

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ,
ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 612.821

**ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ
В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА У КРЫС
С ОСТРЫМ И ХРОНИЧЕСКИМ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ**

© 2024 г. М. И. Зайченко^{1, *}, В. В. Сидорина¹, Г. А. Григорьян¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», Москва, Россия

*e-mail: mariya-zajchenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.04.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принята к публикации 22.07.2024 г.

Известно, что содержание животных в обогащенной среде (ОС) предотвращает развитие тревожно-депрессивных расстройств и когнитивных нарушений, вызванных разными стрессами. В очень ограниченном числе работ по исследованию обучения и памяти в водном лабиринте Морриса животные подвергались провоспалительному стрессу (ПВС) до влияния ОС. В настоящей работе мы впервые исследовали обратную последовательность взаимодействия ОС и стресса, когда животные сначала содержались в ОС, а потом уже подвергались ПВС. С этой целью 40 крыс в возрасте от 25 до 45 дней помещали в ОС, а 40 других крыс содержали в стандартных условиях. ПВС у крыс обеих групп вызывали введением либо 350 мкг/кг бактериального липополисахарида (ЛПС) однократно (острый стресс) или 200 мкг/кг многократно (хронический) за 1 час до начала поведенческих тестов и по ходу их проведения. Контрольным животным вводили физраствор в том же объеме. Полученные данные свидетельствуют, что крысы, содержащиеся в ОС, быстрее находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее меньшее расстояние, чем крысы, которых содержали в стандартных условиях. У животных с острым и хроническим ЛПС-стрессом предварительное содержание в условиях ОС приводило к нормализации показателей поведения до наблюдаемых у контрольных крыс. Под влиянием ОС у тех же крыс происходило также улучшение показателей поведения при оценке рабочей памяти. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ОС в благотворном влиянии на поведение крыс при поиске безопасной платформы.

Ключевые слова: обогащенная среда, острый ЛПС-стресс, хронический стресс, обучение, память, водный лабиринт Морриса

DOI: 10.31857/S0044467724050061

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что развитие организма, помимо строгого генетического контроля, находится под постоянным влиянием окружающей среды. Это влияние проявляется в форме разнообразных эпигенетических модификаций, определяющих вектор развития организма. Особенно чувствительным к таким модификациям является период раннего постнатального онтогенеза. Сильные негативные воздействия внешней среды в этот период, такие как интоксикация, инфекция, отлучение от матери, социальная изоляция, холод и иные формы стресса, нарушают нормальное развитие гипоталамо-гипофизарной надпочечниковой, иммунной и других систем организма, что может привести в будущем к различным психическим заболеваниям, таким

как тревожно-депрессивные расстройства, фобии, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, шизофрения и пр. (Pavlova et al., 2022; Cao et al., 2021; Deng et al., 2021; Upthegrove, Handaker, 2020; Wang et al., 2015). Важным патофизиологическим звеном в генезе всех этих заболеваний является процесс нейровоспаления (Григорьян, 2022; Manickavasagam et al., 2020; Zhao et al., 2019). В экспериментах на животных нейровоспаление чаще всего моделируют с помощью введения провоспалительного ЛПС (Alexander, Rietschel, 2001) или путем прямого введения провоспалительных цитокинов в разные структуры мозга. ЛПС составляют внешнюю часть мембраны грамотрицательных бактерий. Введение в организм ЛПС вызывает развитие нейровоспалительной реакции (sickness behavior – повышение температуры тела, слабость, вялость, нарушение

аппетита и т.д.), нарушение когнитивных (обучения и памяти) и двигательных функций (Czerniawski et al., 2015; Sparkman et al., 2005; Pugh et al., 1998).

Эмпирические наблюдения над людьми и экспериментальные работы на животных показывают, что одним из важных положительных факторов, корректирующих различные психонервные расстройства и нейродегенеративные патологии, является длительное воздействие на организм обогащенной среды (ОС). ОС представляет собой содержание животных в больших группах (социальная стимуляция) или в больших клетках, в которые помещаются разные игрушки, предметы, материал для строительства гнезд (сенсорная стимуляция), лесенки и колеса для бега (двигательная стимуляция). Для обоснования положительных эффектов ОС на эмоционально-когнитивные и двигательные функции мозга мы предложили концепцию функциональной системы (Григорьян, 1990; 2006), в которой центральное место занимает аппарат памяти (Grigoryan, 2023). В частности, недавно в обзорной статье мы (Grigoryan, 2023) детально описали системные механизмы влияния ОС на проявления условной реакции страха с участием разных компонентов функциональной системы в этом процессе.

В литературе накопилось немало работ, в которых исследовали влияние ОС на поведение животных, испытывавших в разные периоды жизни ПВС, вызванный введением ЛПС. Подробно эти работы были недавно обобщены в обзорной статье Лендольфо и соавторов (Landolfo et al., 2023). Так, 5-недельное пребывание взрослых крыс в ОС восстанавливало до нормы увеличенный под влиянием ЛПС уровень кортикостерона в крови и надпочечниках (Mlynarik et al., 2004). ОС усиливала плотность глиальных маркеров в зубчатой фассии и уменьшала повышенный под действием ЛПС уровень цитокинов и хемокинов в гиппокампе (Williamson et al., 2012). ОС также восстанавливала ухудшенные под влиянием ЛПС показатели обучения и памяти (Keymoradzadeh et al., 2022; 2020; Aranda et al., 2019; Ji et al., 2017; Kawano et al., 2014). В частности, пребывание в ОС улучшало обучение в водном лабиринте Морриса (Keymoradzadeh et al., 2020), реакцию пассивного избегания (Keymoradzadeh et al., 2022), узнавание нового объекта (Kavano et al., 2014) и реакцию условного страха (Ji et al., 2017). Во всех этих работах животных вначале подвергали ЛПС-стрессу, а затем исследовали корректирующее влияние ОС на эффекты ПВС. Мы не нашли в литературе ни одной работы, в которой последовательность влияний ЛПС и ОС была бы обратной, то есть сначала животных содержали бы в ОС, а затем подвергали их ЛПС-стрессу.

Учитывая это обстоятельство, целью настоящей работы было исследование обучения и памяти у крыс, подвергнутых ЛПС-стрессу после

их предварительного пребывания в ОС. Эксперименты проводили на двух больших группах животных, содержащихся в ОС и стандартных (СТАНД) условиях в течение 25 дней. В возрасте 45 дней за час до начала обучения в водном лабиринте Морриса одной группе крыс вводили ЛПС однократно (острый стресс), а другой многократно (6 дней подряд) (хронический стресс). Контрольным животным по той же схеме вводили физиологический раствор (рис. 1).

МЕТОДИКА

Опыты проводили на 80 крысах-самцах линии Вистар в возрасте от 25 дней до 5 месяцев, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Все животные содержались в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму. В экспериментах соблюдались принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU), и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

В возрасте 25 дней 40 крыс помещали на 20 дней в обогащенную среду (ОС). Их содержали в 4 трехъярусных клетках размером 60 x 38 x 90 см, которые были оборудованы беличьим колесом, лесенками, материалом для зарывания, игрушками и гамаками. В одной большой клетке находилось 10 крыс из одной группы. Другую группу такого же возраста из 40 животных содержали в стандартных условиях (СТАНД) в домашней клетке размером 51 x 40.5 x 30 см по 5 крыс в клетке без бегового колеса и других дополнительных предметов в клетке. Острый ПВС у крыс обеих групп (ОС и СТАНД) ($n = 10$ в каждой группе) вызывали введением бактериального ЛПС, выделенного из наружной оболочки *Escherichia coli* (кишечная палочка) (ЛПС, 350 мкг/кг) однократно за 1 час до начала обучения (ЛПС-О). Контрольным животным вводили физраствор в том же объеме (ФИЗ-О). Хронический ПВС (ЛПС-Х) вызывали многократным (в течение 6 дней) введением ЛПС в дозе 200 мкг/кг за 1 час до начала поведенческих тестов. Контрольным крысам столько же раз вводили физраствор (ФИЗ-Х). Таким образом, всего в экспериментах участвовало 8 групп животных: 4 группы со СТАНД-условиями проживания и 4 группы с проживанием в ОС.

Обучение в водном лабиринте Морриса. Лабиринт представлял собой круглый пластиковый бассейн черного цвета диаметром 1.5 м и высотой 60 см (Noldus Ltd, Нидерланды), наполненный водой до уровня 30 см. Он располагался в углу большой комнаты и был отделен от остального пространства темной матерчатой шторой. На стенах комнаты и на шторах располагались картинки и/или знаки (квадраты, кресты и т.д.), которые служили

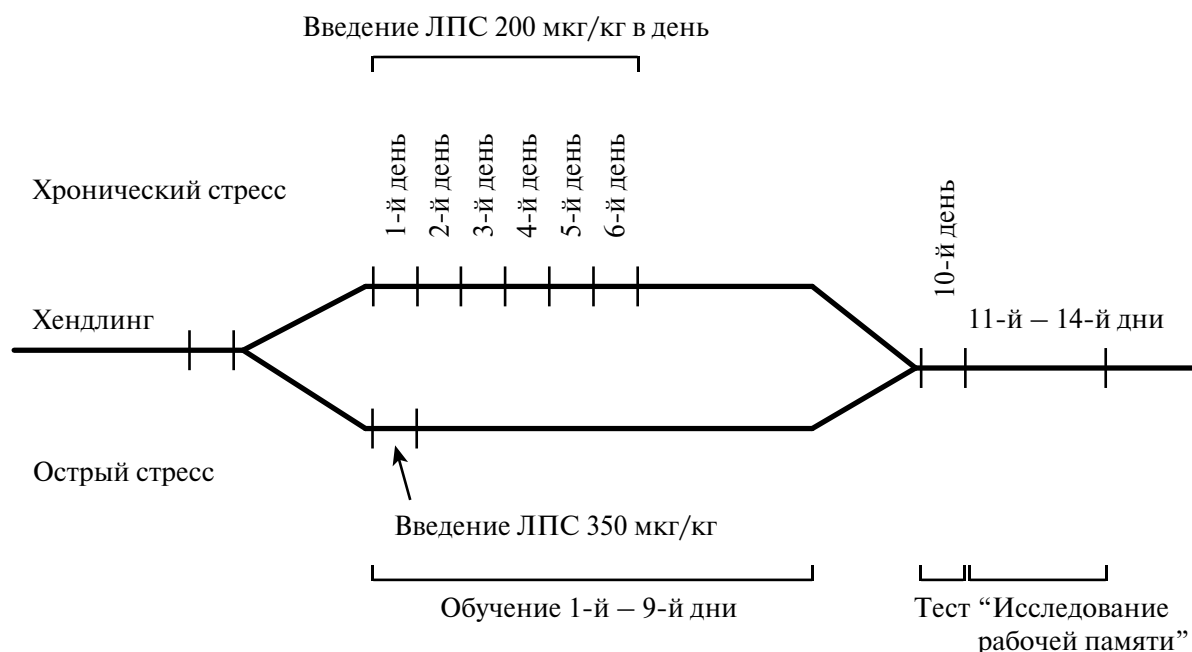


Рис. 1. План экспериментов.
Fig. 1. The plan of experiments.

в качестве внешних стимулов для ориентации животных в пространстве и фиксации положения в бассейне скрытой под водой платформы. Бассейн условно, с помощью двух пересекающихся через центр прямых, делился на 4 квадранта. Точки пересечения прямых со стенками бассейна служили в качестве мест погружения животных в воду (условно — север, юг, запад, восток). В середину одного из квадрантов помещали платформу (10 x 10 см) из прозрачного пластика, верхний край которой находится на 1.5–2.0 см ниже уровня воды. Во время опытов в комнате было тусклое освещение; температура воды в ходе опытов — 22–24°.

Процедура тестирования долгосрочной памяти. Обучение проводили в течение 9 дней. В день осуществляли 2 пробы продолжительностью 60 с и с интервалом примерно 10 мин (Grigoryan et al., 1994). После каждой пробы крыс вынимали из бассейна и протирали сухим полотенцем. Погружение крыс в воду в разные дни осуществляли всегда из двух точек, например с юга в первой пробе и с запада во второй. Если крыса в течение 60 с не находила платформу, то ее сажали на платформу и оставляли на ней в течение 10–15 с. На 10-й день проводили специальную тестовую пробу, во время которой платформа убиралась из бассейна. Крыс погружали в бассейн на 60 с и измеряли время их пребывания в каждом квадранте (Grigoryan et al., 1994).

Процедура тестирования рабочей памяти. Опыты проводили в течение 4 дней после завершения

обучения и проведения тестовой пробы. Ежедневно проводили 4 пробы продолжительностью 60 с каждая. Интервал между пробами составлял 30 с. Крыс в 1-й и в последующих пробах погружали в бассейн с разных стартовых точек (юг, север, запад, восток). Местоположение платформы в разные опытные дни было разным, но в течение одного дня оно оставалось неизменным (Grigoryan et al., 1994). Принципиально важным в этой процедуре является интервал времени между пробами. В течение 30 с крысы должны удерживать в памяти местоположение безопасной платформы и в следующих пробах быстро находить ее. Чем быстрее они это делают, тем лучше у них рабочая память.

Перемещение крыс в бассейне регистрировали с помощью видеотрекинговой системы EthoVision фирмы Noldus Ltd. Оценивали время с момента погружения крыс в бассейн до момента нахождения платформы и взбирания на нее (латентный период), проплываемое за это время расстояние (дистанция), время пребывания в каждом квадранте, скорость движения.

Статистический анализ. Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Колмогорова — Смирнова. При нормальном распределении данные обрабатывали с помощью дисперсионного факторного анализа ANOVA, в остальных случаях — с помощью теста Kruskal-Wallis и Медианного теста. Исследовали влияние факторов: УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ (СТАНД против ОС), СТРЕСС (ЛПС против ФИЗ),

ХАРАКТЕР СТРЕССА (острый, О, против хронического, Х), **ВОЗДЕЙСТВИЕ** (ЛПС-О против ФИЗ-О, ЛПС-Х против ФИЗ-Х), **ДНИ**, **ПРОБЫ** и взаимодействие этих факторов. При post-hoc-анализе применяли критерий Newman–Keuls test. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SEM. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, отмечали наличие тенденции при $0.05 < p < 0.1$. Использовали программу Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние условий содержания на обучение крыс с острым и хроническим ЛПС в водном лабиринте Морриса. Из результатов, представленных на рис. 2, видно, что крысы, содержащиеся в СТАНД-условиях

и ОС и испытывавшие однократный острый (рис. 2 (а)) и многократный хронический ЛПС-стресс (рис. 2 (б)), хорошо обучались находить скрытую под водой платформу. Более успешными в плане нахождения платформы были крысы групп ФИЗ-О и ЛПС-О (94.4% и 92.2% успешных проб соответственно), содержащиеся в условиях ОС, худший результат показали крысы групп ЛПС-Х и ФИЗ-О, содержащиеся в СТАНД-условиях (66.7% и 68.9% успешных проб соответственно). Крыс этих групп чаще приходилось подсаживать на платформу. Успешность нахождения платформы у крыс других групп находилась в диапазоне от 75% до 81%. Неудачные попытки сопровождались принудительной посадкой крыс на платформу. Об успешности обучения свидетельствуют прогрессивное уменьшение латентного периода нахождения платформы и проплываемое

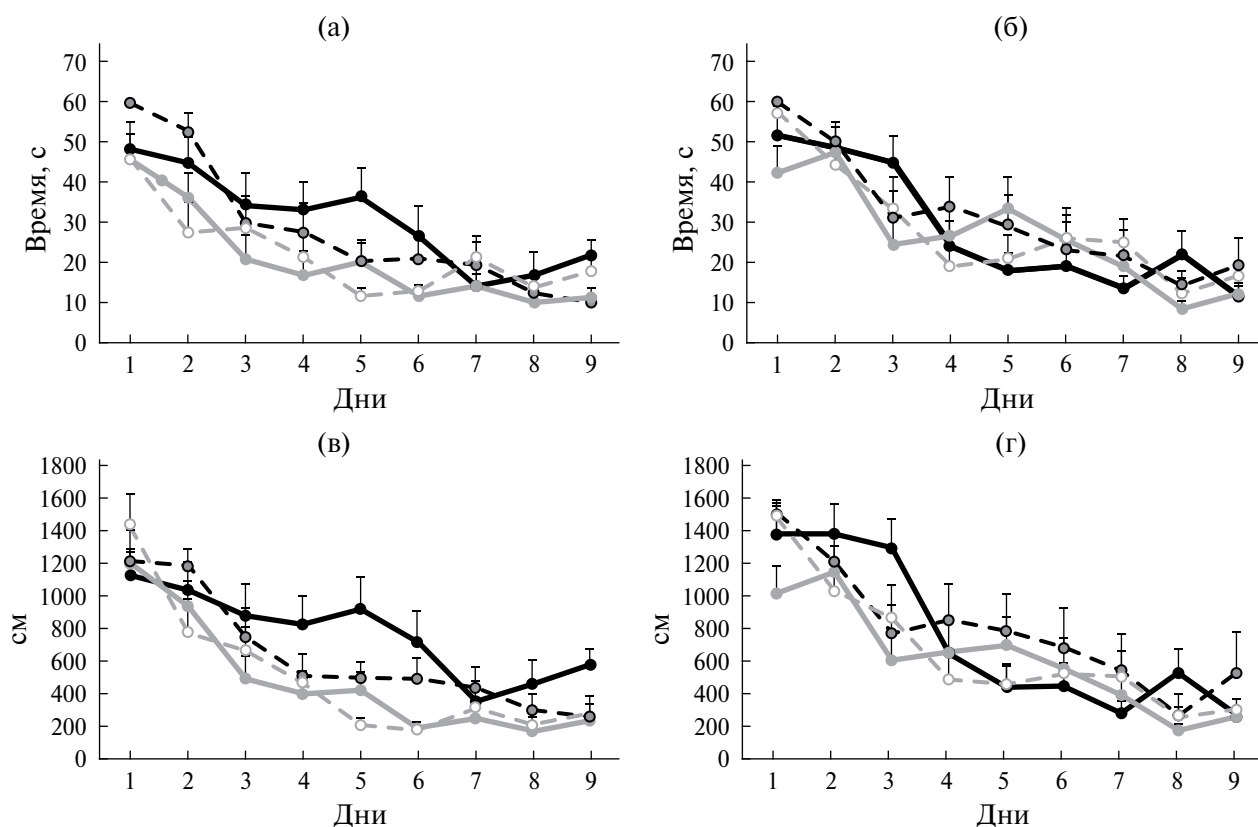


Рис. 2. Динамика обучения крыс в бассейне Морриса под действием острого (а, в) и хронического (б, г) провоспалительного ЛПС-стресса у животных, содержащихся в стандартных условиях (черные линии) и условиях обогащенной среды (серые линии). По оси ординат на панелях а и б время в сек, а на панелях в и г – расстояние в см. По оси абсцисс – дни тестирования. Сплошные линии – контрольные данные с введением физраствора, пунктирные – данные с введением ЛПС.

Fig. 2. Dynamics of learning in the Morris water maze under the influence of acute (а, в) and chronic (б, г) pro-inflammatory LPS stress in rats housed under standard conditions (black lines) and enriched environment (gray lines). Ordinate in the panels а and б shows time in sec, and in the panels в and г – the distance swum in cm. Abscissa shows days of animal testing. Solid lines – data with injection of saline, dotted lines – with injection of the pro-inflammatory LPS.

до нее расстояние (фактор ДНИ по латентному периоду $F(8, 1404) = 86.186, p = 0.0000$ и по дистанции $F(8, 1404) = 92.270, p = 0.0000$). Причем по показателю латентного периода достоверным оказалось также взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ДНИ $F(8, 1404) = 2.2614, p = 0.02112$. Различия проявились за счет более быстрого достижения платформы крысами, предварительно пребывавшими в ОС, по сравнению со СТАНД-условиями проживания (суммарно по всем группам). Взаимодействие факторов ХАРАКТЕР СТРЕССА $\times$ ДНИ и УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ХАРАКТЕР СТРЕССА $\times$ ДНИ оказалось недостоверным, что свидетельствует об отсутствии различий в обучении крыс с острым и хроническим ПВС и их зависимости от условий содержания.

Несмотря на то что взаимодействие указанных выше факторов было недостоверным, влияние фактора УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ по времени достижения платформы и проплываемой дистанции оказалось статистически значимым ($F(1, 1404) = 47.714, p = 0.00000$ для времени достижения платформы и $F(1, 1404) = 60.596, p = 0.00000$ для проплываемого расстояния). Крысы, содержащиеся в ОС, достигали платформы быстрее и проплывали до нее с меньшим расстоянием, чем крысы, содержащиеся в условиях СТАНД (суммарно по всем группам).

Статистически значимые различия ($F(1, 1404) = 5.6339, p = 0.01775$) были выявлены также для взаимодействия факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ХАРАКТЕР СТРЕССА по времени достижения

платформы. Эти различия проявились за счет более быстрого нахождения платформы крысами, содержащимися в ОС, по сравнению со СТАНД-группой, $p < 0.05$, и более быстрым достижением платформы группой крыс, испытывавших острый ЛПС-стресс по сравнению с крысами, перенесшими хронический стресс ($p < 0.05$, *Newman-Keuls test*) (рис. 3 (а)). У животных СТАНД-группы различий между ЛПС-О и ЛПС-Х, ЛПС-О и ФИЗ-О, ЛПС-Х и ФИЗ-Х, а также у животных ОС-группы между ЛПС-Х и ФИЗ-Х не наблюдалось (рис. 3 (а)).

По показателю проплываемой дистанции значимые различия проявились у группы ОС-ЛПС-О vs СТАНД-ЛПС-О, между ОС-ЛПС-О vs ОС-ЛПС-Х и за счет различий между ОС-ЛПС-Х vs СТАНД-ЛПС-Х ($p < 0.05$, *Newman-Keuls test*) (рис. 3 (б)). Крысы группы ОС-ЛПС-Х проплывали меньшее расстояние, чем крысы группы СТАНД-ЛПС-Х. Значимым было также влияние фактора ХАРАКТЕР СТРЕССА по времени нахождения платформы ($F(1, 1404) = 12.643, p = 0.00039$) и проплытому расстоянию ($F(1, 1404) = 18.932, p = 0.00001$), что проявилось при сравнении суммарных данных для острого и хронического ЛПС-стресса (рис. 3). В целом можно отметить, что ОС оказывала стимулирующее влияние на обучение в водном лабиринте Морриса как у нормальных (контрольных) животных, так и у испытывавших острый и хронический ЛПС-стресс, причем в большей степени у тех, которые испытывали острый стресс.

Скорость плавания крыс, содержащихся в ОС, была статистически значимо ниже, чем

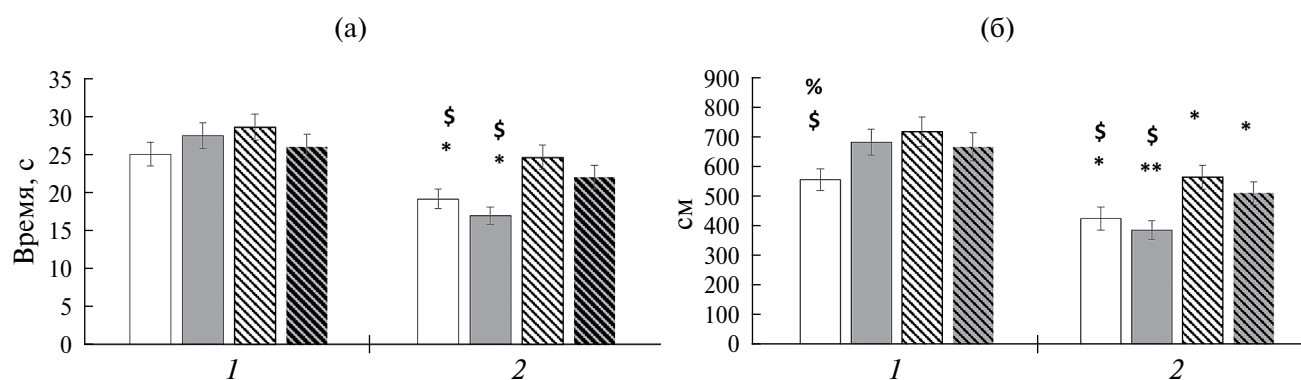


Рис. 3. Время достижения платформы (а) и проплываемая дистанция (б) у крыс, содержащихся в стандартных условиях (1) и в условиях обогащенной среды (2). Белые столбики – острый ЛПС-стресс, серые – контроль (физиологический). Столбики со светлой штриховкой – хронический ЛПС-стресс, столбики с темной штриховкой – контроль (физиологический). * – различия статистически значимы $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по условиям содержания, \$ – между острым и хроническим ЛПС-стрессом, $p < 0.05$.

Fig. 3. Time to reach the platform (a) and distance swum (b) in rats housed under standard conditions (1) and in an enriched environment (2). White bars – acute LPS stress, gray bars – controls (saline solution). Bars with light shading – chronic LPS stress, bars with dark shading – controls. * – the differences are statistically significant between groups with different housing conditions, $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, \$ – between groups with acute and chronic LPS stress, $p < 0.05$.

у СТАНД-группы: $F(1, 1404) = 22.818, p = 0.000$. В то же время если у животных СТАНД-группы как острый, так и хронический стресс приводил к снижению скорости, то в группе крыс, содержащихся в ОС, значительное снижение скорости плавания по сравнению с контролем наблюдалось только у животных с острым ПВС.

Тестовая проба без платформы

В тестовой пробе с отсутствием платформы в бассейне животные, содержащиеся в ОС, проводили в квадранте платформы больше времени, чем те, которые проживали в СТАНД-условиях, хотя различия были лишь на уровне тенденции, $F(1, 74) = 3.65, p = 0.059$. Между группами с острым и хроническим ЛПС-стрессом, а также между группами со стрессом и введением физ. раствора статистически значимых различий обнаружено не было. Также значимые различия не проявились у исследованных групп по проплываемому расстоянию в квадранте, где в ходе обучения располагалась платформа. Это говорит о том, что в конце обучения все группы крыс примерно одинаково находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее примерно одинаковое расстояние.

Рабочая память в зависимости от условий содержания у крыс с острым и хроническим провоспалительным стрессом

ANOVA-анализ показал статистически значимое снижение времени достижения платформы и проплываемого расстояния от первой к четвертой пробе (фактор ПРОБА): $F(3, 1279) = 121.30, p = 0.0000$ по времени достижения платформы и $F(3, 1279) = 73.392, p = 0.0000$ по дистанции (рис. 4). Фактор ДНИ, отражающий время нахождения платформы и проплываемого до нее расстояния в каждый опытный день, оказался также статистически значимым, $F(3, 1279) = 7.2054, p = 0.00009$ и $F(3, 1279) = 7.4531, p = 0.00006$. Это говорит о том, что обучение нахождению платформы с использованием рабочей памяти улучшалось не только при переходе от 1-й пробы к 4-й ежедневно, но и от 1-го к 4-му дню экспериментов.

У животных с острым ЛПС-стрессом в группах ОС и СТАНД различий в проявлениях рабочей памяти по показателю времени нахождения платформы не было (рис. 4 (а)). Но по пройденной дистанции от 1-й ко 2-й пробе рабочая память улучшилась у крыс ОС-ЛПС-О vs ОС-ФИЗ-О, vs СТАНД-ЛПС-О vs СТАНД-ФИЗ-О групп ($p < 0.05$, *Newman-Keuls test*) (рис. 4 (б)). У крыс СТАНД-группы хронический ЛПС-стресс вызывал существенное ($p < 0.01$, *Newman-Keuls test*) ухудшение рабочей памяти по сравнению с контрольными (СТАНД-ФИЗ) животными, что проявилось

в значимом увеличении времени нахождения платформы и проплываемой до нее дистанции (рис. 4 (б, г)). Пребывание в ОС предотвращало ухудшение обучения с использованием рабочей памяти у крыс с ЛПС. Анализ взаимодействия факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ВОЗДЕЙСТВИЕ выявил статистически значимые различия по времени достижения платформы и пройденному расстоянию: $F(3, 1279) = 6.6978, p = 0.00017$ и $F(3, 1279) = 73.392, p = 0.0000$ соответственно. Они проявились за счет различий между группами ОС-ЛПС-Х и СТАНД-ЛПС-Х ($p < 0.01$). Хотя по проплываемой дистанции взаимодействие факторов ВОЗДЕЙСТВИЕ x ПРОБА различий не выявило, $F(3, 1279) = 0.20790, p = 0.89097$, животные ЛПС-О-группы использовали до достижения платформы более короткий путь. Это говорит о том, что рабочая память по показателю проплываемой дистанции не зависела от характера стресса, но по непонятным причинам крысы, испытывавшие острый стресс, проплывали до нее меньшее расстояние.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящих опытах крысы с острым ЛПС-стрессом быстрее находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее меньшее расстояние, чем крысы с хроническим ЛПС-стрессом, причем скорость плавания у них была меньше, чем у контрольных «физрастворных» животных. Эти результаты совпадают с литературными данными (Kupersmidt et al., 2020; Xi et al., 2019; Kahn et al., 2012; Sparkman et al., 2005; Shaw et al., 2001). Различия между острым и хроническим стрессом могли быть вызваны двумя основными причинами. Во-первых, что хронический стресс оказывает более длительное нейротоксическое влияние, чем острый стресс. Это приводит к более интенсивному и продолжительному проявлению «болезненного состояния» (sickness behavior) для животного (Barter et al., 2020). Во-вторых, хроническое многократное введение ЛПС вызывает более интенсивное выделение микроглией провоспалительных цитокинов, хемокинов и других агентов, обостряющих воспалительный процесс и усиливающих «болезненное состояние».

Влияние условий содержания на поведение крыс в водном лабиринте Морриса проявилось за счет значимого влияния фактора УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ (по суммарным данным за все время обучения) и в результате достоверного взаимодействия факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ x ДНИ. В первом случае различия были получены благодаря значимому влиянию обогащенной среды по сравнению со СТАНД-условиями проживания, а во втором — вследствие различий в обучении поиска скрытой под водой платформы у крыс

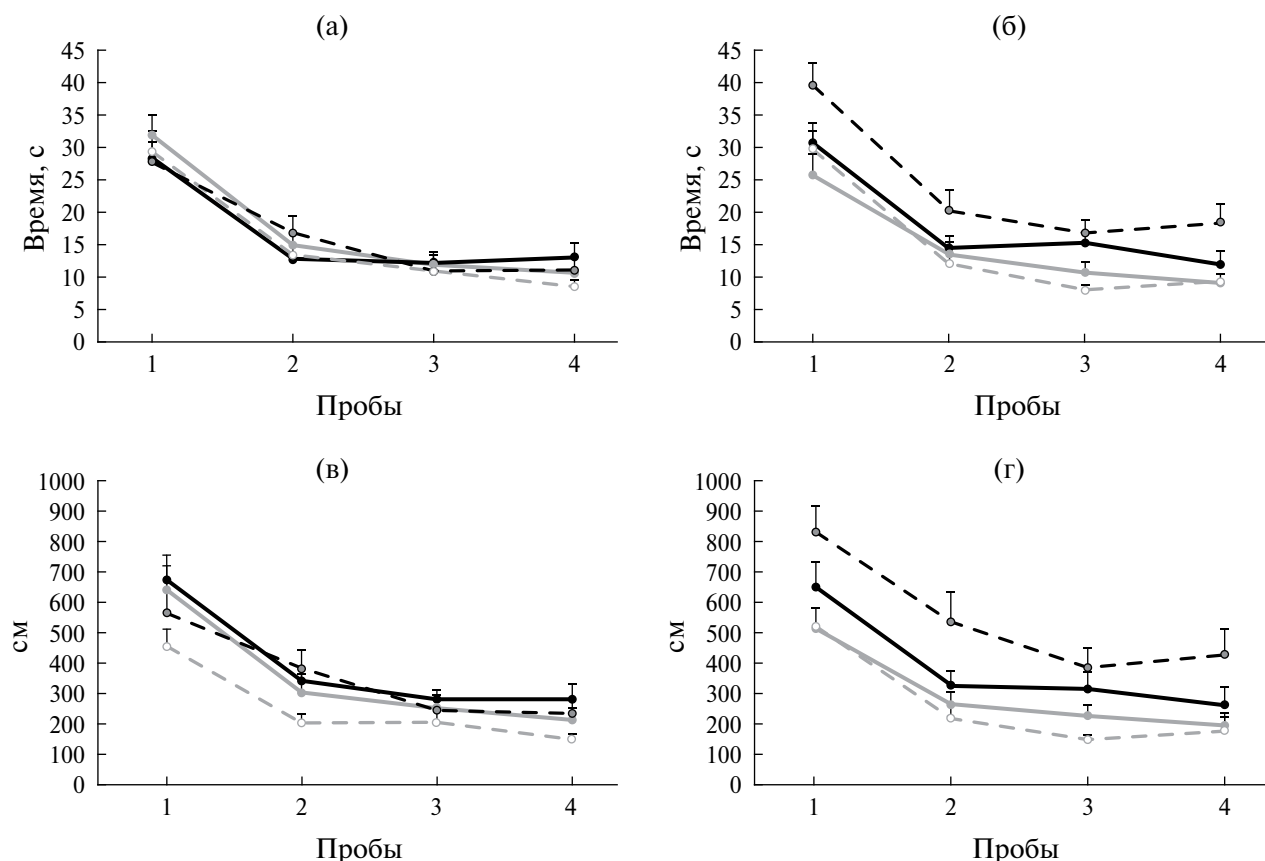


Рис. 4. Динамика времени нахождения платформы (а, б) и проплываемого расстояния (в, г) в бассейне Морриса под действием острого (а, в) и хронического (б, г) провоспалительного ЛПС-стресса у животных, содержащихся в условиях СТАНД (черные линии) и ОС (серые линии). По оси ординат на панелях а и б — время в сек, на панелях в и г — расстояние в см. По оси абсцисс — номера тестирования. Сплошные линии — контрольные данные с введением физраствора, пунктирные — данные с введением провоспалительного ЛПС.

Fig. 4. Dynamics of the time spent on the platform (а, б) and the distance swum (в, г) in the Morris water maze under the influence of acute (а, в) and chronic (б, г) pro-inflammatory LPS stress in animals kept in STAND conditions (black lines) and in the EE (gray lines). Ordinate in the panels а and б — time in sec; in the panels в and г — distance in cm; Abscissa — number of the trial. Solid lines — control data with injection of saline, dot lines — with LPS administration.

обеих этих групп. В целом животные, содержащиеся в ОС, тратили меньше времени и проплывали меньшее расстояние до платформы, чем крысы СТАНД-группы. Они также проводили больше времени в квадранте платформы в ходе тестовой пробы без платформы. Улучшение поведенческих показателей под влиянием ОС происходило как при сравнении групп крыс, испытывавших ПВС, так и при сравнении контрольных групп, получавших инъекции физраствора. Обучение под влиянием ОС по сравнению со СТАНД-группой улучшалось у крыс, получавших острый ЛПС-стресс, по времени достижения платформы, и у крыс, получавших острый и хронический ЛПС-стресс, по показателю проплываемой дистанции. Более того,

ОС в большей степени улучшала показатели обучения у крыс с острым, чем у крыс с хроническим ЛПС-стрессом. Таким образом, если резюмировать полученные нами данные по обучению в водном лабиринте Морриса в зависимости от условий содержания, можно сказать, что 20-дневное пребывание крыс в ОС оказывает существенное и благотворное влияние на поведение нормальных крыс и животных, испытывавших острый и хронический ЛПС-стресс. Здесь важно отметить, что, хотя результаты нашей работы и перекликаются с литературными данными, они впервые, в отличие от работ такого рода, получены при обратной последовательности событий, т.е. когда пребывание животных в обогащенной среде предваряет

воздействие воспалительной интоксикации и последующее проведение опытов. О том, что в литературе «все работы основаны на влияниях ОС после введения ЛПС», говорится в обзорной работе Лендольфо и соавт. (Landolfo et al., 2003, стр. 21). Влияние ОС на обучение и память в водном лабиринте Морриса у нормальных грызунов разного пола, возраста и других особенностей подробно изложено нами ранее в работе (Григорьян, 2021). Нам известна только одна работа (Keumoradzadeh et al., 2020), в которой исследовали влияние обогащенной среды на обучение в водном лабиринте Морриса у крыс с хроническим ПВС. В этой работе ЛПС в очень высокой дозе (1 мг/кг) вводили в 1, 3, 5 и 7-й дни опытов; через одну неделю после введения ЛПС крыс помещали в обогащенную среду и еще через 3 недели исследовали поиск ими скрытой платформы в водном лабиринте Морриса. Хотя отмеченная процедура (4 пробы в день с интервалом в 15 мин, в течение 3 дней) обучения отличалась от той, которая использовалась нами, в обоих случаях были получены примерно одинаковые результаты. Многократный хронический стресс ухудшал латентный период достижения платформы и уменьшал время пребывания в этом квадранте в тестовой пробе, а ОС восстанавливала эти показатели до нормальных значений. Примечательно, что авторы сравнивали между собой усредненные суммарные данные показателей поведения по каждому из трех дней, не приводя данных по взаимодействию факторов ГРУППА x ДНИ, хотя при этом ссылались на использованный ими однофакторный дисперсионный анализ. Что касается возможных системных механизмов облегчающего влияния ОС на обучение в водном лабиринте Морриса, то мы на этот счет высказали гипотезу (Grigoryan, 2023), которая объясняет положительные эффекты ОС с позиций функциональной системы организации поведения (Григорьян, 2006; 1990). Согласно этой гипотезе, ОС влияет практически на работу каждого звена функциональной системы (обработка информации, память, мотивации, подкрепление и двигательная активность), направляя поведение через настройку этих звеньев на снижение страха, ослабление негативной памяти и оптимальный поиск.

Результаты статистического анализа при исследовании рабочей памяти крыс в водном лабиринте Морриса показали, что, хотя основные взаимодействия факторов УСЛОВИЯ ПРОЖИВАНИЯ x ХАРАКТЕР СТРЕССА x ПРОБА, оценивающие проявления рабочей памяти, оказались недостоверными, другие взаимодействия, например, такие, как УСЛОВИЯ ПРОЖИВАНИЯ x ХАРАКТЕР СТРЕССА, проявились с высокой достоверностью. Это было вызвано тем, что у крыс СТАНД-группы хронический ЛПС-стресс существенно ухудшал показатели поведения по сравнению с контрольными животными, что проявилось в увеличении

времени нахождения платформы и проплываемой до нее дистанции. Пребывание в ОС возвращало к контрольным значениям оба этих показателя поведения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что поведение крыс в водном лабиринте Морриса в зависимости от проживания их в ОС и характера испытанного ими стресса существенно различается, но эти различия отражают не разницу в проявлениях рабочей памяти, а какие-то иные функциональные изменения в работе мозга. В любом случае в проведенных опытах ОС оказывала благотворное, положительное влияние на проявление этих функций. В литературе мы нашли только одну похожую работу с влиянием ОС на проявления рабочей памяти у крыс, подверженных перинатальной асфиксии (Galeano et al., 2015). Но, во-первых, нейровоспаление в этой работе вызывалось асфиксией при родах, а не с помощью ЛПС в зрелом периоде. Во-вторых, крыс помещали в ОС с момента отлучения от матери до 17-месячного возраста. В-третьих, оценку рабочей памяти проводили не в 4 последовательных пробах с интервалом в 30 с, а в двух пробах с тем же интервалом, одна из которых была образцовой (sample trial), а другая тестовой (matching trial). ОС в этих опытах существенно уменьшала время достижения платформы у крыс с асфиксией до контрольного уровня, чего не наблюдалось у крыс, содержащихся в стандартных условиях (Galeano et al., 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В небольшом числе работ по исследованию влияния ОС на поведение крыс в водном лабиринте Морриса, испытывавших ПВС с помощью липополисахаридной интоксикации, вначале вызывали ПВС, а затем помещали крыс в ОС и после этого тестировали поведение. В настоящей работе мы впервые, по данным литературы, исследовали обучение и рабочую память крыс в водном лабиринте Морриса при обратной последовательности событий, т.е. пребывание животных в обогащенной среде предвляло воздействие воспалительной интоксикации и последующее проведение опытов. Однако, несмотря на разный порядок пребывания крыс в ОС и получения ими ПВС, результаты опытов совпали. При любом порядке применения ОС оказывала благотворное положительное влияние на поиск скрытой под водой платформы в лабиринте Морриса. Под влиянием ОС происходило более быстрое нахождение безопасной платформы с меньшим проплываемым до нее расстоянием у животных, подвергавшихся острому и хроническому ПВС, и у контрольных крыс, получавших физраствор. Следует также отметить, что динамика обучения и особенности проявления

долговременной и рабочей памяти у крыс с острым и хроническим ПВС была схожей, что свидетельствует о сходном влиянии ОС на функциональные изменения в работе мозга крыс вне зависимости от характера последующего стресса. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ОС в благотворном влиянии на поведение крыс при поиске безопасной платформы.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента — Зайченко М.И., Григорьян Г.А. Проведение экспериментов и обработка материала — Зайченко М.И., Сидорина В.В. Написание статьи и подбор литературы — Зайченко М.И., Григорьян Г.А. Редактирование и рецензирование рукописи — Зайченко М.И., Григорьян Г.А.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2023-2025 годы (№ г.р. 1021062411613-6-3.1.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов, связанных с публикацией данной статьи, отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры с участием животных соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, директивам Совета Европейского парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63/EU) и рекомендациям биоэтического комитета ИВНД и НФ РАН (протокол № 3 от 10.07.2020).

УКАЗАНИЕ НА ДОСТУПНОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

При необходимости первичные данные можно запросить у авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Григорьян Г.А. Взаимодействие сигнальных мотивационных и исполнительных компонентов условного

рефлекса. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 1990. 40 (4): 629–642.

Григорьян Г.А. Память и депрессии. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. 2006. 56 (4): 556–570.

Григорьян Г.А. Молекулярно-клеточные механизмы пластических перестроек, вызванных обогащенной средой. Влияние на обучение и память. Нейрохимия. 2021. 38 (3): 205–220.

Зайченко М.И., Филенко П.А., Сидорина В.В., Григорьян Г.А. Острый и хронический провоспалительный стресс, вызванный введением липополисахарида, регион-специфично изменяет уровень генов провоспалительных цитокинов в мозге крыс и влияет на обучение и память. Спецвыпуск «Molecular mechanisms underpinning different levels of brain plasticity: genes, synapses, cells, neuronal nets, cognition». Журнал Биохимия. 2023.88 (4): 642–655.

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

Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J. Endotoxin Res. 2001. 7(3): 167–202.

Aranda M.L., González Fleitas M.F., Dieguez H.H., Milne G.A., Devouassoux J.D., Keller Sarmiento M.I., Chianelli M., Sande P.H., Dorfman D., Rosenstein R.E. Therapeutic benefit of environmental enrichment on optic neuritis. Neuropharmacology. 2019. 145: 87–98.

Barter J., Kumar A., Rani A., Colon-Perez L.M., Febo M., Foster T.C. Differential effect of repeated lipopolysaccharide treatment and aging on hippocampal function and biomarkers of hippocampal senescence. Mol. Neurobiol. 2020. 57: 4045–4059.

Cao P., Chen C., Liu A., Shan Q., Zhu X., Jia C., Peng X., Zhang M., Farzinpour Z., Zhou W., Wang H., Zhou J.N., Song X., Wang L., Tao W., Zheng C., Zhang Y., Ding Y.Q., Jin Y., Xu L., Zhang Z. Early-life inflammation promotes depressive symptoms in adolescence via microglial engulfment of dendritic spines. Neuron. 2021.109(16): 2573–2589.

Czerniawski J., Miyashita T., Lewandowski G., Guzewski J.F. Systemic lipopolysaccharide administration impairs retrieval of context-object discrimination, but not spatial, memory: Evidence for selective disruption of specific hippocampus-dependent memory functions during acute neuroinflammation. Brain Behav. Immun. 2015. 44: 159–166.

Dandi E., Kalamari A., Touloumi O., Lagoudaki R., Nouisopoulou E., Simeonidou C., Spandou E., Tata D.A. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress. Int. J. Dev. Neurosci. 2018.67:19–32.

Deng I., Wiese M.D., Zhou X.F., Bobrovskaya L. The efficacy of systemic administration of lipopolysaccharide

- in modelling pre-motor Parkinson's disease in C57BL/6 mice. *Neurotoxicology*. 2021. 85: 254–264.
- Galeano P., Blanco E., Logica Tornatore T.M., Romero J.I., Holubiec M.I., Rodríguez de Fonseca F., Capani F. Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia. *Front. Behav. Neurosci.* 2015. 8:406.
- Grigoryan G. A., Mitchell S.N., Hodges H., Sinden J.D., Gray J.A. Are the cognitive-enhancing effects of nicotine in the rat with lesions to the forebrain cholinergic projection system mediated by an interaction with the noradrenergic system? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994. 49(3): 511–521.
- Grigoryan G.A. Neuroinflammation and memory reconsolidation. *The Neurochemical Journal*. 2022. 16 (2): 109–120.
- Grigoryan G.A. The systemic effects of the enriched environment on the conditioned fear reaction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience. REVIEW article. Sec. Learning and Memory*. 2023: 17.
- Ji M.-H., Tang H., Luo D., Qiu L.-L., Jia M., Yuan H.-M., Feng S.-W., Yang J.-J. Environmental conditions differentially affect neurobehavioral outcomes in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. *Oncotarget*. 2017. 8: 82376–82389.
- Kahn M.S., Kranjac D., Alonzo C.A., Haase J.H., Cedillos R.O., et al. Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. *Behav. Brain Res.* 2012. 229: 176–184.
- Kawano T., Morikawa A., Imori S., Waki S., Tamura T., Yamanaka D., Yamazaki F., Yokoyama M. Preventive effects of multisensory rehabilitation on development of cognitive dysfunction following systemic inflammation in aged rats. *J. Anesth.* 2014. 28: 780–784.
- Keymoradzadeh A., Hedayati Ch. M., Abedinzade M., Gazor R., Rostampour M., Taleghani B.K. Enriched environment effect on lipopolysaccharide-induced spatial learning, memory impairment and hippocampal cytokine levels in male rats. *Behav. Brain Res.* 2020. 394: 112814.
- Keymoradzadeh A., Hedayati Ch M., Abedinzade M., Khakpour-Taleghani B. Enriched environment restores passive avoidance memory impairment in a rat model of neuroinflammation. *Physiol. Pharmacol.* 2022. 26: 127–137.
- Kupferschmid B.J., Rowsey P.J., Riviera M. Characterization of spatial learning and sickness responses in aging rats following recurrent lipopolysaccharide administration. *Biol. Res. Nurs.* 2020. 22: 92–102.
- Landolfo E., Cutuli D., Decandia D., Balsamo F., Petrosini L., Gelfo F. Environmental enrichment protects against neurotoxic effects of lipopolysaccharide: A comprehensive overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24(6): 5404.
- Manickavasagam D., Lin L., Oyewumi M.O. Nose-to-brain Co-delivery of repurposed simvastatin and BDNF synergistically attenuates LPS-induced neuroinflammation. *Nanomedicine*. 2020. 23: 102107.
- Mlynarik M., Johansson B.B., Jezova D. Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. (1018): 273–280.
- Pavlova I.V., Broshevitskaya N., Zaichenko M.I., Grigoryan G.A. The influence of long-term housing in enriched environment on behavior of normal rats and subjected to early pro-inflammatory lipopolysaccharide stress. *Brain Behav. Immun. Health* 2023. 30:100639.
- Pavlova I., Broshevitskaya N., M. Zaichenko M., Grigoryan G. Effects of Social isolation and an enriched environment on anxious-depressive behavior in rats in normal conditions and after early proinflammatory stress. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2022. 52 (5): 684–697.
- Pugh C.R., Kumagawa K., Fleshner M., Watkins L.R., Maier S.F., Rudy J.W. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. *Brain Behav. Immun.* 1998. 12: 212–229.
- Shaw K.N., Commins S., O'Mara S.M. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav. Brain Res.* 2001. 124: 47–54.
- Sparkman N.L., Martin L.A., Calvert W.S., Boehm G.W. Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* 2005. 159: 145–151.
- Upthegrove R., Khandaker G.M. Cytokines, oxidative stress and cellular markers of inflammation in schizophrenia. *Curr Top Behav. Neurosci.* 2020. 44: 49–66.
- Xi Y.R., Jiang J.X., Hu Y., Pan J.P., Mi X.N., Gao Q., Xiao F., Zhang W., Luo H.M. The Immune system drives synapse loss during lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in mice. *Aging Neurosci.* 2019. 11: 279.
- Wang W.-Y., Tan M.-S., Yu J.-T., Tan L. Role of pro-Inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann. Transl. Med.* 2015. 3: 136.
- Williamson L.L., Chao A., Bilbo S.D. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav. Immun.* 2012. (26): 500–510.
- Zhao J., Bi W., Xiao S., Lan X., Cheng X., Zhang J., Lu D., Wei W., Wang Y., Li H., et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.* 2019. 9: 5790.

THE INFLUENCE OF ENRICHED ENVIRONMENT ON LEARNING AND MEMORY IN THE MORRIS WATER MAZE IN RATS WITH ACUTE AND CHRONIC PRO-INFLAMMATORY STRESS

M. I. Zaichenko^{a, #}, V. V. Sidorina^a, G. A. Grigoryan^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: mariya-zaichenko@yandex.ru*

It is known that housing in an enriched environment (EE) prevents the development of anxiety-depressive disorders and cognitive impairment caused by various stresses. In a very limited number of studies on learning and memory in the Morris water maze, pro-inflammatory stress was elicited before the exposure of animals in the EE. In this study, we, for the first time, examined the inverse sequence of interaction between EE and stress; in the first place was the action of the EE, while on the second place – the influence of stress. 40 rats aged 25 to 45 days were placed in the EE and 40 other rats were kept under standard conditions. Pro-inflammatory stress in rats of both groups was induced by injection of a bacterial toxin, lipopolysaccharide LPS, once (acute stress, 350 µg/kg) and repeatedly (chronic, 200 µg/kg) 1 hour before the start of behavioral experiments and during their performance. Control animals were injected with saline at the same volume. Rats of the EE group found the platform faster and swam a shorter distance to it than rats of the standard group. Improvements in behavioral parameters were observed in animals with acute and chronic LPS stress, and in control rats. It should also be noted that the dynamics of learning and the features of the long-term and working memory in rats with acute and chronic LPS were similar, which points to a similar effect of EE on functional changes in the brain activity of rats, regardless of the nature of the subsequent stress. The results obtained indicate the important role of EE in beneficially influencing the behavior of rats when searching for a safe platform.

Keywords: the enriched environment, acute and chronic LPS stress, learning, memory, water maze