

**ВЛИЯНИЕ ПЕРИНАТАЛЬНОГО СТРЕССА И АНТИДЕПРЕССАНТОВ  
НА ОСТРЫЙ И ТОНИЧЕСКИЙ БОЛЕВОЙ ОТВЕТ  
И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ У МОЛОДЫХ САМЦОВ КРЫС**

© 2019 г. В. А. Михайленко<sup>1, \*</sup>, И. П. Буткевич<sup>1, 2</sup>, Е. А. Вершинина<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: viktormikhailenko@yandex.ru



У потомства крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу в период беременности (пренатальный стресс), исследовали влияние периферической воспалительной боли в первые два дня жизни на болевую чувствительность, реактивность болевой системы в ответ на воспалительный агент, тревожность, депрессивноподобное поведение и когнитивные способности в препубертатном возрасте. Обнаружено, что пренатальный стресс вызывал у самцов усиление болевой чувствительности, воспалительного болевого ответа, тревожно-депрессивного поведения, ухудшение способности к пространственному обучению. Хроническое введение ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина или агониста 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов буспилона беременным самкам нивелировало вредные последствия пренатального стресса. В этом случае боль у пренатально стрессированных новорожденных не приводила к нарушениям поведения ни в одном из использованных тестов. Более того, комбинация перинатальных стрессоров (пренатальный стресс и болевой стресс у новорожденных) препятствовала вредному влиянию пренатального стресса, что обнаружилось в достоверном снижении уровня болевого ответа в тесте “горячая пластина” и воспалительного болевого ответа в формалиновом тесте по сравнению с уровнем ответов у пренатально стрессированных самцов, не подвергнутых боли в новорожденном возрасте; в этих условиях действие препаратов не проявилось. Сделан вывод, что стрессовые воздействия в перинатальный период развития при определенных условиях способствуют повышению уровня стрессоустойчивости у крыс в препубертатном возрасте. Результаты обсуждаются в контексте современной гипотезы (match/mismatch stress hypothesis), согласно которой стресс в критические периоды развития может программировать адаптивное поведение организма к последующим стрессам.

*Ключевые слова:* перинатальный стресс, флуоксетин, буспирон, боль, депрессия, препубертатный период развития, самцы крыс

DOI: 10.1134/S0869813919070057

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что стресс, которому подвергается организм в перинатальный период развития, является основным фактором риска формирования поведенческих дисфункций и психического расстройства [1–3]. Такое представление поддерживается “кумулятивной” гипотезой стресса, согласно которой стрессорные воздействия в перинатальном возрасте суммируются, что в результате ослабляет способность организма в дальнейшем сопротивляться стрессам. Хронический стресс вызывает развитие депрессии, для лечения которой используются ингибиторы обратного захвата серотонина (5-НТ), среди которых флуоксетин широко применяют в период беременности [4]. Воз-

никшая позднее концепция “прививки от стресса” (инокуляция, иммунизация стрессом) [5] предполагает, что перинатальный стресс при определенных условиях может программировать адаптацию мозговых и поведенческих функций к последующим стрессам. Доказательством этому служат результаты, полученные как в клинике, так и в экспериментах на животных [5]; наряду с этим встречаются работы, не поддерживающие эту концепцию [6]. Актуален вопрос: почему неблагоприятные события во время критических периодов развития у одних людей снижают способность сопротивляться стрессам, тогда как у других представляют собой возможный источник адаптации к стрессам в дальнейшей жизни? Существующие гипотезы дают возможность сделать предположение, что опыт относительно легких неблагоприятных ситуаций в раннем возрасте подготавливает к будущим стрессам и способствует устойчивости к стрессовым ситуациям, но если происходит несоответствие между ранним и последующим опытом, то уязвимость к стрессовым нагрузкам усиливается [7]. Привлечение многих моделей позволило выдвинуть для объяснения явлений уязвимости и устойчивости к стрессам фундаментальную концепцию трех попаданий (three hits), включающих взаимодействие генетического фактора (1), фактора окружающей среды в раннем возрасте (2) и окружающей среды в позднем возрасте (3) [5]. Практическая важность этой проблемы вызывает повышенный интерес к изучению механизмов влияния перинатального стресса [5, 6]. Несмотря на успех, вызванный привлечением современных методов исследования в этой области, остаются без ответа многие вопросы, в частности, когда именно происходит трансформация негативных явлений стресса (изменений в нейрогуморальной регуляции) в раннем возрасте в адаптивный процесс, сочетание каких типов стресса в критические периоды развития повышает устойчивость против стресса в дальнейшей жизни, как изменяются последствия стресса в процессе постнатального развития. Ответам на эти вопросы способствуют поведенческие исследования на животных. В качестве перинатальных стрессоров в лабораторных условиях на грызунах наиболее часто используют материнскую депривацию, социальный и пренатальный стресс [6, 8].

В настоящей работе мы применили в качестве перинатального стресса сочетание пренатального стресса и воспалительной боли у новорожденных крысят. Результаты исследования последствий сочетания данных факторов в критический период развития на разные типы адаптивного поведения в препубертатном возрасте представляет интерес для клиники. Во-первых, стресс во время беременности (пренатальный стресс) вызывает развитие депрессивных состояний, во-вторых, воспалительная боль часто сопутствует недоношенным новорожденным, а также в срок рожденным младенцам, требующим терапевтических или хирургических вмешательств, и, наконец, именно в препубертатный период у детей начинают проявляться симптомы депрессивного поведения [9]. В ранее опубликованных нами работах описано влияние только пренатального стресса [10] и только воспалительной боли в раннем возрасте [11] на пролонгированный двухфазный поведенческий болевой ответ в формалиновом тесте и психоэмоциональное поведение у крыс. Новизна настоящей работы состоит в исследовании влияния сочетания этих двух стрессовых ситуаций в пренатальный и ранний постнатальный период развития на болевую чувствительность, воспалительный болевой ответ, другие типы адаптивного поведения и когнитивные способности. Возраст исследованных крыс относится к препубертатному периоду развития [12], которому были посвящены предыдущие наши работы [10, 11]. Ранее мы сообщили, что повторное введение флуоксетина или агониста серотонинергических рецепторов типа 1A (5-HT<sub>1A</sub>) буспирона беременным самкам крыс, стрессированным во время беременности, нивелирует неблагоприятные последствия пренатального стресса у потомства [13]. Поскольку комбинация стрессоров может изменить активность антидепрессантов,

логично было оценить действие препаратов, направленных на лечение депрессии в период беременности, с целью улучшения поведения, нарушенного пренатальным стрессом, у потомства.

Цель настоящей работы состояла в исследовании у пренатально стрессированных самцов крыс препубертатного возраста влияния воспалительной боли, которой они подвергались в новорожденном состоянии, на болевую чувствительность, пролонгированный воспалительный болевой ответ, тревожно-депрессивное поведение, когнитивные способности, а также влияния на эти типы поведения флуоксетина и бупропиона, препаратов, которые повторно вводились в период беременности их матерям для нивелирования негативных последствий пренатального стресса у потомства.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс 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 и рекомендациями руководства ARRIVE [14]. Протоколы опытов утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. В работе были использованы животные, перенесшие только пренатальный стресс (ПС) и перенесшие комбинированный стресс: ПС и ранний постнатальный (боль в новорожденном возрасте) стресс.

### *Модель пренатального стресса и его фармакологическая коррекция*

Крыс содержали в виварии лаборатории в стандартных условиях, беременность определяли по мазку из влагалища на следующее утро после подсадки. Присутствие сперматозоидов в мазке рассматривали как нулевой день беременности. Моделирование пренатального стресса осуществляли помещением беременных самок, исключая контрольных, в пеналы с 15-го по 21-й день беременности два раза в сутки (в разные утренние (с 9 до 13), и вечерние (с 14 до 19 ч) по 60 мин в условиях сильного освещения [1]. Пенал, сделанный из органического стекла, резко ограничивал движение крысы; стенки пенала можно было раздвигать по мере увеличения размеров самки. Интенсивное развитие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) у плода происходит в последнюю пренатальную неделю, что обуславливает стрессирование самки именно в последнюю неделю беременности [15].

С 9-го дня беременности до родов некоторые самки получали ежедневно внутривенную инъекцию ингибитора обратного захвата серотонина (5-HT) антидепрессанта флуоксетина (10 мг/кг, Sigma), или агониста 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов анксиолитика бупропиона (3.5 мг/кг, Sigma), или физиологического раствора. Контрольные самки оставались без инъекций. Дозы препаратов соответствовали рекомендациям, имеющимся в литературе [16], а также были апробированы нами ранее [17]. Таким образом, в эксперименты было включено потомство: 1) контрольных самок (без иммобилизации и введения препаратов); 2) самок, подвергнутых иммобилизации и введению физиологического раствора; 3) самок, подвергнутых иммобилизации и введению флуоксетина; 4) самок, подвергнутых иммобилизации и введению бупропиона.

### *Модель воспалительной боли*

На следующие сутки после рождения потомства в помете оставляли по возможности 4 самца и 4 самки. Часть новорожденных животных из каждой группы в первый и повторно во второй день жизни подвергали воспалительной боли (подкож-

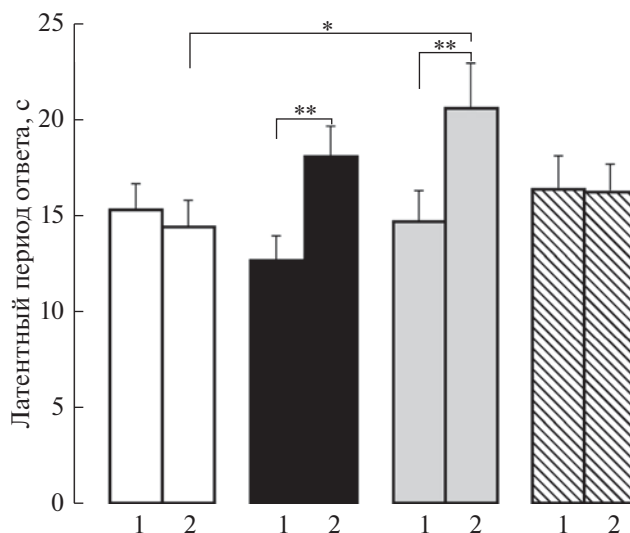
ная инъекция 2.5%-ного раствора формалина, 0.5 мкл в подошву левой задней конечности). Сразу после инъекции новорожденные крысята были возвращены матери. Остальные животные не были подвергнуты воспалительной боли. В каждой из 8 групп было не менее 8–10 самцов.

#### *Поведенческие тесты*

Начиная с 25-дневного возраста, все самцы были исследованы в батарее тестов. В тесте “горячая пластина” для оценки базальной болевой чувствительности каждого самца по одному помещали на горячую пластину (55°C) и регистрировали трижды с перерывом в 10 мин латентный период реакции отряхивания задней конечности (с) в ответ на термический раздражитель, полученные данные усредняли. На следующие сутки в **формалиновом тесте** каждого самца по одному помещали в прозрачную камеру и регистрировали ответную реакцию на подкожную инъекцию формалина (2.5%, 1 мкл) в течение 60 мин: число сгибаний + встряхиваний (спинальный уровень) и продолжительность реакции вылизывания (супраспинальный уровень) (с), которые характеризуют интенсивность болевой реакции в ответ на воспалительный агент [17, 18]. Зарегистрированные показатели в тоническую фазу поведенческого ответа анализировали. Последующие тесты осуществляли с интервалом в трое суток между тестами. В **приподнятом крестообразном лабиринте** регистрировали в течение 5 мин время пребывания в открытых рукавах – показатель, обратное пропорциональный уровню тревожности [19]. В **тесте принудительного плавания** (модификация теста Порсолта) [20], который позволяет оценить влияние антидепрессантов на уровень выраженности депрессивноподобного поведения, крысу помещали в сосуд с водой (диаметр 25 см, высота 60 см, температура воды 25–27°C) и в течение 5 мин регистрировали время нахождения крысы в неподвижном состоянии (время иммобильности – показатель депрессивноподобного поведения). В **водном лабиринте Морриса** (диаметр бассейна 1.2 м и глубина 0.5 м) оценили способность животных к пространственному обучению. Для этого каждого самца по отдельности помещали в бассейн с водой и регистрировали латентный период, в течение которого животное находило платформу, установленную на дне бассейна на 2 см ниже уровня воды. Животному позволяли находиться на платформе в течение 15 с. Проводили четыре попытки (с промежутками в 20 с), которые повторяли два раза (две пробы) с промежутком между пробами 4 мин; все полученные данные усредняли для определения времени нахождения крысой платформы. Поведение животных в каждом тесте регистрировали с помощью видеокамеры. Все используемые нами поведенческие тесты подробно описаны в наших предыдущих статьях [11, 21].

#### *Статистический анализ*

Анализировали влияние факторов: воздействие (контроль, физиологический раствор + ПС, флуоксетин + ПС, бупирон + ПС) и экспериментальные условия (ПС, ПС + новорожденная боль) на зависимые переменные с использованием одномерного двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA. В качестве зависимых переменных выступали: 1) латентный период в тесте горячая пластина; 2) число сгибаний и встряхиваний, а также продолжительность вылизывания в формалиновом тесте; 3) время пребывания в открытых рукавах в тесте приподнятого крестообразного лабиринта; 4) время иммобильности в тесте вынужденного плавания и 5) время нахождения платформы в водном тесте Морриса. Во множественных апостериорных сравнениях использовался тест Бонферрони. Статистические решения принимали на 5% уровне значимости при двусторонней альтернативе.



**Рис. 1.** Влияние пренатальных воздействий (пренатальный стресс и пренатальное введение флуоксетина и буспирона пренатально стрессированным крысам) и боли в новорожденном возрасте на латентный период болевого ответа на термический раздражитель в тесте “горячая пластина” у самцов крыс препубертатного периода развития. 1 – без боли и 2 – с болью в новорожденном возрасте. По вертикали – латентный период ответа (с). Белые столбики – пренатально не стрессированные (контроль), черные столбики – пренатальное введение физиологического раствора пренатально стрессированным крысам, серые столбики – пренатальное введение флуоксетина пренатально стрессированным крысам, заштрихованные столбики – пренатальное введение буспирона пренатально стрессированным крысам. Уровень значимости: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка.

Анализ данных проводился на основе программного комплекса SPSS Inc. Данные представлены средними значениями со стандартными ошибками средних.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**В тесте “горячая пластина”** у самцов крыс препубертатного возраста обнаружено значимое влияние на латентный период экспериментальных условий  $F(1.85) = 5.5$ ,  $p = 0.022$ ,  $\eta^2 = 0.061$ , кроме того, получена тенденция к значимости взаимодействия экспериментальных условий и воздействия  $F(3.85) = 2.6$ ,  $p = 0.058$ ,  $\eta^2 = 0.084$ . Во множественных апостериорных сравнениях тест Бонферрони показал, что латентный период ответа у крыс с комбинацией стрессоров был больше, чем у крыс с ПС (\*\* $p < 0.01$ ). Латентный период у крыс ПС + флуоксетин + новорожденная боль был больше, чем у крыс ПС + флуоксетин (\*\* $p < 0.01$ ) и у крыс с новорожденной болью (\* $p < 0.05$ ) (рис. 1). Таким образом, воспалительная боль у пренатально стрессированных новорожденных препятствовала проноцицептивному влиянию пренатального стресса на болевую чувствительность, антиноцицептивное действие флуоксетина на латентный период ответа в этих условиях усилилось.

**В формалиновом тесте** для сгибания + встряхивания получено значимое влияние экспериментальных условий  $F(1.83) = 5.1$ ,  $p = 0.027$ ,  $\eta^2 = 0.058$  и влияние воздействия  $F(3.83) = 6.9$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.200$ . Тест Бонферрони обнаружил, что флуоксетин (\* $p < 0.05$ ) и буспирон (\*\* $p < 0.01$ ) уменьшили число сгибаний + встряхиваний (спинальный уровень болевого ответа) у ПС крыс. Боль у ПС новорожденных крыс

с флуоксетином уменьшила этот показатель по сравнению с числом сгибаний + + встряхиваний у крыс с комбинацией стрессоров ( $*p < 0.05$ ) (рис. 2А).

Для продолжительности вылизывания (супраспинальный уровень) получено значимое влияние воздействия  $F(3.83) = 2.5$ ,  $p = 0.064$ ,  $\eta^2 = 0.083$  и взаимодействие воздействия и экспериментальных условий  $F(3.83) = 6.6$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.193$ . Тест Бонферрони обнаружил увеличение продолжительности вылизывания у крыс с новорожденной болью ( $*p < 0.05$ ) и у ПС крыс ( $**p < 0.01$ ) по сравнению с этим показателем у контрольных животных (рис. 2Б). ПС + флуоксетин и ПС + буспирон уменьшили продолжительность вылизывания по сравнению с этим показателем у ПС крыс ( $**p < 0.01$  в обоих случаях). Комбинация стрессоров (ПС + боль в период новорожденности) по сравнению с ПС уменьшила продолжительность вылизывания ( $***p < 0.001$ ) и вернула уровень болевой ответа к контрольному уровню (рис. 2Б). В этих условиях флуоксетин и буспирон не проявили действие. Таким образом, ПС, как и боль у новорожденных, увеличили болевой ответ у самцов препубертатного возраста, флуоксетин и буспирон нивелировали влияние ПС. Важно, что комбинация стрессоров предотвратила влияние ПС на болевой ответ и нормализовала его, антиноцицептивное действие препаратов не проявилось.

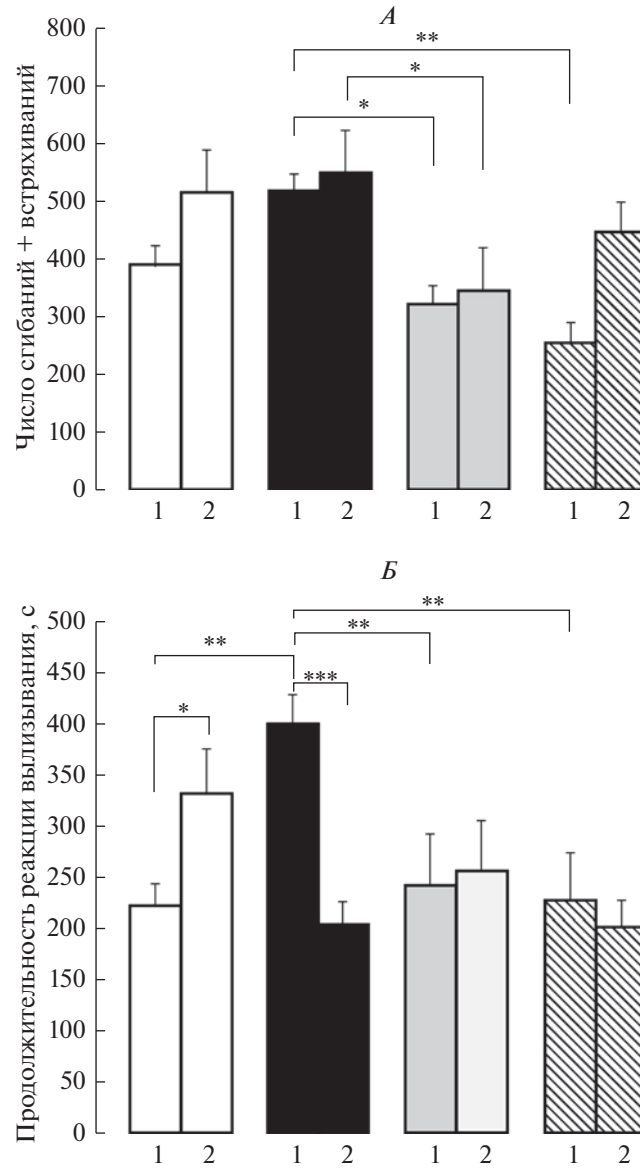
**В тесте приподнятого крестообразного лабиринта статистический анализ не обнаружил** значимого влияния ни экспериментальных условий, ни воздействия на время пребывания в открытых рукавах.

**В тесте принудительного плавания** обнаружен главный эффект экспериментальных условий  $F(1.83) = 12.1$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.127$  и воздействия  $F(3.83) = 24.2$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.467$  на время иммобильности. Тест Бонферрони обнаружил, что воспалительная боль, ПС и комбинация стрессоров достоверно увеличили время иммобильности по сравнению с этим показателем у контроля ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.01$  соответственно), флуоксетин и буспирон снизили этот показатель ( $***p < 0.01$ , в обоих случаях) (рис. 4). Комбинация стрессоров и ПС вызвали одинаковое увеличение времени иммобильности, препараты в условиях комбинированного стресса также проявили антидепрессивный эффект ( $***p < 0.01$ , в обоих случаях). Таким образом, боль в новорожденном возрасте, пренатальный стресс и комбинированный стресс усилили депрессивно-подобное поведение, влияние последних было одинаково и доминировало над влиянием боли в новорожденном возрасте ( $*p < 0.05$ ) на время иммобильности. Антидепрессивное действие препаратов в условиях комбинированного стресса сохранялось.

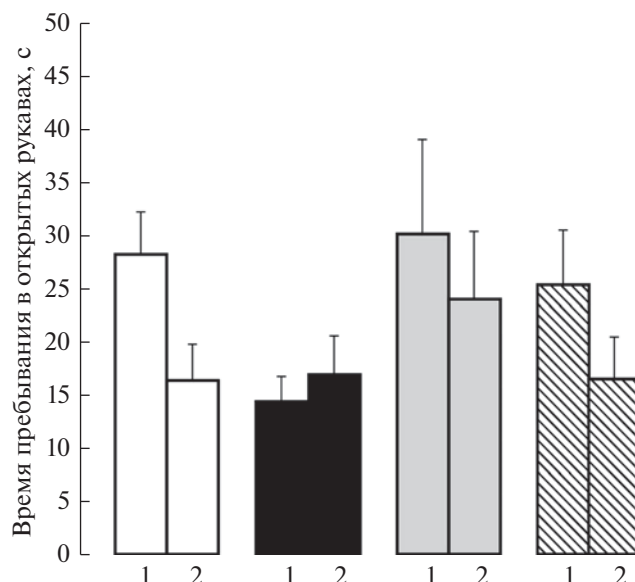
**В водном лабиринте Морриса** обнаружен главный эффект воздействия  $F(3.82) = 6.7$ ,  $p < 0.001$ ,  $\eta^2 = 0.197$  на время нахождения платформы, но не выявлена зависимость когнитивного показателя от новорожденной боли. Тест Бонферрони обнаружил, что ПС увеличил время нахождения платформы по сравнению с контролем ( $*p < 0.05$ ), флуоксетин и буспирон нивелировали действие ПС ( $**p < 0.01$  и  $*p < 0.05$  соответственно) (рис. 5). Комбинация стрессоров достоверно не изменила этот показатель. Таким образом, влияние боли в новорожденном возрасте не отразилось на способности к пространственному обучению. Действие препаратов в условиях комбинация перинатальных стрессоров не проявилось.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для изучения эффекта перинатального стресса у самцов препубертатного периода развития было исследовано влияние каждого стрессора в отдельности (только пренатальный стресс, только боль в новорожденном возрасте) и впервые их сочетания на болевые ответы, тревожно-депрессивное поведение и когнитивные способности. Кроме того, важно было определить, изменит ли у самцов препубертатного периода развития воспалительная боль в новорожденном возрасте пренаталь-



**Рис. 2.** Влияние пренатальных воздействий (пренатальный стресс и пренатальное введение флуоксетина и буспирона пренатально стрессированным крысам) и боли в новорожденном возрасте на поведенческий болевой ответ в формалиновом тесте у самцов крыс подросткового периода развития. 1 – без боли и 2 – с болью в новорожденном возрасте. По вертикали – число стибаний + встряхиваний (А) и продолжительность реакции вылизывания (с) (Б). Белые столбики – пренатально не стрессированные (контроль), черные столбики – пренатальное введение физиологического раствора пренатально стрессированным крысам, серые столбики – пренатальное введение флуоксетина пренатально стрессированным крысам, заштрихованные столбики – пренатальное введение буспирона пренатально стрессированным крысам. Уровень значимости: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка.

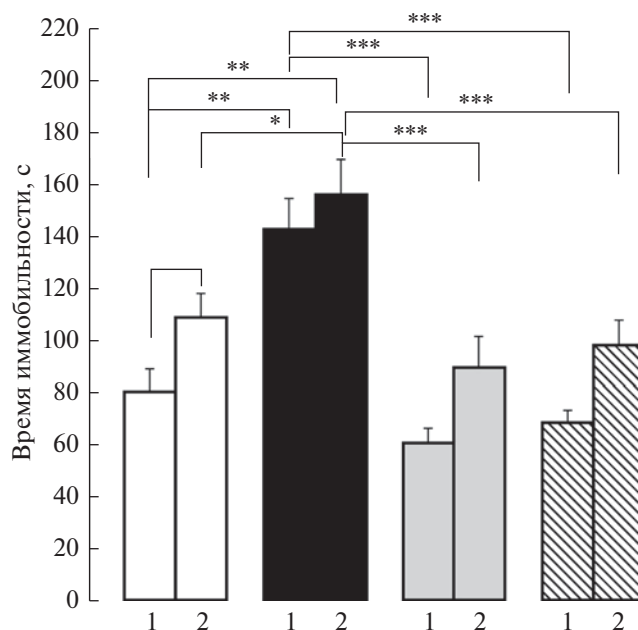


**Рис. 3.** Влияние пренатальных воздействий (пренатальный стресс и пренатальное введение флуоксетина и буспилона пренатально стрессированным крысам) и боли в новорожденном возрасте на время пребывания в открытых рукавах в тесте приподнятого крестообразного лабиринта у самцов крыс adolescentного периода развития. 1 – без боли и 2 – с болью в новорожденном возрасте. По вертикали – время пребывания в открытых рукавах (с). Белые столбики – пренатально не стрессированные (контроль), черные столбики – пренатальное введение физиологического раствора пренатально стрессированным крысам, серые столбики – пренатальное введение флуоксетина пренатально стрессированным крысам, заштрихованные столбики – пренатальное введение буспилона пренатально стрессированным крысам.

ное влияние антидепрессанта флуоксетина и анксиолитика буспилона, хроническому введению которых были подвергнуты их стрессированные во время беременности матери. Принимая во внимание тесные взаимоотношения между ноцицептивной системой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [22], и важную роль 5-НТ1А рецептора в этих взаимоотношениях [23], мы показали влияние используемых перинатальных воздействий на разные типы адаптивного поведения.

Представленные в настоящей работе результаты по влиянию пренатального стресса у самцов указывают на усиление тонического воспалительного болевого ответа, депрессивно-подобного поведения и нивелирование этих изменений, вызванное хронической инъекцией флуоксетина и буспилона их матерям, стрессированным во время беременности, что подтверждает полученные нами ранее данные [13]. Многочисленные клинические и экспериментальные исследования представляют доказательства о негативном влиянии пренатального стресса на развитие мозга [24], на тревожно-депрессивное поведение [1], серотонинергическую систему [25, 26]. Вредные для развивающегося организма влияния пренатального стресса были предотвращены у потомства введением ингибитора обратного захвата 5-НТ флуоксетина самкам мышей в период беременности [27] или самкам крыс в период молочного вскармливания [28]. В настоящее время появляются работы, позволяющие рассматривать пренатальный стресс не только, как фактор риска, но и как

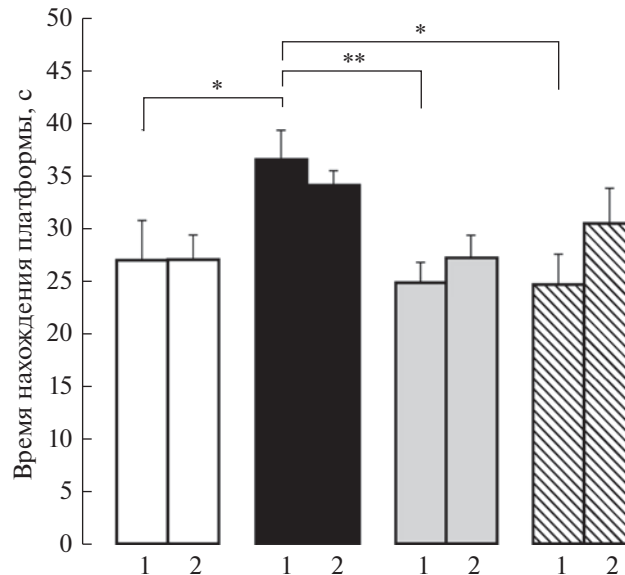




**Рис. 4.** Влияние пренатальных воздействий (пренатальный стресс и пренатальное введение флуоксетина и бупропиона пренатально стрессированным крысам) и боли в новорожденном возрасте на время иммобильности в тесте принудительного плавания у самцов крыс подросткового периода развития. 1 – без боли и 2 – с болью в новорожденном возрасте. По вертикали – время иммобильности (с). Белые столбики – пренатально не стрессированные (контроль), черные столбики – пренатальное введение физиологического раствора пренатально стрессированным крысам, серые столбики – пренатальное введение флуоксетина пренатально стрессированным крысам, заштрихованные столбики – пренатальное введение бупропиона пренатально стрессированным крысам. Уровень значимости: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка.

фактор, повышающий способность организма адаптироваться к стрессу в последующем онтогенезе [8].

При исследовании влияния только боли в новорожденном возрасте на разные типы поведения мы обнаружили усиление воспалительного болевого ответа, интегрированного на супраспинальном уровне, и депрессивно-подобного поведения, что подтверждает полученные нами ранее результаты [11]. Данные литературы свидетельствуют о том, что воспалительная боль у новорожденных может иметь долгосрочное влияние не только на функциональную активность ноцицептивной системы, но и на адаптивное поведение [29, 30]. Сообщается, что боль у новорожденных, вызванная химическим воспалительным агентом каррагеном, модифицирует в дальнейшем не только активность ноцицептивной системы, но и ГГНС [31] и тревожное поведение [30]. Повторная боль у новорожденных, являющаяся одновременно и стрессом, представляет опасность для нормального развития ГГНС, которая влияет на перцепцию боли и связанный с ней хронический болевой синдром [32, 33]. Ноцицептивные системы и ГГНС на ранних этапах развития находятся в состоянии повышенной пластичности и работают согласованно, реагируя на вредные и полезные стимулы [34]. Боль у новорожденных нарушает нормальное протекание гипореспонсивного периода развития ГГНС, главное предназначение которого состоит в поддержании пониженного уровня глюкокортикоидов, что не-



**Рис. 5.** Влияние пренатальных воздействий (пренатальный стресс и пренатальное введение флуоксетина и бупирона пренатально стрессированным крысам) и боли в новорожденном возрасте на время нахождения платформы в тесте Морриса у крыс подросткового периода развития. 1 – без боли и 2 – с болью в новорожденном возрасте. По вертикали – время нахождения платформы (с). Белые столбики – пренатально не стрессированные (контроль), черные столбики – пренатальное введение физиологического раствора пренатально стрессированным крысам, серые столбики – пренатальное введение флуоксетина пренатально стрессированным крысам, заштрихованные столбики – пренатальное введение бупирона пренатально стрессированным крысам. Уровень значимости: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка.

обходимо для протекания нормальных морфофункциональных процессов в ранний критический период формирования головного мозга [1]. Болевые воздействия в этот период также нарушают механизм регуляции обратной связи в ГГНС. Одним из нейрохимических медиаторов, участвующих в ингибирующем контроле ГГНС, является 5-НТ; сообщается, что у крыс активация рецепторов 5-НТ<sub>1A</sub> в дорсомедиальном гипоталамусе является одним из факторов для ингибирования индуцированной стрессом активности ГГНС [23].

В литературе нам не встретились работы, в которых в качестве стрессовых воздействий в критические периоды развития использовалась бы такая комбинация воздействий, как в нашем исследовании. Новые данные, полученные в настоящей работе, при исследовании последствий сочетания пренатального стресса и воспалительной боли в новорожденном возрасте на исследованные типы поведения указывают на то, что комбинация стрессоров ни в одном из тестов не увеличила негативное влияние пренатального стресса на поведение. Более того, комбинация стрессоров препятствовала вредному влиянию пренатального стресса, что проявилось особенно ярко в снижении уровня болевого ответа, организованного на супраспинальном уровне в формалиновом тесте. Результат взаимодействия двух типов стресса в критический период развития можно рассматривать как программирование адаптивного поведения именно к болевому стрессу в дальнейшем онтогенезе, своего рода “прививку от боли”. Важные данные, полученные в фор-

малиновом тесте, указывают на то, что боль в период новорожденности у пренатально стрессированных самцов предотвратила проноцицептивное влияние пренатального стресса на болевой ответ, организованный на супраспинальном уровне, нормализовала его, антиноцицептивное действие флуоксетина и буспилона не проявилось. В тесте принудительного плавания боль в новорожденном возрасте увеличила показатель депрессивно-подобного поведения, пренатальный и комбинированный стресс усилили в одинаковой степени депрессивно-подобное поведение, антидепрессивное действие препаратов сохранялось. В водном лабиринте Морриса боль в новорожденном возрасте не вызвала значимое изменение во времени нахождения платформы. Пренатальный стресс ухудшил когнитивные способности, а флуоксетин и буспирон нивелировали действие пренатального стресса. Комбинация стрессоров не изменила влияние ПС, действие флуоксетина и буспилона в условиях комбинированного стресса не проявилось.

Флуоксетин и буспирон опосредуют антидепрессивный и анксиолитический эффекты через 5-HT<sub>1A</sub> рецептор [35]. Буспирон является частичным агонистом 5-HT<sub>1A</sub> ауторецепторов и полным агонистом гетерорецепторов. Продолжительное использование буспилона вызывает активацию 5-HT<sub>1A</sub> ауторецепторов и приводит к их десенситизации, и, следовательно, к увеличению секреции 5-НТ в гиппокампе и префронтальной коре. Предполагается, что антиноцицептивное влияние буспилона осуществляется через кальциевые каналы L типа [36]. Флуоксетин ингибирует транспортер серотонина, увеличивает концентрацию 5-НТ в интерстициальной жидкости головного мозга, что усиливает влияние этого биогенного амина на постсинаптические рецепторы и способствует ослаблению депрессивного состояния [37]. Молекулярные особенности буспилона как частичного агониста 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов определяют его использование в сочетании с флуоксетином для повышения эффективности последнего при лечении депрессий [38]. Данные исследования, выполненного на молекулярном уровне с использованием еще одного ингибитора обратного захвата 5-НТ-пароксетина, указывают на участие глюкокортикоидных рецепторов в качестве потенциального ключевого механизма в формировании транскрипционных изменений и клинического ответа на лечение антидепрессантами [39]. Активация 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов в дорсомедиальном гипоталамусе вносит вклад в ингибирование индуцированной стрессом активности ГГНС [22]. Существующее мнение об антиноцицептивном влиянии обоих препаратов не однозначно [40]. Полученные нами данные вносят вклад в представление о флуоксетине и буспилоне не только как о препаратах, оказывающих антидепрессантное и анксиолитическое действие соответственно, но также как и о препаратах, способных проявлять и антиноцицептивный эффект.

Таким образом, полученные новые данные демонстрируют, что комбинация стрессоров в перинатальный период развития препятствует проноцицептивному влиянию пренатального стресса, что проявляется в повышении устойчивости к воспалительному болевому стрессу при достижении крысами препубертатного периода развития. В этих условиях действие флуоксетина и буспилона не проявляется. Обращает на себя внимание тот факт, что боль у пренатально стрессированных новорожденных не препятствует негативному влиянию пренатального стресса на депрессивно-подобное поведение и на способность к пространственному обучению, но и не доминирует над эффектом пренатального стресса. Полученные данные по влиянию перинатального стресса на болевую чувствительность и воспалительный болевой ответ поддерживают широко обсуждаемую в настоящее время гипотезу “соответствие/несоответствие” (match/mismatch hypothesis) [7]. Согласно этой гипотезе адаптация к стрессу формируется в том случае, если запрограммированное поведение к определенному типу стресса в критический период развития соответствует (match) стрессовым условиям в дальнейшем онтогенезе, тогда как их

несоответствие (mismatch) наносит вред организму. Более глубокое понимание воздействия стресса в раннем возрасте может помочь в разработке персонализированных методов лечения пролонгированной боли в последующем онтогенезе и стратегий, направленных на предотвращение ее возникновения.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weinstock M.* Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiology of stress*. 6: 3–13. 2017.
2. *McGowan P.O., Matthews S.G.* Prenatal Stress, Glucocorticoids, and Developmental Programming of the Stress Response. *Endocrinology*. 159(1): 69–82. 2018.
3. *Беляева Л.Е., Федченко А.Н., Лигецкая И.В., Ковцова Е.И., Столярова В.Н.* Влияние комбинированного пренатального стресса на физическую выносливость, болевую чувствительность и поведение крыс. *Вест. Витебск. гос. мед. универ.* 14: 26–33. 2015. [*Belyaeva L.E., Fedchenko A.N., Ligetskaya I.V., Kovzova E.I., Stolyarova V.N.* The effect of combined prenatal stress on physical stamina, pain sensitivity and behavior of rats. *Bull. Vitebsk. state med. univer.* 14: 26–33. 2015. (In Russ.)].
4. *Olivier J.D., Blom T., Arentsen T., Homberg J.R.* The age-dependent effects of selective serotonin reuptake inhibitors in humans and rodents: A review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 1;35(6): 1400–8. 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.09.013>
5. *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.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008>
6. *Genty J., Tetsi Nomigni M., Anton F., Hanesch U.* The combination of postnatal separation and social stress in young adulthood does not lead to enhanced inflammatory pain and depression-related behavior in rats. *PLoS One*. 13(8): e0202599. 2018.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202599>
7. *Nederhof E., Schmidt M.V.* Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol. Behav.* 106: 691–700. 2012.
8. *Hartman S., Belsky J.* Prenatal programming of postnatal plasticity revisited-and extended. *Dev. Psychopathol.* 30(3): 825–842. 2018.  
<https://doi.org/10.1017/S0954579418000548>
9. *Paus T., Keshavan M., Giedd J.N.* Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat. Rev. Neurosci.* 9: 947–957. 2008.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2513>
10. *Butkevich I.P., Verzhinina E.A.* Prenatal stress alters time characteristics and intensity of formalin-induced pain responses in juvenile rats. *Brain Res.* 915: 88–93. 2001.
11. *Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Lavrova Yu.A., Ulanova N.A.* Repeated Inflammation-Related Pain Syndrome in Neonatal Male Rats Alters Adaptive Behavior during the Adolescent Period of Development. *Neurosci. Behav. Physiol.* 46(4): 461–466. 2016.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-016-0258-1>
12. *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.
13. *Mikhailenko V.A., Butkevich I.P.* Prenatal Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> Receptors Improves Adaptive Behavior in Prenatally Stressed Rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 166(3): 306–309. 2019.
14. *Kilkenny 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.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
15. *Ward I.L., Weisz J.* Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*. 114: 1635–1644. 1984.
16. *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.

17. *Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Vershinina E.A., Otellin V.A., Aloisi A.M.* Buspirone before prenatal stress protects against adverse effects of stress on emotional and inflammatory pain-related behaviors in infant rats: Age and sex differences. *Brain Res.* 1419(1): 76–84. 2011.
18. *Dubuisson D., Dennis S.G.* The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4(2): 161–174. 1977.
19. *Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 14(3): 149–167. 1985.
20. *Porsolt R.D., LePichon M., Jalfre M.* Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266: 730–732. 1977.
21. *Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Vershinina E.A., Ulanova N.A.* Differences in adaptive behaviors of adolescent male and female rats exposed at birth to inflammatory pain or stress. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 51(4): 305–315. 2015.
22. *Lanfumey L., Mongeau R., Cohen-Salmon C., Hamon M.* Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(6): 1174–1184. 2008.
23. *Stamper C.E., Hassell J.E.Jr., Kapitz A.J., Renner K.J., Orchinik M., Lowry C.A.* Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat dorsomedial hypothalamus inhibits stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress.* 20(2): 223–230. 2017. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1301426>
24. *Van den Bergh B.R.H., Dahnke R., Mennes M.* Prenatal stress and the developing brain: Risks for neurodevelopmental disorders. *Dev. Psychopathol.* 30(3): 743–762. 2018. <https://doi.org/10.1017/S0954579418000342>
25. *Van den Hove D.L., Leibold N.K., Strackx E., Martinez-Claros M., Lesch K.P., Steinbusch H.W., Schruers K.R., Prickaerts J.* Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24(4): 595–607. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.09.006>
26. *Kiryanova V., Smith V.M., Antle M.C., Dyck R.H.* Behavior of Adult 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Knockout Mice Exposed to Stress During Prenatal Development. *Neuroscience.* 10(371): 16–28. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.039>
27. *Avitsur R.* Prenatal fluoxetine modifies the behavioral and hormonal responses to stress in male mice: Role for glucocorticoid insensitivity. *Behav. Pharmacol.* 28(5): 345–355. 2017.
28. *Rayen I., van den Hove D.L., Prickaerts J., Steinbusch H.W., Pawluski J.L.* Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. *PLoS One.* 6(9): e24003. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024003>
29. *Schwaller F., Fitzgerald M.* The consequences of pain in early life: Injury-induced plasticity in developing pain pathways. *Eur. J. Neurosci.* 39: 344–355. 2014.
30. *Victoria N.C., Murphy A.Z.* The long-term impact of early life pain on adult responses to anxiety and stress: Historical perspectives and empirical evidence. *Dev. Neurobiol.* 37: 1–13. 2016.
31. *Rincón-Cortés M., Sullivan R.M.* Early life trauma and attachment: Immediate and enduring effects on neurobehavioral and stress axis development. *Front. Endocrinol.* 5: 33. 2014.
32. *Anand K.J., Coskun V., Thrivikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M.* Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *Physiol. Behav.* 66(4): 627–637. 1999.
33. *Mooney-Leber S.M., Brummelte S.* Neonatal pain and reduced maternal care: Early-life stressors interacting to impact brain and behavioral development. *Neuroscience.* 342: 21–36. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.001>
34. *Andrews M.H., Matthews S.G.* Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: Serotonergic involvement. *Stress.* 7(1): 15–27. 2004.
35. *Albert P.R., Fiori L.M.* Transcriptional dis-regulation in anxiety and major depression: 5-HT<sub>1A</sub> gene promoter architecture as a therapeutic opportunity. *Curr. Pharm.* 20: 3738–3750. 2014.
36. *Liang J.H., Wang X.H., Liu R.K., Sun H.L., Zheng J.W.* Buspirone-induced antinociception is mediated by L-type calcium channels and calcium/caffeine-sensitive pools in mice. *Psychopharmacology. (Berl).* 166(3): 276–283. 2003.
37. *Hervás I., Artigas F.* Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 358: 9–18. 1998.
38. *Gobert A., Rivet J.-M., Cistarelli L., Melon C., Millan M.J.* Buspirone modulates basal and fluoxetine-stimulated dialysate levels – of dopamine, noradrenaline and serotonin in the frontal cortex of freely moving rats: Activation of serotonin receptors and blockade of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors underlie its actions. *Neuroscience.* 93(4): 1251–1262. 1999.
39. *Bjartmar L., Johansson I.M., Marcusson J., Ross S.B., Seckl J.R., Olsson T.* Selective effects on NGFI-A, MR, GR and NGFI-B hippocampal mRNA expression after chronic treatment with different subclasses of antidepressants in the rat. *Psychopharmacology. (Berl).* 151(1): 7–12. 2000.
40. *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.

**Influence of Perinatal Stress and Antidepressants on the Acute and Tonic Pain Responses and Psycho-Emotional Behavior in Young Male Rats****V. A. Mikhailenko<sup>a, \*</sup>, I. P. Butkevich<sup>a, b</sup>, E. A. Vershinina<sup>a</sup>**<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, Russia*<sup>b</sup>*Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russia**\*e-mail: viktormikhailenko@yandex.ru*

In the offspring of rats subjected to immobilization stress during pregnancy (prenatal stress), the effects of peripheral inflammatory pain in the first two days of life on pain sensitivity, pain system reactivity in response to an inflammatory agent, anxiety, depressive-like behavior and cognitive abilities in prepubertal age were investigated. It was found that prenatal stress in males increased pain sensitivity, inflammatory pain response, anxiety-depressive behavior, impaired the ability to spatial learning. Chronic administration of the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine or the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist buspirone to pregnant rat dams leveled the harmful effects of prenatal stress. In this case, pain in prenatally stressed newborns did not lead to behavioral disorders in any of the tests used. Moreover, the combination of perinatal stressors (prenatal stress and painful stress in newborns) prevented the harmful effects of prenatal stress, which was found in a significant decrease in the level of pain response in the hot plate test and the inflammatory pain response in the formalin test compared to the level of responses in the prenatally stressed males not exposed to pain in the newborn; under these conditions, the effect of the drugs was not manifested. It was concluded that stressful effects in the perinatal period of development under certain conditions contribute to an increase in the level of resilience in rats at a prepubertal age. The results are discussed in the context of the modern hypothesis (match / mismatch stress hypothesis), according to which stress at critical periods of development can program the adaptive behavior of the organism to subsequent stresses.

*Keywords:* perinatal stress, fluoxetine, buspirone, pain, depression, prepubertal period of development, male rats

## ЦИТИРОВАТЬ:

Михайленко В.А., Буткевич И.П., Вершинина Е.А. Влияние перинатального стресса и антидепрессантов на острый и тонический болевой ответ и психоэмоциональное поведение у молодых самцов крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 105(7): 888–901.

DOI: 10.1134/S0869813919070057

## TO CITE THIS ARTICLE:

Mikhailenko V.A., Butkevich I.P., Vershinina A.A. Influence of Perinatal Stress and Antidepressants on the Acute and Tonic Pain Responses and Psycho-Emotional Behavior in Young Male Rats. *Russian Journal of Physiology*. 105(7): 888–901.

DOI: 10.1134/S0869813919070057