

## ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ ИЗМЕНЕНИЙ СТРЕСС-ГОРМОНАЛЬНОЙ И КОГНИТИВНОЙ ФУНКЦИЙ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ БОЛИ В НОВОРОЖДЕННОМ ВОЗРАСТЕ

© 2022 г. И. П. Буткевич<sup>1,\*</sup>, В. А. Михайленко<sup>1</sup>, Е. А. Вершинина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: irinabutkevich@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.10.2021 г.

После доработки 22.11.2021 г.

Принята к публикации 23.11.2021 г.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния умеренного неонатального болевого стресса, вызванного у новорожденных самцов и самок крысят созданием очага воспалительной боли, на стрессовую реактивность гормонального ответа и когнитивные процессы в водном лабиринте Морриса во взрослом состоянии. Полученные данные указывают на отсутствие значимых различий в показателях пространственного обучения и памяти между подопытными крысами, подвергнутыми неонатальной воспалительной боли, и контрольными животными. Однако у подопытных крыс обнаружены половые различия в пространственной долговременной памяти, эффективность которой была выше у самцов, чем у самок. После тестирования долговременной памяти реактивность гипоталамо-гипофизарно-адреноренальной системы, оцененная по содержанию гормона стресса кортикостерона в плазме крови в ответ на формалиновый тест, у подопытных самцов была выше, чем у самок. Только у подопытных самок обнаружены различия между показателями кратковременной и долговременной памяти, с более высокой эффективностью кратковременной памяти. Таким образом, обнаружен половой диморфизм во влиянии неонатального болевого стресса на пространственную долговременную память у взрослых крыс; у подопытных самцов по сравнению с подопытными самками выявлена более эффективная долговременная память, сочетающаяся с более высокой стрессовой реактивностью гормонального ответа.

*Ключевые слова:* неонатальная воспалительная боль, взрослые крысы, кортикостерон, пространственное обучение и память

**DOI:** 10.31857/S0044452922020036

Боль является стрессом для организма. Ранний возраст по сравнению со взрослым характеризуется более высокой чувствительностью к боли из-за незрелости центральной нервной системы и сформировавшейся нисходящей тормозной системы, регулирующей болевые сигналы [1, 2]. Повторные болевые воздействия в неонатальном возрасте нарушают развитие центральной нервной системы [3], что провоцирует в дальнейшем изменения в функциональной активности ноцицептивной системы [4, 5], адаптивной гипоталамо-гипофизарно-адреноренальной системы (ГГАКС) и разных типов поведения [6]. В неонатальной клинике для новорожденных был введен термин болевой стресс. Клинические данные по исследованию влияния болевого стресса в раннем возрасте на функциональную активность ГГАКС ограничены подростковым возрастом и получены на детях, которые родились раньше срока и нуждались в интенсивных терапевтических процедурах в новорожденном состоянии [6–8]. Обращает на себя

внимание противоречивость результатов по исследованию влияния болевого стресса в раннем возрасте на функциональную активность ГГАКС. Как увеличение, так и отсутствие в изменении уровня кортизола было обнаружено после болевых процедур [9]. Противоположные результаты, более низкий уровень кортизола в слюне, был обнаружен у недоношенных детей с более высоким числом болевых процедур в раннем возрасте, чем у детей с меньшим их числом [8, 10].

Существует тесное нейроанатомическое и физиологическое взаимодействие между болью и ГГАКС, которое регулируется гипоталамусом, миндалиной, гиппокампом, префронтальной корой и таламусом [11–13]. Особенности этого взаимодействия в ответ на повреждающие раздражители в раннем возрасте недостаточно изучены. Поскольку существует множество факторов, влияющих на боль и ГГАКС в неонатальный период, данные о влиянии боли на ГГАКС, полученные как в клинике, так и в лабораторных исследованиях на животных, явля-

ются неполными [6]. Более того, воздействие стресса и боли на ГГАКС зависит от возраста, даже в младенческом возрасте [14]. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения взаимосвязи между неонатальной болью и ГГАКС, так как существует многогранная взаимосвязь между типом боли, ее интенсивностью, полом, возрастом во время воздействия боли и реакцией ГГАКС.

Модификацию стрессорной реактивности ГГАКС связывают с нарушением негативной обратной связи, осуществляемой глюкокортикоидами через паравентрикулярное ядро гипоталамуса и гипофиз. Периферический стероидный гормон ГГАКС, кортизол у людей, кортикостерон у грызунов играют важную роль в обучении и памяти [15]. Ключевыми внешними регуляторами активности ГГАКС являются гиппокамп, миндалина, префронтальная кора, структуры, вовлеченные в когнитивную сферу, поэтому изменения, вызванные неонатальным болевым стрессом в этих структурах мозга, могут модифицировать процессы обучения и памяти. Исследования на младенцах [16] и детях школьного возраста [17] подтверждают неблагоприятное влияние неонатальной боли на когнитивную сферу, однако остается до сих пор открытым вопрос о возможном долговременном влиянии перенесенной неонатальной боли на когнитивные процессы и регуляцию ГГАКС.

Многочисленные работы на животных посвящены изучению влияния не болевого стресса (отнятие от матери, лимитированные жизненные условия и др.) на реактивность ГГАКС и когнитивные способности [14, 18, 19], тогда как число исследований по влиянию болевого стресса крайне ограничено [20]. Существует множество моделей неонатальной боли, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. Все они предназначены для моделирования опыта младенцев, которые каждый день переживают множество повреждений кожи в отделении интенсивной терапии [21]. Нам известно лишь о нескольких исследованиях на грызунах, в которых изучалось влияние неонатальной воспалительной боли на обучение, память или ГГАКС. Например, боль, вызванная формалином у новорожденных крыс, нарушила у этих животных в возрасте 64 дней пространственное обучение и память, тестированные в радиальном лабиринте, в котором используется пищевое подкрепление [22]. В других работах инъекция воспалительных агентов каррагена или адьюванта Фрейнда в заднюю конечность новорожденным крысятам приводила к дефициту пространственной памяти у взрослых крыс [23], нарушению регуляции ГГАКС, но не влияла на краткосрочную или долгосрочную память у крыс обоего пола [12], однако вызывала дефицит пространственного обучения у самцов крыс [24]. Модель острой воспалительной боли, вызванной подкожной инъекцией формалина, широко используется в течение многих лет в исследованиях

болевого системы [25, 26]. Формалин вызывает повреждающие последствия, которые сравнимы с повреждениями в неонатальной клинике, тогда как вышеупомянутые воспалительные агенты карраген и адьювант Фрейнда значительно превосходят повреждения, вызванные инвазивными процедурами, по интенсивности и продолжительности.

Следует подчеркнуть, что данные литературы по исследуемому вопросу получены в основном на особях мужского пола, при исследовании разнополых особей результаты противоречивы [27–29]. Несмотря на несоответствия имеющихся данных, нет сомнения в том, что болезненные травмы и вызванные ими переживания в раннем возрасте могут нарушить процессы пространственного обучения и памяти в постнатальном онтогенезе. Актуальность данного вопроса очевидна, принимая во внимание распространенность в неонатальной клинике инвазивных процедур, которые могут вызвать воспалительный ответ, а также установленную связь между неонатальной болью и нарушениями в ЦНС [3, 4]. Подчеркивается, что для выяснения механизмов влияния болевых переживаний в раннем возрасте на когнитивную функцию и адаптивную стрессовую ГГАКС необходимо включение разнополых особей [6, 14].

Ранее при исследовании влияния неонатальной периферической боли, вызванной формалином, на пространственное обучение и память мы обнаружили половые различия у крыс позднего препубертатного возраста с более выраженным нарушением когнитивной функции у самцов и отсутствием взаимосвязи между активацией ГГНС, неонатальной болью и показателями пространственного обучения и памяти [30]. Настоящее исследование является продолжением предыдущего и проведено на взрослых крысах, чтобы выяснить, сохраняются ли данные нарушения у половозрелых животных. Актуальность данной проблемы очевидна, принимая во внимание распространенность болевых инвазивных процедур в неонатальной клинике (ежедневное взятие крови из пяточки, трахеотомия, уколы, хирургические операции), которые могут вызвать воспалительный ответ, а также установленную связь между неонатальной болью и нарушениями в центральной нервной системе [3, 4]. В настоящее время эта проблема становится особенно актуальной, когда коронавирусная инфекция охватила уже и новорожденных, которым требуется интенсивная терапия.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании долговременного влияния болевого стресса, вызванного воспалительной болью на периферии, у одно- и двухсуточных крысят обоего пола, на пространственное обучение и память, а также реактивность ГГАКС в ответ на стресс у взрослых крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на потомстве крыс линии Вистар, полученных из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург). Все процедуры работы с животными проводились в соответствии с принципами Базельской декларации; протоколы опытов утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 28/10 от 28.10.2021). Взрослые самки и самцы, как и их потомство (подопытные – 34 самца и 30 самок, контрольные – 29 самцов и 28 самок), содержались в стандартных условиях (свободный доступ к стандартизированной пище и воде, 12:00–12:00 включение и выключение света в 8 ч, 22–23°C) в виварии лаборатории. На следующее утро, после подсадки к трем не рожающим самкам двух самцов, у самок брали мазки из влагалища для определения беременности. Через сутки после рождения потомства в каждом помете оставляли не более восьми крысят, самцов и самок поровну по возможности. Одно- и повторно двухдневным крыскам инъецировали подкожно раствор формалина (2.5%, 0.5 мкл) в подошву задней конечности (контроль – инъекция физиологического раствора) для создания очага воспалительной боли, после чего крысят сразу возвращали к своим матерям. Подопытных крысят маркировали.

В возрасте 30 дней разнополых крыс рассаживали без матери в разные клетки не более четырех-пяти крыс в каждой. Начиная с 90–100-дневного возраста у животных исследовали процесс пространственного обучения в течение пяти дней в водном лабиринте Морриса [31]. Крысу помещали в бассейн, в котором она должна была в течение 60 с найти металлическую платформу (диаметр 10 см), расположенную на дне бассейна (диаметр 120 см, высота 72 см, температура воды 22–24°C) ниже уровня воды на 2 см. Бассейн визуально разделяли на четыре части, в одной из них находилась платформа, местоположение которой не изменяли. Регистрировали время нахождения платформы (латентный период, с). Если попытка была неудачной, экспериментатор сам помещал крысу на платформу, в этом случае латентный период принимали за 60 с. Первые четыре попытки с перерывом между каждой в 15 с и пребыванием на платформе в 20 с составляли первую пробу. Следующая вторая аналогичная проба предоставлялась крысе через четыре мин отдыха в сухой клетке. Кратковременную память регистрировали на пятый день после первой пробы, а через четверо суток после этого – долговременную память; в обоих случаях крысу на 60 с помещали в бассейн без платформы и регистрировали латентный период достижения целевого квадранта, места, где ранее находилась платформа, а также время пребывания в целевом квадранте за период времени, равный 60 с. Использовали

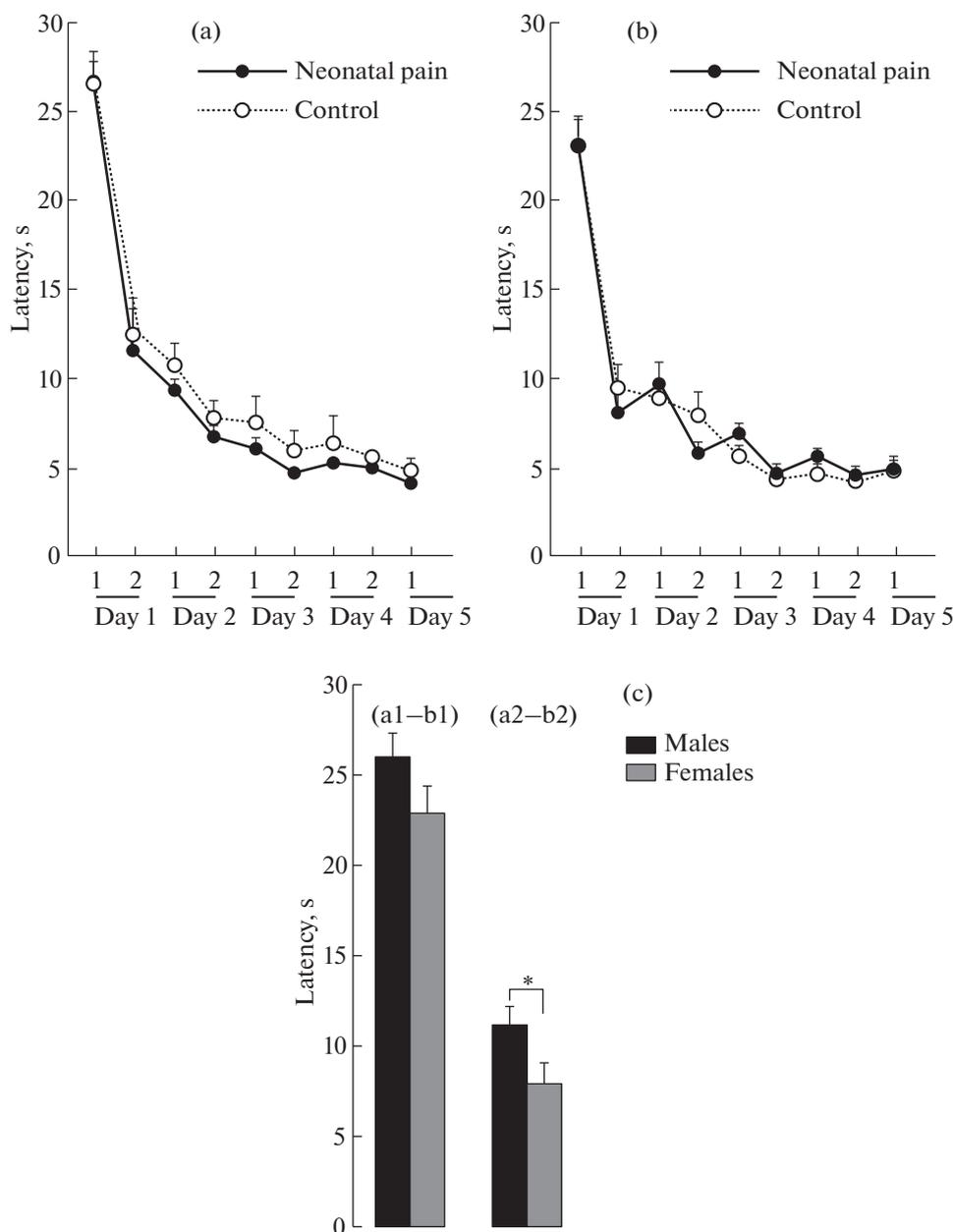
специальную компьютерную программу для регистрации траектории движения крысы с помощью вебкамеры. После завершения исследования долговременной памяти у крыс оценивали реактивность ГГКС в ответ на боль, вызванную инъекцией формалина в заднюю конечность. Через 30 мин после инъекции формалина (пик болевого ответа, [32]) декапитацией собирали образцы крови для дальнейшего определения содержания кортикостерона в плазме крови. Плазму крови хранили при температуре минус 20°C. Кортикостерон определяли в двух экземплярах методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов (“Хема-Medica Co” Cat №: K210R; Россия) с помощью спектрофотометрической пластины (Spectrostar NANO, BMG Labtech, Германия).

Полученные данные проверялись на нормальность выборок с использованием критерия Колмогорова-Смирнова, с последующим тестом статистических методов. Статистический анализ результатов проводили с использованием дисперсионного анализа ANOVA в программном комплексе SPSS Inc 13 с последующими множественными сравнениями по Бонферрони. Анализ данных по обучению, памяти и кортикостерону проводили с использованием разных моделей дисперсионного анализа: двухфакторного (пол, воздействие), смешанного (кратковременная и долговременная память, пол, воздействие) и трехфакторного (пол, воздействие и время) соответственно. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка. Статистические решения принимали на 5%-ном уровне значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для пространственного обучения применяли одномерный двухфакторный анализ для каждого дня в отдельности (факторы: пол & воздействие). Главные эффекты дали значимое влияние пола, но не воздействия, в первый тренировочный день в первой пробе ( $F(1.117) = 4.455, p = 0.037, \eta^2 = 0.037$ ) и второй пробе ( $F(1.117) = 5.252, p = 0.024, \eta^2 = 0.043$ ). Смешанный дисперсионный анализ (зависимые переменные – значения латентного периода, факторы: пол, воздействие, попытки) обнаружил у подопытных крыс половые различия в первый день только во второй пробе ( $p = 0.026$ ), в первой пробе – на уровне тенденции ( $p = 0.067$ ), с более продолжительным латентным периодом у самцов (рис. 1а, 1с). Первый день принято рассматривать как самый показательный во влиянии стрессовых воздействий на процесс обучения в тесте Морриса [33].

В пространственной памяти также не было обнаружено значимого влияния неонатальной боли у крыс обоего пола. Трехмерный дисперсионный анализ выявил значимые различия в долговременной памяти между подопытными самцами и самка-

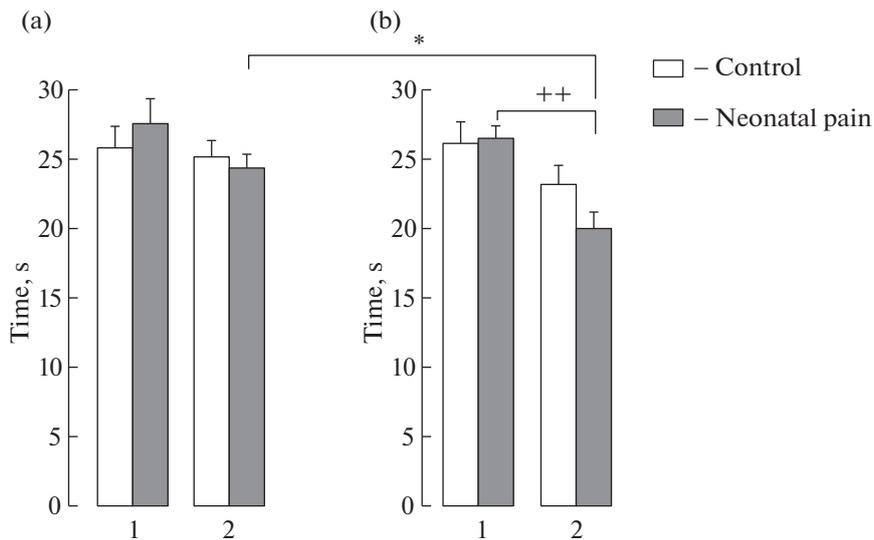


**Рис. 1.** Латентный период достижения платформы в водном лабиринте Морриса в первую пробу в течение пяти тренировочных дней и вторую пробу в течение четырех тренировочных дней пространственного обучения, у самцов (а) и самок (б) взрослых крыс, подвергнутых неонатальной воспалительной боли, и контрольных крыс. По горизонтали: номера проб (1, 2) и пяти тренировочных дней. (с) Графики a1–b1 и a2–b2 иллюстрируют результаты статистического анализа в первый тренировочный день в пробе 1 и пробе 2 у самцов и самок. Различия между подопытными самцами и самками в первый день в первой пробе: a1–b1, уровень значимости:  $p = 0.067$ ; во второй пробе: a2–b2, уровень значимости:  $*p = 0.026$ .

ми для продолжительности нахождения в целевом квадранте  $F(1.93) = 5.62$ ,  $p = 0.020$ ,  $\eta^2 = 0.057$ , с более высокой эффективностью у самцов ( $p = 0.017$ ). У подопытных самок обнаружены различия во времени нахождения в целевом квадранте между кратковременной и долговременной памятью  $F(1.23) = 15.4$ ,  $p = 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.401$  с большей продолжительностью в кратковременной памяти ( $p < 0.01$ ),

т.е. с более эффективной кратковременной памятью по сравнению с долговременной (рис. 2).

При исследовании реактивности ГГКС в ответ на формалиновый тест после тестирования у взрослых крыс долговременной памяти трехфакторный (пол, воздействие и время) дисперсионный анализ ANOVA обнаружил главные эффекты для времени:  $F(2.64) = 74.745$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.700$  и взаимодей-



**Рис. 2.** Регистрация кратковременной (1) и долговременной (2) памяти в водном лабиринте Морриса у самцов (а) и самок (б) взрослых крыс, подвергнутых в новорожденном состоянии воспалительной боли. По вертикали: время нахождения в целевом квадранте (с). Белые столбики – контроль, темные столбики – неонатальная боль. Уровень значимости: \* $p < 0.05$ , половые различия в долговременной памяти у крыс с неонатальной болью; ++ $p < 0.01$ , между кратковременной и долговременной памятью у самок с неонатальной болью.

ствия факторов Время и Воздействие:  $F(2.64) = 3.65$ ,  $p = 0.032$ ,  $\eta^2 = 0.102$ . Апостериорный анализ с поправкой Бонферрони показал, что неонатальная боль увеличила у взрослых крыс с тестируемой долговременной памятью содержание кортикостерона в ответ на 30-минутный формалиновый тест по сравнению с базальным уровнем гормона ( $p < 0.001$  у обоего пола) и с уровнем гормона у контрольных самцов ( $p = 0.012$ ), но не у самок. У подопытных животных выявлены половые различия с более высокой реактивностью ГГКС у самцов, чем у самок ( $p = 0.048$ ), тогда как для контрольных самцов и самок реактивность ГГКС в подобных условиях была идентичной. Через сутки после фор-

малинового теста уровень кортикостерона был нормализован (табл. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в настоящей работе результаты показали, что боль, вызванная подкожной инъекцией воспалительного агента формалина в подошву задней конечности в первые два дня жизни крысят, не изменила во взрослом состоянии исследованные характеристики пространственного обучения, кратковременной и долговременной памяти в водном лабиринте Морриса у крыс обоего пола. В то же время у крыс с неонатальной воспалительной болью, но не у контрольных, были выявлены поло-

**Таблица 1.** Влияние воспалительной боли, вызванной инъекцией формалина или физиологического раствора в подошву задней конечности у новорожденных крысят, на уровень кортикостерона в плазме крови через 30 мин и 24 часа после формалинового теста у взрослых самцов и самок крыс

| Пол животных | Уровень кортикостерона (нмоль/л)   |              |  |               |                      |              |
|--------------|------------------------------------|--------------|--|---------------|----------------------|--------------|
|              | Базальный уровень                  |              | Время отбора пробы после формалинового теста |               |                      |              |
|              | Физиологический раствор (контроль) | Формалин     | Физиологический раствор (контроль)           |               | Формалин             |              |
|              |                                    |              | 30 мин                                       | 24 ч          | 30 мин               | 24 ч         |
| Самцы        | 180.5 ± 54.5                       | 173.1 ± 75.8 | 767.5 ± 96.9                                 | 296.0 ± 51.1  | *** + 1189.4 ± 108.7 | 338.4 ± 56.9 |
| Самки        | 278.4 ± 48.2                       | 217.4 ± 30.4 | 838.2 ± 127.5                                | 383.1 ± 111.2 | ***968.9 ± 102.6     | 345.9 ± 79.8 |

Примечание. Неонатальная боль увеличила у взрослых крыс, прошедших тестирование долговременной памяти, содержание кортикостерона через 30 мин после формалинового теста по сравнению с базальным уровнем гормона (\*\*\*)  $p < 0.001$  у обоего пола) и уровнем гормона у контрольных самцов ( $\hat{p} = 0.012$ ), но не у контрольных самок, в результате чего у подопытных животных проявились половые различия с более высокой реактивностью ГГКС у самцов, чем у самок ( $^+p < 0.05$ ).

вые различия в пространственной долговременной памяти, которая характеризовалась более высокой эффективностью у самцов. После тестирования долговременной памяти у самцов с неонатальной воспалительной болью реактивность ГГКС в ответ на формалиновый тест была выше, чем у контрольных самцов, тогда как у самок аналогичных различий в уровне кортикостерона не проявилось. У подопытных крыс обнаружены половые различия в реактивности ГГКС в ответ на формалиновый тест, с более высокой реактивностью у самцов, чем у самок, тогда как у контрольных животных реактивность ГГКС была идентичной. Кроме того, только у подопытных самок, но не у подопытных самцов и не у контрольных крыс обоего пола, долговременная память была менее эффективна по сравнению с кратковременной памятью.

Ранее нами было впервые показано, что новорожденные крысята в ответ на инъекцию формалина в подошву задней конечности демонстрируют продолжительное (более суток) увеличение содержания кортикостерона в плазме крови, что дало нам возможность предполагать о долговременном влиянии данного воспалительного болевого воздействия на ГГКС и, возможно, на когнитивную функцию [34]. Однако в препубертатный период развития только самцы с аналогичным неонатальным воздействием, но не самки, обнаружили ухудшение в пространственном обучении и памяти, но реактивность ГГКС в ответ на принудительное плавание не была изменена у крыс обоего пола по сравнению с контролем (физиологический раствор) [34]. Данные настоящего исследования указывают на модификацию влияний неонатальной воспалительной боли у крыс в процессе развития. Действительно, негативное влияние неонатальной умеренной воспалительной боли, выявленное нами у самцов крыс препубертатного возраста, не проявилось у взрослых самцов, более того, долговременная память у них стала достоверно эффективнее, чем у самок.

Отсутствие влияния повторной неонатальной воспалительной боли на характеристики пространственного обучения и памяти у взрослых крыс в настоящей работе можно было бы связать с низкой концентрацией формалина, используемой нами для новорожденных крысят в первые два дня жизни. Действительно, при использовании в качестве воспалительного агента формалина с более высокой концентрацией и объемом (4%, 5 мкл) по сравнению с нашей работой, и более продолжительной инъекцией (с первого по четвертый день жизни) в каждую лапу крысятам авторы обнаружили у них в 64-дневном возрасте нарушение пространственного обучения и памяти в радиальном лабиринте [22]. В данном инструменте используется пищевое подкрепление, крыса ориентируется по запаху и визуальным меткам внутри лабиринта, тогда как в водном лабиринте Морриса, который

применяли мы, — по предметам вокруг бассейна и в отсутствие обонятельных стимулов; и, наконец, еще одно отличие между нашей работой и упомянутой — это разные линии крыс (Вистар и Спрэг-Дули). Мы не можем сравнивать наши результаты с результатами, полученными с применением у новорожденных грызунов каррагена или адьюванта Фрейнда в связи с тем, что данные воспалительные агенты вызывают значительно более продолжительные и повреждающие последствия, чем формалин. Перечисленные, хотя и несопоставимые данные указывают на то, что воспалительная боль в раннем возрасте может иметь долгосрочные последствия для последующей функции ГГКС и когнитивной сферы.

Наряду с отсутствием различий во влиянии неонатального болевого стресса между подопытными и контрольными крысами, мы обнаружили у подопытных самцов по сравнению с подопытными самками более эффективную долговременную память, сочетающуюся с более высокой стрессовой реактивностью гормонального ответа. Какие механизмы могут быть вовлечены во влияние неонатальной воспалительной боли на когнитивные процессы и реактивность ГГКС во взрослом состоянии? В месте инъекции формалина выделяется “inflammatory soup” (“воспалительный суп”) [35], в состав которого входят многие вещества, включая и гистамин, который вызывает расширение капилляров, повышение их проницаемости, увеличение выброса адреналина и глюкокортикоидов. Высвобождение этих сигнальных молекул усиливает воспалительный ответ, опосредует периферическую сенсibilизацию и передает болевые сигналы в дорсальный рог спинного мозга. Стимуляция первичных афферентных нейронов вызывает высвобождение медиаторов воспаления, которые, в свою очередь, активируют центральные нейроны и глиальные клетки. В раннем онтогенезе гистамин может способствовать синаптической пластичности, зависимой от NMDA-рецептора, а во взрослом возрасте — ингибировать синаптическую пластичность, зависящую от NMDA-рецептора, также через рецептор H3, что может указывать на зависимость от возраста связь рецептора H3 с внутриклеточными процессами [36, 37]. Чувствительность организма к гистамину высокая в период низкого уровня глюкокортикоидов, наблюдаемого у крыс в утренние часы. Именно в это время мы собирали кровь у новорожденных для определения кортикостерона в ответ на инъекцию формалина [34], тогда как кровь у взрослых — после регистрации долговременной памяти, т.е. после полудня. Нельзя исключить, что возрастные особенности влияния гистамина и его H3 рецептора, а также реципрокные отношения между гистамином и глюкокортикоидами, вовлечены в эффекты неонатальной боли на реактивность ГГКС.

Высокий и относительно длительный уровень кортикостерона, вызванный формалиновой болью у новорожденных крыс [34], ухудшает развитие паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN). Кортикотропин-релизинг-гормон (CRH) данного ядра регулирует нейрогенез в гиппокампе, который участвует в пространственном обучении и памяти [38]. Нейросекреторные системы CRH кроме нейропептидов выделяют глутамат в гипофизарные портальные сосуды [39]. Глутаматергические нейроны являются одними из основных звеньев в процессах обучения и запоминания [6]. Роль глутамата во время развития в основном связана с его ионотропным рецептором (NMDA рецептором), который присутствует уже у P0 крыс [40]. При созревании возбуждающих синапсов в гиппокампе новорожденной крысы в NMDA рецепторе преобладает NR2B рецепторная субъединица, при активации которой быстрее, чем при активации NR2A субъединицы, развивается долговременная потенциация, что способствует укреплению памяти. В ходе постнатального развития происходит смена NR2B на NR2A рецепторную субъединицу. Чрезмерные уровни глюкокортикоидов усиливают высвобождение глутамата [41], вызывая нейротоксичность, которая усиливает апоптоз, как показано в гиппокампе и других областях мозга в течение первой послеродовой недели у крысы [42, 43]. Показано, например, что избирательная потеря белка NR2B и последующая синаптическая дисфункция ослабляют функцию префронтальной коры во время развития и провоцируют возникновение ранних когнитивных нарушений [44]. Вышеописанные возрастные модификации рецептора гистамина и рецепторных субъединиц NMDA рецептора могут быть вовлечены в выявленные нами изменения в пространственном обучении, памяти и ГГКС у взрослых подопытных крыс.

Влияние неонатальной боли на когнитивную функцию осуществляется и другими физиологическими системами. Половые стероидные гормоны эстрогены и андрогены модулируют пренатальное и постнатальное развитие многих процессов в ноцицептивной, иммунной системах, ГГКС и когнитивной функции [45]. Особое внимание в настоящее время уделяется половым различиям в развитии микроглии, реагирующей на стресс и боль [46]. Специфическое для пола выделение эстрогенов в неонатальном периоде с доминированием женского полового гормона у самцов приводит к дифференцированному вовлечению иммунной системы у разнополых особей в ответ на болевой стресс. Неонатальная боль может неодинаково изменить у разнополых особей сбалансированное развитие тесно взаимосвязанных между собой иммунной системы, ГГКС и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы, которые влияют на синаптическую пластичность в структурах головного мозга (47). Существует предположение, что стресс

в раннем возрасте может иметь не только повреждающие последствия, но и адаптационный потенциал, который, взаимодействуя с чувствительностью индивидуума к программированию (пластичность в раннем возрасте), определяет в дальнейшем активность физиологических систем организма. На основании наших предыдущих исследований [48] и данных литературы [49] мы допускаем, что обнаруженная нами у подвергнутых неонатальной боли самцов более высокая по сравнению с самками эффективность пространственной долговременной памяти, сочетающаяся с более высокой реактивностью ГГКС, может свидетельствовать в поддержку теории соответствия-несоответствия [50], которая предполагает адаптивную способность умеренного стресса в ранний критический период развития в подготовке организма к соответствующим условиям данной стрессовой среды (в нашем случае формалиновый тест) у взрослых крыс. Дизайн настоящего исследования включал стресс воспалительной боли в новорожденном возрасте, а во взрослом состоянии – стресс в водном лабиринте Морриса и болевой стресс в формалиновом тесте. Взаимодействие различных типов стресса, как неоднократно отмечалось в литературе, может привести к неожиданным результатам [51]. Таким образом, обнаруженные половые различия у подопытных крыс свидетельствуют о том, что стресс умеренной неонатальной воспалительной боли может определять в дальнейшем половой диморфизм в пространственной памяти, что косвенно указывает на половые различия в синаптической пластичности, лежащей в основе обучения и памяти, в структурах, которые вовлечены в когнитивные процессы. Данные, полученные в нашем исследовании, позволяют заключить, что умеренный стресс воспалительной боли у новорожденных крыс способствует формированию у самцов адаптивной восприимчивости к факторам окружающей среды (чувствительность к программированию в предъявляемых крысам экспериментальных условий оказалась выше у самцов, чем у самок), что в результате проявилось у самцов в более высокой эффективности долговременной памяти и более высокой реактивности ГГКС в ответ на формалиновый стресс. Очевидно, что данная ситуация с коронавирусом у детей раннего возраста обусловит всплеск исследований по взаимосвязи когнитивных нарушений с неонатальным болевым стрессом.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 17-04-00214а.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.), сбор данных (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.), обработка данных (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.), написание и редактирование манускрипта (И.П.Б., В.А.М., Е.А.В.).

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность старшим лаборантам-ассистентам лаборатории онтогенеза нервной системы, Е.Н. Лавровой и Н.А. Улановой, за помощь в проведении экспериментов, а также д.б.н. Е.И. Тюльковой (лаб. регуляции функций нейронов мозга, зав. д.б.н. Е.А. Рыбникова) за проведение количественного анализа за кортикостерона.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fitzgerald M* (2015) What do we really know about newborn infant pain? *Exp Physiol* 100: 1451–1457. <https://doi.org/10.1113/ep085134>
2. *De Kort AR, Joosten EAJ, Patijn J, Tibboel D, van den Hoogen NJ* (2021) The development of descending serotonergic modulation of the spinal nociceptive network: a life span perspective. *Pediatr Res Online* ahead of print. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01638-9>
3. *Brewer CL, Baccei ML* (2020) The development of pain circuits and unique effects of neonatal injury. *Neural Transmission (Vienna)* 127: 467–479. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02059-z>
4. *Schwaller F, Fitzgerald M* (2014) The consequences of pain in early life: injury-induced plasticity in developing pain pathways. *Eur J Neurosci* 39: 344–352. <https://doi.org/10.1111/ejn.12414>
5. *Williams MD, Lascelles BD* (2020) Early Neonatal Pain—A Review of Clinical and Experimental Implications on Painful Conditions Later in Life. *Front Pediatr* 7: 8–30. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00030>
6. *Mooney-Leber SM, Brummelte S* (2017) Neonatal pain and reduced maternal care: Early-life stressors interacting to impact brain and behavioral development. *Neuroscience* 7: 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.001>
7. *Grunau RE, Holsti L, Haley DW, Oberlander T, Weinberg J, Solimano A, Whitfield MF, Fitzgerald C, Yu W* (2005) Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. *Pain* 113: 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.10.020>
8. *Brummelte S, Chau CMY, Cepeda IL, Cecil MY, Chau, Degenhardt A, Weinberg J, Synnes AR, Grunau RE* (2015) Cortisol levels in former preterm children at school age are predicted by neonatal procedural pain-related stress. *Psychoneuro-endocrinology* 51: 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.018>
9. *Herrington CJ, Olomu IN, Geller SM* (2004) Salivary cortisol as indicators of pain in preterm infants: a pilot study. *Clin Nurs Res* 13: 53–68. <https://doi.org/10.1177/1054773803259665>
10. *Grunau RE, Cepeda IL, Chau CM, Brummelte S, Weinberg J, Lavoie PM, Ladd M, Hirschfeld AF, Russell E, Koren G, Van Uum S, Brant R, Turvey SE* (2013) Neonatal pain-related stress and NFKBIA genotype are associated with altered cortisol levels in preterm boys at school age. *PLoS One* 8: 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073926>
11. *Ulrich-Lai YM, Herman JP* (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
12. *Victoria NC, Inoue K, Young LJ, Murphy AZ* (2013) Long-term dysregulation of brain corticotrophin and glucocorticoid receptors and stress reactivity by single early-life pain experience in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 38: 3015–3028. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.08.013>
13. *Timmers I, Quaedflieg CWE, Hsu MC, Heathcote LC, Rovnaghi CR, Simons LE* (2019) The interaction between stress and chronic pain through the lens of threat learning. *Neurosci Biobehav Rev* 107: 641–655. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.007>
14. *Van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG* (2017) Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci* 11: 87. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
15. *Akirav I, Kozenicky M, Tal D, Sandi C, Venero C, Richter-Levin G* (2004) A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn Mem* 11: 188–195. <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.61704>
16. *Grunau RE, Whitfield MF, Petrie-Thomas J, Synnes AR, Cepeda IL, Keidar A, Rogers M, Mackay M, Hubber-Richard P, Johannesen D* (2009) Neonatal pain, parenting stress and interaction, in relation to cognitive and motor development at 8 and 18 months in preterm infants. *Pain* 143: 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.02.014>
17. *Ranger M, Grunau RE* (2014) Early repetitive pain in preterm infants in relation to the developing brain. *Pain Manag* 4: 57–67. <https://doi.org/10.2217/pmt.13.61>
18. *Bonapersona V, Kentrop J, Van Lissa CJ, Van der Veen R, Joëls M, Sarabdjitsingh RA* (2019) The behavioral phenotype of early life adversity: A 3-level meta-analysis of rodent studies. *Neurosci Biobehav Rev* 102: 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.021>
19. *Fitzgerald E, Sinton MC, Wernig-Zorc S, Morton NM, Holmes MC, Boardman JP, Drake AJ* (2021) Altered hypothalamic DNA methylation and stress-induced hyperactivity following early life stress. *Epigenetics Chromatin* 14 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00405-8>
20. *Khawla Q, Alzoubi NKH, Alhusban A, Bawaane A, Al-Azzani M, Khabour OF* (2017) Sucrose and naltrexone prevent increased pain sensitivity and impaired long-term memory induced by repetitive neonatal noxious stimulation: Role of BDNF and  $\beta$ -endorphin. *Physiol Behav* 179: 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.06.015>
21. *Grunau RE, Holsti L, Peters JW* (2006) Long-term consequences of pain in human neonates. *Semin Fetal Neonatal Med* 11: 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.02.007>

22. *Anand KJ, Garg S, Rovnaghi CR, Narsinghani U, Bhutta AT, Hall RW* (2007) Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. *Pediatr. Res* 62: 283–290. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180986d2f>
23. *Henderson YO, Victoria NC, Inoue K, Murphy AZ, Parent MB* (2015) Early life inflammatory pain induces long-lasting deficits in hippocampal-dependent spatial memory in male and female rats. *Neurobiol Learn Mem* 118: 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.010>
24. *Amaral C, Antonio B, Oliveira MGM, Haman C, Guinsburg R, Covolan L* (2015) Early postnatal nociceptive stimulation results in deficits of spatial memory in male rats *Neurobiol. Learn Mem* 125: 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.012>
25. *Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S* (1992) The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5–17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-t](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t)
26. *Roca-Vinardell A, Berrocoso E, Llorca-Torralba M, García-Partida JA, Gibert-Rahola J, Mico JA* (2018) Involvement of 5-HT<sub>1A/1B</sub> receptors in the antinociceptive effect of paracetamol in the rat formalin test. *Neurobiol Pain* 3: 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.01.004>
27. *Chen M, Xia D, Min C, Zhao X, Chen Y, Liu L, Li X* (2016) Neonatal repetitive pain in rats leads to impaired spatial learning and dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in later life. *Sci Rep* 14: 39159. <https://doi.org/10.1038/srep39159>
28. *Xia D, Min C, Chen Y, Ling R, Chen M, Li X* (2020) Repetitive pain in neonatal male rats impairs hippocampus-dependent fear memory later in life. *Front Neurosci* 14: 722. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00722>
29. *Mogil JS* (2020) Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nature Rev Neurosci* 21: 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0310-6>
30. *Mikhailenko VA, Butkevich IP, Vershinina EA* (2021). Studying the effect of neonatal inflammatory pain on cognitive processes and the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in rats of prepubertal age. *J. Evol Biochem Physiol* 57: 031–1039. <https://doi.org/10.31857/S0044452921050041>
31. *Morris RGM* (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn and Motiv* 12:239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
32. *Butkevich I, Mikhailenko V, Semionov P, Bagaeva T, Otelin V, Aloisi AM* (2009) Effects of maternal corticosterone and stress on behavioral and hormonal indices of formalin pain in male and female offspring of different ages. *Horm Behav* 55: 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.09.008>
33. *Vorhees CV, Williams MT* (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J* 55: 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
34. *Butkevich IP, Mikhailenko VA, Vershinina EA, Barr GA* (2021) The Long-Term Effects of Neonatal Inflammatory Pain on Cognitive Function and Stress Hormones Depend on the Heterogeneity of the Adolescent Period of Development in Male and Female Rats. *Front Behav Neurosci* 15: 691578. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00125>
35. *Basbaum AI, Jessell TM* (2000) The perception of pain. Principles of neural science. Eds: ER Kandel, JH.Schwartz, TM Jessell. New York: McGraw-Hill Comp. 472–481.
36. *Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H* (2001) Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol* 59: 1–8. <https://doi.org/10.1124/mol.59.1.1>
37. *Rapanelli M, Frick LR, Horn KD, Schwarcz RC, Pogorelov V, Nairn AC* (2016) The Histamine H3 receptor differentially modulates Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and act signaling in striatonigral and striatopallidal neurons. *J Biol Chem* 291: 21042–21052. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.731406>
38. *Koutmani Y, Gampierakis IA, Polissidis A, Ximerakis M, Koutsoudaki PN, Polyzos A, Agrogiannis G, Karaliota S, Thomaidou D, Rubin LL, Politis PK, Karalis KP* (2019) CRH Promotes the Neurogenic Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Rep* 29: 932–945.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.037>
39. *Hrabovszky E, Wittmann G, Turi GF, Liposits Z, Fekete C* (2005) Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone Neurons of the Rat Contain Vesicular Glutamate Transporter-2. *Endocrinology* 146: 341–347. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0856>
40. *Behuet S, Cremer JN, Cremer M, Palomero-Gallagher N, Zilles K, Amunts* (2019) Developmental Changes of Glutamate and GABA Receptor Densities in Wistar Rats. *Front Neuroanat* 13: 100. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00100>
41. *Verhaeghe R, Gao V, Morley-Fletcher S, Bouwalder H, Van Camp G, Cisani F, Nicoletti F, Maccari S* (2021) Maternal stress programs a demasculinization of glutamatergic transmission in stress-related brain regions of aged rats. *Geroscience* 13: 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00375-5>
42. *Lu J, Goula D, Sousa N, Almeida OFX* (2003) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 121: 123–131. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00421-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00421-4)
43. *Dührsen L, Simons SH, Dzierżko M, Genz K, Boos V, Siffringer M, Tibboel D, Felderhoff-Mueser U* (2013) Effects of repetitive exposure to pain and morphine treatment 742 on the neonatal rat brain. *Neonatology* 103: 35–43. <https://doi.org/10.1159/000341769>
44. *Gulchina Y, Xu S-J, Snyder MA, Elefant F, Gao W-J* (2017) Epigenetic mechanisms underlying NMDA receptor hypofunction in the prefrontal cortex of juvenile animals in the MAM model for schizophrenia. *J Neurochem* 143: 320–333. <https://doi.org/10.1111/jnc.14101>
45. *Green MR, McCormick CM* (2016) Sex and stress steroids in adolescence: Gonadal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Gen Comp Endocrinol* 234: 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.004>

46. Nelson LH, Lenz KH (2017) The immune system as a novel regulator of sex differences in brain and behavioral development. *J Neurosci Res* 95: 447–461. <https://doi.org/10.1002/jnr.23821>
47. Wang K, Xu F, Campbell SP, Hart KD, Durham TD, Maylie J, Xu J (2020) Rapid actions of anti-Müllerian hormone in regulating synaptic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *FASEB J* 34: 706–719. <https://doi.org/10.1096/fj.201902217R>
48. Butkevich IP, Mikhailenko VA, Vershinina EA (2020) Combination of Stressors in the Critical Periods of Development Increases Resistance to Inflammatory Pain Stress in Adult Rats. *Neurosci Behav Physiology* 50: 1090–1097. <https://doi.org/10.1007/s11055-020-01010-0>
49. Nederhof E, Schmidt MV (2012) Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol Behav* 106: 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.008>
50. Daskalakis NP, Bagot RC, Parker KJ (2013) The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology* 38: 1858–1873. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008>
51. Sokołowski A, Folkierska-Żukowska M, Jednoróg K, Moodie CA, Dragan WŁ (2020) The relationship between early and recent life stress and emotional expression processing: A functional connectivity study. *Cogn Affect Behav Neurosci* 20: 588–603. <https://doi.org/10.3758/s13415-020-00789-2>

## Sexual Dimorphism in the Effect of Neonatal Inflammatory Pain on Stress Reactivity of the Hormonal Response and Cognitive Functions in Adult Rats

I. P. Butkevich<sup>a,#</sup>, V. A. Mikhailenko<sup>a</sup>, and E. A. Vershinina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: irinabutkevich@yandex.ru*

The effect of moderate neonatal stress induced by inflammatory pain in rat pups of both sexes on the hormonal response and cognitive processes in adult animals was studied in the Morris water maze. No significant differences in spatial learning and memory were found in experimental rats exposed to neonatal inflammatory pain vs. control animals. However, experimental rats exhibited sex differences in long-term spatial memory whose efficiency was higher in males vs. females. After long-term memory testing, stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, as assessed by the plasma corticosterone level in the formalin test, was higher in experimental males vs. females. Only experimental females exhibited differences between short-term and long-term memory, with the efficiency being higher in the former. Thus, sexual dimorphism was found in the effect of neonatal nociceptive stress on long-term spatial memory in adult rats: experimental males vs. females demonstrated more effective long-term memory combined with a higher stress reactivity of the hormonal response.

*Keywords:* neonatal inflammatory pain, adult rats, corticosterone, spatial learning and memory