm, II – high-frequency; A – total for all EEG leads; dashed line – 2–5 clicks, solid – 6–10; vertically – spectrum power, $\mu\text{V/s}$, horizontally – time, 2-second segments; arrow – the beginning of clicks after waking up; “х”, “*” and “***” are the differences ($p < 0.1$, 0.05 and 0.01, respectively); the interval over which the analysis of variance was carried out is shown; average error is shown; B – the results of analysis of variance for EEG leads; map-schemes with significant differences for individual factors and their combinations are given; light gray, dark gray and black color of assignments – $p < 0.1$, 0.05 and 0.01 respectively.

бодрствования является необходимым условием для моторного взаимодействия организма с внешней средой.

Результаты парных сравнений мощностных характеристик ЭЭГ для отведений ЭЭГ в периоды до нажатий на кнопку приведены на рис. 4. Мы сочли возможным

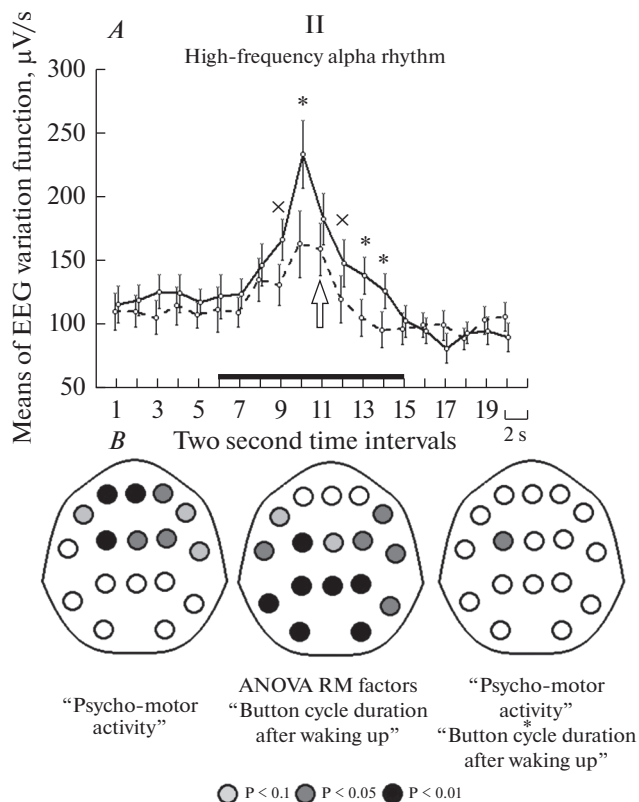


Рис. 2. Окончание

привести на этом и других рисунках не только статистически значимые результаты, но и результаты на уровне тенденции по следующим соображениям. Исследуемые нами отрезки ЭЭГ приходятся на переходные состояния цикла “сон—бодрствование”, сопровождаемые периодом психомоторной деятельности и активизацией сознания. В качестве подхода к оценке этого феномена мы взяли поведенческий показатель — разное число нажатий в этих переходных состояниях. Мерой для оценки мозгового обеспечения локализованных на коротком интервале времени процессов пробуждения—засыпания, психомоторной деятельности и появления—угасания сознания в данном исследовании были выбраны мощностные характеристики колебаний электрической корковой активности мозга. Детальное описание региональных различий в ЭЭГ при данной параметризации комплекса наблюдаемых явлений, как нам представляется, позволит читателю получить о них более полную информацию. Разумеется, это не исключает критического отношения к результатам, полученным на уровне тенденции.

Мы показали, что перед началом психомоторной активности характеристики альфа-ритма выше в том случае, когда испытуемый впоследствии дольше нажимал на кнопку. Эти различия наблюдаются в низкочастотном альфа-ритме за 5–6 с до начала нажатий с вовлечения каудальных областей и непосредственно перед нажатиями в течение 2 с (рис. 4, I). В высокочастотном альфа-ритме эта разница отме-

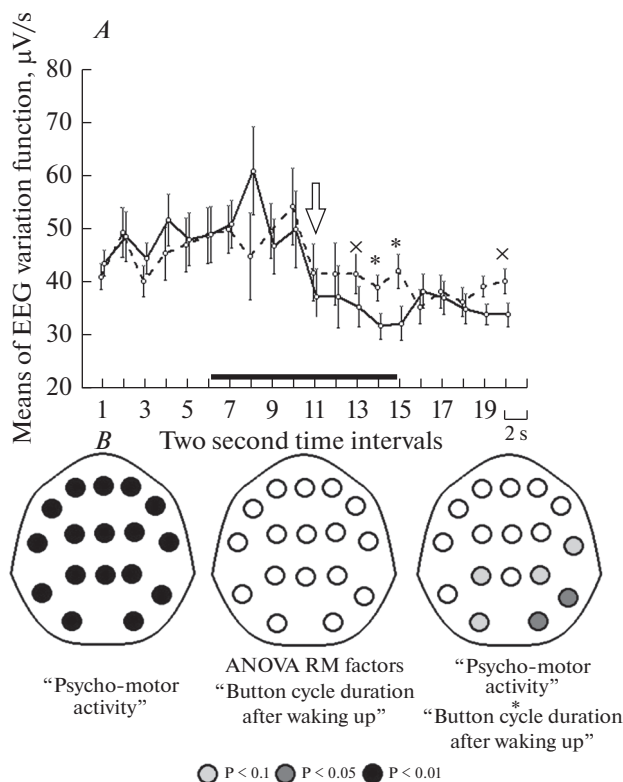


Рис. 3. Спектральные характеристики дельта-ритма при разной длительности периода нажатий на кнопку во время восстановления выполнения психомоторного теста после спонтанного пробуждения. Обозначения, как на рис. 2.

Fig. 3. The spectral characteristics of the delta-rhythm with different durations of the period the button is pressed during recovery of the psychomotor test after spontaneous awakening. Designations as in fig. 2.

чается позднее (за 3–4 с до начала нажатий) в каудальных и передне-височных областях, а непосредственно перед началом деятельности распространяются и на области Fz, Cz и C4 (рис. 4, II). Передне-височная кора играет важную роль в обеспечении рабочей памяти [16]. Латеральная префронтальная кора участвует в организации систем направленного внимания и нисходящего (top–down) когнитивного контроля [17–19]. В нашем исследовании активация, опережающая начало деятельности в передне-височной и вентrolатеральной префронтальной коре, может отражать процессы, связанные с извлечением инструкции из рабочей памяти, на основании которой планируются дальнейшие действия.

Различия в мощности альфа-колебаний в центральной области правого полушария отражает подготовку к более длительной моторной деятельности, приближающейся по времени к полному циклу нажатий психомоторного теста. Известно, что изменения в ЭЭГ, связанные с реализацией движений конечностями, наиболее выражены в полушарии, контралатеральном конечности (в частности, руке), которой совершается движение [20, 21]. Можно предположить, что подготовка к началу моторной реакции также осуществляется в контралатеральном полушарии.

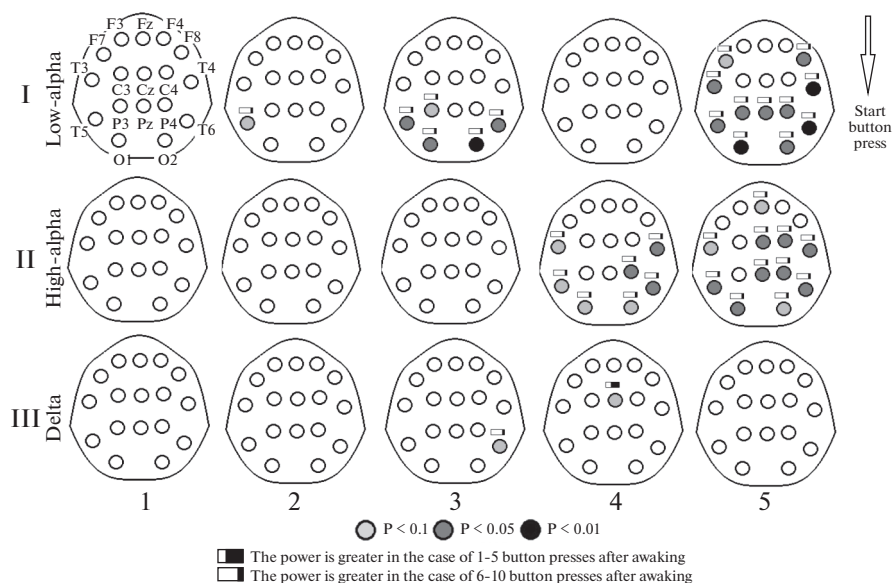


Рис. 4. Карты-схемы результата парных сравнений спектральных характеристик ЭЭГ, которая предшествует началу нажатий на кнопку: сравниваются ситуации, когда впоследствии будет наблюдаться малое (от 2 до 5) и большее (от 6 до 10) число нажатий. I, II и III – низкочастотный, высокочастотный альфа-ритм и дельта-ритм соответственно; 1–5 – 2-секундные интервалы времени; стрелка – момент начала нажатий; светло-серый, темно-серый и черный цвет отведений – $p < 0.1$, 0.05 и 0.01 соответственно; знак “прямоугольник с большим зачернением” – мощность больше в случае последующей ситуации с 2–5-ю нажатиями, “прямоугольник с меньшим зачернением” – мощность больше в случае последующей ситуации с 6–10-ю нажатиями.

Fig. 4. Map-schemes of the result of pairwise comparisons of the spectral characteristics of the EEG, which precedes the start of pressing the button: situations when a small number (from 2 to 5) and a larger number (from 6 to 10) of clicks will subsequently be observed. I, II and III – low-frequency, high-frequency alpha rhythm and delta rhythm, respectively; 1–5 – 2 second time intervals; arrow – the moment of the start of pressing; light gray, dark gray and black color of assignments – $p < 0.1$, 0.05 and 0.01 respectively; the sign “rectangle with greater blackening” – power is greater in the case of a subsequent situation with 2–5 clicks, “rectangle with lower blackening” – power is greater in the case of the subsequent situation with 6–10 clicks.

Различия в дельта-ритме перед паттернами нажатий разной длительности практически отсутствуют (рис. 4, III).

Результаты парных сравнений мощностных характеристик ЭЭГ для отведений ЭЭГ в периоды до нажатий на кнопку приведены на рис. 5. Характеристики альфа-ритма также могут служить показателем длительности бодрствования в исследуемые периоды пробуждения. Относительно продолжительный период нажатий сопровождается в целом более высокими амплитудными значениями альфа-ритма по сравнению с более коротким периодом (рис. 5, I и II). Окончание нажатий и в том, и в другом случае возвращает величины мощностных показателей альфа-активности к тем, которые наблюдались до пробуждения.

Менее выраженные различия между ситуациями с различной длительностью временных периодов поведенческой активности отмечены в дельта-ритме. При реализации деятельности во время относительно продолжительного периода нажа-

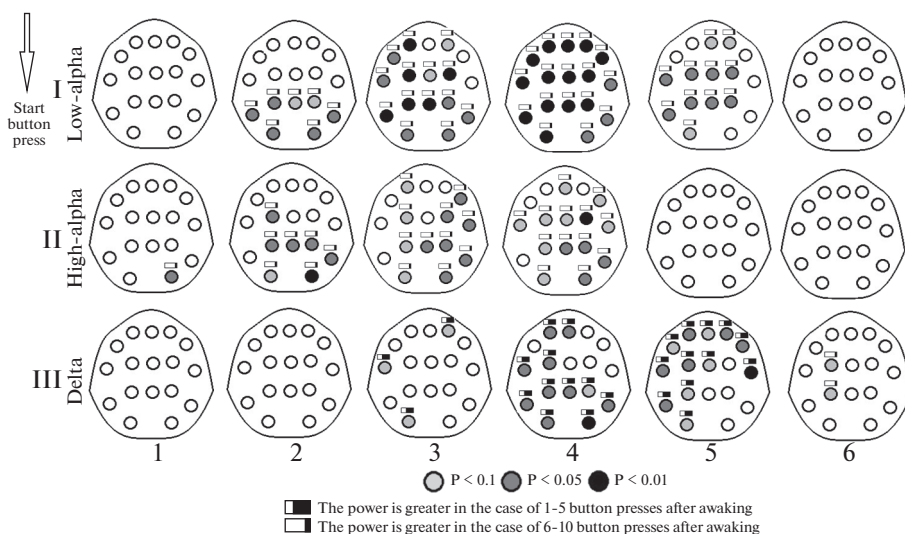


Рис. 5. Карты-схемы результата парных сравнений спектральных характеристик ЭЭГ между ситуациями с малым и большим числом нажатий при восстановлении выполнения психомоторного теста после спонтанных пробуждений. 1–6 – 2-секундные интервалы времени. Остальные обозначения, как на рис. 4.
Fig. 5. Map-schemes of the pairwise comparisons result of the EEG spectral characteristics between situations with a small and a large number of clicks when restoring the psychomotor test after spontaneous awakenings. 1–6 – 2 second time intervals. Other designations as in fig. 4.

тий его мощностные характеристики несколько снижаются, а во время короткого практически не меняются (рис. 5, III). Отметим, что даже небольшое снижение мощности дельта-ритма в ситуации, когда испытуемый приближался к полному воспроизведению цикла нажатий психомоторного теста, привело к появлению значимых различий, наиболее выраженных на 7–10-й с от момента начала нажатий. Сохранение низкочастотной активности, характерной для состояния сна после пробуждения, т.н. инерция сна описана в литературе [4–7].

Отметим, что термин “инерция сна” принято использовать при исследовании нарушений деятельности после продолжительного дневного и ночного сна, включающего стадию глубокого сна (третья стадия). Деятельность субъекта при этом изучается не непосредственно после пробуждения, а через какое-то время. В условиях нашего исследования периоды сна, предшествующие спонтанным пробуждениям, были относительно непродолжительными, а сам сон достигал только второй стадии. Существуют работы, показывающие, что после короткого сна, в котором отсутствует третья стадия, вместо сонливости наблюдается активация мозга [22]. Учитывая все это, использовать данный термин для объяснения изменений в ЭЭГ во время наблюдаемых нами явлений не совсем корректно. Однако категорически отрицать влияние последствие сна на кратковременное пробуждение, психомоторную деятельность, осуществляемую в этот период, а впоследствии быстрое засыпание, — не представляется очевидным.

Таким образом, мощность дельта-ритма в определенной мере также может рассматриваться как характеристика длительности кратковременных пробуждений.

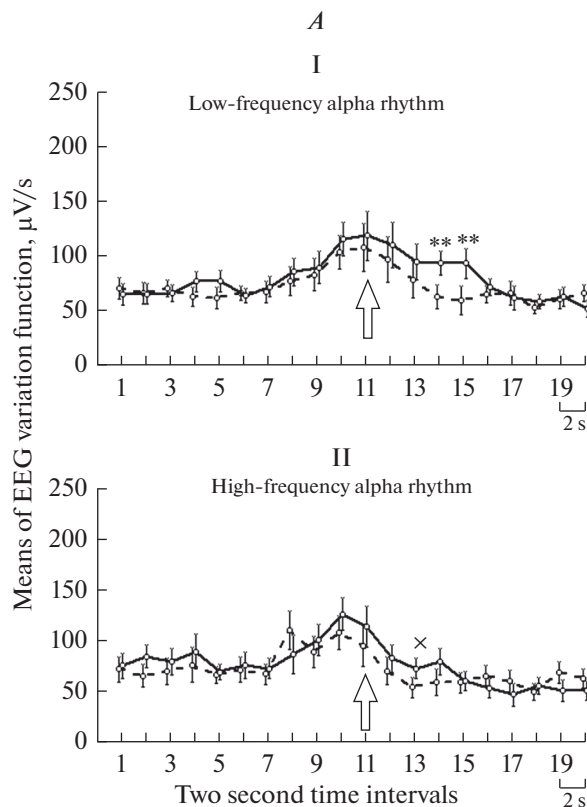


Рис. 6. Спектральные характеристики низкочастотного и высокочастотного альфа-ритма лобных областей отведения ЭЭГ при разной длительности периода нажатий на кнопку во время восстановления выполнения психомоторного теста после спонтанного пробуждения. *A* – F3, *B* – F4. Остальные обозначения, как на рис. 2.

Fig. 6. Spectral characteristics of the low-frequency and high-frequency alpha-rhythm of the EEG leads frontal areas with different durations of the button presses during the restoration of the psychomotor test after spontaneous awakening. *A* – F3, *B* – F4. Other designations as in fig. 2.

Отсутствие различий в лобных областях в альфа-ритме на начальном этапе осуществления психомоторной деятельности разной продолжительности (кратковременной и более длительной, приближающейся к выполнению полного цикла нажатий) свидетельствует, что эти области задействованы в одинаковой степени независимо от числа нажатий (рис. 6).

Данный результат может служить подтверждением того, что наблюдаемая психомоторная активность не является автоматической, неосознаваемой, а сопровождается сниженным, фрагментарным сознанием [23, 24]. Мы полагаем, что число нажатий при выполнении психомоторного теста во время переходных процессов от сна к деятельности и от деятельности снова ко сну свидетельствует об уровне сознания, которое проявляется при этом. Надеемся, что наше исследование дает пищу для размышления и поиска новых экспериментальных парадигм в исследовании сознания и его нейрональных коррелятов.

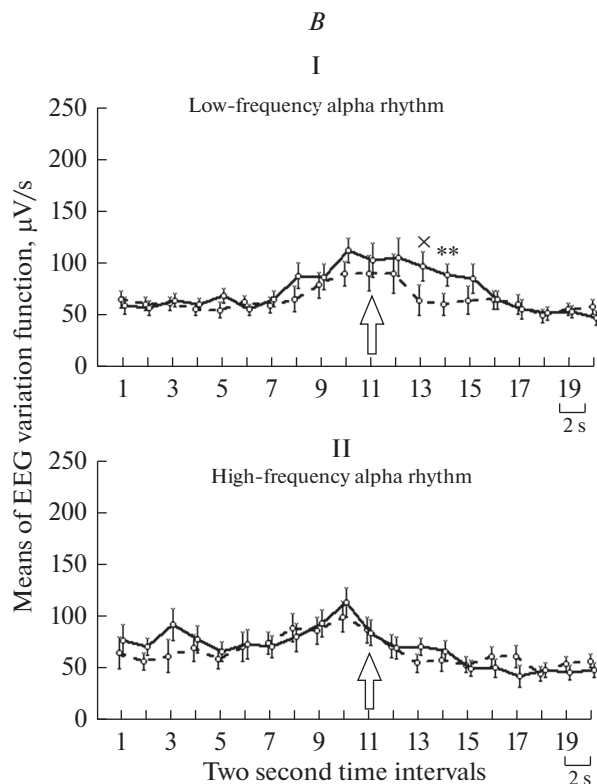


Рис. 6. Окончание

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 20-013-00683а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsai P.J., Chen S.C., Hsu C.Y., Wu C.W., Wu Y.C., Hung C.S., Yang A.C., Liu P.Y., Biswal B., Lin C.P. Local awakening: regional reorganizations of brain oscillations after sleep. *Neuroimage*. 102(2): 894–903. 2014.
2. Peter-Derex L., Magnin M., Bastuji H. Heterogeneity of arousals in human sleep: A stereo-electroencephalographic study. *Neuroimage*. 123: 229–244. 2015.
3. Schwabedal J., Riedel M., Penzel Th., Wessel N. Alpha-wave frequency characteristics in health and insomnia during sleep. *J. Sleep. Res.* 25: 278–286. 2016.
4. Ferrara M., Curcio G., Fratello F., Moroni F., Marzano C., Pellicciari M.C., Gennaro L.D. The electroencephalographic substratum of the awakening. *Behav. Brain Res.* 167: 237–244. 2006.
5. Marzano C., Ferrara M., Moroni F., De Gennaro L. Electroencephalographic sleep inertia of the awakening brain. *Neuroscience*. 176: 308–17. 2011.
6. Trotti L. Waking up is the hardest thing I do all day: Sleep inertia and sleep drunkenness. *Sleep Med. Rev.* 35: 76–84. 2017.
7. Vallat R., Meunier D., Nicolas A., Ruby P. Hard to wake up? The cerebral correlates of sleep inertia assessed using combined behavioral, EEG and fMRI measures. *Neuroimage*. 184: 266–278. 2019.
8. Ikeda H., Hayashi M. Effect of sleep inertia on switch cost and arousal level immediately after awakening from normal nocturnal sleep. *Sleep and Biol. Rhythms*. 6: 120–125. 2008.

9. Черемушкин Е.А., Петренко Н.Е., Генджалиева М.С., Яковенко И.А., Малахов Д.Г., Дорохов В.Б. ЭЭГ активность мозга, предшествующая спонтанному восстановлению психомоторной деятельности после эпизодов микросна. Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(8): 1002–1012. 2019. [Cheremushkin E.A., Petrenko N.E., Gendzhaliyeva M.S., Yakovenko I.A., Malakhov D.G., Dorokhov V.B. EEG activity preceding spontaneous restoration of psychomotor activity after microsleep episodes. Russ. J. Physiol. 105(8): 1002–1012. 2019. (In Russ)].
10. Hale J.R., White T.P., Mayhew S.D., Wilson R.S., Rollings D.T., Khalsa S., Arvanitis T.N., Bagshaw A.P. Altered thalamocortical and intra-thalamic functional connectivity during light sleep compared with wake. *Neuroimage*. 125: 657–667. 2016.
11. Дорохов В.Б. Альфа-веретена и К-комплекс-фазические активационные паттерны при спонтанном восстановлении нарушений психомоторной деятельности на разных стадиях дремоты. Журн. высш. нерв. деят. 53(4): 502–511. 2003. [Dorokhov V.B. Alpha bursts and K-complex- phasic activation pattern during spontaneous recovery of correct psychomotor performance at different stages of drowsiness. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 53(4): 502–511. 2003. (In Russ)].
12. Dorokhov V.B., Malakhov D.G., Orlov V.A., Ushakov V. Experimental Model of Study of Consciousness at the Awakening: fMRI, EEG and Behavioral Methods: Proc. of the Ninth Annual Meeting of the BICA Society. In: Biologically Inspired Cognitive Architectures. 82–87. 2018.
13. Козлов М.К. Оценка достоверности вариационных характеристик пре- и постстимульной кривой ЭЭГ по критерию хи-квадрат. Журн. высш. нерв. деят. 59(2): 281–290. 2009. [Kozlov M.K. Estimation of the Validity of Variational Characteristics of Pre-and Poststimulus EEG by the Chi-Square Test. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 59(2): 281–290. 2009. (In Russ)].
14. Steriade M., McCormick D.A., Sejnowski T.J. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. 262: 679–685. 1993.
15. Halász P., Terzano M., Parrino L., Bodizs R. The nature of arousal in sleep. *J. Sleep. Res.* 13: 1–23. 2004.
16. Petrides M., Pandya D. The Frontal Cortex. In: The Human Nervous System. Eds. Paxinos G., Mai U. Acad. Press. Amsterdam. 950–972. 2004
17. Kostandov E.A. The role of implicit estimation of time intervals and set plasticity in facial expression processing. In: Cognitive Systems Monographs. 25: 349–366. 2015.
18. Morales J., Lau H., Fleming S.M. Domain-General and Domain-Specific patterns of activity supporting metacognition in human prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 38(14): 3534–3546. 2018.
19. Nyberg L. Cognitive control in the prefrontal cortex: A central or distributed executive? *Scand. J. Psychol.* 59(1): 62–65. 2018.
20. Pfurtscheller G., Neuper C. Movement and ERD/ERS. In: The Bereitschafts potential. Movement related cortical potentials. Eds. Jahanshahi M., Hallett M.N.Y. Kluwer Acad. Plenum Publ. 191–206. 2003.
21. Kostandov E.A., Cheremushkin E.A., Yakovenko I.A., Petrenko N.E. Relationships between the flexibility of cognitive performance and the α -rhythm response to conditioning stimuli. *Human Physiology*. 41(5): 468–477. 2015.
22. George P.T. The psycho-sensory wake drive—a power source for power naps and other common sleep-wake phenomena: a hypothesis. *Sleep Breathing Physiology and Disorders. Review*. 22(1): 41–48. 2018.
23. Fazekas P., Overgaard M. Multidimensional Models of Degrees and Levels of Consciousness. *Trends in Cognitive Sci.* 20(10): 715–716. 2016.
24. Fazekas P., Overgaard M. Multiple factors and multiple mechanisms determine the quality of conscious experiences: a reply to Anzulewicz and Wierzbach. *Cogn. Sci.* 42 (6): 2101–2103. 2018.

EEG Characteristics in the Process of Short-Time Spontaneous Wakes of Different Duration at Changes in Psychomotor Activity Caused by Falling Asleep

E. A. Cheremushkin^{a,*}, N. E. Petrenko^a, M. S. Gendzhaliyeva^b,
D. G. Malakhov^c, and V. B. Dorokhov^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*

^b*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^c*National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

*e-mail: ivnd@mail.ru

During daytime sleep, the changes in the spectral characteristics of the EEG during recovery periods of the psychomotor test with spontaneous short-term awakenings were studied in 17 healthy subjects. The test contained two successively alternating tasks: the

“silent” counting from 1 to 10, synchronized with the clicks on the button, and only the “silent” count. The monotonous nature of the test leads to a rapid decrease in the level of wakefulness and in most cases causes falling asleep. The appearance of button clicks is a behavioral indicator of the resumption of cognitive processes inhibited during sleep. Situations were compared for a small (2–5) and relatively large (6–10) number of button presses. The onset of button presses is preceded by the appearance of a generalized alpha rhythm, which decreases during psychomotor activity. At the same time, its power was always greater in a situation with longer periods of observed behavioral activity. The cessation of the button presses is accompanied with the return of the alpha activity power to values observed before the awakening. The EEG alpha rhythm at the reduced wakefulness during short-term awakenings apparently characterizes the activation of the thalamo-cortical mechanism, and is required for the motor interaction of the body with the environment. The absence of differences in the frontal areas at the initial stage of performing short-term and longer-term activity (approaching the full cycle of clicks) suggests that during this period they are involved to the same extent, regardless of the number of clicks. These results indirectly confirm that the observed psychomotor activity, even with a small number of clicks, is not automatic and unconscious, but is accompanied by a reduced, fragmented consciousness.

Keywords: daytime sleep, psychomotor test, spontaneous awakening, sleep inertia, EEG, alpha rhythm, consciousness

ЦИТИРОВАТЬ:

Черемушкин Е.А., Петренко Н.Е., Генджалиева М.С., Малахов Д.Г., Дорохов В.Б. Характеристики ЭЭГ в процессе кратковременных самопроизвольных пробуждений разной длительности при изменениях в психомоторной деятельности, вызванных засыпанием. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 342–355.

DOI: 10.31857/S0869813920030036

TO CITE THIS ARTICLE:

Cheremushkin E.A., Petrenko N.E., Gendzhalieva M.S., Malakhov D.G., Dorokhov V.B. EEG Characteristics in the Process of Short-Time Spontaneous Wakes of Different Duration at Changes in Psychomotor Activity Caused by Falling Asleep. Russian Journal of Physiology. 106(3): 342–355.

DOI: 10.31857/S0869813920030036

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В МОЗГЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС
ПОСЛЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ ВВЕДЕНИЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА**

© 2020 г. А. Н. Трофимов^{1, *}, А. Ю. Ротов^{1, 2}, Е. А. Вениаминова¹, К. Фомалонт¹,
А. П. Шварц^{1, 2}, О. Е. Зубарева^{1, 2}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: alexander.n.trofimov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.12.2019 г.

После доработки 21.01.2020 г.

Принята к публикации 21.01.2020 г.

Большое количество исследований указывает на роль раннего опыта, в частности неонатальных инфекций, в формировании высокого уровня тревожности в последующей жизни. Одним из механизмов таких изменений может быть нарушение функциональной активности ионотропных глутаматных рецепторов, связанное с перестройкой их субъединичного состава. Целью данной работы явилось изучение показателей тревожности и уровня экспрессии в медиальной префронтальной коре, вентральной и дорзальной областях гиппокампа генов субъединиц NMDA-рецепторов (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*) и AMPA-рецепторов (*Gria1*, *Gria2*) у взрослых крыс, которым в раннем возрасте вводили бактериальный липополисахарид (ЛПС) в дозах, индуцирующих развитие нейровоспалительных процессов. Экспрессию генов изучали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Показано, что введение крысам-самцам Вистар на 15-е, 18-е и 21-е сутки жизни ЛПС в дозе 25 или 50 мкг/кг индуцирует усиление экспрессии генов провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли в областях гиппокампа. Через 3 месяца после введений ЛПС выявлено усиление экспрессии генов *Grin2b*, *Gria1*, *Gria2* в вентральной области гиппокампа (после инъекций 50 мкг/кг ЛПС) и гена *Gria2* в дорзальной области гиппокампа (после введения 25 мкг/кг ЛПС). Эти изменения сопровождаются нарушением исследовательского поведения в тесте Открытое поле и снижением уровня тревожности в Приподнятом крестообразном лабиринте. Проведенное исследование показало, что введение бактериального ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе, приводит к отставленным во времени изменениям экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в гиппокампе и связанных с ними форм поведения.

Ключевые слова: раннее развитие, мозг, воспаление, липополисахарид, тревожность, NMDA-рецептор, AMPA-рецептор

DOI: 10.31857/S0869813920030097

Тревожные расстройства являются наиболее распространенными психическими заболеваниями во всем мире: по данным разных исследований от 3.8 до 33.7% взрослых людей сталкиваются с подобными проблемами хотя бы единожды в жиз-

ни [1, 2], при этом молекулярные механизмы высокой предрасположенности к развитию тревожных расстройств остаются малоизученными.

Большое количество исследований указывает на роль раннего опыта, в частности пренатальных и неонатальных стрессов и инфекционных заболеваний, в формировании высокого уровня тревожности в последующей жизни [3, 4].

Экспериментальной моделью неонатальных инфекционных заболеваний является введение животным бактериального липополисахарида (ЛПС, эндотоксина) — элемента клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Связываясь с Toll-like рецепторами IV типа (TLR4), ЛПС индуцирует в клетках иммунной и нервной систем синтез провоспалительных цитокинов — интерлейкинов (ИЛ)-1 β и -6 и фактора некроза опухоли (ФНО) [5], что приводит к развитию продромального синдрома, включающего повышение температуры тела, нарушение пищевой и исследовательской мотиваций, подавлению социальной активности, преобладанию медленноволнового сна, активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [6]. При введении умеренных доз эндотоксина эти эффекты у взрослых непродолжительны, однако введение тех же доз ЛПС в раннем онтогенезе может оказывать долговременное повреждающее действие на функции ЦНС. В частности, показано, что у потомства крыс, получавших ЛПС во время беременности, и у крысят, которым вводили ЛПС в первые дни жизни, в подростковом возрасте повышена локомоторная активность [7], развивается депрессивно-подобное и тревожное поведение [8–10], а во взрослом возрасте отмечаются депрессивно-подобные изменения поведения [10–12].

Предполагается, что одним из факторов возникновения психоэмоциональных расстройств, связанных с негативными влияниями среды в раннем возрасте, может быть нарушение формирования NMDA- и AMPA-глутаматных рецепторов в клетках ЦНС [13]. Общеизвестной является роль этих рецепторов в регуляции процессов нейропластичности, обучения и памяти [14–17]. Однако также обсуждается вовлеченность NMDA- и AMPA-рецепторов в патогенез биполярных расстройств [18–20], поскольку уровень экспрессии NMDA-рецепторов в гиппокампе коррелирует с показателями тревожности [21], а внутригиппокампальное введение их агонистов модулирует уровень тревожности экспериментальных животных [22].

Функциональная активность NMDA- и AMPA-рецепторов напрямую связана с их субъединичным составом [23–25]. NMDA-рецепторный комплекс представляет собой гетеротетрамер, состоящий из обязательных GluN1 и вариантных GluN2 (a–d) либо GluN3 (a, b) субъединиц, благодаря которым обеспечивается большая функциональная и региональная вариативность NMDA-рецепторов [24]. Субъединицы NMDA-рецепторов кодируются генами *Grin1*, *Grin2a–Grin2d*, *Grin3a*, *Grin3b*. AMPA-рецепторы состоят из 4 субъединиц GluA (1–4), чаще это димер димеров из двух GluA2 и двух других (GluA1, GluA3 либо GluA4) субъединиц [26]. Субъединицы AMPA-рецепторов кодируются генами *Gria1–Gria4*. GluA2-содержащие рецепторы, в отличие от не содержащих эти субъединицы, непроницаемы для ионов кальция [27].

Критическим периодом для формирования субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторных комплексов в мозге крысы является ранний постнатальный онтогенез. Созревание рецепторов выражается в изменении их конструкции, процесс имеет разную динамику в различных областях мозга и подтипах нейронов [28–32]. В гиппокампе крыс существенные возрастные перестройки субъединичного состава NMDA-рецепторов происходят на 2–3-й неделях жизни [33–35]. Они выражаются, в частности, в усилении продукции GluN2a и, как следствие, увеличении доли NMDA-рецепторов, содержащих эту субъединицу. Примерно в те же сроки происходит дозревание AMPA-рецепторов нейронов коры [36, 37]. Незрелые синапсы содержат кальций-проницаемые AMPA-рецепторы, которые по мере со-

зревания мозга заменяются на содержащие GluA2 кальций-непроницаемые рецепторы [38]. Данные о влиянии неонатальных инфекций на формирование субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов в критический период их созревания немногочисленны и разрозненны.

В данной работе исследованы показатели тревожности и уровень экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в клетках мозга, наблюдаемые у взрослых крыс, которым вводили бактериальный ЛПС в течение 3-й недели жизни — периода активного формирования субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект, схема эксперимента

Работа выполнена на крысах Вистар с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС), одобренных Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ”. Разведение животных производили в условиях вивария Института, поскольку стресс, связанный с перевозкой беременных самок, мог существенно повлиять на поведение потомства. Крысята содержались со своими матерями до возраста 30 дней, после чего их отсаживали и содержали в стандартных условиях. Всего в работе использовано 73 крысы из 18 пометов (31 в поведенческих и 42 в биохимических экспериментах). Количество крысят в пометах выравнивали (по 8–9 животных). Крысят-самок при необходимости оставляли в помете, но в работе не использовали. Крысят-самцов из каждого помета делили на 3 группы: животные двух групп получали внутрибрюшинные введения ЛПС в умеренно пирогенных дозах 25 или 50 мкг/кг в 15-й, 18-й и 21-й дни жизни, крысятам контрольной группы производили внутрибрюшинное введение эквивалентного объема апиогенного физиологического раствора в те же сроки. Выбранная доза ЛПС является умеренно пирогенной, поскольку вызывает повышение температуры тела на 0.6–1.9°C у большинства животных через 2–4 ч после введения, что было определено в предварительных экспериментах. ЛПС вводили троекратно с целью моделирования частых детских инфекций. Во время введений крысят разлучали с матерью не более чем на 15 с. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

Для характеристики использованной экспериментальной модели, в частности, для доказательства способности использованных доз ЛПС запускать воспалительные процессы в мозге, часть экспериментальных и контрольных животных декапитировали через 2 ч после последней инъекции с последующим анализом экспрессии в клетках мозга генов провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО.

Изучение отдаленного влияния введений ЛПС в течение 3-й недели жизни на экспрессию генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов и глутамат-зависимые формы поведения проводили на отдельных группах экспериментальных и контрольных животных в возрасте 3–3.5 месяцев.

Поведенческое тестирование

Открытое поле

Оценку ориентировочно-исследовательского поведения, локомоторной активности и уровня тревожности крыс проводили в тесте Открытое поле, представляющем собой круглую арену диаметром 100 см с бортами высотой 40 см и двойным дном, в котором имеется 16 отверстий диаметром 3.5 см и глубиной 1 см — “норок”. Тестирование проводилось однократно в течение 3 мин. Эксперимент проводили в промежуток времени с 18 до 22 ч при освещенности поля 25 лк. Арену после каждой крысы протирали 0.6%-ным раствором перекиси водорода для удаления запа-

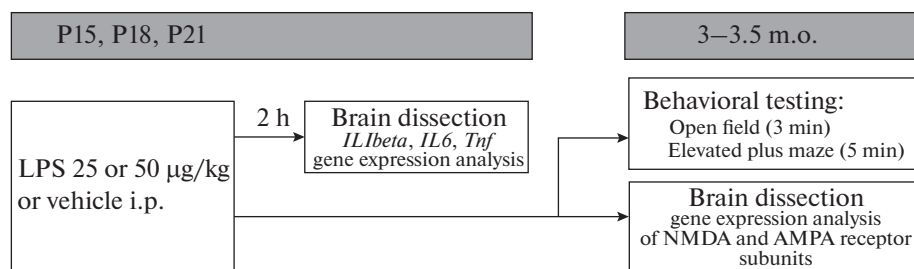


Рис. 1. Схема эксперимента. Бактериальный ЛПС вводили крысам на 15-е, 18-е и 21-е сутки. Экспрессию генов провоспалительных цитокинов изучали в медиальной префронтальной коре (мПФК), дорзальном и вентральном гиппокампе (ДГ, ВГ) через 2 ч после последней инъекции. В возрасте 3–3.5 месяцев уровень исследовательского и тревожного поведения был оценен в Открытом поле и Приподнятом крестообразном лабиринте. Экспрессию генов субъединиц NMDA- и AMPA- рецепторов определяли в том же возрасте в mPFC, DH, и VH в отдельной группе животных.

Fig. 1. Schematic outline of study. Rat pups received LPS injections on P15, P18 and P21. Expression of pro-inflammatory genes in the medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal and ventral hippocampus (DH, VH) was studied 2 h post-injection. At the age of 3–3.5 m.o., the levels of exploratory and anxiety-like behaviors were assessed in the Open field and Elevated plus maze. Gene expression levels of NMDA- and AMPA- receptor subunits in the mPFC, DH, and VH were analyzed at the same age in a separate cohort of animals.

хов, затем водой для удаления перекиси, после чего вытирали насухо. О поведении животных судили по длительности проявления поведенческих паттернов исследовательского поведения (стойки с упором, исследование норок), тревожности (вертикальные стойки без упора, груминг), локомоторной активности (локомоция, движения на месте).

Приподнятый крестообразный лабиринт

Оценку тревожности и исследовательского поведения животных проводили также в Приподнятом крестообразном лабиринте, который состоял из двух открытых и двух закрытых, расположенных перпендикулярно друг другу рукавов длиной по 50 см, шириной 10 см. Высота стенок двух закрытых рукавов составляла 40 см, высота установки от пола — 60 см. Тестирование проводилось однократно в течение 5 мин при освещенности открытых рукавов 25 лк через 5 мин после тестирования в Открытом поле. О тревожности крыс судили по суммарному времени, проведенному в открытых рукавах, об исследовательской активности — по суммарной длительности выглядываний из закрытых рукавов.

Подсчет длительности поведенческих актов в обоих тестах производили в режиме реального времени с использованием этологической программы Field 4, разработанной в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова Института экспериментальной медицины.

Оценка уровня экспрессии генов

Об уровне экспрессии генов судили по содержанию мРНК гена интереса относительно количества мРНК референсного гена внутреннего хозяйства *Gapdh*. Животных в возрасте 3–3.5 месяцев декапитировали, извлекали мозг, немедленно его замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до проведения биохимических исследований.

Производили выделение тотальной РНК из изучаемых структур мозга, реакцию обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.

Выделение РНК

Извлечение медиальной префронтальной области коры (мПФК) и дорзальной и вентральной областей гиппокампа (ДГ, ВГ) из замороженного мозга осуществляли на срезах, производимых с помощью микротом-криостата Thermo Scientific MICROM HM 525 при -20°C , согласно схеме, основанной на “Атласе мозга крысы в стереотаксических координатах” [39] — соответственно, роstralная и каудальная границы выделения относительно брегмы для мПФК: от 4.20 до 2.52 мм; для ДГ: от -2.64 до -5.28 мм; для ВГ: от -4.56 до -5.28 мм.

Выделение тотальной РНК из структур мозга проводили методом одношаговой кислотой гуанидин-изотиоцианат-фенол-хлороформной экстракции согласно протоколу, прилагаемому к TRI-реагенту. Немедленно после извлечения структуры мозга помещали в тризол (TRI Reagent®; Molecular Research Center, Inc., США) и гомогенизировали. Затем к полученному раствору добавляли хлороформ. Через 10 мин после интенсивного минутного перемешивания раствор центрифугировали при 12000 g в течение получаса, а полученную в результате центрифугирования верхнюю водную фазу, содержащую РНК, отбирали в отдельную пробирку и оставляли на 12–15 ч с эквивалентным объемом изопропилового спирта при $+4^{\circ}\text{C}$. Затем данный раствор центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин, а полученный осадок РНК помещали в 70%-ный раствор этанола для хранения при -20°C до проведения реакции обратной транскрипции — получения кодирующей ДНК (кДНК) на матрице РНК.

ОТ-ПЦР

Высушенные осадки РНК растворяли в обработанной диэтилпиروкарбонатом деионизированной воде. Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) по оптической плотности на длине волны 260 нм. Для проведения обратной транскрипции брали 1 мкг РНК каждого образца. Отжиг oligo-dT праймеров на РНК производили при $+70^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин. После краткого охлаждения и центрифугирования в пробы добавляли реакционную смесь, содержащую буфер для обратной транскриптазы, нуклеотиды, ингибитор РНКаз, обратную транскриптазу M-MLV в количествах согласно протоколу, прилагаемому к обратной транскриптазе M-MLV (Promega, Fitchburg, США). Пробу помещали на 70 мин в амплификатор C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) для проведения реакции синтеза кДНК на матрице РНК при температуре $+42^{\circ}\text{C}$. После остановки реакции в течение 10 мин при $+65^{\circ}\text{C}$ полученные пробы кДНК хранили при -20°C до проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР по технологии TaqMan к 1 мкл кДНК образцов добавляли реакционную смесь, содержащую Taq-буфер, раствор MgCl_2 , нуклеотиды, прямой и обратный праймеры, зонд, Taq-полимеразу в количествах согласно протоколу, прилагаемому к TaqM-полимеразе (ООО Алкор-Био, Санкт-Петербург, Россия). Амплификацию проводили в термоциклере C1000 Touch™ ThermalCycler с оптико-реакционным модулем CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) по следующей программе: “горячий старт” — $+95^{\circ}\text{C}$, 300 с; денатурация — $+95^{\circ}\text{C}$, 5 с, отжиг праймеров и элонгация с регистрацией флуоресценции — $+60^{\circ}\text{C}$, 10 с (50 циклов). Анализ каждой пробы проводили в двух параллелях.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов
Table 1. Nucleotide sequences of primers and probes used for qRT-PCR analysis

Ген (GeneBank) кодируемый белок Gene (GeneBank) encoded protein	Нуклеотидные последовательности (5' → 3'): прямой праймер, обратный праймер, зонд Nucleotide sequences (5' → 3'): forward primer, reverse primer, probe	Ссылка Ref.
<i>Gapdh</i> (NM_017008)	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTT HEX-ATCACGCCACAGCTTTCCAGAGGG-BHQ-1	[40]
<i>IL1beta</i> (NM_031512) ИЛ-1β (ИЛ-1β)	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG GGGTCCATGGTGAAGTCAAC FAM-TGTCCCAGACATTGCTGTTTCTTAGG-BHQ-1	[41]
<i>IL6</i> (NM_012589) ИЛ-6 (ИЛ-6)	CAAGACCATCCAATCATCTTG CACAGTGAGGAATGTCCACAAAAC FAM-TCGGCAAACCTAGTGTGCTATGCCTAAGCA-BHQ-1	[41]
<i>Tnf</i> (NM_012675) ФНО (TNF)	CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA CTCCTGGTATGAAATGGCAAATC FAM-CCCGACTATGTGCTCCTCACCCACA-BHQ-1	[41]
<i>Grin1</i> (NM_012573) GluN1	GTTCTTCCGCTCAGGCTTTG AGGGAAACGTTCTGCTTCCA FAM-CGGCATGCGCAAGGACAGCC-BHQ-1	[42]
<i>Grin2a</i> (NM_012573) GluN2a	GCTACACACCCTGCACCAATT CACCTGGTAACCTTCCTCAGTGA FAM-TGGTCAATGTGACTTGGGATGGCAA-BHQ-1	[43]
<i>Grin2b</i> (NM_012574) GluN2b	CCCAACATGCTCTCTCCCTTAA CAGCTAGTCGGCTCTCTTGGTT FAM-AGACGCCAAACCTCTAGGCGGACAG-BHQ-1	[43]
<i>Gria1</i> (NM_031608) GluA1	TCAGAACGCCTCAACGCC TGTAAGTGGTACCCGATGCCA ROX-TCCTGGGCCAGATCGTGAAGCTAGAAAA-BHQ-2	[44]
<i>Gria2</i> (NM_017261) GluA2	CAGTGCATTTTCGGGTAGGGA TGCGAAACTGTTGGCTACCT FAM-TCGGAGTTCAGACTGACACCCCA-BHQ-1	[44]

Использовали отрицательный контроль без добавления матрицы, а также отрицательный контроль обратной транскрипции (образцы РНК, к которым не добавляли ревертазу в реакционную смесь для ОТ). Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Анализ кривых амплификации производили в программе Bio-Rad CFX Manager™ 2.1 (Bio-Rad Laboratories, США) методом пороговой линии. Эффективность праймеров в мультиплексных ПЦР была проверена в отдельных экспериментах. Определение относительного количества мРНК в исследуемых образцах производили 2^{-ΔΔCt} -методом относительно уровня мРНК гена домашнего хозяйства *Gapdh* [45] и усредненных значений контрольной группы.

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали программы Microsoft Excel (Microsoft Corp., США), SPSS Statistics 20 (IBM Corp., США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США). Нормальность распределения выборочных данных проверяли с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку

многие из исследованных показателей не имели нормального распределения, для сравнения групп использовали Н-критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным попарным сравнением критерием Данна. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. На графиках представлены медианы и интерквартильный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение ЛПС в раннем возрасте повышает уровень экспрессии провоспалительных генов в гиппокампе

В результате проведенного исследования было выявлено повышение уровня экспрессии гена интерлейкина-1 β *IL1beta* в дорзальной и вентральной областях гиппокампа крысят через 2 ч после заключительной инъекции ЛПС на 21-й день постнатального развития по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор, при этом в дорзальном отделе гиппокампа статистически значимое повышение данного показателя также обнаружено при введении более низкой дозы ЛПС 25 мкг/кг (физ.р-р–ЛПС25 $p = 0.03$, физ.р-р–ЛПС50 $p = 0.09$, попарное сравнение критерием Данна; рис. 2(B)), а в вентральном – при введении более высокой дозы ЛПС 50 мкг/кг (физ.р-р–ЛПС25 $p = 0.13$, физ.р-р–ЛПС50 $p < 0.01$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 2C). В медиальной префронтальной коре данный показатель не изменяется при введении обеих доз ЛПС по сравнению с животными контрольной группы ($p > 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса; рис. 2A).

Уровень экспрессии гена интерлейкина-6 *IL6* достоверно не изменялся через 2 ч после введений ЛПС ни в мПФК, ни в областях гиппокампа ($p > 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса; (рис. 2D–F).

Повышенный уровень экспрессии гена фактора некроза опухоли *Tnf* по сравнению с контрольной группой был выявлен в дорзальном гиппокампе животных через 2 ч после инъекции 50, но не 25 мкг/кг ЛПС (физ.р-р–ЛПС25 $p = 0.51$, физ.р-р–ЛПС50 $p = 0.03$, попарное сравнение критерием Данна; рис. 2(H)), при этом в ВГ количество мРНК данного гена не отличалось от контроля после введения обеих доз ЛПС ($p > 0.05$, критерий Краскела–Уоллиса; рис. 2(I)). В мПФК наблюдаемое увеличение продукции мРНК *Tnf* после введения ЛПС не достигало уровня статистической значимости ($H = 5.7$, $p = 0.051$, критерий Краскела–Уоллиса; (рис. 2G).

Введение ЛПС в раннем возрасте приводит к отдаленным нарушениям ориентировочно-исследовательского поведения

Тестирование животных в Открытом поле выявило снижение исследовательской активности взрослых животных, получавших ЛПС в течение 3-й недели, по сравнению с животными контрольной группы, которое выражалось в сниженной суммарной длительности стоек с упором ($H = 6.10$; $p = 0.047$; попарное сравнение критерием Данна –физ.р-р–ЛПС25, $p = 0.04$; (рис. 3A)). Такая же тенденция была по показателю общего числа стоек с упором, но различия не достигали статистической значимости ($H = 5.75$; $p = 0.057$). По другим показателям исследовательского поведения: общей длительности обследования норок в Открытом поле и времени выглядывания из закрытых рукавов Приподнятого крестообразного лабиринта – различий между группами не выявлено (соответственно, $H = 2.9$, $p = 0.23$ и $H = 2.9$, $p = 0.24$, критерий Краскела–Уоллиса; (рис. 3C, D)).

Тревожность взрослых животных, получавших в раннем периоде постнатального онтогенеза ЛПС, была ниже, чем у контрольных крыс, что выразилось в увеличении времени пребывания в открытых рукавах Приподнятого крестообразного лабиринта ($H = 12.87$; $p = 0.002$, физ.р-р–ЛПС50 $p = 0.004$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 3F). Увеличение времени груминга у животных, получав-

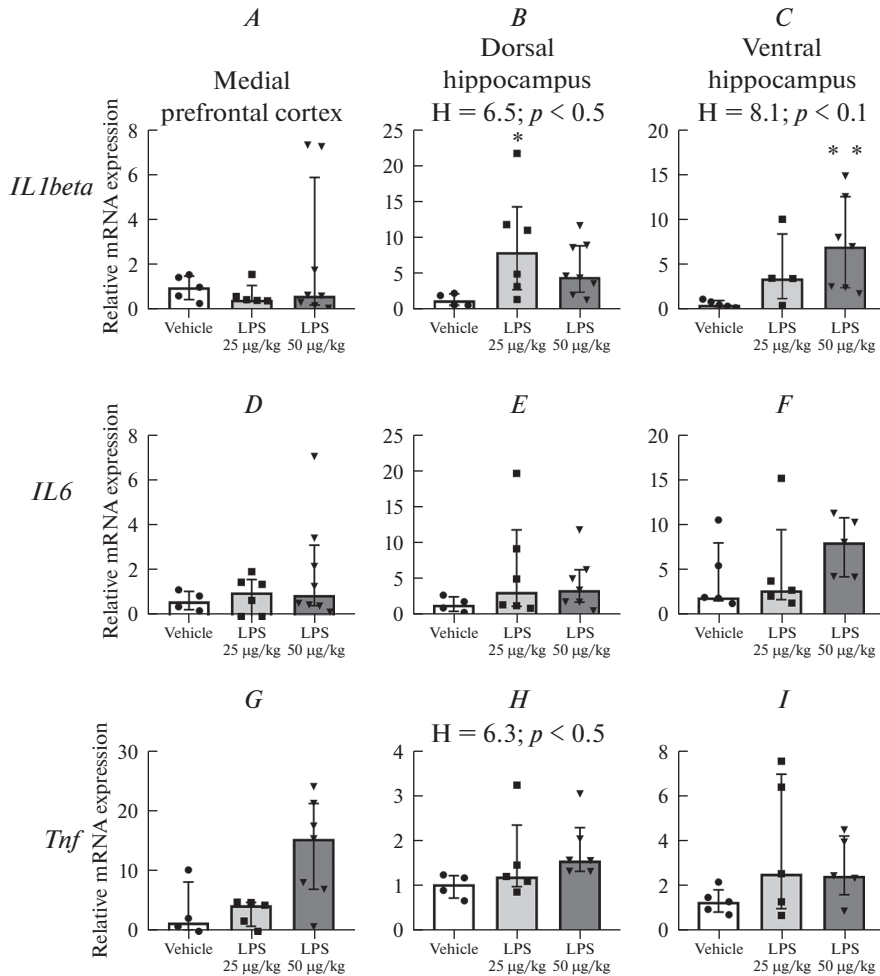


Рис. 2. Увеличение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов в гиппокампе после введения ЛПС в раннем возрасте. H — достоверные различия между группами по критерию Краскела—Уоллиса; * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой, апостериорный критерий Данна. $n = 4-8$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала.

Fig. 2. Neonatal LPS administration elevates gene expression of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus. In the mPFC, early-life LPS treatment did not change mRNA levels of (A) *IL1beta* gene 2 h post treatment ($p > 0.05$), while its expression increased in (B) dorsal and (C) ventral areas of the hippocampus compared to vehicle-treated control. (D–F) Expression of *IL6* mRNA did not differ between the groups in the studied brain areas. (G) Observable LPS-induced elevation of *Tnf* expression was not statistically significant ($p = 0.50$). TNF mRNA was elevated in the (H) dorsal, but not (I) ventral hippocampus ($p > 0.05$) of LPS-treated animals in comparison with control rats. H — significant differences between groups by Kruskal — Wallis test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, Dunn's *post hoc* test. $n = 4-8$. Data presented as Median and Interquartile range.

ших ЛПС, не достигало уровня статистической значимости ($H = 4.3$, $p = 0.12$, критерий Краскела—Уоллиса; (рис. 3E)).

Длительность локомоторной активности была пониженной у крыс с введением 25 мкг/кг ЛПС ($H = 7.20$; $p = 0.028$; физ.р-р—ЛПС25, $p = 0.051$, попарное сравнение

критерием Данна; (рис. 3G)). По показателю движения на месте животные трех групп достоверно не различались ($H = 5.4$, $p = 0.07$, критерий Краскела–Уоллиса; (рис. 3H)). Поскольку явных качественных нарушений двигательных функций у экспериментальных крыс не отмечалось, можно предположить, что снижение локомоции в новом пространстве было связано с пониженной исследовательской мотивацией.

Таким образом, введение ЛПС в течение третьей недели жизни, приводило к умеренным нарушениям исследовательского поведения и снижению уровня тревожности экспериментальных животных.

Введение ЛПС в раннем возрасте вызывает отдаленные изменения уровня экспрессии генов субъединиц NMDA-и AMPA-рецепторов в гиппокампе

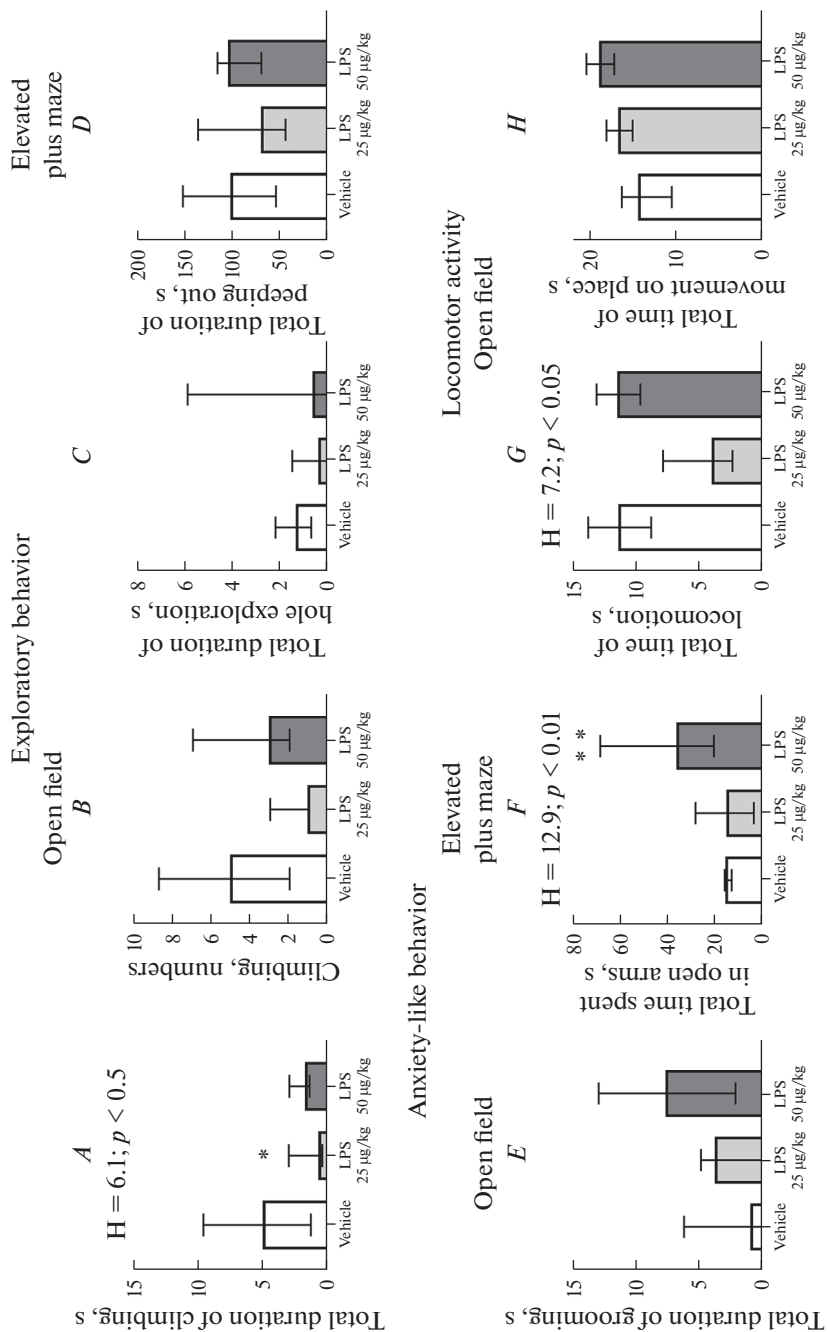
В результате ПЦР-анализа количества мРНК генов субъединиц глутаматных NMDA-рецепторов *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*, а также отношения *Grin2a/Grin2b* не было выявлено различий в мПФК и ДГ между контрольной группой и группами животных, получавших в раннем возрасте ЛПС в обеих дозах (критерий Краскела–Уоллиса, мПФК: *Grin1* $H = 2.6$, $p = 0.28$; (рис. 4A); *Grin2a* $H = 0.8$, $p = 0.68$; (рис. 4D); *Grin2b* $H = 0.7$, $p = 0.73$; (рис. 4G); *Grin2a/Grin2b* $H = 2.2$, $p = 0.34$; (рис. 4J); ДГ: *Grin1* $H < 0.1$, $p = 0.96$; (рис. 4B); *Grin2a* $H = 2.3$, $p = 0.34$; (рис. 4E); *Grin2b* $H = 2.3$, $p = 0.34$; (рис. 4H); *Grin2a/Grin2b* $H = 3.2$, $p = 0.21$; (рис. 4K)).

В вентральной области гиппокампа также не было выявлено различий между группами по уровню экспрессии генов GluN1- и GluN2a-субъединиц (критерий Краскела–Уоллиса, *Grin1* $H = 3.4$, $p = 0.18$; (рис. 4C); *Grin2a* $H = 1.2$, $p = 0.57$; (рис. 4F)). При этом выявлено повышение уровня продукции мРНК GluN2b-субъединицы в ВГ взрослых животных, получавших в течение 3-й недели ЛПС в дозе 50 мкг/кг, по сравнению с контрольной группой (физ.р-р–ЛПС25 $p = 0.64$, физ.р-р–ЛПС50 $p < 0.01$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 4I)), а также снижение отношения количества мРНК генов *Grin2a/Grin2b* в вентральном гиппокампе таких животных в сравнении с контролем (физ.р-р–ЛПС25 $p = 0.12$, физ.р-р–ЛПС50 $p < 0.01$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 4L)).

Уровень экспрессии гена GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов не различался у взрослых животных трех групп в мПФК ($H = 3.2$, $p = 0.21$, критерий Краскела–Уоллиса; (рис. 5A)) и повышен в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, причем уровни статистической значимости описываемые различия достигают после введения ЛПС в дозе 25 мкг/кг для дорзальной области (физ.р-р–ЛПС25 $p < 0.01$, физ.р-р–ЛПС50 $p = 0.08$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 5B)) и

Рис. 3. Отдаленные изменения ориентировочно-исследовательского поведения животных в результате введения ЛПС в раннем возрасте. Н – достоверные различия между группами по критерию Краскела–Уоллиса; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой, апостериорный критерий Данна. $n = 6–14$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала.

Fig. 3. Adult animals treated with LPS during early postnatal period display aberrant exploratory and anxiety-like behaviors. Early-life LPS administration on P15, P18, P21 led to a (A) decreased total duration of climbing in the Open field (OF) compared to control, while no differences in (B) total number of climbing (OF), (C) duration of hole exploration (OF), (D) total duration of peeping out in the Elevated plus maze (EPM) were observed between the groups. (E) total duration of grooming (OF) increased in LPS-treated groups statistically insignificant, while (F) total time spent in the open arms of EPM increased after LPS 50 $\mu\text{g/kg}$ compared with control. (G) While animals treated with 25 $\mu\text{g/kg}$ LPS were less horizontally active in comparison with control rats, (H) no differences of total time of movement on place were observed. Н – significant differences between groups by Kruskal–Wallis test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, Dunn's *post hoc* test. $n = 6–14$. Data presented as Median and Inter-quartile range.



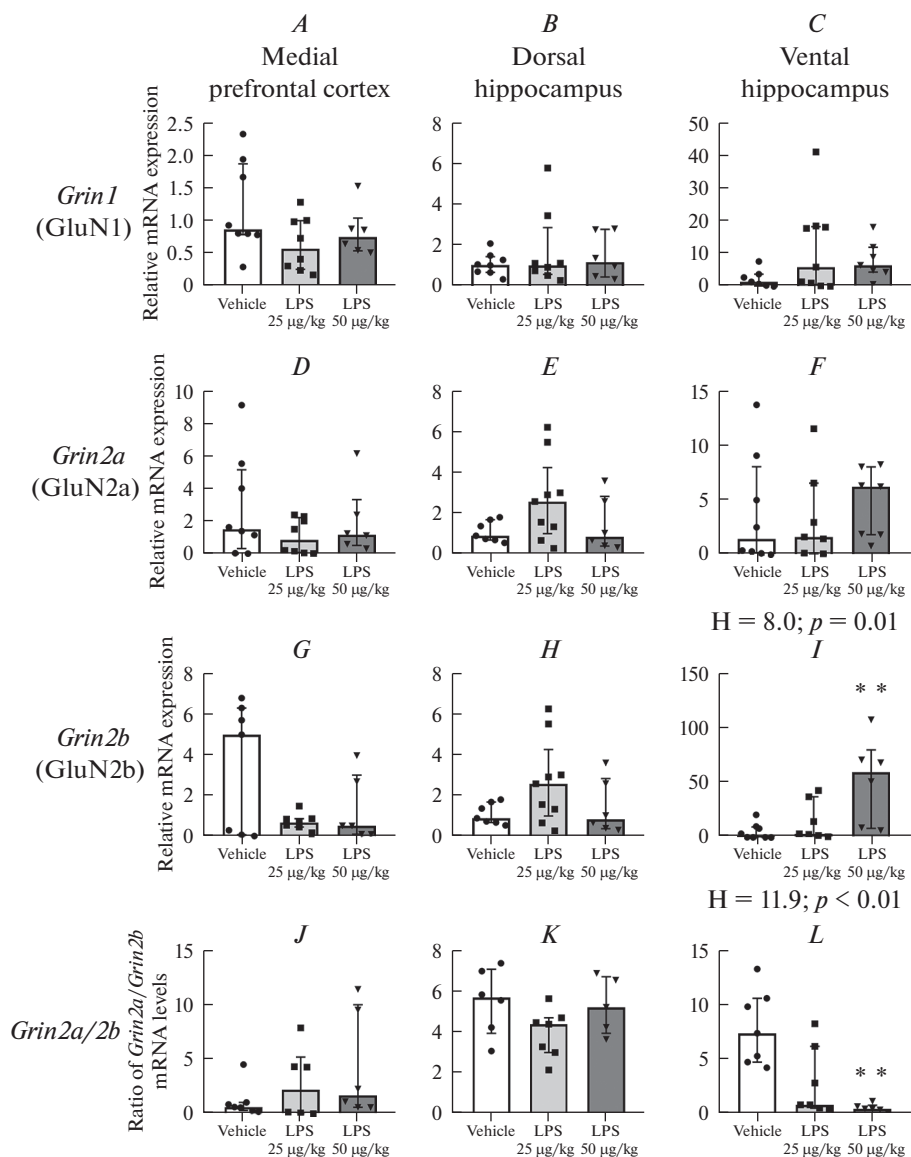


Рис. 4. Изменения уровня экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов в мозге взрослых крыс в результате введения ЛПС в раннем возрасте. H – достоверные различия между группами по критерию Краскела–Уоллиса; ** – $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой, апостериорный критерий Данна. $n = 5-9$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала.

Fig. 4. Early postnatal LPS administration affects mRNA expression of genes encoding NMDA receptor subunits in the brain of adult rats. In the mPFC and DH of 3.5 m.o. animals, no effects of LPS injections on P15, P18, P21 compared to control were found regarding mRNA expression of NMDA receptor subunit genes (A, B) *Grin1* (encodes GluN1 subunit), (D, E) *Grin2a* (encodes GluN2a subunit), (G, H) *Grin2b* (encodes GluN2b subunit), as well as (J, K) ratio of *Grin2a/Grin2b* mRNA expression ($p > .05$). mRNA expression levels of (C) *Grin1* and (F) *Grin2a* in the VH also did not differ between LPS- and vehicle-treated groups ($p > 0.05$), whereas (I) *Grin2b* expression was upregulated and (L) *Grin2a/Grin2b* ratio decreased in the VH of adult rats that have been injected with 50 µg/kg LPS during early development. H – significant differences between groups by Kruskal–Wallis test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, Dunn's *post hoc* test. $n = 5-9$. Data presented as Median and Interquartile range.

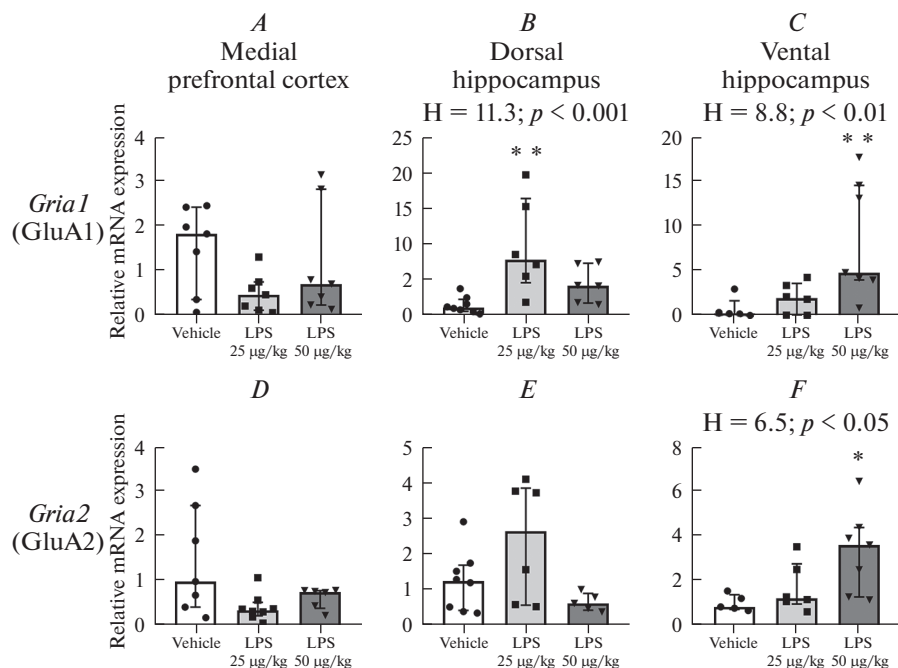


Рис. 5. Изменения уровня экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов в мозге взрослых крыс в результате введения ЛПС в раннем возрасте. Н — достоверные различия между группами по критерию Краскела—Уоллиса; * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой, апостериорный критерий Данна. $n = 5-8$. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала.

Fig. 5. mRNA expression of genes encoding AMPA receptor subunits in the brain of adult rats is violated by early postnatal LPS administration. Expression of genes (A) *Gria1* (encodes GluA1 subunit) and (D) *Gria2* (encodes GluA2 subunit) in the mPFC of LPS- and vehicle-treated animals was found to be equal among the groups ($p > 0.05$). In the DH of adult rats, (B) expression of *Gria1* is upregulated by neonatal LPS 25 µg/kg injections compared to control, while (E) *Gria2* mRNA expression was not changed ($p > 0.05$). Administration of 50 µg/kg LPS on P15, P18, P21 led to increased mRNA levels of (C) *Gria1* and (F) *Gria2* genes in the VH of adult animals. Н — significant differences between groups by Kruskal — Wallis test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control, Dunn's *post hoc* test. $n = 5-8$. Data presented as Median and Interquartile range.

50 мкг/кг — для вентральной (физ.р-р—ЛПС25 $p = 0.83$, физ.р-р—ЛПС50 $p < 0.01$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 5С)).

В вентральной области гиппокампа также выявлено более высокое содержание мРНК GluA2-субъединицы AMPA-рецептора после введений ЛПС в дозе 50 мкг/кг в сравнении с контрольными животными (физ.р-р—ЛПС25 $p = 0.80$, физ.р-р—ЛПС50 $p = 0.03$, попарное сравнение критерием Данна; (рис. 5F)). Различий по уровню экспрессии гена *Gria2* в мПФК и ДГ взрослых животных трех групп не выявлено (соответственно $H = 4.8$, $p = 0.09$; $H = 4.2$, $p = 0.12$, критерий Краскела—Уоллиса; (рис. 5D, E)).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование выявило отсроченные нарушения исследовательского поведения, снижение уровня тревожности и изменение экспрессии генов субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов в гиппокампе крыс после введения в раннем постнатальном периоде бактериального ЛПС в дозах, индуцирую-

щих развитие воспалительных реакций (повышенный синтез провоспалительных цитокинов) в мозге.

Наиболее близким аналогом нашей работы являются исследования Е.-М. Hargé с соавт. [46], исследовавшими особенности экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов у крыс, которым однократно вводили бактериальный ЛПС в различные периоды раннего постнатального онтогенеза. Отличия проведенного нами исследования заключались в том, что кроме субъединиц NMDA-рецепторов были исследованы изменения экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов, ЛПС вводили курсом, а для однократных введений были использованы более низкие дозы ЛПС (25 и 50 мкг/кг против 100 мкг/кг, использованных Е.-М. Hargé с соавт.). Кроме того, в нашей работе был проведен дифференциальный анализ изменений, происходящих в вентральной и дорзальной областях гиппокампа. Последнее было важно в связи с появлением в последние годы исследований, доказывающих различную функциональную роль вентральной и дорзальной областей гиппокампа [47–49].

Проведенные нами исследования показали, что курсовое введение ЛПС в течение 3-й недели жизни усиливает экспрессию гена GluN2b-субъединицы NMDA-рецептора, а также приводит к уменьшению соотношения мРНК GluN2a/2b в вентральном, но не дорзальном гиппокампе и не в медиальной префронтальной коре. Этот результат согласуется с данными, полученными Е.-М. Hargé с соавт., выявившими увеличение продукции мРНК GluN2b в клетках гиппокампа крыс после введения им ЛПС на 14-е сутки жизни [46]. В отличие от названных авторов мы не выявили усиления экспрессии гена GluN2b-субъединицы во фронтальной коре и не обнаружили усиления экспрессии гена GluN2a-субъединицы в гиппокампе, что может быть связано с более низкой дозой ЛПС, использованной в наших экспериментах.

Экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов глутамата в работе Е.-М. Hargé с соавт. не изучалась, однако она была исследована М.А. Galic с соавт. в другой экспериментальной модели — после интрацеребровентрикулярного введения на 14-й день жизни PolyI:C (синтетическая молекула, введение которой моделирует вирусную инфекцию). Во взрослом возрасте у данных экспериментальных крыс отмечалось усиление экспрессии гена GluA1-субъединицы в гиппокампе [50], что соответствует результатам, полученным нами на модели с введением бактериального ЛПС. Кроме того, мы выявили усиление продукции мРНК GluA2-субъединицы в вентральном гиппокампе, что не отмечалось в модели с введением PolyI:C [50].

Обращает на себя внимание, что наиболее выраженные изменения экспрессии генов как провоспалительных цитокинов, так и субъединиц ионотропных рецепторов глутамата выявлены нами в гиппокампе, но не в медиальной префронтальной коре. Большая чувствительность нейронов гиппокампа по сравнению с нейронами медиальной префронтальной коры к системному введению ЛПС была продемонстрирована в электрофизиологических исследованиях [51]. Было показано, что системное введение ЛПС приводит к появлению спайк-волновых разрядов в гиппокампе, но не в коре. Некоторые авторы предполагают селективную повышенную чувствительность гиппокампа к действию провоспалительных агентов [47]. Возможно, это связано с высокой плотностью в клетках гиппокампа рецепторов провоспалительного цитокина интерлейкина-1 [52], опосредующего центральные эффекты ЛПС.

В нашем исследовании у взрослых крыс, которым вводили ЛПС в течение 3-й недели жизни, более выраженные изменения экспрессии генов субъединиц NMDA-и AMPA-рецепторов обнаружены в вентральном (по сравнению с дорзальным) гиппокампе. Поскольку вентральный гиппокамп играет важную роль в регуляции эмоционального поведения, в частности, уровня тревожности [47], в связи с полученными результатами представлялось актуальным оценить влияние неонатальных введений ЛПС на тревожное поведение взрослых животных.

Было показано, что курсовое введение ЛПС в течение 3-й недели жизни приводит к незначительному снижению исследовательского поведения в Открытом поле и уменьшению уровня тревожности в Приподнятом крестообразном лабиринте.

Влияние неонатальных инъекций ЛПС на данные формы поведения ранее были оценены в ряде работ. Большинство исследователей осуществляли инъекции ЛПС в первые дни жизни экспериментальных животных. Повышение тревожности, в том числе в Приподнятом крестообразном лабиринте, было показано у крыс-подростков, получавших инъекции ЛПС в дозе 50 мкг/кг на 5-е и 7-е сутки жизни [53]. Также высокий уровень тревожности выявлен у взрослых крыс, которым вводили 25 мкг/кг ЛПС в первый день жизни [54] либо 50 мкг/кг на 3-й и 5-й день жизни [55]. Однако другие авторы в тех же моделях (введение 50 мкг/кг ЛПС на 3-е и 5-е сутки жизни) отмечают пониженную тревожность у подростков [56] и взрослых животных [57].

Работ, в которых ЛПС вводился бы в течение 3-й недели жизни, значительно меньше. V.M. Doenni с соавт. было показано, что инъекции ЛПС в дозе 100 мкг/кг на 14-й день жизни приводят к нарушению угасания страха в ответ на условный стимул у взрослых обученных животных, при этом поведение в Приподнятом крестообразном лабиринте не нарушается [58]. S.J. Spencer с соавт. в аналогичной экспериментальной парадигме не обнаружили изменения уровня тревожности, хотя показали нарушение исследовательского поведения [59]. Возможно, влияние неонатальных инъекций ЛПС на уровень тревожности зависит от дозы эндотоксина и сроков его введения.

Снижение уровня тревожности, выявленное нами, может быть связано с обнаруженными изменениями экспрессии генов NMDA-рецепторов в вентральном гиппокампе. Вовлеченность данных рецепторов в регуляцию тревожного поведения ранее была показана в нескольких фармакологических исследованиях. Так, было выявлено, что введение самого N-метил-D-аспартата в вентральный гиппокамп увеличивало время пребывания в открытых рукавах Приподнятого крестообразного лабиринта, что свидетельствует о снижении тревожности [60]. Кроме того, инъекции в ту же зону мозга антагониста NMDA-рецепторов D-AP5 отменяло анксиолитические эффекты морфина [61].

В целом, проведенное нами исследование показало, что введение бактериально-го ЛПС в период активного формирования NMDA- и AMPA-глутаматных рецепторов, приводит к отставленным во времени изменениям экспрессии генов субъединиц этих рецепторов и связанных с ними форм поведения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФФИ грант № 17-04-02116 и Программой президиума РАН № 18.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bandelow B., Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin. Neurosci.* 17(3): 327–335. 2015.
2. Remes O., Brayne C., van der Linde R., Lafortune L. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. *Brain Behav.* 6(7): e00497. 2016.
3. Maccari S., Krugers H.J., Morley-Fletcher S., Szyf M., Brunton P.J. The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. *J. Neuroendocrinol.* 26(10): 707–723. 2014.
4. Goodwin R.D. Association between infection early in life and mental disorders among youth in the community: a cross-sectional study. *BMC Public Health.* 11: 878. 2011.
5. Buchanan M.M., Hutchinson M., Watkins L.R., Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J. Neurochem.* 114(1): 13–27. 2010.
6. Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 29(2): 247–264. 2009.
7. Ling Z., Zhu Y., Tong C.W., Snyder J.A., Lipton J.W., Carvey P.M. Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. *Exp. Neurol.* 216(2): 312–320. 2009.

8. Majidi J., Kosari-Nasab M., Salari A.-A. Developmental minocycline treatment reverses the effects of neonatal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors, hippocampal inflammation, and HPA axis activity in adult mice. *Brain Res. Bull.* 120: 1–13. 2016.
9. Majidi-Zolbanin J., Azarfarin M., Samadi H., Enayati M., Salari A.-A. Adolescent fluoxetine treatment decreases the effects of neonatal immune activation on anxiety-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.* 250: 123–132. 2013.
10. Dinel A.-L., Joffre C., Trifilieff P., Aubert A., Foury A., Le Ruyet P., Layé 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.* 11: 155. 2014.
11. 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.* 43: 55–65. 2013.
12. 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.* 304: 1–10. 2016.
13. Sun H., Jia N., Guan L., Su Q., Wang D., Li H., Zhu Z. Involvement of NR1, NR2A different expression in brain regions in anxiety-like behavior of prenatally stressed offspring. *Behav. Brain Res.* 257: 1–7. 2013.
14. Sweatt J.D. Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances. *J. Neurochem.* 139 Suppl: 179–199. 2016.
15. Diering G.H., Hugarir R.L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron.* 100(2): 314–329. 2018.
16. Lisman J. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 372(1715). 2017.
17. Sarantis K., Antoniou K., Matsokis N., Angelatou F. Exposure to novel environment is characterized by an interaction of D1/NMDA receptors underlined by phosphorylation of the NMDA and AMPA receptor subunits and activation of ERK1/2 signaling, leading to epigenetic changes and gene expression in rat hippocampus. *Neurochem. Int.* 60(1): 55–67. 2012.
18. Du J., Quiroz J., Yuan P., Zarate C., Manji H.K. Bipolar disorder: involvement of signaling cascades and AMPA receptor trafficking at synapses. *Neuron Glia Biol.* 1(3): 231–243. 2004.
19. Du J., Creson T. K., Wu L.-J., Ren M., Gray N.A., Falke C., Wei Y., Wang Y., Blumenthal R., Machado-Vieira R., Yuan P., Chen G., Zhuo M., Manji H.K. The role of hippocampal GluR1 and GluR2 receptors in manic-like behavior. *J. Neurosci.* 28(1): 68–79. 2008.
20. Machado-Vieira R., Henter I.D., Zarate C.A. New targets for rapid antidepressant action. *Prog. Neurobiol.* 152: 21–37. 2017.
21. Barkus C., McHugh S.B., Sprengel R., Seeburg P.H., Rawlins J.N.P., Bannerman D.M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur. J. Pharmacol.* 626(1): 49–56. 2010.
22. Solati J. Dorsal hippocampal N-methyl-D-aspartate glutamatergic and δ -opioidergic systems modulate anxiety behaviors in rats in a noninteractive manner. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 27(11): 485–493. 2011.
23. Gielen M., Siegler Retchless B., Mony L., Johnson J.W., Paoletti P. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature.* 459(7247): 703–707. 2009.
24. Hansen K.B., Yi F., Perszyk R.E., Furukawa H., Wollmuth L.P., Gibb A.J., Traynelis S.F. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* 150(8): 1081–1105. 2018.
25. Henley J.M., Wilkinson K.A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 17(6): 337–350. 2016.
26. Greger I.H., Esteban J.A. AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17(3): 289–297. 2007.
27. Liu S., Lau L., Wei J., Zhu D., Zou S., Sun H.-S., Fu Y., Liu F., Lu Y. Expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron.* 43(1): 43–55. 2004.
28. Wenzel A., Fritschy J. M., Mohler H., Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J. Neurochem.* 68(2): 469–478. 1997.
29. Babb T. L., Mikuni N., Najm I., Wylie C., Olive M., Dollar C., MacLennan H. Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Res.* 64(1–2): 23–30. 2005.
30. du Bois T.M., Huang X.-F. Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction: relevance to schizophrenia. *Brain Res. Rev.* 53(2): 260–270. 2007.
31. Lippman-Bell J.J., Zhou C., Sun H., Feske J.S., Jensen F.E. Early-life seizures alter synaptic calcium-permeable AMPA receptor function and plasticity. *Mol. Cell Neurosci.* 76: 11–20. 2016.
32. Yuan T., Bellone C. Glutamatergic receptors at developing synapses: the role of GluN3A-containing NMDA receptors and GluA2-lacking AMPA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 719(1–3): 107–111. 2013.

33. *Szczurowska E., Mareš P.* NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiol. Res.* 62. Suppl 1: S21–S38. 2013.
34. *Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H.* Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12(3): 529–540. 1994.
35. *Guillarte T.R., McGlothlin J.L.* Hippocampal NMDA receptor mRNA undergoes subunit specific changes during developmental lead exposure. *Brain Res.* 790(1–2): 98–107. 1998.
36. *Farhy-Tselnick I., Allen N.J.* Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural. Dev.* 13(1): 7. 2018.
37. *Kumar S.S., Bacci A., Kharazja V., Huguenard J.R.* A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 22(8): 3005–3015. 2002.
38. *Blanco-Suarez E., Liu T.-F., Kopelevich A., Allen N.J.* Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors. *Neuron.* 100(5): 1116–1132.e13. 2018.
39. *Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th Edition. Acad. Press. 2007.
40. *Lin W., Burks C.A., Hansen D.R., Kinnamon S.C., Gilbertson T.A.* Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels. *J. Neurophysiol.* 92(5): 2909–2919. 2004.
41. *Rioja L., Bush K.A., Buckton J.B., Dickson M.C., Life P.F.* Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clin. Exp. Immunol.* 137(1): 65–73. 2004.
42. *Giza C.C., Maria N.S.S., Hovda D.A.* N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J. Neurotrauma.* 23(6): 950–961. 2006.
43. *Floyd D.W., Jung K.-Y., McCool B.A.* Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307(3): 1020–1029. 2003.
44. *Malkin S.L., Amakhin D.V., Veniaminova E.A., Kim K.K., Zubareva O.E., Magazanik L.G., Zaitsev A.V.* Changes of AMPA receptor properties in the neocortex and hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuroscience.* 327: 146–155. 2016.
45. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4): 402–408. 2001.
46. *Harré E.-M., Galic M.A., Mouihate A., Noorbakhsh F., Pittman Q.J.* Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* PMC Canada manuscript submission. 27(3): 644–653. 2008.
47. *Gulyaeva N.V.* Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochem. Res.* 44(6): 1306–1322. 2019.
48. *Fanselow M.S., Dong H.-W.* Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* Elsevier Inc. 65(1): 7–19. 2010.
49. *Floriou-Servou A., von Ziegler L., Stalder L., Sturman O., Privitera M., Rassi A., Cremonesi A., Thöny B., Bohacek J.* Distinct Proteomic, Transcriptomic, and Epigenetic Stress Responses in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Biol. Psychiatry.* 84(7): 531–541. 2018.
50. *Galic M.A., Riazzi K., Henderson A.K., Tsutsui S., Pittman Q.J.* Viral-like brain inflammation during development causes increased seizure susceptibility in adult rats. *Neurobiol. Dis.* 36(2): 343–351. 2009.
51. *Mamad O., Islam M. N., Cunningham C., Tsanov M.* Differential response of hippocampal and prefrontal oscillations to systemic LPS application. *Brain Res.* 1681: 64–74. 2018.
52. *Farrar W.L., Kilian P.L., Ruff M.R., Hill J.M., Pert C.B.* Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. *J. Immunol.* 139(2): 459–463. 1987.
53. *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.* 55(5): 3775–3788. 2018.
54. *Benmhammed H., El Hayek S., Nassiri A., Bousalham R., Mesfioui A., Ouichou A., El Hessni A.* Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments. *Behav. Brain Res.* 362: 46–55. 2019.
55. *Sominsky L., Fuller E.A., Bondarenko E., Ong L.K., Averell L., Naliwaiko E., Dunkley P.R., Dickson P.W., Hodgson D.M.* Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PLoS One.* 8(3): e57700. 2013.
56. *Rico J.L.R., Ferraz D.B., Ramalho-Pinto F.J., Morato S.* Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 215(1): 102–109. 2010.
57. *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.* 59: 135–146. 2017.
58. *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.* 63: 176–185. 2017.

59. Spencer S.J., Heida J.G., Pittman Q.J. Early life immune challenge—effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety. *Behav. Brain Res.* 164(2): 231–238. 2005.
60. Bina P., Rezvanfard M., Ahmadi S., Zarrindast M.R. Anxiolytic-Like Effects and Increase in Locomotor Activity Induced by Infusions of NMDA into the Ventral Hippocampus in Rat: Interaction with GABAergic System. *Basic Clin. Neurosci.* 5(4): 267–276. 2014.
61. Motevasseli T., Rezayof A., Zarrindast M.-R., Nayer-Nouri T. Role of ventral hippocampal NMDA receptors in anxiolytic-like effect of morphine. *Physiol. Behav.* 101(5): 608–613. 2010.

Behavioral Alterations of Adult Rats Evoked by Neonatal Lps Injections Are Associated with Changes of Ionotropic Glutamate Receptors Gene Expression in the Brain

**A. N. Trofimov^{a,*}, A. Yu. Rotov^{a,b}, E. A. Veniaminova^a, K. Fomalont^a,
A. P. Schwarz^{a,b}, and O. E. Zubareva^{a,b}**

^a*Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia*

^b*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

*e-mail: alexander.n.trofimov@gmail.com

A large number of studies indicate the role of early-life experience, in particular neonatal infections, in the formation of a high level of anxiety later in life. Changes in NMDA and AMPA glutamate receptor subunit composition that result in the violation of receptor functional activity may comprise the mechanism behind the behavioral impairments. Our work aimed to investigate exploratory and anxiety-like forms of behavior of adult rats that were treated with lipopolysaccharide (LPS) during the 3rd week of postnatal development at neuroinflammation-inducing doses. Levels of gene expression of NMDA receptor subunits (*Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*) and AMPA receptor subunits (*Gria1*, *Gria2*) in the medial prefrontal cortex, ventral and dorsal areas of the hippocampus were assessed by qRT-PCR. Our study on Wistar male rats revealed that the administration of LPS at doses of 25 and 50 µg/kg on P15, P18, P21 increased the expression of proinflammatory cytokine mRNA (interleukin-1β and tumor necrosis factor) in the hippocampus 2 h post treatment. Elevated expression of *Grin2b*, *Gria1*, *Gria2* genes in the ventral hippocampus was observed 3 months after the administration of 50 µg/kg LPS compared with saline-treated control rats. *Gria2* gene expression was found to be increased in the dorsal hippocampus 3 months after 25 µg/kg LPS injections in comparison with the controls. These changes were accompanied by impaired exploratory behavior of adult LPS-treated rats in the Open field test and a decreased level of anxiety in the Elevated plus maze. Taken together, our results substantiate early-life inflammation as a cause of prolonged changes in the hippocampal expression of genes of NMDA and AMPA receptor subunits and have an impact on related forms of behavior.

Keywords: early development, brain, inflammation, lipopolysaccharide, anxiety, NMDA receptor, AMPA receptor

ЦИТИРОВАТЬ:

Трофимов А.Н., Ротов А.Ю., Вениаминова Е.А., Фомалонт К., Шварц А.П., Зубарева О.Е. Изменение поведения и экспрессии генов ионотропных рецепторов глутамата в мозге взрослых крыс после неонатальных введений бактериального липополисахарида. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(3): 356–372.

DOI: 10.31857/S0869813920030097

TO CITE THIS ARTICLE:

Trofimov A.N., Rotov A.Yu., Veniaminova E.A., Fomalont K., Schwarz A.P., Zubareva O.E. Behavioral Alterations of Adult Rats Evoked by Neonatal LPS Injections are Associated with Changes of Ionotropic Glutamate Receptors Gene Expression in the Brain. *Russian Journal of Physiology.* 106(3): 356–372.

DOI: 10.31857/S0869813920030097

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ФЕНОТИПА
МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C**

© 2020 г. И. Г. Капица¹*, Е. А. Иванова¹, Т. А. Воронина¹, С. Б. Середенин¹

¹Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

*E-mail: ingakap73@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2019 г.

После доработки 19.11.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

Выявлено и подтверждено наличие у мышей линии BALB/c специфических особенностей поведения, которые можно рассматривать как расстройства аутистического спектра (РАС): низкий уровень взаимодействия с социально значимыми стимулами и даже избегание этого взаимодействия, нарушение распознавания и, особенно, узнавания запахов, усиление тревожного и стереотипного поведения. Мыши линии BALB/c могут служить в качестве экспериментальной идиопатической модели РАС для изучения патогенеза заболевания и его фенотипических проявлений, а также для оценки возможных средств коррекции РАС.

Ключевые слова: мыши линии BALB/c, расстройства аутистического спектра, социальный дефицит, стереотипия, нарушения обоняния, тревожность

DOI: 10.31857/S0869813920020053

Расстройства аутистического спектра (РАС) — психические заболевания, возникающие в результате нарушений развития головного мозга, характеризующиеся высокой наследуемостью при значительной как генетической, так и клинической гетерогенности. Основными критериями РАС являются дефициты социальной и коммуникативной сфер, узконаправленные интересы и стереотипии, причем не только моторные, но и мыслительные. Распространенность заболевания по современным данным составляет от 0.5 до 2.0% и неуклонно нарастает по всему миру [1].

Для экспериментального изучения РАС применяются генетически модифицированные грызуны, которые, однако, позволяют анализировать лишь отдельные дисфункции. Наряду с этим используются модели идиопатического РАС — отобранные по фенотипу мыши инбредных линий с хорошо воспроизводимыми социальными дефицитами и стереотипным поведением, а также рядом сопряженных с РАС симптомов [2]. Среди последних рассматриваются мыши линии BALB/c, демонстрирующие признаки поведения, схожие с РАС, в числе которых низкий уровень социальных взаимоотношений, снижение различных аспектов материнского поведения, высокий уровень тревожности, межсамцовой агрессии, и, кроме того, большая восприимчивость к амфетамин- или метамфетамин-индуцированной аутоагрессии, которая уменьшается при лечении рisperидоном [3].

Согласно другим данным у мышей линии BALB/c не обнаружено дефектов в социальной памяти или социальном познании, отсутствует нарушение обонятельных функций [3], но выявлено слабо выраженное стереотипное поведение (груминг, рытье подстилки, жевание) [1].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей поведения мышей линии BALB/c в сравнении с мышами линии C57Bl/6 или аутбредными мышами SHK в некоторых поведенческих тестах, применяемых для оценки симптомов PAC.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 62 самцах мышей линии BALB/c 5 недельного возраста и массой 13–15 г, на 18 самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 5 нед., массой 20–22 г и на 31 самцах аутбредных мышей SHK в возрасте 5 нед., массой 22–26 г на начало эксперимента, полученных из питомника филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России”. Животных рандомизировано распределяли по группам (численность групп указана в таблицах) и содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29 августа 2014 г. № 51. Работа выполнялась в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и была одобрена комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” протокол № 1 от 18.02.2019. Животные содержались в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к корму (гранулированный корм ГОСТ Р 50258-92) и отфильтрованной водопроводной воде (фильтр Барьер Гранд NEO) ad libitum, при температурном режиме 20–22°C, при световом режиме — 12 ч свет/12 ч темнота; в полипропиленовых клетках с решеткой из цинкохромовой стали (Т/ЗС), с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки по 8–10 мышей в каждой клетке. Адаптация к условиям вивария проводилась в течение 14–16 дней. Все эксперименты проводились с 9.00 до 14.00.

Тест нарушения социального взаимодействия применяли в модифицированном варианте, разработанном в лаборатории J.N. Crawley [4] и широко используемом во многих экспериментах [3, 5–12]. Исследование проводили в акриловой установке длиной 60, шириной 24 и высотой 30 см, разделенной прозрачными перегородками на три равных отсека, сообщающихся между собой. Мышь помещали в центральный отсек установки и оставляли на 10 мин при поднятых перегородках между отсеками. Затем, в момент, когда тестируемая мышь находилась в центральном отсеке, перегородки опускали и в крайние отсеки помещали цилиндры из металлической сетки (11 см в высоту, 9 см в диаметре). В одном из цилиндров находилась незнакомая мышь той же линии, пола и возраста, что и тестируемая (социальный объект), а в другом — ранее не предъявлявшаяся пластмассовая игрушка высотой 8 и шириной 4 см (несоциальный объект). Тестирование проводили в течение 6 мин, регистрируя продолжительность нахождения тестируемой мыши в отсеке с социально значимым или незначимым объектами; продолжительность обнюхивания социального объекта (подход тестируемой мыши на 1 см и ближе к цилиндру с новой мышью); число заходов мыши в отсеки и число “контактных” подходов тестируемой мыши к социально значимому объекту. Мыши, у которых время, проведенное в отсеках с разными по социальной значимости объектами, статистически не отличалось, или время, проведенное в отсеке с несоциальным объектом, было больше, чем в отсеке с социальным объектом, определялись как мыши с утратой общительности и дефицитом социального взаимодействия, что характерно для PAC.

У лиц с PAC отмечаются нарушения походки и обоняния, которые могут быть отражением патологии мозжечка и нервных узлов, связанных с обонянием, например, обонятельной луковицы и вентральной височной обонятельной коры, имеющих место при этих расстройствах [13]. Поэтому предиктором социального дефицита рассматривается обонятельная диссоциация [14].

Тест на откапывание еды (Buried food-finding test) выполнялся согласно K. Radyushkin с соавт. [15]. Животным в качестве корма на протяжении 4 дней давали шоколадное печенье (2 г/животное) при свободном доступе к воде. Опыт проводили на фоне 12-часовой пищевой депривации. Мышь помещали в один из концов стандартной домашней клетки, пол которой застилали чистыми опилками высотой 3 см, и с закопанным на другом конце клетки на глубину 1.5 см кусочком шоколадного печенья. Регистрировали латентное время нахождения еды (начало ее раскапывания). Продолжительность поиска не должна превышать 2 мин. Для оценки моторной активности и уровня мотивации животного тест повторяли, но кусочек печенья оставляли на поверхности опилок.

Тест обонятельной дискриминации (Olfactory discrimination test). В данном тесте исследуется поведение животных, направленное на поиск гнезда в условиях предъявления двух обонятельных стимулов [16]. Установка представляет собой стандартную клетку длиной 35, шириной 20 и высотой 15 см, в центре которой проведена линия, а в боковых концах установлены стеклянные чашки Петри диаметром 10 см, одна из которых заполнена опилками из домашней клетки, смена опилок в которой не проводилась в течение 3 дней (запах гнезда), а другая — чистыми опилками (нейтральный запах). Животных индивидуально помещали в центр клетки и измеряли латентное время первого выбора одного из стимулов, определяемое по моменту захода мыши обеими передними лапами в чашку с опилками.

Тест обонятельной габитуации/дисгабитуации (Olfactory habituation/dishabituation) позволяет изучать обонятельное распознавание, предпочтение и привыкание к несоциальным и социальным запахам при их повторном предъявлении [10, 17, 18]. Исследование проводили согласно методике, предложенной В.С. Ryan и соавт. [18]. Мышь перед началом тестирования помещали в стандартную клетку с чистыми опилками на 30 мин. Ватный тампон длиной 15 см смачивали в воде и пропускали через крышку клетки так, чтобы он располагался на высоте 5 см от выстилающих дно клетки опилок. Выполняли по 3 предъявления каждого запаха: нейтральный стимул — дистиллированная вода; несоциальный — разбавленный цветочный запах (экстракт апельсина, 100% натуральное эфирное масло апельсина сладкого (ООО Аспера Лтд), разбавленное дистиллированной водой в соотношении 1 : 100); социальный — моча мышей линии C57Bl/6. Продолжительность каждого предъявления составляла 2 мин. Регистрировали суммарное число реакций животных, которые включали подходы к тампону и взаимодействие с ним, а именно, повороты головы мыши в сторону стимула при нахождении на расстоянии не более 2 см от него, обнюхивание, залезание, жевание тампона. Кроме того, фиксировали число вставаний мышей на задние лапы и закапываний в подстилку.

Тест обследования отверстий (Hole-board exploration) проводили согласно методике S. Моу и соавт. [7]. Тестирование проводили в инфракрасном актометре фирмы Panlab, Испания (модель LE 8825 IR Motor Activity Monitor V 08/05/120). Установка представляет собой квадрат, пол которой разделен на 16 квадратов с 16 одинаковыми отверстиями. Отверстия были пронумерованы и подразделены на угловые, пристенные и центральные. В течение 10 мин регистрировали: общее число перемещений мыши в установке, число заглядываний (Nose poke) в отверстия, а также продолжительность её пребывания в угловой и в пристенной зоне установки.

Тест “Открытое поле” является моделью слабого стресса у грызунов [19]. В исследовании использовали установку “Открытое поле” (TS0501-М, ООО НПК Открытая Наука, Россия). Мышь помещали в центр поля и регистрировали ее поведение в течение 5 мин в условиях сменной освещенности: 3 мин — ярко освещенное поле (источник света: лампа накаливания общего назначения напряжением 230 В, мощностью 40 Вт, расположенная над центром поля на высоте 95–100 см), 1 мин — тем-

нота (включали красную светодиодную ленту, 12 В, закрепленную по верхнему борту установки) и 1 мин — вновь ярко освещенное поле.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica V. 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальных группах либо отсутствовало нормальное распределение, либо межгрупповое равенство дисперсий не соблюдалось, дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна—Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Результаты в таблицах представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$). Различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В тесте социального взаимодействия мыши инбредной линии C57Bl/6, служившие контролем для мышей BALB/c, характеризовались как общительные, демонстрирующие высокий уровень социального взаимодействия, животные. Так, у мышей C57Bl/6 средняя длительность нахождения в отсеке с незнакомой мышью (социально значимым объектом — аутбредная мышь-самец), была на 61.3% больше, чем в отсеке с социально незначимым объектом; а продолжительность обнюхивания незнакомой мыши было на 32.0% дольше, чем в группе животных линии BALB/c (табл. 1). При этом мыши линии C57Bl/6 в 1.54 раза чаще посещали отсек с социально значимым объектом, чем противоположный отсек, и совершали в 1.25 раз больше подходов к социальному объекту на расстоянии менее 1 см, чем мыши BALB/c (табл. 1). Оценка уровня социального взаимодействия (общительности), вычисленная по соотношению времени, проведенному мышами группы C57Bl/6 в отсеке, содержащем незнакомую мышь, ко времени в 2-х различных по социальной значимости отсеках, выявила предпочтение мышами этой линии социального объекта несоциальному.

Мыши линии BALB/c предпочитали отсек с несоциальным объектом, находясь в нем на 12.0% дольше, чем в отсеке с социальным объектом (табл. 1). Время обнюхивания незнакомой мыши было в 1.5 раза меньше, чем в группе мышей C57Bl/6. Мыши линии BALB/c осуществляли достоверно меньше заходов в отсеки с объектами по сравнению с животными другой линии, что, по-видимому, объясняется их повышенной тревожностью по сравнению с мышами C57Bl/6. Однако число заходов в отсек с социально значимым объектом у мышей BALB/c было в 2.2 раза больше, чем в отсек с социально незначимым объектом, хотя эти заходы были непродолжительными (табл. 1). Показатель общительности в группе мышей BALB/c составил 46.0%, что указывает на отсутствие предпочтения к социальному стимулу.

Таким образом, по результатам данного теста, мыши линии BALB/c определяются как “малообщительные” животные, демонстрирующие низкий уровень социального взаимодействия, что характерно для аномалий поведения при аутизме. Полученные данные находят подтверждение в исследованиях других авторов [5, 17].

В тесте “Откапывание еды” мыши линии BALB/c в 1.7 раза дольше искали запечатанную под опилками еду в сравнении с мышами SHK. При этом, в условиях визуализации еды латентное время подхода к еде у животных разных линий не отличалось, что свидетельствует о равном уровне мотивации и отсутствии двигательных различий (рис. 1). Полученные данные коррелируют с клиническими наблюдениями, демонстрирующими нарушение обоняния и вкуса у пациентов с РАС, у которых способность идентификации запахов снижена по сравнению со здоровыми людьми [15].

В тесте обонятельной дискриминации мыши линии BALB/c затрачивали в 1.6 раз больше времени на поиск “гнезда”, при этом к опилкам с нейтральным за-

Таблица 1. Поведение мышей линий BALB/c и C57Bl/6 в тесте социального взаимодействия
Table 1. Behavior of BALB/c and C57Bl/6 mice in the social interaction test

Параметры Parameters		Группа мышей, число животных Group of mice, number of animals	
		BALB/c, $n = 12$	C57Bl/6, $n = 10$
Продолжительность нахождения в отсеке, с Duration of stay in the compartment, s	Центральном Central	96.8 ± 6.9	70.0 ± 2.3*
	С социальным объектом With social object	124.9 ± 12.1	179.6 ± 12.3*
	С несоциальным объектом With a non-social object	141.9 ± 15.7	110.7 ± 8.6 [#]
Длительность обнюхивания социального объекта, с The duration of sniffing of the social object, s		40.4 ± 5.1	59.8 ± 8.1*
Предпочтение отсека с социальным объектом по времени нахождения: $[T_{co}/(T_{co} + T_{nso})] \times 100$ Preference of the compartment with a social object (by time of stay): $[T_{co}/(T_{co} + T_{nso})] \times 100$		46.0%	62.0%
Число заходов в отсек, ед Number of visits in the compartment	С социальным объектом With social object	16.6 ± 0.9	24.8 ± 3.3*
	С несоциальным объектом With a non-social object	7.7 ± 0.8 [#]	13.5 ± 1.1*, [#]
Число подходов к социальному объекту, ед. Number of approaches to the social object		11.8 ± 0.7	14.7 ± 1.2*

* $p < 0.05$ по сравнению с группой мышей BALB/c; [#] $p < 0.05$ по сравнению с показателем отсека с социальным объектом (внутригрупповое сравнение); T – продолжительность нахождения в отсеке; co – социальный объект; nso – несоциальный объект.

* $p < 0.05$ compared to BALB/c mice; [#] $p < 0.05$ compared to the index of the compartment with a social object (intra-group comparison); T – time of staying in the compartment; co – social object; nso – non-social object.

пахом они подходили в 1.4 раза быстрее, чем мыши SHK. Различий между латентным временем выбора нейтральных опилок и опилок из домашней клетки у мыши линии BALB/c не обнаруживалось, тогда как у мышей SHK отмечалось значимое предпочтение опилок “из гнезда” – скорость подхода к ним была в 1.8 раза больше, чем к опилкам с нейтральным запахом (табл. 2).

Кроме того, примерно третья часть мышей линии BALB/c при предоставлении на выбор двух обонятельных стимулов предпочитала нейтральные опилки, тогда как в группе мышей SHK этот выбор имел прямо противоположный характер (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о возможном нарушении способности распознавания запахов у мышей линии BALB/c и, особенно, о стойком избегании социальных стимулов, включая запах домашней клетки.

В тесте обонятельной габитуации/дисгабитуации характерной чертой поведения интактных аутбредных мышей SHK было четкое распознавание нового запаха, что выражалось в повышенной реакции мышей на тампон с нанесенным на него запахом при первом предъявлении каждого обонятельного стимула и в быстром привыкании к запаху при его повторном предъявлении. Так, при первом тестировании запаха “Апельсин” у аутбредных мышей отмечено увеличение на 66.0% реакций на обонятельный стимул по сравнению с предшествующим третьим предъявлением нейтрального запаха “Вода”. Еще более выраженной была реакция аутбредных мышей при первом предъявлении социального обонятельного стимула относительно предшествующего запаха “Апельсин”: увеличение комплекса реакций мышей на ватный тампон, пропитанный новым социальным запахом, составило 84.7% (табл. 3).

У мышей линии BALB/c при предъявлении незнакомого несоциального цитрусового запаха реакция на новый стимул была ниже, чем на третье предъявление

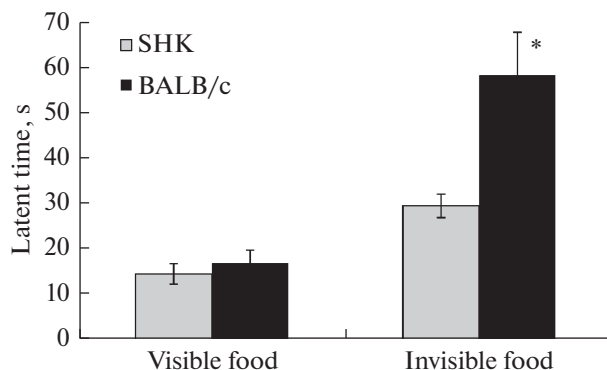


Рис. 1. Продолжительность поиска еды у мышей BALB/c ($n = 10$) и SHK ($n = 12$) в тесте “Откапывание еды”.
Fig. 1. Duration of food search in BALB/c ($n = 10$) and SHK ($n = 12$) mice in the food digging test. * $p < 0.05$ по сравнению с группой мышей SHK. * $p < 0.05$ compared to SHK mice.

нейтрального запаха “Вода” (табл. 3), что, возможно, связано с некоторым нарушением процесса распознавания запахов и с повышенной тревожностью мышей при реакции на новизну. Однако предъявление стимула “Запах мышей C57Bl/6” вызвало повышение активности тестируемых животных, хотя и в меньшей степени, чем в группе аутидных животных.

Анализ динамики реагирования мышей SHK на повторное предъявление одинаковых запахов показал достоверное снижение реакции на них, тогда как у мышей линии BALB/c выраженность адаптации к обонятельным стимулам уменьшалась. Так, при третьем предъявлении запаха “Вода” снижение реакции мышей линии BALB/c относительно первого его предъявления составило 36.0%, тогда как в группе аутидных мышей — 86.8%. Реакция мышей BALB/c на цитрусовый запах при последующих предъявлениях относительно его первой демонстрации практически не менялась. Уменьшение ответной реакции на стимул “Моча мышей C57Bl/6” у мышей линии BALB/c относительно первого его предъявления также было незначительным и составило при его третьем предъявлении всего 27.8% против 69.5% в группе мышей SHK (табл. 3).

Таким образом, у мышей BALB/c выявлена выраженная обонятельная дисабиляция как на социально значимые, так и незначимые запахи.

Таблица 2. Поведение мышей линии BALB/c и мышей SHK в тесте обонятельной дискриминации

Table 2. Behavior of BALB/c and SHK mice in the olfactory discrimination test

Группа, число животных Group of mice, number of animals	Латентное время выбора обонятельного стимула, с The latent time of selection of the olfactory stimulus, s		Число мышей, выбравших обонятельный стимул, % Number of mice that chose the olfactory stimulus, %	
	нейтральный запах neutral smell	запах “гнезда” the smell of “nests”	нейтральный запах neutral smel	запах “гнезда” the smell of “nests”
BALB/c, $n = 29$	$70.0 \pm 8.6^*$	$86.2 \pm 8.9^*$	$65.5 \pm 8.9^{**}$	$34.5 \pm 8.9^{**,\#}$
SHK, $n = 31$	98.4 ± 7.0	$54.0 \pm 8.5^{##}$	32.3 ± 8.5	$67.7 \pm 8.5^{##}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ достоверность различий относительно группы мышей SHK. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ достоверность различий относительно параметров “нейтрального запаха” (внутригрупповое сравнение).
 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to SHK mice. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ compared to the parameters of “neutral smell” (intra-group comparison).

Таблица 3. Реакции на обонятельные стимулы у мышей линии BALB/c и мышей SHK
Table 3. Responses to olfactory stimuli in BALB/c and SHK mice

Обонятельный стимул Olfactory stimulus	Предъявление запаха The presentation of the odor	Реакция на обонятельный стимул, ед. The response to the olfactory stimulus, units	
		SHK, <i>n</i> = 9	BALB/c, <i>n</i> = 16
Нейтральный запах, вода Neutral smell, water	1	12.9 ± 1.5	10.0 ± 0.9
	2	4.0 ± 0.8*	8.0 ± 1.1
	3	1.7 ± 0.5#	6.4 ± 0.7
Апельсин Orange	1	5.3 ± 1.3	3.5 ± 0.9
	2	2.0 ± 0.4*	3.2 ± 0.8
	3	2.0 ± 0.7	2.10 ± 0.81
Моча мышей C57Bl/6 Urine of C57Bl/6 mice	1	13.1 ± 2.7	10.8 ± 1.4
	2	3.9 ± 1.2*	6.9 ± 0.8
	3	4.0 ± 1.5	7.8 ± 1.3

* $p < 0.05$ достоверность различий относительно значений при 1-м предъявлении того же стимула; # $p < 0.05$ достоверность различий относительно значений при 2-м предъявлении того же стимула.

* $p < 0.05$ compared to the parameters at the 1st presentation of the same stimulus; # $p < 0.05$ compared to the parameters at the 2nd presentation of the same stimulus.

Одним из проявлений тревожного и стереотипного поведения мышей, регистрируемого в данном тесте, является число актов закапываний в подстилку. Установлено, что показатель числа актов закапываний в подстилку при предъявлении всех видов обонятельных стимулов был выше в группе мышей линии BALB/c по сравнению с интактными аутбредными мышами SHK (табл. 4). Исходя из того, что различий между реакциями мышей BALB/c (акты закапывания) на предъявление разных по значимости стимулов не было, и, кроме того, реакция на наиболее значимый стимул — социальный запах, была менее всего выражена — в 2 раза меньше, чем при контакте с нейтральным запахом и, в то же время, значимо не отличалась от соответствующей реакции мышей SHK, подобное поведение следует расценивать как повышенную стереотипию и отсутствие интереса к социальному стимулу, а возможно, и как неспособность его распознавания. Нарушение распознавания специфических сигналов, связанных с “дружелюбием”, у мышей BALB/c, проявляющееся в отсутствие реакции у мышей, содержащихся в изоляции, на особой той же линии, возраста и пола, но содержащихся в группе, указывающее на низкую социальную активность этой линии мышей, наблюдалось и в других исследованиях [20].

В тесте обследования отверстий мыши линии BALB/c демонстрировали дефицит исследовательской активности, проявляющийся в уменьшении на 17.4% общего количества заглядываний в отверстия установки по сравнению с группой мышей SHK, при отсутствии различий в общей двигательной активности (табл. 5). Анализ продолжительности нахождения мышей линии BALB/c в угловой, пристенной и центральной зонах установки выявил статистически значимое снижение на 41.4% регистрируемого показателя только в центральной зоне установки по сравнению с группой аутбредных мышей (табл. 5).

Общее число заглядываний в отверстия установки в группе мышей линии BALB/c значимо не отличалось от показателя группы мышей SHK, за исключением снижения в 3.1 раза числа заглядываний в центральные отверстия (табл. 5).

Таким образом, в тесте обследования отверстий существенные отличия поведения мышей разных линий заключались в уменьшении продолжительности нахождения в центре установки и числа заглядываний в центральные отверстия у мышей линии BALB/c как у высокотревожных животных. Признаков повышенной стереотипии в данном тесте обнаружено не было.

Таблица 4. Поведение мышей линии BALB/c и мышей SHK в тесте обонятельной габитуации/дисгабитуации (число закапываний в подстилку)**Table 4.** Behavior of BALB/c and SHK mice in the olfactory habituation/dishabitation test (number of digging in their bedding)

Группа, количество животных Group of mice, number of animals	Число закапываний в подстилку при предъявлении обонятельного стимула, ед. The number of instillations in the litter at the presentation of the olfactory stimulus		
	вода water	апельсин orange	моча мышей C57Bl/6 urine of mice C57Bl/6
BALB/c, $n = 16$	6.8 ± 1.1	5.3 ± 0.6	3.4 ± 0.9
SHK, $n = 9$	$3.0 \pm 0.9^{\#}$	$1.4 \pm 0.6^{\#}$	1.0 ± 0.6

$p < 0.05$ достоверность различий относительно значений в группе мышей BALB/c.# $p < 0.05$ compared to BALB/c mice.**Таблица 5.** Поведение мышей линии BALB/c и мышей SHK в условиях теста обследования отверстий**Table 5.** Behavior of BALB/C and SHK mice in the hole-board test

Параметры Parameters		BALB/c, $n = 15$	SHK, $n = 10$
Локомоторная активность, ед. Locomotor activity		1483.5 ± 107.9	1482.5 ± 80.2
Общее число заглядываний в отверстия, ед. The total number of peeks into the holes		65.9 ± 3.7	79.8 ± 6.5
Время нахождения в зонах, с Time spent in areas, s	Угловая Corner area	278.1 ± 12.5	276.7 ± 10.5
	Пристенная Wall area	288.4 ± 12.1	266.1 ± 11.1
	Центральная Central zone	33.5 ± 6.7	$57.2 \pm 8.5^{\#}$
Количество заглядываний в отверстия, ед. Number of peeks into the holes	Угловые Corner holes	31.3 ± 2.1	35.3 ± 3.0
	Пристенные Wall holes	32.1 ± 2.1	36.7 ± 3.3
	Центральные The center hole	2.5 ± 0.7	$7.8 \pm 1.6^{\#}$

$p < 0.05$ достоверность различий относительно группы мышей BALB/c.# $p < 0.05$ compared to BALB/c mice.

В тесте “Открытое поле” мыши линии BALB/c, независимо от предъявляемых условий освещенности установки, демонстрировали низкую двигательную активность как на периферии установки, так и в прецентральной и центральной ее части по сравнению с группой мышей линии C57BL/6 ($p < 0.05$) (табл. 6). Полученные данные свидетельствуют о малоактивном, пассивном поведении мышей линии BALB/c и о наличии у них ярко выраженной тревожности.

При сравнении показателей группы мышей линии BALB/c, регистрируемых при ярком освещении установки и в его отсутствие, отмечался рост числа перемещений (в среднем на 66.7%) на периферии и в прецентральной части поля (табл. 6). Однако возвращение к яркому освещению установки приводило к снижению на 33.0% активности животных на периферии и к уменьшению числа посещений “опасных” зон (табл. 6).

Согласно данным литературы, у мышей BALB/c, так же как и при РАС у человека, обнаружено снижение концентрации серотонина в мозге, увеличение объема и

Таблица 6. Поведение мышей линии BALB/c и C57Bl6 в условиях теста “Открытое поле со сменной освещенности”**Table 6.** Behavior of BALB/c and C57Bl6 mice in the open field test with light change

Показатели Parameters		BALB/c, $n = 9$	C57Bl6, $n = 8$
		Яркий свет, 3 мин Bright light, 3 min	
Латентное время начала движения The latent time of the beginning of the movement		17.9 ± 4.7	3.8 ± 0.8*
Горизонтальная активность Horizontal activity	Периферия Periphery	5.1 ± 1.0	18.6 ± 1.9**
	2/3 поля 2/3 of the field	0.6 ± 0.1	5.8 ± 0.7**
	Выходы в центр Exits to the center	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1**
Количество заглядываний в отверстия Number of peeks in the holes		4.1 ± 0.4	7.3 ± 0.5**
		Темнота. 1 мин Darkness. 1 min	
Горизонтальная активность Horizontal activity	Периферия Periphery	9.2 ± 1.8 [#]	19.0 ± 2.1**
	2/3 поля 2/3 of the field	1.0 ± 0.5	7.5 ± 1.4**
	Выходы в центр Exits to the center	0.1 ± 0.1	1.5 ± 0.4**
Количество заглядываний в отверстия Number of peeks in the holes		4.5 ± 0.5	6.5 ± 0.2*
		Яркий свет. 1 мин Bright light. 1 min	
Горизонтальная активность Horizontal activity	Периферия Periphery	6.2 ± 1.3	14.0 ± 1.7**
	2/3 поля 2/3 of the field	0.3 ± 0.2	4.7 ± 1.0**
	Выходы в центр Exits to the center	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.6**
Количество заглядываний в отверстия Number of peeks in the holes		4.3 ± 0.5	4.5 ± 1.2

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с мышами BALB/c; # $p < 0.06$ по сравнению аналогичным параметром при предъявлении яркого света (внутригрупповое сравнение).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to BALB/c mice; # $p < 0.06$ compared to the same parameter when presenting bright light (intra-group comparison).

массы головного мозга, прежде всего, размеров гиппокампа, мозжечка, изменение размеров амигдалы, недоразвитость крупных структур белого вещества мозга – мозолистого тела и капсулы интерна [1, 3, 5], уменьшение лобных и теменно-височных долей [21]. Установлено, что у мышей BALB/c реакция страха сопровождается падением связывающей способности бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецептора [22], и также показано длительное снижение уровня BDNF в структурах мозга при стрессовом ответе, что подтверждает недостаточность адаптивных механизмов у мышей данной линии [23]. У эмбрионов мышей BALB/c замедлен рост гиппокампальной коммиссуры, которая, однако, достигает нормальных размеров во взрослом возрасте [3, 5]. Указанные фенотипические признаки мышей BALB/c в определенной степени сходны с таковыми у мышей линии BTBR, широко используемых в качестве модели PAC [6, 21, 24].

На основании структурной магнитно-резонансной томографии головного мозга у больных с РАС выявлено увеличение объема и толщины коры, отражающее незрелость, с атипичными зонами в лобной, височной и теменной долях; двустороннее увеличение объема миндалины у маленьких детей; увеличение общего объема мозжечка, гипоплазия червя, уменьшение объемов серого вещества в долях червя и в ножках мозжечка; увеличение объемов хвостатого ядра, ненормальные формы структур базальных ядер; уменьшенный общий объем мозолистого тела или увеличенный размер мозолистого тела (особенно при макроцефалии) и другие [25].

Наличие поведенческих и нейроанатомических признаков у мышей BALB/c, сходных с проявлениями РАС у человека [3, 5], позволяет полагать, что данная линия мышей может служить моделью для изучения патогенеза заболевания, по крайней мере определенного его подтипа, и его фенотипических проявлений, а также для оценки действия возможных средств коррекции различных проявлений РАС.

Таким образом, поведенческими особенностями мышей линии BALB/c являются низкий уровень взаимодействия с социально значимыми стимулами и даже избегание этого взаимодействия, нарушение распознавания и, особенно, узнавания запахов, усиление тревожного и стереотипного поведения. Полученные данные подтверждают возможность использования мышей линии BALB/c для моделирования РАС и оценки эффективности терапевтических средств для уменьшения симптомов РАС.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 0521-2019-0007.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Avraham Y., Berry E.M., Donskoy M., Ahmad W.A., Vorobiev L., Albeck A., Mankuta D. Beta-carotene as a novel therapy for the treatment of "Autistic like behavior" in animal models of Autism. *Behav. Brain Res.* 364: 469–479. 2019.
2. Kazdoba T.M., Leach P.T., Yang Mu, Silverman J.L., Solomon M., Crawley J.N. Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 28: 1–52. 2016.
3. Brodtkin E.S. BALB/c mice: Low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. *Behav. Brain Res.* 176: 53–65. 2007.
4. Moy S.S., Nadler J.J., Perez A., Barbaro R.P., Johns J.M., Magnuson T.R., Piven J., Crawley J.N. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3(5): 287–302. 2004.
5. Moy S.S., Nadler J.J., Young N.B., Perez A., Holloway L.P., Barbaro R.P., Barbaro J.R., Wilson L.M., Threadgill D.W., Lauder J.M., Magnuson T.R., Crawley J.N. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav. Brain Res.* 176(1): 4–20. 2007.
6. Silverman J.L., Yang M., Lord K., Crawley J.N. Behavioral phenotyping assay for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 11(7): 490–502. 2010.
7. Moy S.S., Nadler J.J., Poe M.D., Nonneman R.J., Young N.B., Koller B.H., Crawley J.N., Duncan G.E., Bodfish J.W. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. *Behav. Brain Res.* 188(1): 178–194. 2008.
8. Crawley J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* 17: 448–459. 2007.
9. Crawley J.N., Chen T., Puri A., Washburn R., Sullivan T.L., Hill J.M., Young N.B., Nadler J.J., Moy S.S., Young L.J., Caldwell H.K., Young W.S. Social approach behaviors in oxytocin knock-out mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides.* 41(3): 145–163. 2007.
10. Chadman K.K., Gong S., Scattoni M.L.S., Boltuck S.E., Gandhi S.U., Heintz N., Crawley J.N. Minimal aberrant behavioral phenotypes of neuroligin-3 R451C knockin mice. *Autism Res.* 1: 147–158. 2008.
11. Rouillet F.I., Crawley J.N. Mouse models of autism: testing hypotheses about molecular mechanisms. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 7: 187–212. 2011.
12. Shah C.R., Forsberg C.G., Kang J., Veenstra-Vanderweele J. Letting a typical mouse judge whether mouse social interactions are atypical. *Autism Res.* 6(3): 212–220. 2013.
13. Burket J.A., Young C.M., Green T.L., Benson A.D., Deutsch S.I. Characterization of gait and olfactory behaviors in the BALB/c mouse model of autism spectrum disorders. *Brain Res. Bull.* 122: 29–34. 2016.

14. Muratori F., Tonacci A., Billeci L., Catalucci T., Iglizzi R., Calderoni S., Narzisi A. Olfactory processing in male children with autism: atypical odor threshold and identification. *J. Autism Dev. Disord.* 47(10): 3243–3251. 2017.
15. Radyushkin K., Hammerschmidt K., Boretius S., Varoqueaux F., El-Kordi A., Ronnenberg A., Winter D., Frahm J., Fischer J., Brose N., Ehrenreich H. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav.* 8: 416–425. 2009.
16. Gregory E.H., Pfaff D.W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiol. Behav.* 6(5): 573–576. 1971.
17. Yang M., Crawley J.N. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. 24. *Curr. Protoc. Neurosci.* 48(1): 8.24.1–8.24.12. 2009.
18. Ryan B.C., Young N.B., Crawley J.N., Bodfish J.W., Moy S.S. Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behav. Brain Res.* 208: 178–188. 2010.
19. Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В. Тест “открытого поля” как прогностический критерий устойчивости крыс линии “Вистар” к эмоциональному стрессу. *Журн. высш. нерв. деят.* 45(4): 775–781. 1995. [Koplik E.V., Salieva R.M., Gorbunova A.V. The open-field test as a prognostic criterion of resistance to emotional stress in Wistar rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat.* 45(4): 775–781. 1995. (In Russ)].
20. Arakawa H. Involvement of serotonin and oxytocin in neural mechanism regulating amicable social signal in male mice: Implication for impaired recognition of amicable cues in BALB/c strain. *Behav. Neurosci.* 131(2): 176–191. 2017.
21. Ellegood J., Crawley J.N. Behavioral and neuroanatomical phenotypes in mouse models of autism. *Neurotherapeutics.* 12: 521–533. 2015.
22. Yarkova M.A., Seredenin S.B. Temporal characteristics of stress-induced decrease in benzodiazepine reception in C57BL/6 and BALB/c mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 157(6): 733–735. 2014.
23. Melkumyan D.S., Seredenina T.S., Yarkova M.A., Valdman E.A., Seredenin S.B. Analysis of BDNF in Brain Structures of Inbred Mice with Different Phenotypes of Mental and Stress Reaction. *Bull. Exp. Biol. Med.* 140(11): 549–551. 2005.
24. Scattoni M.L., Martire A., Cartocci G., Ferrante A., Ricceri L. Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T + tf/J strain, a mouse model of autism. *Behav. Brain Res.* 251: 35–40. 2013.
25. Григоренко Е.Л. Расстройства аутистического спектра. Вводный курс. Учебное пособие для студентов. М. Практика. 2018. [Grigorenko E.L. Rasstrojstva autisticheskogo spektra. Vvodnyj kurs. Uchebnoe posobie dlya studentov. [Autism spectrum disorders. Introductory course. Textbook for students] Moscow. Praktika. 2018].

Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of BALB/c Mice

I. G. Kapitsa^{a,*}, E. A. Ivanova^a, T. A. Voronina^a, and S. B. Seredenin^a

^aZakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia

*e-mail: ingakap73@mail.ru

BALB/c mice were used as idiopathic model of autism spectrum disorders (ASD). According to specific tests for evaluation of ASD symptoms, BALB/c mice demonstrate low level of interaction with socially significant stimuli and even avoidance of this interaction, violation of recognition and, especially, recognition of odors, strengthening of disturbing and stereotypical behavior. Therefore, BALB/c mice might be used to study pathogenesis of ASD and its phenotypic manifestations as well as correction treatment.

Keywords: BALB/c mice, autism spectrum disorders (ASD), social deficit, stereotypy, olfaction disorder, anxiety

ЦИТИРОВАТЬ:

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Серединин С.Б. Особенности поведенческого фенотипа мышей линии BALB/C. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 373–383. DOI: 10.31857/S0869813920020053

TO CITE THIS ARTICLE:

Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of Balb/C Mice. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 373–383. DOI: 10.31857/S0869813920020053

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *Disc1* У МЫШЕЙ ЛИНИЙ L100P
И Q31L НА ФОРМИРОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ,
ПОДОБНОГО ОБСЕССИВНО-КОМПУЛЬСИВНОМУ**

© 2020 г. К. В. Смирнова^{1, 2}, М. В. Морозова¹, С. А. Татаурова¹,
Т. Г. Амстиславская^{1, 2}, Е. А. Литвинова^{1, 3}, Е. Н. Кожевникова^{1, 3, *}

¹Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: kozhevnikovaen@physiol.ru

Поступила в редакцию 20.12.2019 г.

После доработки 06.02.2020 г.

Принята к публикации 06.02.2020 г.

Обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) является широко распространенным расстройством психики и приводит к ограничению социальной адаптации носителя заболевания. ОКР является ключевым примером ряда состояний, известных как обсессивно-компульсивные, и связанных с ними расстройств. Эти заболевания клинически гетерогенны и этиологически сложны, а их основные патофизиологические механизмы до сих пор неизвестны. Важную роль в понимании патогенеза ОКР играют полученные на лабораторных животных модели данного заболевания, дающие понимание молекулярных основ стереотипного поведения и генетической архитектуры ОКР. Ранее было показано, что мыши с делецией 2 и 3 экзонов гена *Disc1* (*disrupted in schizophrenia 1*) проявляют поведение, подобное обсессивно-компульсивному. Мутации в гене *Disc1* ассоциированы с развитием шизофрении у людей, одним из аспектов которой зачастую является обсессивно-компульсивное поведение. В данной работе были использованы две линии мышей с точечными мутациями в гене *Disc1* (линии L100P и Q31L) для выделения локуса данного гена, ответственного за формирование поведения, подобного обсессивно-компульсивному. Мы показали, что именно аминокислотная замена у мышей линии Q31L приводит к формированию поведенческих нарушений, ассоциированных с повторяющимися действиями в тесте закапывание шариков, тогда как замена у линии L100P не приводит к формированию подобного фенотипа. Кроме того, установлено, что поведение, подобное обсессивно-компульсивному, вызвано дефицитом активности серотонинергической системы, так как внутрибрюшинная инъекция метаболитического предшественника синтеза серотонина — 5-гидрокситриптофана (5-НТР) нивелировала поведенческие нарушения, наблюдаемые в тесте закапывание шариков.

Ключевые слова: обсессивно-компульсивное расстройство, ген *Disc1*, линии мышей L100P и Q31L, серотонин, поведение

DOI: 10.31857/S0869813920030103

Обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) является психоневрологическим расстройством, которое характеризуется двумя различными феноменами: повторяющимися, беспокоящими, навязчивыми мыслями (обсессии) и явными по-

вторными поведенческими актами (компульсии) [1–3]. Распространенность обсессивно-компульсивного расстройства составляет 2.3% [4]. Оно существенно мешает социальной адаптации и снижает социально-экономический статус носителя заболевания. ОКР клинически гетерогенно и этиологически сложно, и его основные патофизиологические механизмы до сих пор неизвестны [5, 6]. 30–40% пациентов с ОКР не дают адекватного ответа на лечение, кроме того, у 10% пациентов проявляется тяжелая хроническая форма резистентного состояния, вызванного традиционным лечением [7]. В связи с этим очевидно, что необходимо дальнейшее изучение патофизиологии ОКР и поиск новых стратегий лечения данного заболевания. Для этого необходимы адекватные модели, отражающие не только внешние проявления данного заболевания, но и эндофенотип.

Изначально сбалансированная хромосомная транслокация, вовлекавшая ген *Disc1* (*disrupted in schizophrenia 1*), была обнаружена в большой шотландской семье, в которой наблюдалось существенное разнообразие психических расстройств: шизофрения, шизоаффективное расстройство, биполярное аффективное расстройство, монополярное аффективное расстройство и расстройство поведения подростков [8]. В настоящее время известно, что белок DISC1 является многофункциональным цитозольным каркасным белком, который участвует в передаче сигналов через ряд различных путей и регулирует многие процессы, например, организацию цитоскелета, клеточный цикл, пролиферацию клеток, передачу сигнала и внутриклеточный транспорт [9, 10]. Эти данные свидетельствуют о том, что DISC1 играет несколько ключевых ролей в нормальном развитии мозга, в то время как ряд механизмов, от нарушения структуры гена до aberrантной обработки белка, может приводить к развитию психических заболеваний [10].

Имеется несколько линий экспериментальных животных с нарушенным геном *Disc1*. Особый интерес представляют 2 линии мышей: Q31L, моделирующая депрессивно-подобное состояние, и L100P — общепризнанная генетическая модель шизофрении [11, 13–17]. У линии Q31L повышена иммобильность в тесте принудительного плавания, снижено социальное взаимодействие в тесте с другим животным и неживым объектом и уменьшено потребление сахарозы в тесте на предпочтение сахарозы, а у линии L100P существенно понижено преимпульсное ингибирование реакции вздрагивания на акустический сигнал, увеличена гиперактивность в открытом поле и снижена рабочая память в Т-образном лабиринте [11]. Линия мышей Q31L несет точечную мутацию (замена одного нуклеотида) во 2-м экзоне гена *Disc1*, приводящую к замене глутамина на лейцин в положении 31-й аминокислоты в белке DISC1, а мыши линии L100P — точечную мутацию во 2-м экзоне гена *Disc1*, приводящую к замене лейцина на пролин в положении 100-й аминокислоты в белке DISC1 [11].

Интересно, что данные мутации попадают в область делеции экзонов 2 и 3 (рис. 1), которые были исследованы B. Wulker с соавт. [12]. В этой работе было показано, что мыши, у которых отсутствует 2-й и 3-й экзон гена *Disc1* проявляют поведение, подобное обсессивно-компульсивному. Авторы использовали один из самых распространенных поведенческих тестов на поведение, подобное обсессивно-компульсивному — тест на закапывание шариков [6]. Делеция 2-го и 3-го экзонов приводила к существенному увеличению числа закопанных шариков. Эти данные свидетельствуют о том, что мутации в гене *Disc1* также могут быть моделями ОКР. Поскольку мутации, приводящие к аминокислотным заменам в линиях Q31L и L100P, нарушают взаимодействие белка DISC1 с рядом важных белковых партнеров, вовлеченных в передачу внутриклеточных сигналов, то представляется интересным определить их вклад в развитие поведенческих фенотипов, характерных для обсессивно-компульсивного поведения. Таким образом, целью нашей работы было исследовать поведение мышей линий L100P и Q31L на наличие ОКР-подоб-

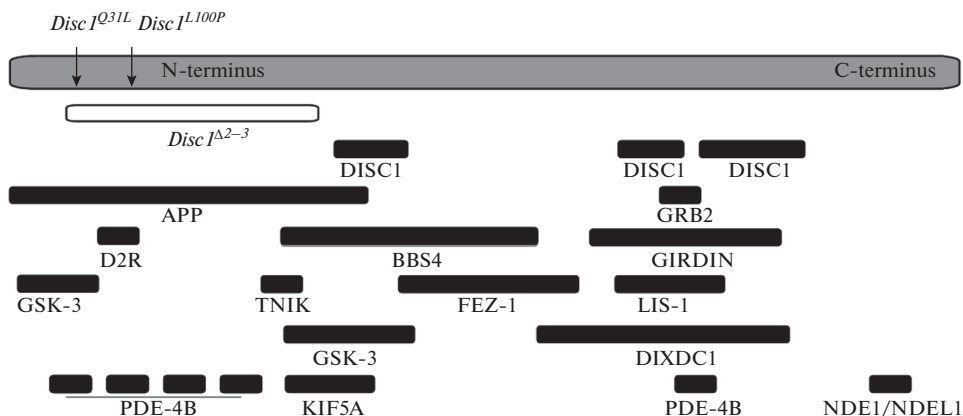


Рис. 1. Структура белка DISC1 и схема его взаимодействия с другими белками.

Fig. 1. The structure of the DISC1 protein and the scheme of its interaction with other proteins.

ного поведенческого фенотипа и установить возможные механизмы, лежащие в основе данного нарушения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Для работы были взяты половозрелые самцы линий мышей L100P и Q31L из уникальной научной установки “Биологическая коллекция — генетические биомодели нейropsychических заболеваний” (№ 493387) Научно-исследовательского института физиологии и фундаментальной медицины. В качестве контроля использовали самцов мышей линии C57Bl/6 (далее WT), поскольку данные мутации поддерживаются на генетическом фоне C57Bl/6. Протокол получения животных линий Q31L и L100P был описан ранее [11]. Возраст животных составлял 5 мес., средняя масса — 30 ± 4 г.

Животные содержались в открытых клетках размером $37 \times 21 \times 15$ см по 3–4 особи при температуре помещения 22°C с постоянным доступом к пище и воде и добавлением материала для гнездования. Световой режим: 12 : 12 ч, свет выключался в 12:00 и включался в 00:00. Все тестирования проводились в темное время в свете красной лампы.

Работу с животными выполняли согласно биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC) и приказу Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. N 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом, протокол № 8 от 15.08.2019.

Тестирование поведения

Было сформировано три экспериментальные группы животных: самцы линии C57Bl/6 (группа WT, $n = 10$), Q31L ($n = 10$) и L100P ($n = 10$), промежуток между различными поведенческими тестами составлял три дня. Тест открытое поле проводили в 2 последующих дня, используя по 5 животных из каждой группы в течение одного дня тестирования: мышь помещали в центр квадратной пластиковой установки 40×40 см с прозрачными стенками и непрозрачным дном, и в течение

6 мин фиксировали пройденный путь, активность, время, проведенное в центре арены, площадь исследованной арены и число стоек с помощью оборудования и программного обеспечения Ethovision XT 10 (Noldus International Technology) согласно следующим установкам: Центром поля считали участок 20×20 см в центре установки. Уровень активности измерялся в процентах “активных” пикселей от общей площади арены с усреднением по 5 кадрам (0.2 с; запись 25 кадров/с). Использованы следующие градации активности: высокая активность — более 0.5%, средняя активность — от 0.01 до 0.5% и отсутствие активности — менее 0.01%. Состояния длительностью менее 0.1 с в анализ не принимали. Стойками считали активность на уровне 75 мм над поверхностью арены открытого поля. Данное ограничение позволяет фиксировать только положение мыши на задних лапах без опоры на передние лапы. Время груминга и количество дефекаций считали вручную. Между тестированиями каждой мыши арена очищалась 70%-ным раствором этанола для удаления запахов.

Исследование на поведение, подобное обсессивно-компульсивному, проводили с использованием теста закапывание шариков. В клетку размером $37 \times 21 \times 15$ см насыпали подстил (березовые опилки) слоем 4 см, на поверхности подстила размещали 20 стеклянных шариков диаметром 1 см. В подготовленные клетки помещали по одному животному и оставляли на 30 мин. Затем мышей убирали в домашние клетки и считали количество шариков, которые были полностью закопаны в опилки [18, 19].

Введение 5-НТР

Введение 5-НТР проводили на интактной группе животных линии Q31L ($n=10$). 5-НТР растворяли в PBS (натрий-фосфатный буфер) и вводили внутривентрикулярно самцам линии Q31L по 40 мкг/кг массы животного из расчета 4 мл/кг [20]. Тестирование поведения было проведено в тестах открытое поле и закапывание шариков через 1.5 ч после введения препарата в два независимых дня.

Статистический анализ

Характер распределения выборки определяли при помощи описательной статистики в программе Statistica 10.0 с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Выборки, распределенные нормально, анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим тестом Тьюки HSD. Для статистической обработки распределений, отличных от нормального, использовали непараметрический метод множественных сравнений Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Манна–Уитни (U-тест).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест открытое поле

Для того, чтобы оценить двигательную и исследовательскую активность, а также отдельные признаки тревожности животных разных групп, был проведен тест открытое поле. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил существенных различий между животными разных линий по площади исследованной арены и количеству стоек, которые отражают исследовательскую активность. Также мы не наблюдали достоверных различий по продолжительности нахождения в центре поля и на периферии, что считается критерием тревожности. Пройденный путь, который является показателем общей моторной активности, также не различался между группами (рис. 2). При этом однофакторный дисперсионный анализ показал наличие эффекта генотипа по отсутствию двигательной активности в процентах от об-

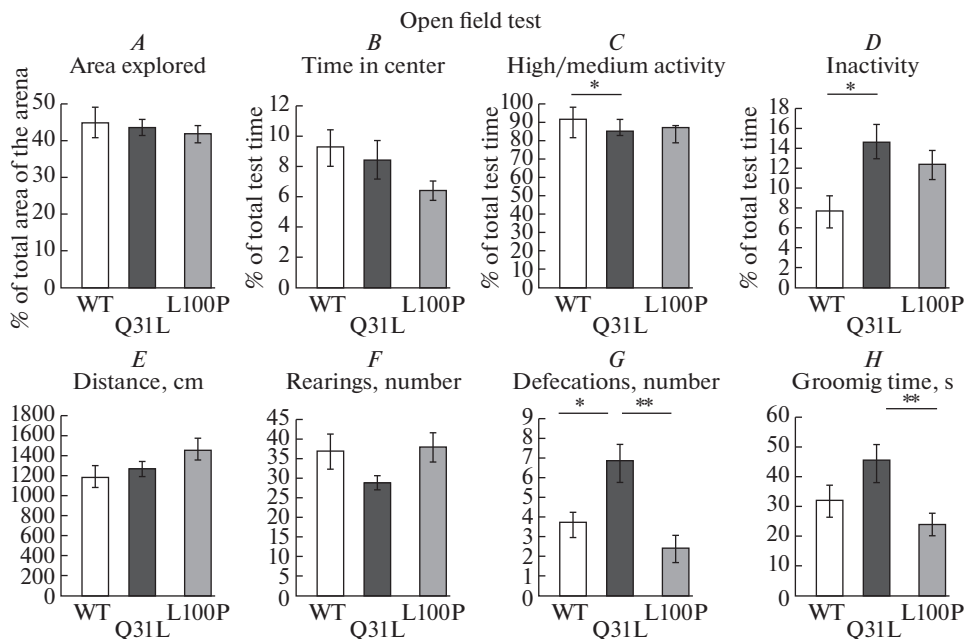


Рис. 2. Поведение мышей в тесте открытое поле.

A – исследованная часть арены (доля от общей площади); *B* – время, проведенное в центре открытого поля (доля общего времени); *C* – высокая и средняя активность (доля от общего времени теста); *D* – время неподвижности (доля от общего времени теста); *E* – пройденный путь в см; *F* – число стоек; *G* – количество актов дефекации; *H* – общее время грумингов.

Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 10$ для каждой группы, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ в соответствии с тестом Тьюки HSD.

Fig. 2. The behavior of the test mice in the open field test.

A – area explored and time spent in the center (*B*) of the arena; *C* – high and medium activity; *D* – immobility time; *E* – distance traveled in cm; *F* – the number of rearings; *G* – the number of defecations; *H* – total grooming time.

Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean, $n = 10$ for each group * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ according to the HSD Tukey test.

щего времени тестирования ($F_{(2,27)} = 4.8617$, $p = 0.016$) и по времени со средней и высокой активностью (%) ($F_{(2,27)} = 4.6469$, $p = 0.018$). Последующая оценка с помощью критерия Тьюки HSD показала, что самцы линии Q31L существенно дольше были неактивными по сравнению с мышами линии WT ($p = 0.013$), тогда как различий между группами WT и L100P обнаружено не было ($p = 0.119$). При сравнении животных по времени средней и высокой активности обнаружено, что животные Q31L отличались от контроля существенным снижением доли времени нахождения в активном состоянии (Тьюки HSD: $p = 0.016$), тогда как мыши линий WT и L100P не различались по этому параметру (Тьюки HSD: $p = 0.134$). Увеличенное время неподвижности может свидетельствовать о депрессивном статусе. Также однофакторный дисперсионный анализ выявил различия между линиями по показателям, которые могут косвенно отражать эмоциональный статус животного: количество актов дефекации ($F_{(2,27)} = 8.8386$, $p = 0.001$) и общее время груминга ($F_{(2,25)} = 5.4389$, $p = 0.011$). У животных Q31L наблюдалось значительно большее число актов дефекации по

сравнению с мышами WT (Тьюки HSD: $p = 0.020$) и по сравнению с животными L100P (Тьюки HSD: $p = 0.001$), при этом группы WT и L100P не различались по этому параметру (Тьюки HSD: $p = 0.458$). Общее время груминга было существенно выше у мышей Q31L по сравнению с L100P (Тьюки HSD: $p = 0.008$), но не отличалось между группами Q31L и WT (Тьюки HSD: $p = 0.134$) и L100P и WT (Тьюки HSD: $p = 0.446$). Эти результаты могут быть показателем повышенной тревожности мышей Q31L. Кроме того, увеличение общего времени груминга может быть объяснено смещенной активностью животных, вызванной повышенной тревожностью или склонностью к повторяющимся действиям.

Тест закапывание шариков

Ранее было показано, что делеция экзонов 2 и 3 в гене *Disc1* приводит к формированию поведения, характерного для обсессивно-компульсивного: эти животные закапывают достоверно больше шариков в тесте закапывание шариков. Мы использовали такой же тест для оценки склонности животных линий Q31L и L100P к повторяющимся действиям. В этом эксперименте тест Краскела–Уоллиса показал достоверный эффект генотипа на число полностью закопанных шариков ($H(2, n = 30) = 6.824959, p = 0.033$). Применение критерия Манна–Уитни выявило существенные различия по количеству полностью закопанных шариков между группами животными (рис. 3). Самцы линии Q31L закапывали значительно больше шариков, чем мыши линий WT ($U = 21, p = 0.028$) и L100P ($U = 22, p = 0.035$). Животные L100P достоверно не отличались по числу полностью закопанных шариков от контрольных животных ($U = 0, p = 1$). Эти данные указывают на наличие компульсивного поведения у животных Q31L, но не у L100P.

Поскольку одной из причин возникновения ОКР является снижение активности серотонинергической системы, то мы исследовали эффект введения метаболитического предшественника синтеза серотонина 5-НТР на компульсивное поведение животных Q31L. После введения 5-НТР животных исследовали в тестах открытое поле и закапывание шариков. Статистический анализ с применением критерия Манна–Уитни показал, что самцы Q31L после инъекции 5-НТР (Q31L + 5НТР) закапывали существенно меньше шариков, чем самцы группы Q31L ($U = 20.5, p = 0.028$) (рис. 3). Для исключения вероятности того, что снижение закопанных шариков является следствием снижения общей активности животных, связанной со стрессом после введения препарата или побочным эффектом введения 5-НТР на моторную активность, был проведен тест открытое поле. В этом тесте животные Q31L + 5НТР проходили такой же путь, что и животные Q31L без введения препарата, что говорит об отсутствии эффекта 5-НТР на общую активность животного.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тест закапывание шариков широко используется на экспериментальных животных как модель ОКР [21–24]. Данная модель у мышей соответствует двум основным требованиям, предъявляемым к экспериментальным моделям психопатологии: сходство симптомов расстройства с компульсивными чертами модели и сходство реакции на введение препаратов [21, 24]. Полагают, что шарики в тесте закапывание шариков вызывают исследовательское поведение у мышей, но вследствие отсутствия обратной связи не могут обеспечить животное необходимым стимулом для естественного завершения исследования, что приводит к компульсивному закапыванию [21, 22, 25].

Данный тест моделирует именно ОКР, а не другие виды поведения, поскольку показано, что сами шарики не вызывают у мышей повышение тревожности и избегания, а интенсивность закапывания шариков не коррелирует с тревожностью.

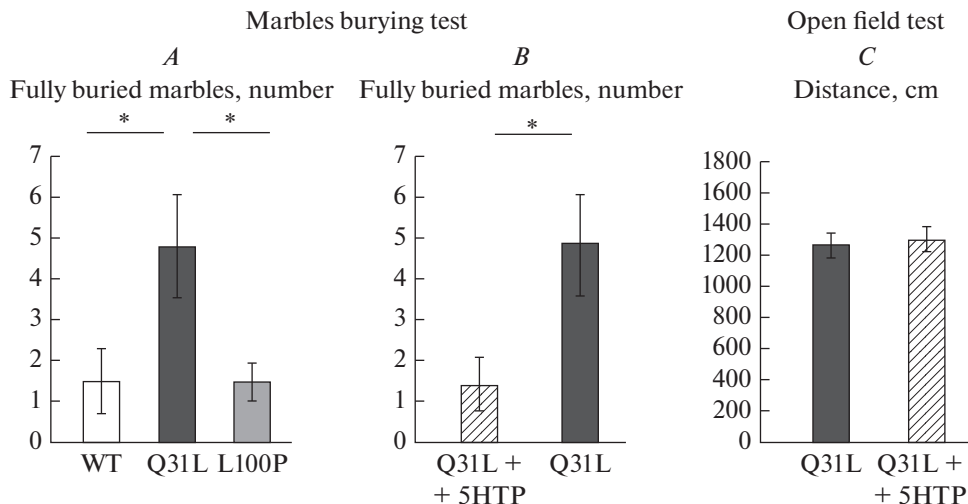


Рис. 3. Поведение животных линии Q31L в тесте закапывание шариков и эффект введения 5-НТП на поведение животных Q31L.

A – количество полностью закопанных шариков в тесте закапывание шариков. *B* – количество полностью закопанных шариков в тесте закапывание шариков после инъекции 5-НТП (40 мг/кг). *C* – длина пройденного пути в тесте открытое поле после инъекции 5-НТП (40 мг/кг).

Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 10$ для каждой группы, $*p < 0.05$, по критерию Манна–Уитни для теста закапывание шариков.

Fig. 3. The behavior Q31L mice in the marble burying test and the effect of 5-HTP on their behavior.

A – the number of fully buried marbles in the marble burying test. *B* – the number of fully buried marbles in the marble burying test after 5-HTP injection (40 mg/kg). *C* – the distance traveled in the open field test after 5-HTP injection (40 mg/kg).

The data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean, $n = 10$ for each group, $*p < 0.05$, according to the Mann–Whitney U test for the marble burying test.

В этот тест также не вносит вклад исследовательское поведение, поскольку при повторных тестированиях, когда шарик теряли свою новизну, закапывание шариков не снижалось [26]. Кроме того, показано, что флувоксамин (специфический ингибитор обратного захвата серотонина), который является эффективным средством для лечения ОКР, понижает число закапываемых шариков, не влияя на тревожность [18].

Самцы линии Q31L в тесте закапывание шариков закапывали существенно больше шариков, чем самцы контрольной линии WT. При этом в тесте открытое поле не было обнаружено существенных различий по пройденному пути у мышей разных групп. Более того, животные Q31L существенно больше времени были неактивны и соответственно меньше времени проявляли среднюю и высокую активность, поэтому наблюдаемое нами увеличение закапывания шариков не связано с повышением активности мышей. Таким образом, можно говорить о том, что у мышей линии Q31L проявляется поведение, подобное обсессивно-компульсивному.

ОКР характеризуется как расстройство, связанное с тревожностью [27]. У мышей линии Q31L отмечается повышенная тревожность, что выражается в существенно большем количестве грумингов и увеличенном количестве дефекаций в тесте открытое поле. Кроме того, показано, что пациенты с ОКР часто страдают

сопутствующей депрессией [28]. Согласно этому снижение активности самцов Q31L в тесте открытое поле косвенно указывает на депрессивный статус животных. Наши данные согласуются с опубликованными ранее результатами, показавшими, что мыши линии Q31L проявляют депрессивно-подобное поведение и рассматриваются как модель депрессии [11, 17]. Исследовательская активность, которая выражается количеством стоек и, отчасти, площадью исследованной арены, у животных разных линий не различалась.

Существует несколько теорий патогенеза ОКР. Среди основных – нарушения в серотонинергической и дофаминергической системах мозга [1, 28, 29]. Мы предполагаем, что дофаминергическая система не играет ключевой роли в формировании поведенческого фенотипа в тесте “закапывание шариков” у животных Q31L, поскольку для лечения ОКР посредством воздействия на дофаминергическую систему используют малые дозы антагониста дофамина рisperидона, а у мышей Q31L уже снижен уровень дофамина в прилежащем ядре [17, 30].

Наиболее вероятно, что в нарушении поведения играет существенную роль именно серотонинергическая система. Наиболее распространенным терапевтическим средством для лечения ОКР на данное время являются ингибиторы обратного захвата серотонина [31]. Ранее T.V. Lipina с соавт. показали, что у мышей линии Q31L уровень серотонина в прилежащем ядре существенно ниже, чем у контрольной группы – мышей дикого типа [17]. Следует отметить, что прилежащее ядро является важной мишенью для глубокой стимуляции мозга, так как его дисфункция связана с ключевыми симптомами нескольких основных психических расстройств, включая ОКР [17, 32]. Для проверки этой гипотезы мышам Q31L был введен метаболический предшественник серотонина 5-НТР, который преодолевает гематоэнцефалический барьер и, попадая в мозг, метаболизируется декарбоксилазой ароматических аминокислот с образованием серотонина [20]. В нормальных физиологических условиях этот фермент не насыщен субстратом, поэтому введение 5-НТР приводит к усилению синтеза и повышению уровня серотонина [33, 34]. Тест закапывание шариков после введения препарата показал ослабление поведения, подобного обсессивно-компульсивному, что выражалось в уменьшении количества полностью закопанных шариков, это согласуется со сделанным ранее предположением. Двигательная активность, выраженная длиной пройденного пути, при этом не изменилась, следовательно, мы наблюдали снижение именно компульсивного поведения.

В то же время, поведение самцов L100P в данном тесте не отличалось от такового животных контрольной группы WT, что указывает на отсутствие эффекта замены данной аминокислоты на обсессивно-компульсивное поведение. Эти данные согласуются с полученными ранее, где показано отсутствие изменений на уровне серотонина в исследованных отделах мозга [17].

Мутации в гене *Disc1* ассоциированы с развитием шизофрении у людей, одним из аспектов которой зачастую является обсессивно-компульсивное поведение. Результаты, полученные в данной работе, указывают на то, что именно N-терминальная часть гена *Disc1* вовлечена в формирование этого аспекта шизофрено-подобного поведения, что согласуется с данными, полученными на большой делеции этого гена [12]. На основе приведенных результатов мышей линии Q31L можно также рассматривать как возможную модель ОКР, которая моделирует не только поведение, но и частично эндофенотип больных ОКР. Кроме того, наши данные указывают на то, что поведение подобное ОКР у мышей линии Q31L, вызвано сниженным уровнем серотонина в прилежащем ядре. Интересно, что именно замена у мышей линии Q31L, но не L100P, вызывает развитие ОКР-подобного фенотипа у животных. Из рис. 1 следует, что при замене глутамин на лейцин в положении 31-й аминокислоты в белке DISC1 нарушается его взаимодействие с рядом белков-партнеров:

APP (предшественник амилоида), GSK-3 (гликогенсинтаза-киназа-3), PDE-4B (фосфодиэстераза). Наибольший интерес в данном случае представляет GSK-3, поскольку взаимодействие с APP и PDE-4B может нарушаться и при замене в положении 100-й аминокислоты в белке DISC1 — замене лейцина на пролин у животных L100P, однако ОКР-подобного поведения данное изменение не вызывает. Таким образом, гликогенсинтаза-киназа-3 могла бы стать одной из возможных мишеней для подбора лекарственных препаратов для борьбы с ОКР у людей. Проверка данной гипотезы требует дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № 0538-2019-0005). Работа М.В. Морозовой поддержана грантом РФФ № 18-74-00057.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aouizerate B., Guehl D., Cuny E., Rougier A., Bioulac B., Tignol J., Burbaud P. Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: a necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Progr. Neurobiol.* 72(3): 195–221. 2004.
2. Bartz J.A., Hollander E. Is obsessive-compulsive disorder an anxiety disorder? *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 30(3): 338–352. 2006.
3. Goddard A.W., Shekhar A., Whiteman A.F., McDougale C.J. Serotonergic mechanisms in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Drug Discov. Today.* 13(7–8): 325–332. 2008.
4. Kessler R.C., Berglund P., Demler O., Jin R., Merikangas K.R., Walters E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry.* 62(6): 593–602. 2005.
5. Pauls D.L., Abramovitch A., Rauch S.L., Geller D.A. Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 15(6): 410–424. 2014.
6. Alonso P., Lopez-Sola C., Real E., Segalas C., Menchon J. M. Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11: 1939–1955. 2015.
7. Fineberg N.A., Gale T.M. Evidence-based pharmacotherapy of obsessive compulsive disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 8(1): 107–129. 2005.
8. Millar J.K., Wilson-Annan J.C., Anderson S., Christie S., Taylor M.S., Semple C.A., Devon R.S., St Clair D.M., Muir W.J., Blackwood D.H., Porteous D.J. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 9(9): 1415–1423. 2000.
9. Chubb J.E., Bradshaw N.J., Soares D.C., Porteous D.J., Millar J.K. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol. Psychiatry.* 13(1): 36–64. 2008.
10. Brandon N.J., Millar J.K., Korth C., Sive H., Singh K.K., Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J. Neurosci.* 29(41): 12768–12775. 2009.
11. Clapcote S.J., Lipina T.V., Millar K.J., Mackie S., Christie S., Ogawa F., Lerch J.P., Trimble K., Uchiyama M., Sakuraba Y., Kaneda H., Shiroishi T., Houslay M.D., Henkelman R.M., Sled J.G., Gondo Y., Porteous D.J., Roder J.C. Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. *Neuron.* 54 (3): 387–402. 2007.
12. Wulfer B., Nagai T., Sobue A., Itoh N., Kuroda K., Kaibuchi K., Nabeshima T. Yamada, K. Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in Disc1Δ2–3/Δ2–3 mice. *Genes, Brain and Behavior.* 17(8): e12478. 2018.
13. Lipina T.V., Niwa M., Jaaro-Peled H., Fletcher P.J., Seeman P., Sawa A., Roder J.C. Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 9 (7): 777–789. 2010.
14. Lipina T.V., Kaidanovich-Beilin O., Patel S., Wang M., Clapcote S.J., Liu F., Woodgett J.R., Roder J.C. Genetic and pharmacological evidence for schizophrenia-related Disc1 interaction with GSK-3. *Synapse.* 65(3): 234–248. 2011.
15. Lipina T.V., Haque F.N., McGirr A., Boutros P.C., Berger T., Mak T.W., Roder J.C., Wong A.H. Prophylactic valproic acid treatment prevents schizophrenia-related behaviour in Disc1-L100P mutant mice. *PloS One.* 7(12): e51562. 2012.
16. Lipina T.V., Zai C., Hloušek D., Roder J.C., Wong A.H. Maternal immune activation during gestation interacts with Disc1 point mutation to exacerbate schizophrenia-related behaviors in mice. *J. Neurosci.* 33(18): 7654–7666. 2013.
17. Lipina T.V., Fletcher P.J., Lee F.H., Wong A.H., Roder J.C. Disrupted-in-schizophrenia-1 Gln31Leu polymorphism results in social anhedonia associated with monoaminergic imbalance.

- ance and reduction of CREB and β -arrestin-1,2 in the nucleus accumbens in a mouse model of depression. *Neuropsychopharmacology*. 38(3): 423–36. 2013.
18. Ichimaru Y., Egawa T., Sawa A. 5-HT1A-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 68(1): 65–70. 1995.
 19. Taylor G.T., Lerch S., Chourbaji S. Marble burying as compulsive behaviors in male and female mice. *Acta Neurobiol. Exp.* 77(3): 254–260. 2017.
 20. Liu Y., Jiang Y., Si Y., Kim J., Chen Z., Rao Y. Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice. *Nature*. 472(7341): 95–99. 2011.
 21. Joel D. Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review. *Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 30(3): 374–388. 2006.
 22. Korff S., Harvey B.H. Animal models of obsessive-compulsive disorder: rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatr. Clin. North. Am.* 29(2): 371–390. 2006.
 23. Li X., Morrow D., Witkin J.M. Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: comparison with marble burying. *Life Sci.* 78(17): 1933–1939. 2006.
 24. Boulougouris V., Chamberlain S.R., Robbins T.W. Cross-species models of OCD spectrum disorders. *Psychiatry Res.* 170(1): 15–21. 2009.
 25. Londei T., Valentini A.M.V., Leone V.G. Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behavior. *Behav. Brain. Res.* 94(2): 249–254. 1998.
 26. Thomas A., Burant A., Bui N., Graham D., Yuva-Paylor L.A., Paylor R. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 204(2): 361–373. 2009.
 27. Sasson Y., Zohar J., Chopra M., Lustig M., Iancu I., Hendler T. Epidemiology of obsessive-compulsive disorder: A world view. *J. Clin. Psychiatry*. 58(suppl 12): 7–10. 1997.
 28. Westenberg H.G.M., Fineberg N.A., Denys D. Neurobiology of obsessive-compulsive disorder: serotonin and beyond. *CNS spectrums*. 12(S3): 14–27. 2007.
 29. Rosenberg D.R., Keshavan M.S. Toward a Neurodevelopmental Model of Obsessive Compulsive Disorder. *Biol. Psychiatry*. 43(9): 623–640. 1998.
 30. da Rocha F.F., Correa H. Is circadian rhythm disruption important in obsessive-compulsive disorder (OCD)? A case of successful augmentation with agomelatine for the treatment of OCD. *Clin. Neuropharmacol.* 34(4): 139–140. 2011.
 31. Greist J.H., Jefferson J.W. Obsessive-compulsive disorder. *Focus*. 5(3): 283–298. 2007.
 32. Sesia T., Bulthuis V., Tan S., Lim L.W., Vlaming R., Blokland A., Harry W.M. Steinbusch, Sharp T., Visser-Vandewalle V., Temel Y. Deep brain stimulation of the nucleus accumbens shell increases impulsive behavior and tissue levels of dopamine and serotonin. *Exp. Neurology* 225(2): 302–309. 2010.
 33. Moir A.T.B., Eccleston D. The effects of precursor loading in the cerebral metabolism of 5-hydroxyindoles. *J. Neurochem.* 15(10): 1093–1108. 1968.
 34. Okada F., Saito Y., Fujieda T., Yamashita I. Monoamine changes in the brain of rats injected with L-5-hydroxytryptophan. *Nature*. 238(5363): 355–356. 1972.

The Effect of Point Mutations in the *Disc1* Gene in L100P and Q31L Mice on the Development of the OCD-Like Behavior

K. V. Smirnova^{a, b}, M. V. Morozova^a, S. A. Tataurova^a, T. G. Amstislavskaya^{a, b}, E. A. Litvinova^{a, c}, and E. N. Kozhevnikova^{a, c, *}

^aScientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine,
Novosibirsk, Russia

^bSiberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia

^cInstitute of Molecular and Cellular Biology, The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia

*e-mail: kozhevnikovaen@physiol.ru

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a widespread mental disorder, which leads to social disability of the patient. OCD is a key example of a number of conditions known as obsessive-compulsive and related disorders. These disorders are clinically heterogeneous and etiologically complex and their main pathophysiological mechanisms are still unknown. An important role in understanding the pathogenesis of OCD is played by models of this disease obtained in laboratory animals that provide an understanding of the molecular basis of stereotyped behavior and the genetic architecture of OCD. One of

the OCD genetic models is the mice with a deletion of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene (*disrupted in schizophrenia 1*). Mutations in the *Disc1* gene are associated with the development of schizophrenia in humans, which is known to be associated with obsessive-compulsive behavior. In this work, we used two mouse strains with point mutations in the *Disc1* gene (L100P and Q31L strains) to isolate the locus of this gene responsible for the formation of OCD-like behavior. We have shown that Q31L amino acid substitution leads to the development of behavioral phenotype associated with repetitive actions in the marble burying test, while the L100P substitution does not lead to the formation of such phenotype. In addition, we showed that the OCD-like behavior is caused by the deficiency of the serotonergic system, since an intraperitoneal injection of the metabolic precursor of serotonin - 5-hydroxytryptophan (5-HTP) rescued the behavioral phenotype observed in the marble burying test.

Keywords: obsessive-compulsive disorder, *Disc1*, L100P, Q31L, mice, serotonin, behavior

ЦИТИРОВАТЬ:

Смирнова К.В., Морозова М.В., Татаурова С.А., Амстиславская Т.Г., Литвинова Е.А., Кожевникова Е.Н. Влияние точечных мутаций в гене *Disc1* у мышей линий L100P и Q31L на формирование поведения, подобного обсессивно-компульсивному. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(3): 384–394.

DOI: 10.31857/S0869813920030103

TO CITE THIS ARTICLE:

Smirnova K.V., Morozova M.V., Tataurova S.A., Amstislavskaya T.G., Litvinova E.A., Kozhevnikova E.N. The Effect of Point Mutations in the *Disc1* Gene in L100P and Q31L Mice on the Development of the OCD-like Behavior. Russian Journal of Physiology. 106(3): 384–394.

DOI: 10.31857/S0869813920030103

ИНЕСА БЕНЕДИКТОВНА КОЗЛОВСКАЯ (02.06.1927–19.02.2020)



После тяжелой болезни от нас ушла Инеса Бенедиктовна Козловская, блестящий ученый, яркий незаурядный человек, учитель. Инеса Бенедиктовна Козловская была выдающимся специалистом в области гравитационной физиологии, долгие годы руководила отделом сенсомоторной физиологии и профилактики Института медико-биологических проблем РАН. Она была избрана членом-корреспондентом РАН, удостоена почетного звания “Заслуженный деятель науки РФ”.

Инеса Бенедиктовна уже с юности проявляла активную жизненную позицию, незаурядные качества лидера и редкие способности к науке. Ее научная карьера начиналась в стенах 1-го Московского медицинского института. Закончив аспирантуру на кафедре физиологии, в 1954 г. она успешно защитила кандидатскую диссертацию и начала педагогическую деятельность. В 1960 г. перешла работать в Институт высшей нервной деятельности. В 1966–1971 годах, находясь в зарубежной командировке, она занималась исследованиями в Рокфеллеровском университете в

лаборатории проф. Н. Миллера и в Нью-Йоркском медицинском колледже под руководством проф. В. Брукса. По возвращении в Москву в 1971 г. она перешла в Институт проблем передачи информации и в 1976 г. защитила докторскую диссертацию и стала признанным экспертом в области физиологии мозжечка.

В 1977 году неожиданно для всех по приглашению академика О.Г. Газенко Инеса Бенедиктовна переходит на работу в Институт медико-биологических проблем. В совершенно новой для себя области исследований она быстро выдвинулась в ряды мировых лидеров. Именно она возглавила Приматологическую часть программы БИОН и ряд крупных нейрофизиологических проектов. Она стала лидером в области разработки методов профилактики двигательных нарушений, вызванных действием невесомости.

За результаты исследований в полетах космических аппаратов “Бион” (1973–1993 гг.) и их использования в теории и практике космической медицины в 1998 г. она была удостоена премии Правительства Российской Федерации, а в 2002 г. – Государственной премии РФ в области науки и техники за цикл исследований особенностей управления движением в условиях микрогравитации, позволивших разработать информационное обеспечение качества визуальной стабилизации космических объектов. И.Б. Козловская – лауреат премии Первого канала “Призвание” – за создание нового направления в медицине, премии им. Л.А. Орбели РАН, а также ряда международных премий, в том числе премии имени Нело Пейса Международного общества гравитационной физиологии (2007 г.), премии в области наук о жизни Международной академии астронавтики (1995 г.), американской премии выдающимся исследователям биоастронавтики им. Л. Янга за важный вклад в исследования нейро-мышечного контроля и здоровья космонавтов (2011 г.) и Премии им. Дж. Саттона “За научные достижения, продвинувшие область космической медицины” (2019 г.). Работы Инесы Бенедиктовны и ее научного коллектива внесли важный вклад в изучение гравитационных механизмов в двигательной системе и в практику пилотируемых космических полетов. Разработанные ею подходы находят применение также в практике клинической, авиационной и спортивной медицины.

Ее ученики и соратники, ученые нашего Института всегда будут хранить добрую память о замечательном ученом и человеке Инесе Бенедиктовне Козловской.

Сотрудники ИМБП РАН