

ОСТРЫЙ И ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ СТРЕСС РЕГИОН-СПЕЦИФИЧНО ИЗМЕНЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МОЗГЕ КРЫС И ВЛИЯЕТ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА

© 2023 М.И. Зайченко*, П. Филенко, В. Сидорина, Г.А. Григорьян

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: mariya-zajchenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.10.2022

После доработки 11.03.2023

Принята к публикации 11.03.2023

Целью настоящей работы был сравнительный анализ влияния острого и хронического липополисахаридного стресса на поведение крыс в водном лабиринте Морриса и экспрессии mRNA провоспалительных цитокинов и *BDNF* в разных структурах мозга. Актуальность исследования связана с малой изученностью анализа влияния острого и хронического стресса на проявление когнитивных функций мозга с неоднозначными влияниями обоих типов стресса на гипоталамо-гипофизарную ось и экспрессию генов провоспалительных цитокинов, а также противоречивыми на этот счет данными литературы. В работе были использованы метод иммуноферментного анализа для оценки содержания кортикостерона в сыворотке крови и метод ПЦР — для оценки экспрессии генов провоспалительных цитокинов в разных структурах мозга. Острый липополисахаридный стресс (ЛПС-стресс) улучшал обучение в водном лабиринте Морриса. В среднем за период обучения крысы с острым ЛПС-стрессом проплывали меньшее расстояние до платформы, проводили меньше времени в периферической зоне бассейна (тигмотаксис) и плавали с меньшей скоростью по сравнению с контрольными животными, которым вводили физиологический раствор, и группой крыс, подвергавшейся хроническому ЛПС-стрессу. В пробе без платформы существенных различий по времени пребывания в квадранте платформы и проплываемому расстоянию у крыс разных групп не наблюдалось. Острый ЛПС-стресс вызывал увеличение экспрессии mRNA *TNF-α* и *IL-1β* в гиппокампе и миндалине, но не во фронтальной коре по сравнению с контрольными животными. Хронический ЛПС-стресс, хотя и увеличивал экспрессию mRNA *TNF-α* и *IL-1β* в миндалине и гиппокампе по сравнению с контрольными группами, но различия между группами проявлялись только на уровне тенденции, а экспрессия mRNA *BDNF*, по сравнению с контролем, не изменялась ни в одной из отмеченных структур. Экспрессия mRNA *IL-6* имела тренд к возрастанию при остром ЛПС-стрессе в миндалине и тренд к снижению — при хроническом ЛПС-стрессе в гиппокампе по сравнению с контрольными животными. В целом, наиболее яркие молекулярно-биохимические изменения происходили в миндалине и гиппокампе, в которых наблюдалось увеличение экспрессии mRNA интерлейкинов *TNF-α* и *IL-1β* как при остром, так и при хроническом ЛПС-стрессе. Изменения экспрессии mRNA *BDNF* во фронтальной коре отсутствовали.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: обучение, память, водный лабиринт, липополисахарид, острый и хронический стресс, интерлейкины, *BDNF*, ПЦР, миндалина, гиппокамп, фронтальная кора.

DOI: 10.31857/S0320972523040085, EDN: AKUTQU

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы хронический стресс, депрессии и другие психоневрологические расстройства все чаще связывают с воспалитель-

ными процессами и активностью иммунной системы мозга. Для исследования связи нейровоспаления с такими расстройствами широко используется модель провоспалительной липополисахаридной бактериальной интоксикации.

Принятые сокращения: ЛПС — липополисахарид; ЛПС-О — однократное введение ЛПС за 1 ч до начала обучения; ЛПС-Х — введение ЛПС для исследования влияния хронического стресса; ФИЗ — физраствор; ФИЗ-О — однократное введение ФИЗ за 1 ч до начала обучения; ФИЗ-Х — введение ФИЗ для исследования влияния хронического стресса; *BDNF* — нейротрофический фактор мозга; *TNF-α* — фактор некроза опухолей альфа.

* Адресат для корреспонденции.

Влияния липополисахаридов (ЛПС) во многом схожи (хотя есть и различия) с эффектами стрессов, вызываемых разными негативными факторами (многократный электрошок, материнское отлучение, социальная изоляция и т.д.), поэтому их действие рассматривается как провоспалительный стресс. Бактериальные ЛПС являются составным компонентом внешней части мембраны различных грамотрицательных бактерий. Молекулы ЛПС включают доминантную липофильную зону (липид А) и ковалентно связанную гидрофильную область поли- или олигосахарида. Липид А является главным стимулятором врожденной и приобретенной иммунных систем у животных и человека. Первичными клетками мишенями для ЛПС являются фагоциты (периферические моноциты, тканевые макрофаги и нейтрофилы), которые экспрессируют связанный с мембраной антиген CD14 (mCD14) и рецепторы толл 4. ЛПС-связывающий протеин катализирует переход мономерного ЛПС из агрегатных комплексов, а иногда и прямо от грамотрицательных бактерий, к связывающему рецептору CD14 (mCD14) на поверхности фагоцитов, который, в свою очередь, ведет к высвобождению большого числа эндогенных медиаторов, таких как липидные медиаторы, редуцированные формы кислорода и цитокины/хемокины, через комплекс TLR4*MD-2 (см. обзор Alexander и Rietschel [1]). Среди цитокинов и хемокинов выделяют белки с провоспалительным и противовоспалительным действием: фактор некроза опухоли альфа (TNF- α); интерлейкины – IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18; интерфероны альфа и бета; MIF (macrophage migration inhibitory factor); MCP-1, MCP-3 (monocyte chemoattractant protein), MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 (macrophage inflammatory protein) и трансформирующий фактор роста β – (TGF- β) [1].

В большинстве работ исследование влияния провоспалительного ЛПС-стресса на обучение и память проводят с использованием однократного (острого) введения бактериального эндотоксина. При этом ЛПС вводят животным разного возраста [2, 3], самцам или самкам [4–6], в разных дозах [7], с разным интервалом времени от момента введения ЛПС до начала проведения поведенческих опытов [8], изолированно или в комбинации с другими типами стрессов [9], в качестве основного или повторного, провоцирующего (challenge) стресса [10]. В то же время в литературе мало работ, в которых сравнивают между собой влияния острого и хронического ЛПС-стресса на обучение и память, уровень провоспалительных цитоки-

нов/кортикостерона и других маркеров нейровоспаления при обоих видах стресса. В частности, в работе Shaw et al. [11] на крысах было показано, что обучение в водном лабиринте Морриса проходило хуже при остром (однократном), чем при хроническом (5-кратном) введении ЛПС (100 мкг/кг), хотя уровень BDNF в зубчатой фасции гиппокампа в обоих случаях был примерно одинаковым. В другой похожей работе на мышах [12] существенных различий во влияниях однократного и 5-кратного введений ЛПС (250 мкг/кг) на латентный период нахождения скрытой под водой платформы и проплываемой дистанции по сравнению с контрольными животными и относительно друг друга обнаружено не было. Однако различия не проявлялись у молодых (2-месячных) мышей. У старых (годовалых) мышей показатели времени нахождения платформы и проплываемого расстояния под влиянием ЛПС-стресса ухудшались, особенно при хроническом введении ЛПС. Годовалые мыши с хроническим стрессом также больше времени проводили на периферии бассейна (тигмотаксис) и имели меньшую скорость плавания по сравнению с другими группами животных [12]. У крыс при многократном введении ЛПС (300 мкг/кг) (в первые 2 дня обучения с повтором через неделю тоже в первые 2 дня продолжающегося обучения) были обнаружены значительные отклонения угла направления плавания (heading angle) по отношению к цели и времени пребывания в квадранте платформы по сравнению с контрольными животными [13]. В работе на мышах [14] хронический (7-дневный) ЛПС-стресс (250 мкг/кг) не выявил существенных различий в скорости обучения в лабиринте Морриса по сравнению с контролем, хотя в тестовых пробах мыши, получавшие 7-дневный ЛПС-стресс, проводили значительно меньше времени в квадранте платформы, чем контрольные животные. При большой дозе (1 мг/кг) после 7-дневного введения ЛПС мыши обучались значительно хуже, чем контрольные животные; они проводили значительно меньше времени в квадранте платформы и реже пересекали зону платформы в тестовой пробе [15]. Важно помнить, что влияния ЛПС-стресса в водном лабиринте Морриса могут быть связаны не только с эффектами так называемого «болезненного состояния» (sickness behavior), которое обычно продолжается около суток [16], но и с другими факторами. В частности, влияние ЛПС может по-разному проявляться в зависимости от методических и процедурных условий эксперимента – размеров бассейна и платформы,

числа и времени использованных проб, временных промежутков между пробами, доз токсина, возраста животных и т.д. Возможно влияние ЛПС также на другие функции, такие как двигательная активность, мотивация поиска, уровень тревожности и др.

Целью настоящей работы было исследование на крысах влияния острого (1-дневного) и хронического (7-дневного) ЛПС-стресса на особенности обучения и памяти в водном лабиринте Морриса и экспрессию mRNA провоспалительных цитокинов, отражающих уровень воспаления мозга и экспрессию mRNA *BDNF*, как маркера нейропластичных изменений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на 40 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 4–4,5 месяца, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму.

Для исследования влияния острого стресса использовали липополисахарид («Sigma», США; серотип O26:B6), провоспалительный бактериальный токсин, выделенный из наружной оболочки *Escherichia coli*. Его вводили однократно внутрибрюшинно (ЛПС-О) (350 мкг/кг в объеме 1,0 мл/кг) за 1 ч до начала обучения 10 крысам ($n = 10$). Контрольным животным ($n = 10$) вводили физраствор (ФИЗ)

в том же объеме (ФИЗ-О). Для исследования влияния хронического стресса (ЛПС-Х) липополисахарид вводили внутрибрюшинно 10 крысам ($n = 10$) в дозе 200 мкг/кг, в объеме 1,0 мл/кг за 1 ч до начала обучения в течение 6 дней. Контрольным животным ($n = 10$) вводили в течение того же времени ФИЗ (ФИЗ-Х). Для создания острого и хронического провоспалительного стресса нами были выбраны умеренные дозы ЛПС (350 и 200 мкг/кг), но достаточно эффективные, чтобы вызвать поведенческие изменения в водном лабиринте Морриса по сравнению с контрольными животными. В литературе для этой цели применяют дозы в 1 мг/кг для острого [17] и хронического [18] применения; 500 мкг/кг — для острого введения [19] и 250 мкг/кг — для острого [11] и хронического [20] введения.

Схема проведения экспериментов по дням дана на рис. 1.

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 располагали картинки и/или знаки (квадраты, кресты и т.д.), которые служили в качестве внешних стимулов для ориентации животных в пространстве и фиксации положения в бассейне скрытой под водой платформы. Бассейн условно, с помощью двух пересекающихся

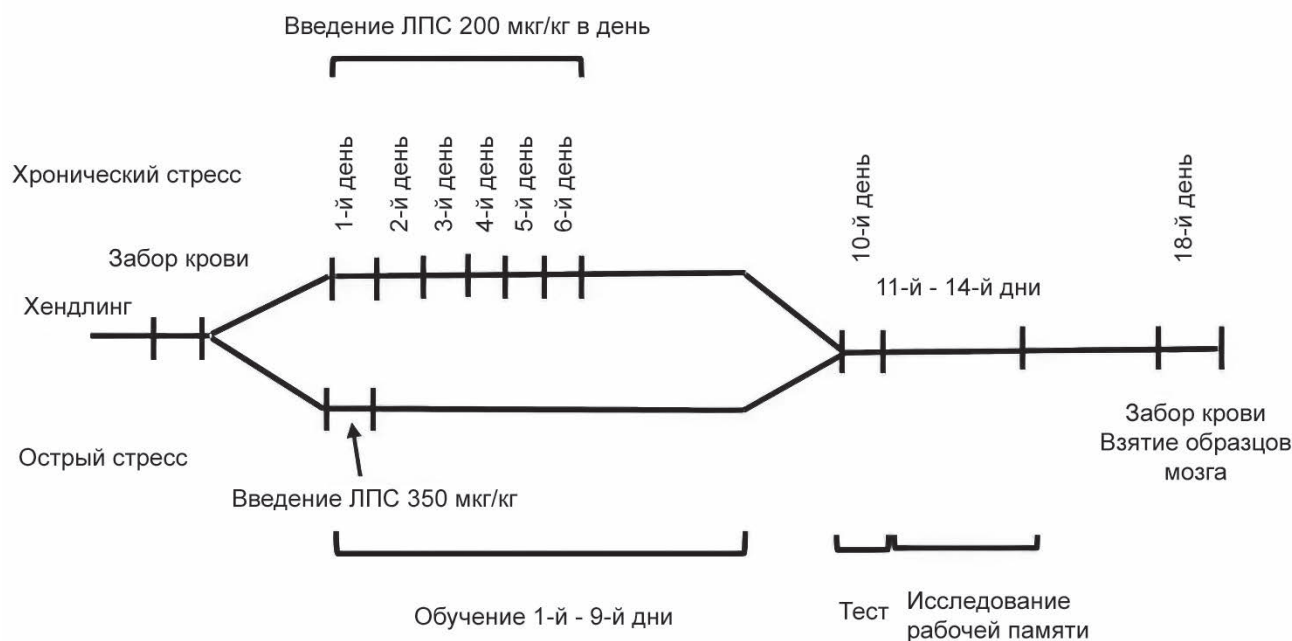


Рис. 1. Схема проведения экспериментов

через центр прямых, разделяли 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 × 10 см) из прозрачного пластика, верхний край которой находился на 1,5–2,0 см ниже уровня воды. Во время опытов в комнате было тусклое освещение; во время опытов поддерживали постоянную температуру воды (22–24 °C).

Процедура тестирования долгосрочной памяти.

Обучение проводили в течение 9 дней по протоколу, изложенному в работе Grigoryan et al. [21]. В день проводили 2 пробы продолжительностью 60 с с интервалом примерно 10 мин [21]. 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. Перемещение крыс в бассейне регистрировали с помощью видеотрекинговой системы EthoVision («Noldus Ltd»). Оценивали время с момента погружения крыс в бассейн до момента нахождения платформы и залезания на нее (латентный период), проплываемое расстояние до платформы (дистанция), время пребывания в каждом квадранте, скорость плавания, время, проводимое на периферии бассейна.

На 10-й день проводили специальную пробу, во время которой платформу убирали из бассейна. Крыс погружали в бассейн на 60 с и измеряли время их пребывания в каждом квадранте и в зоне платформы.

Процедура тестирования рабочей (краткосрочной) памяти. Опыты проводили в течение 4 дней на тех же крысах по протоколу, изложенному в работе Grigoryan et al [21]. Ежедневно проводили 4 пробы продолжительностью 60 с каждая. Интервал между пробами составлял 30 с. Крыс в первой 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. 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 круче у них градиент обучения и, следовательно, лучше рабочая память.

Иммуноферментный анализ крови. Забор крови из хвостовой вены производили за 2 дня до начала экспериментов в бассейне Морриса, декапитационную кровь брали при забое животных на 4-й день после окончания экспериментов в бассейне Морриса, после пробы на сахарозу и теста вынужденного плавания. Ряд экспериментальных работ свидетельствует, что дополнительное стрессорное воздействие, такое как вынужденное плавание, проведенное за 30–60 мин до момента забора крови, способно усиливать различие по биохимическим показателям крови между группами, ранее подвергнутыми стрессу [22, 23]. Тесты на сахарозу и вынужденное плавание выполнялись в рамках магистерской работы П. Филенко (кафедра биоорганической химии, биофак МГУ). Результаты описаны в его дипломной работе, в данной статье не приводятся из-за ограниченности объема статьи. Для получения сыворотки кровь центрифугировали 15 мин при 1500 g. Аликвоты сыворотки крови хранили при –80 °C до проведения иммуноферментного анализа. Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли с помощью наборов EIA-4164, Corticosterone ELISA («DRG», Германия) для проведения конкурентного иммуноферментного анализа. Это позволяло детектировать как свободный кортикостерон, так и связанный с транспортными белками. Концентрацию провоспалительного цитокина IL-1β определяли с помощью наборов Rat IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA («R&D Systems», США). Процедуру измерения проводили в соответствии с инструкцией производителя. Оптическую плотность раствора измеряли на микропланшетном ридере Hidex 425-301 («Hidex», Финляндия).

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Выделение образцов ткани гиппокампа, миндалины и фронтальной коры проводили после декапитации. Мозг вынимали, промывали в ледяном изотоническом растворе NaCl, на определенных уровнях мозга в соответствии с атласом мозга крысы [24] делали срезы мозга и, исходя из координат этого атласа, специальным инструментом (анатомической ложечкой) производили забор биоматериала из правого и левого полушарий мозга. Выделяли цельные гиппокампы, фронтальную кору и миндалину. Далее выделенные структуры замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °C. Образцы гомогенизировали в реагенте для выделения суммарной РНК, ExtractRNA («Евроген», Россия) и выделяли тотальную РНК. Концентрацию и чистоту образцов РНК проверяли на

Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательность праймеров 5'→3'	
<i>Il-1β</i>	F: TCTGTGACTCGTGGGATGAT	R: CACTTGTGGCTTATGTTCTGTGTC
<i>Il-6</i>	F: GCCACTGCCTTCCCTACTTCAC	R: GACAGTGCATCATCGCTGTTTCATAC
<i>Tnf-α</i>	F: GTCCAACTCCGGGCTCAGAAT	R: ACTCCCCCGATCCACTCAG
<i>Bdnf</i>	F: CCATAAGGACGCGGACTTGTAC	R: AGACATGTTTGCGGCATCCAGG
<i>Hprt</i>	F: CGTCGTGATTAGTGATGATGAAC	R: CAAGTCTTTCAGTCCTGTCCATA
<i>Ywhaz</i>	F: TTGAGCAGAAGACGGAAGGT	R: GAAGCATTTGGGGATCAAGAA

приборе NanoPhotometer N60 («Implen», Германия). После этого образцы РНК очищали методом ДНКазной обработки с помощью набора DNaseI («Thermo Fisher Scientific», США), на реакцию очистки брали 2 мкг РНК, процедуру проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Часть продукта после ДНКазной обработки брали для обратной транскрипции, оставшуюся часть использовали в качестве отрицательного контроля «без обратной транскрипции» в полимеразной цепной реакции. Первую часть РНК смешивали с random (dN10)-праймером и олиго(dT)-праймером («Евроген»), смесь инкубировали при 70 °С в течение 2 мин, затем смешивали с подготовленной смесью реактивов из набора MMLV RT kit («Евроген») с добавлением ингибитора РНКаз RNase Inhibitor («New England Biolabs», США); реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Полученный в результате обратной транскрипции продукт разводили 8-кратно с использованием деионизованной воды, вторую часть очищенной РНК также разбавляли. В качестве реагента для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор «Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+LowROX» («Евроген»). Реакцию проводили в амплификаторе для количественной ПЦР CFX384 Touch («Bio-Rad», США). Все реакции проводили в двух повторах в соответствии с протоколом: 5 мин при 95 °С, 1 цикл; 30 с при 95 °С, 30 с при требуемой для пары праймеров температуре и элонгация — 15 с при 72 °С, 40 циклов.

Последовательности использованных в работе праймеров. Праймеры подбирали на основе последовательностей из базы данных NCBI в программном пакете Lasergene PrimerSelect. Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в таблице.

В качестве нормировочных генов использовали *Hprt* и *Ywhaz*, выбранные по резуль-

татам анализа транскриптома гиппокампа крысы [25]. Относительную представленность транскриптов оценивали по методу $E^{\Delta\Delta Ct}$ [26].

Эффективность реакции измеряли для каждого рабочего разведения праймеров методом серийных разведений. Во всех экспериментах эффективность реакции находилась в диапазоне 1,9–2,08. Для каждого гена было рассчитано значение $Eff^(-\Delta\Delta Ct)$, которое отражает изменения в экспрессии гена по сравнению с контрольным. Результат просчитывали относительно среднего геометрического значения для нормировочных генов. Каждую пробу дублировали, кроме того, для каждой пробы и каждого гена ставили контроль «без обратной транскрипции». Для каждой лунки контролировали температуру плавления продукта ПЦР.

Статистический анализ. Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение значений исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова (BasicStatistics, раздел DescriptiveStatistics). Если распределение значений анализируемого параметра соответствовало нормальному, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, разделы одностороннего, факторного и повторных измерений. При post-hoc-анализе применяли критерий Ньюмана–Кеулса. Анализировали влияние факторов «ГРУППА» (4 градации: ЛПС-О, ФИЗ-О, ЛПС-Х и ФИЗ-Х), «ДНИ» (для долговременной памяти) или «ПРОБА» (для рабочей памяти) и взаимодействие этих факторов. Если распределение значений не соответствовало нормальному распределению, то в этом случае для сопоставления групп использовали тест Краскела–Уоллиса ANOVA с последующим сравнением групп с помощью множественных сравнений (непараметрическая статистика).

Для сопоставления двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Для оценки случайности пребывания в целевом квадранте использовали Observed vs Expected тест Хи-квадрат (непараметрическая статистика). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; отмечали наличие тенденции при $0,05 < p < 0,1$. Данные на рисунках представляли в виде средних значений $\pm$ ошибки средних (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние острого и хронического ЛПС-стресса на обучение и долгосрочную память. В процессе обучения у всех групп крыс происходило уменьшение латентного периода достижения платформы и проплываемой дистанции (рис. 2, а). Для этих показателей значение фактора «ДНИ» было статистически значимым [$F_{8,324} = 25,306$; $p < 0,0001$ — для латентного периода и $F_{8,324} = 18,788$; $p < 0,0001$ — для проплываемой дистанции]. Взаимодействия факторов «ГРУППА $\times$ ДНИ» по латентному периоду и дистанции между группами, испытывавшими ЛПС-стресс, и контрольными животными выявлено не было [$F_{8,324} = 1,7318$; $p = 0,09$]. Влияние фактора «ГРУППА» для проплываемой дистанции было статистически значимым [$F_{3,648} = 3,418$; $p < 0,05$] (рис. 2, б). Post-hoc-анализ выявил различия между ЛПС-О и ФИЗ-О ($p < 0,05$) и между ЛПС-О и ЛПС-Х ($p < 0,01$). Скорость плавания была значительно меньше у крыс, испытывавших острый и хронический ЛПС-стресс по сравнению с контрольными ФИЗ-группами, фактор «ГРУППА» [$F_{3,648} = 3,762$; $p = 0,0106$].

Крысы группы ЛПС-О проводили также существенно меньше времени [$F_{3,651} = 3,1356$; $p < 0,05$] и проплывали значительно меньшее расстояние [$F_{3,651} = 5,8286$; $p < 0,001$] в периферической зоне бассейна (тигмотаксис), чем крысы групп ФИЗ-О и ЛПС-Х ($p < 0,05$).

Тестовая проба без платформы. В тестовой пробе на 10-й день эксперимента с отсутствующей платформой статистически значимых различий между разными группами крыс обнаружено не было ни по времени проведения, ни по дистанции, проплываемой в квадранте платформы. Отношение времени пребывания в квадранте платформы к общему времени плавания составляло у крыс ЛПС-О $37,85 \pm 2,34\%$; ФИЗ-О — $32,92 \pm 2,88\%$; ЛПС-Х — $40,79 \pm 2,64\%$ и ФИЗ-Х — $34,31 \pm 3,38\%$, что статистически значимо демонстрирует не случайность пребывания в целевом квадранте ($p < 0,01$; критерий согласия Пирсона). Эти данные свидетельствуют о том, что после 9 дней обучения все группы крыс примерно одинаково обучались находить скрытую под водой платформу.

Влияние острого и хронического ЛПС-стресса на рабочую память. Влияние фактора «ПРОБА» было статистически значимым [$F_{3,1279} = 121,3$; $p < 0,0000$] при анализе времени достижения платформы и при анализе проплываемой до платформы дистанции [$F_{3,1279} = 73,362$; $p < 0,0000$]. Анализ влияния фактора «ГРУППА» при исследовании рабочей памяти выявил статистически значимые различия между исследуемыми группами по показателю времени достижения платформы [$F_{3,624} = 5,41$; $p < 0,001$]. Post-hoc-анализ показал, что эти различия происходили за счет

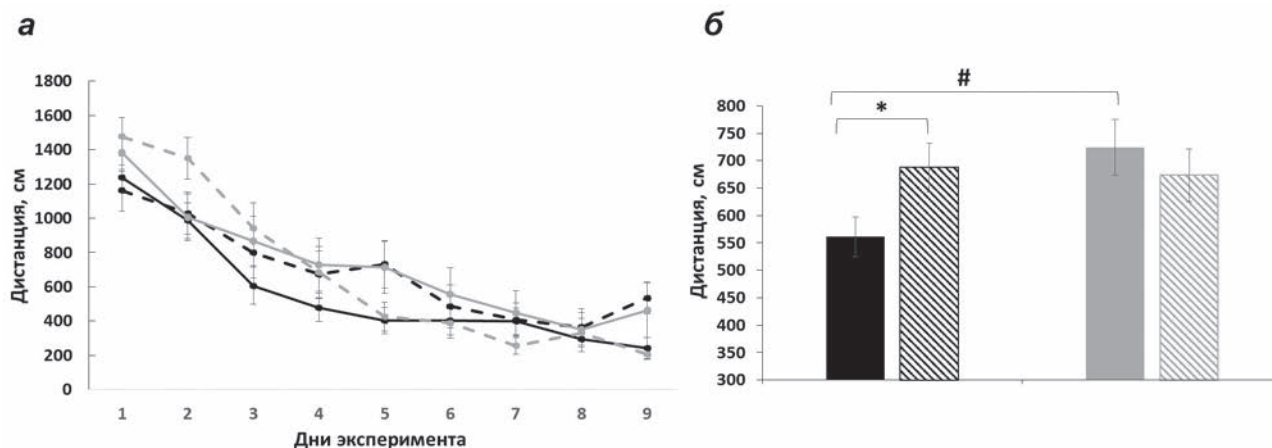


Рис. 2. Усредненная по двум пробам за каждый опытный день динамика изменений проплываемой до платформы дистанции в процессе обучения (а) и усредненная по всем пробам проплываемая дистанция до достижения платформы (б). Столбики и сплошные линии черного цвета — ЛПС-О, черные заштрихованные столбики и прерывистые линии — ФИЗ-О, серые — ЛПС-Х, серые заштрихованные столбики и прерывистые линии — ФИЗ-Х. Различия статистически значимы ($p < 0,05$) между ЛПС-О и ФИЗ-О — *; между ЛПС-О и ЛПС-Х — #

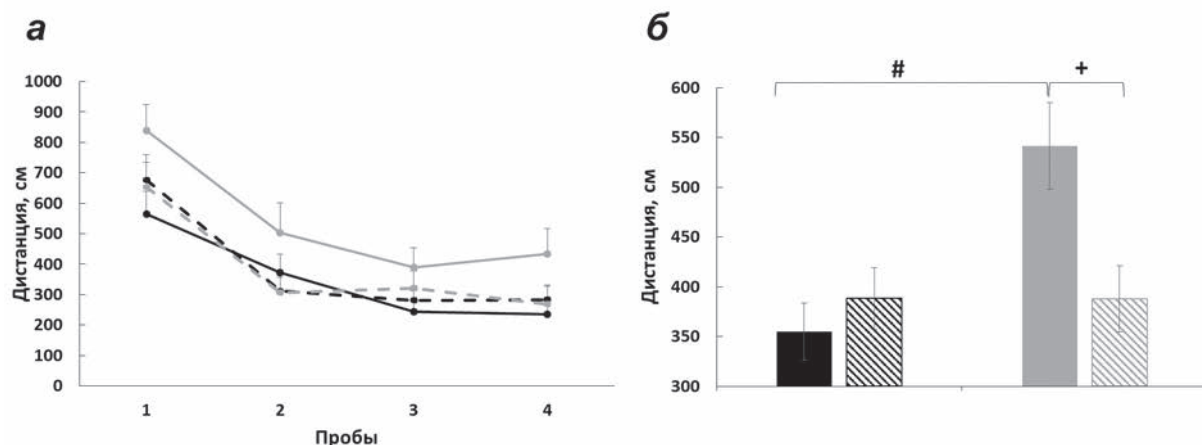


Рис. 3. Усредненная по 4-м дням за каждую (1–4) пробу дистанция, проплываемая до нахождения платформы (а), и усредненная по всем пробам проплываемая дистанция до достижения платформы (б). + $p < 0,05$ – различия статистически значимы между ЛПС-Х и ФИЗ-Х. Остальные обозначения, как на рис. 2

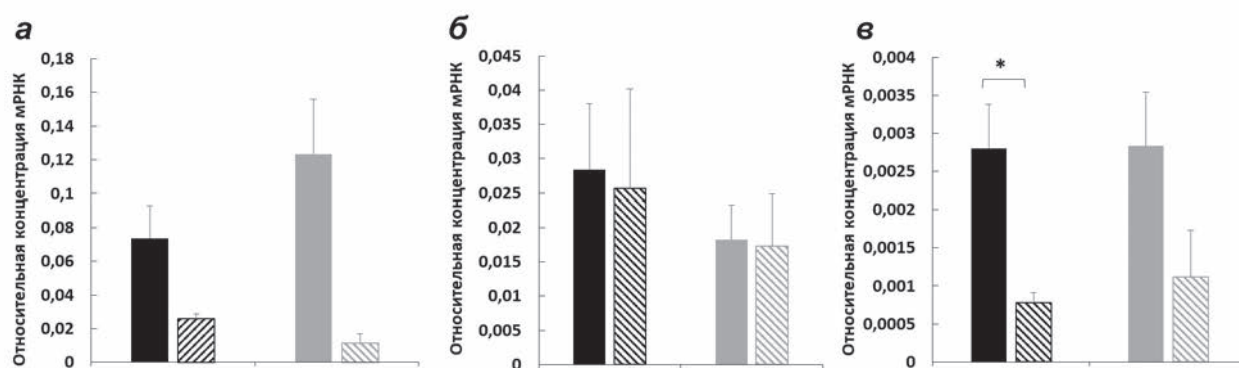


Рис. 4. Относительное количество mRNA *TNF-α* при остром и хроническом стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). * Различия статистически значимы, $p < 0,05$. Остальные обозначения, как на рис. 2

крыс группы ЛПС-Х, которые существенно отставали по времени нахождения платформы от других групп ($p < 0,01$; рис. 3, а и б). Различий между группами ЛПС-О, ФИЗ-О и ФИЗ-Х обнаружено не было. На рис. 3, а видно, что отставание крыс группы ЛПС-Х прослеживалось на протяжении всех четырех проб, хотя при этом взаимодействия факторов «ГРУППА × ПРОБА» выявлено не было [$F_{9,624} = 0,66$; $p > 0,05$].

Сходные различия между группами наблюдались по показателю проплываемой дистанции. Влияния фактора «ГРУППА» было статистически значимым [$F_{3,624} = 5,85$, $p < 0,001$], Post-hoc-анализ выявил различия между группой ЛПС-Х и остальными группами ($p < 0,005$). Взаимодействие факторов «ГРУППА × ПРОБА» выявлено не было [$F_{9,624} = 0,383$; $p > 0,05$]. Несмотря на то что отставание по времени достижения платформы и проплываемой дистанции у крыс группы ЛПС-Х отчетливо наблюдалось в первой и последующих пробах, выявленные различия не отражают разницу в проявлениях

рабочей памяти, поскольку анализ не выявил взаимодействия факторов «ГРУППА × ПРОБА».

Влияние острого и хронического стресса на биохимические показатели крови. Сопоставление уровней кортикостерона. Анализ уровня кортикостерона не выявил различий между крысами групп ЛПС-О и ФИЗ-О (2194,6 нмоль/литр $\pm$ 201,4 и 2331,2 нмоль/литр $\pm$ 97,3) и между группами ЛПС-Х и ФИЗ-Х (1613,2 нмоль/литр $\pm$ 97,3 и 1574,8 нмоль/литр $\pm$ 270,5). Однако у крыс с острым ЛПС-стрессом показатели уровня кортикостерона в крови были статистически значимо выше, чем у крыс с хроническим ЛПС-стрессом ($p < 0,5$).

Сравнение уровней интерлейкина-1β. Анализ уровня интерлейкина IL-1β выявил его повышенное содержание у крыс с ЛПС-О (60,2 пг/мл $\pm$ 15,1 против 36,6 пг/мл $\pm$ 12,7 – у ФИЗ-группы) и ЛПС-Х (59,4 пг/мл $\pm$ 21,9 против 33,9 пг/мл $\pm$ 6,1 – у ФИЗ-группы). Однако из-за большого разброса данных статистической значимости различия не достигли.

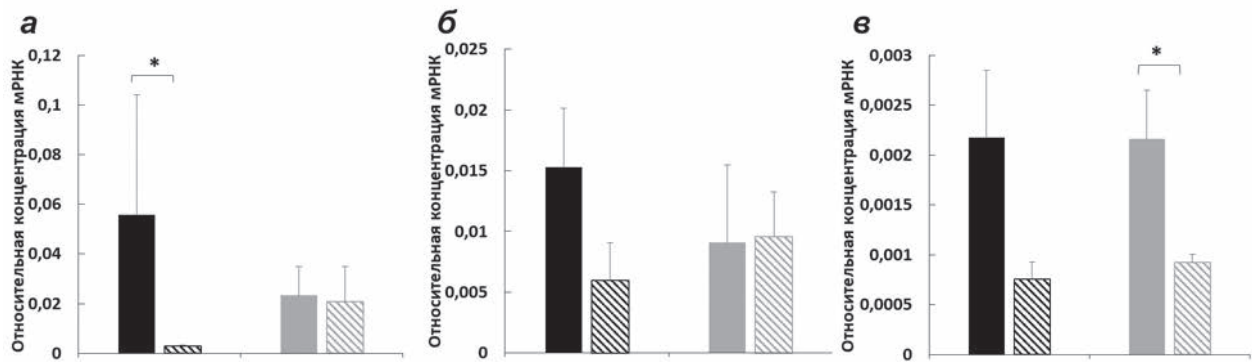


Рис. 5. Относительное содержание mRNA *IL-1β* при остром и хроническом стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). Остальные обозначения, как на рис. 2

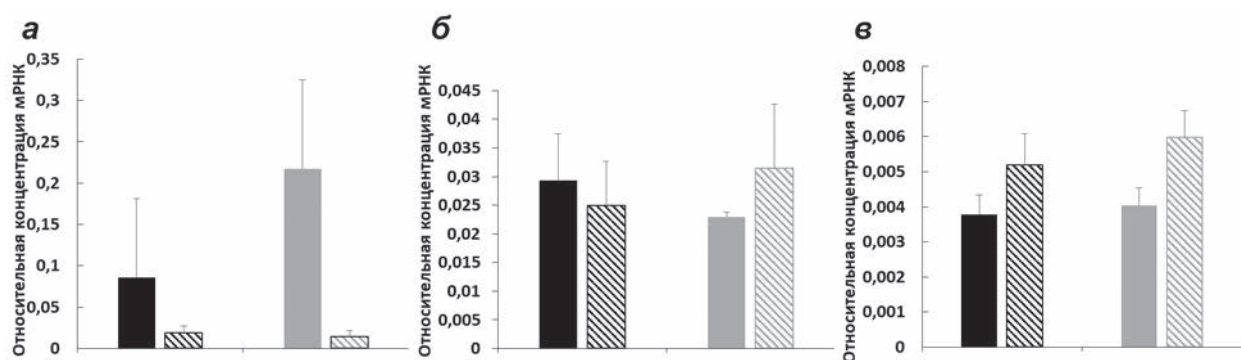


Рис. 6. Относительное содержание mRNA *IL-6* при остром и хроническом ЛПС-стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). Остальные обозначения, как на рис. 2

Влияние острого и хронического ЛПС-стресса на экспрессию генов, связанных с нейровоспалением и нейропластичностью. Признаки нейровоспаления оценивали при помощи регистрации уровня экспрессии mRNA *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, а для изучения пластических изменений исследовали уровень экспрессии mRNA *BDNF*, который является маркером пластичности.

Уровень экспрессии *TNF-α*. В группах острого и хронического ЛПС-стресса уровень экспрессии mRNA гена провоспалительного цитокина *TNF-α* в миндалине был выше, чем в контроле; тест Краскела–Уоллиса: [$H(3, n = 14) = 9,8; p = 0,0203$]. В группах ЛПС-Х и ЛПС-О этот показатель был больше, чем в группах ФИЗ-Х и ФИЗ-О (рис. 4, а). Уровень экспрессии этого цитокина в группе ЛПС-Х был 1,67 раза больше, чем в группе ЛПС-О. Различий во влиянии острого и хронического провоспалительного ЛПС-стресса на экспрессию mRNA *TNF-α* во фронтальной коре обнаружено не было (рис. 4, б). В гиппокампе уровни экспрессии mRNA *TNF-α* между ЛПС-О и ФИЗ-О существенно различались между собой; тест Краскела–Уоллиса:

[$H(3, n = 18) = 7,839766; p = 0,0494$], а между ЛПС-Х и ФИЗ-Х – проявлялись с различиями на уровне тенденции (рис. 4, в). Между группами крыс ЛПС-О и ЛПС-Х различий в уровне экспрессии *TNF-α* выявлено не было.

Уровень экспрессии mRNA *IL-1β* в миндалине у группы ЛПС-О значимо превышал уровень экспрессии группы ФИЗ-О; тест Краскела–Уоллиса: [$H(3, n = 15) = 8,835833; p = 0,0316$]. В группах ЛПС-Х и ФИЗ-Х различий выявлено не было (рис. 5, а). Хотя уровень экспрессии mRNA *IL-1β* в группе острого стресса был больше, чем в группе хронического стресса, статистически значимых различий между ними не наблюдалось.

Во фронтальной коре ЛПС-О приводил к некоторому повышению уровня экспрессии *IL-1β* относительно контрольной группы, но его было недостаточно для проявления статистически значимых различий. Между группами ЛПС-Х и ФИЗ-Х различий в уровне экспрессии mRNA *IL-1β* также не было обнаружено (рис. 5, б). Уровень экспрессии mRNA *IL-1β* в гиппокампе у крыс ЛПС-О увеличивался в 2,87 раза, а у крыс группы ЛПС-Х – в 2,34 раза по сравнению с контрольными данными;

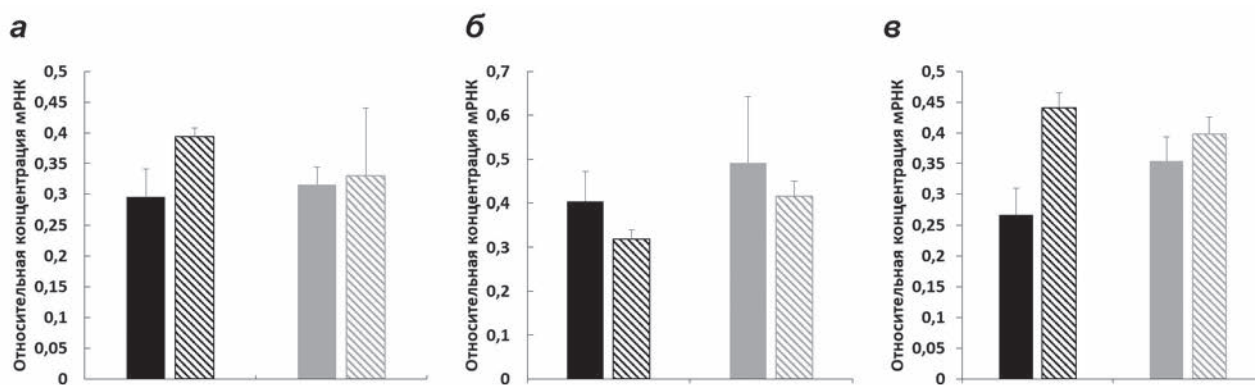


Рис. 7. Относительное количество mRNA *BDNF* при остром и хроническом ЛПС-стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). Остальные обозначения, как на рис. 2

тест Краскела–Уоллиса: [$H(3, n = 18) = 10,33801$; $p = 0,0159$]. Между группами ЛПС-О и ЛПС-Х различия не проявились (рис. 5, в).

Уровень экспрессии mRNA *IL-6*. Существенного повышения уровня экспрессии mRNA *IL-6* в исследованных структурах мозга обнаружено не было, за исключением тренда к увеличению в миндалине у группы ЛПС-Х по сравнению с ФИЗ-Х ($p = 0,0819$) и тренда к уменьшению в гиппокампе у ЛПС-Х по сравнению с группой ФИЗ-Х ($p = 0,0974$) (рис. 6).

Экспрессия mRNA *BDNF*. Провоспалительный ЛПС-стресс не оказывал существенного влияния на экспрессию mRNA *BDNF* в миндалине и фронтальной коре. Небольшое статистически незначимое снижение экспрессии mRNA *BDNF* происходило в гиппокампе в группе ЛПС-О по сравнению с группой ФИЗ-О ($p = 0,1879$) (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, крысы, испытывавшие острый ЛПС-стресс в наших опытах, быстрее, чем крысы с хроническим ЛПС-стрессом, находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее меньшее расстояние по сравнению с контрольной и ЛПС-Х группами. Они проводили также меньше времени и проплывали меньшее расстояние в периферической зоне бассейна (тигмотаксис), чем контрольные и ЛПС-Х группы крыс, причем скорость плавания у них, как и у крыс с ЛПС-Х-стрессом, была меньше, чем у контрольных животных. В тестовой пробе без платформы время пребывания крыс в квадранте платформы и проплываемое расстояние в этом квадранте у разных групп не отличались существенно друг от друга. Нам известна только одна работа на крысах, в которой, как и в нашей работе, срав-

нивались влияния острого и хронического (5-кратного) стресса, вызванного введением ЛПС [11]. В ней обучение проводили в течение 8 дней с перерывом в 3 дня после 5-го дня. Ежедневно проводили по 5 проб с интервалом в 5 с. В опытах участвовали 3 группы крыс: 1) получавшие ЛПС (100 мкг/кг) только один раз в первый день обучения, 2) получавшие ЛПС в течение 5 дней, 3) контрольная группа, получавшая физраствор. В противоположность нашим данным, группа с однократным введением ЛПС (острый стресс) показала наихудший навык по углу направления движения к платформе (heading angle), латентному периоду и проплываемому расстоянию до платформы. У нее была также выше скорость плавания. Группа с хроническим ЛПС-стрессом не отличалась от контрольных животных. Во время тестовой пробы без платформы наблюдались различия по проплываемому расстоянию между группами с острым и хроническим стрессом, но разницы между каждой из этих групп и контролем не наблюдалось. Детальный анализ данных и рисунков рассматриваемой работы показал, что группа с острым ЛПС-стрессом отличалась от контрольной группы ФИЗ по углу направления к платформе только на 5-й и 6-й дни обучения, а по латентному периоду — только на 4-й и 8-й дни. Различий в обучении между контрольной группой (ФИЗ) и группой с хроническим ЛПС-стрессом не наблюдалось ни в один из дней обучения. Наименьшее расстояние до платформы проплывали крысы с хроническим введением ЛПС. Скорость была наименьшей также у крыс, испытывавших хронический стресс. У крыс с острым стрессом в целом она была больше, чем у других групп, но в разные дни различия могли не проявляться. В пробе без платформы различий между группой ФИЗ и группой с острым ЛПС-стрессом по проплываемой дистанции не наблюдалось,

но значимой была разница между группами с острым и хроническим стрессом: первые проплывали большее расстояние. Нетрудно видеть, что наши данные и результаты, полученные в работе Shaw et al. [11], существенно различаются между собой, чему может быть ряд причин, и прежде всего, существенные различия в процедуре опытов. В частности, мы использовали ежедневно только две пробы с интервалом 10 мин, а в работе Shaw et al. [11] в день проводили по 5 проб с интервалом всего в 5 с, причем в значительно большем по размеру бассейне ($D = 2$ метра). Последние два обстоятельства могли вызывать утомление животных и усложнять поиск ими скрытой под водой платформы. На наш взгляд, это создавало у крыс дополнительный стресс, который отражался на скорости обучения. Известно, что ЛПС и стимулируемые им цитокины могут оказывать как тормозные, так и облегчающие эффекты на процессы памяти, которые зависят от применяемой дозы. Первые вызываются при больших (патологических) дозах, тогда как вторые — при малых (физиологических) дозах [27]. В наших опытах острый провоспалительный ЛПС-стресс мог вызывать облегчение поиска скрытой под водой платформы по причине невысокой концентрации введенного токсина. Возможно, что этой дозы было недостаточно (даже при хроническом применении) для вызова интенсивного нейровоспалительного процесса, проявляемого в форме поведенческого «болезненного состояния», существенного роста уровня цитокинов и влияния их на систему стресса (ГГНС). На самом деле, уровень исследованных нами цитокинов в некоторых структурах (в частности, в гиппокампе) существенно не отличался при остром и хроническом ЛПС-стрессе, хотя различия с контролем были существенными, что свидетельствует о развитии нейровоспалительного процесса. Имеются данные, согласно которым обучение облегчалось даже при хроническом стрессе, вызванном непрерывным введением ЛПС в четвертый желудочек со скоростью 0,25 мкл/ч на протяжении 74 дней, что приводило к значительному уменьшению латентного периода нахождения платформы [28]. При введении 20 мкг ЛПС в поле СА1 гиппокампа в течение 5 дней происходили такие же изменения [29]. Следует отметить, что нередко наблюдаются расхождения между биохимическими и поведенческими данными. Например, в работе на мышах при высоких уровнях провоспалительного цитокина IL-1 β в гиппокампе в ответ на внутрибрюшинное введение большой дозы ЛПС (1,25 мг/кг) время, проведенное в квад-

ранте платформы, и число пересечений зоны платформы у крыс, получавших ЛПС, и контрольных животных не отличалось [30].

Известно, что слабый стресс оказывает положительное влияние не только на обучение, но и на общую приспособляемость организма и его устойчивость к последующим стрессам. В частности, на модели стресса социальной изоляции нами было показано, что крысы-изолянты лучше обучаются находить 4 рукава с пищей в 8-канальном радиальном лабиринте, чем контрольные животные [31].

Работ, касающихся сравнения влияния острого и хронического ЛПС-стресса на проявления рабочей памяти, в литературе нам найти не удалось. В наших опытах, хотя латентный период и пройденная дистанция во всех пробах были наибольшими у группы крыс с хроническим ЛПС-стрессом, сказать о том, что у них была слабее выражена рабочая память, нельзя, поскольку анализ ANOVA не выявил взаимодействия эффектов «ГРУППА $\times$ ПРОБА». Cunningham и Sanderson [32] считают, что для оценки обучения в водном лабиринте Морриса более адекватным поведенческим показателем является пройденная дистанция, а влияние сильного стресса больше связано не с когнитивными, а с эмоциональными, двигательными или мотивационными компонентами поведения. То есть, во-первых, стресс мог приводить к снижению двигательной активности, и в результате этого — к снижению скорости плавания. Во-вторых, стресс мог усиливать эмоционально-негативное состояние и тревожность, что меняло у крыс аллоцентрическую стратегию поведения на эгоцентрическую. Последнее обстоятельство приводит к значительному усилению тигмотаксиса (плавания у стенок бассейна) и избеганию центральных областей бассейна.

Согласно полученным нами биохимическим данным, можно говорить о наличии процесса нейровоспаления в группах острого и хронического стресса, причем наиболее очевидно этот процесс протекает в миндалине. Хотя в некоторых структурах и наблюдаются отличия в уровнях экспрессии mRNA провоспалительных цитокинов, существенных различий между группами острого и хронического стресса по остроте протекания нейровоспаления в наших опытах получить не удалось. Согласно данным по экспрессии mRNA *BDNF*, группы, подвергшиеся стрессу, должны хуже поддаваться обучению, причем, учитывая наблюдаемые изменения в гиппокампе, худшие результаты должна была бы демонстрировать группа острого стресса. Zhu et al. [33] исследовали

с помощью иммуноферментного метода экспрессию цитокинов (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α*) и *BDNF* в гиппокампе крыс, которых подвергали 3- и 7-дневному ЛПС-стрессу в процессе обучения в водном лабиринте Морриса. По сравнению с контрольными крысами, которым вводили ФИЗ, обе группы с ЛПС-стрессом хуже обучались находить скрытую под водой платформу (по латентному периоду нахождения и времени, проведенному в квадранте платформы) и содержали больше цитокинов *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* в гиппокампе при неизменном уровне *BDNF*. Такие же данные по *BDNF* были получены в работе Shaw et al. [11] с помощью метода ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Данные опытов в работе Zhu et al. [33] с некоторыми оговорками совпадают с нашими биохимическими результатами в части по содержанию *IL-1 β* , *TNF- α* и *BDNF* в гиппокампе у крыс, подвергнутых хроническому ЛПС-стрессу, а данные опытов в работе Shaw et al. [11] совпадают по *BDNF*. Причем одной из оговорок является то, что мы использовали для оценки метод ПЦР, который позволяет определить уровень транскрипционной активности (уровень mRNA) генов, кодирующих белки провоспалительных цитокинов и *BDNF*, а в работах Shaw et al. [11] и Zhu et al. [33] применяли иммуноферментный анализ, который оценивает уровень экспрессии самих этих медиаторов. Кроме того, в нашей работе экспрессия mRNA *IL-1 β* и *TNF- α* была больше в гиппокампе не только при хроническом, но и при остром ЛПС-стрессе. А экспрессия mRNA *IL-6* была больше в миндалине при остром, а в гиппокампе — при хроническом стрессе по сравнению с контрольными показателями, как и в работе Zhu et al. [33]. Sparkman et al. [34] специально исследовали роль цитокина *IL-6* в проявлениях памяти в опытах на мышах. Процедура обучения нахождения скрытой под водой платформы в водном бассейне Морриса в их опытах была следующей: две группы мышей (одна — контрольная *IL-6*^(+/+), а другая — с нокаутом гена *IL-6*^(-/-)) получали 3 пробы в день в течение 7 дней. Положение платформы каждый день меняли. Интересно то, что если после выработки навыка нахождения скрытой под водой платформы мышам группы *IL-6*^(+/+) вводили внутрибрюшинно ЛПС, то память у них существенно ухудшалась. Если ЛПС вводили группе мышей с нокаутом *IL-6*^(-/-), то память у них не изменялась. При этом содержание в сыворотке *IL-1 β* и *TNF- α* у мышей обеих групп после введения ЛПС в равной степени увеличивалось, но повышенные уровни *IL-1 β* и *TNF- α* при отсутствии интерлейкина *IL-6* были недо-

статочными, чтобы ослабить память у нокаутных мышей. Другими словами, при отсутствии интерлейкина *IL-6* другие провоспалительные цитокины оказались малоэффективными, чтобы ослабить память. Надо отметить, что данные по влиянию ЛПС-стресса на уровень *BDNF* в литературе противоречивые (см. обзор Lima Giacobbo et al. [35]). Так, Elkabes et al. [36] не обнаружили методом ПЦР изменений в уровне экспрессии mRNA *BDNF* между контрольной группой и группой, получавшей ЛПС, тогда как в работе Miwa et al. [37] с помощью того же метода ЛПС-стресс вызывал увеличение экспрессии mRNA *BDNF*. Дополнительно они исследовали экспрессию *BDNF* в культуре микроглии из мозга эмбрионов крыс, подверженных влиянию ЛПС. По их мнению, ЛПС активирует микроглию, которая участвует в нейрональной регенерации за счет продукции нейротрофинов и увеличения концентрации *BDNF*, что оказывает нейропротекторное влияние в мозге эмбриона. Отрицательные результаты по *BDNF* в работе Sparkman et al. [34] авторы связывают с малой дозой ЛПС, а также, возможно, с удалением взятием пробы (на 10-й день опытов), при котором влияние ЛПС уже могло полностью исчезнуть. Такое объяснение применимо и к нашим результатам. Нейровоспалительные процессы под влиянием ЛПС, ухудшение обучения и пространственной памяти в лабиринте Морриса с усилением активности микроглии наблюдали также в опытах на мышах [38]. Уровни интерлейкинов *IL-4* и *IL-10* в сыворотке крови и в гомогенатах мозга под влиянием ЛПС уменьшались, уровни *TNF- α* , *IL-1 β* , простагландина E2 и оксида азота — возрастали [38]. Введение мышам ЛПС ухудшало обучение в лабиринте Морриса и значительно повышало уровни цитокинов *TNF- α* и *IL-6*, тогда как уровни *BDNF* значительно снижались [39, 40]. О том, что ухудшение обучения в водном лабиринте Морриса происходит под влиянием развития нейровоспаления и действием цитокинов, в частности *IL-1 β* , было показано в опытах на мышах в работе Arai et al. [8]. Авторы обнаружили, что введение ЛПС приводит к ухудшению обучения в водном лабиринте Морриса в связи с усилением продукции цитокина *IL-1 β* , а применение антагониста цитокина выравнивает обучение у этой группы по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острый ЛПС-стресс улучшал обучение крыс в водном лабиринте Морриса по сравне-

нию с контрольными животными и группой с хроническим ЛПС-стрессом. Крысы с острым стрессом быстрее находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее меньшее расстояние. Они также меньше времени проводили в периферической зоне бассейна (тигмотаксис) и плавали с меньшей скоростью, чем другие группы животных. В пробе без платформы время пребывания в квадранте платформы и проплываемое расстояние у крыс разных групп существенно не различалось. Острый ЛПС-стресс вызывал увеличение экспрессии mRNA *TNF-α* и *IL-1β* в гиппокампе и миндалине, но не во фронтальной коре по сравнению с контрольными животными. Хронический ЛПС-стресс, хотя и увеличивал экспрессию *TNF-α* и *IL-1β* в миндалине и гиппокампе по сравнению с контрольными группами, но различия между группами проявились только на уровне тренда, а экспрессия mRNA *BDNF*, по сравнению с контролем, не изменялась ни в одной из отмеченных структур. Выявлены тренды к возрастанию mRNA *IL-6* при остром ЛПС-стрессе в миндалине и к снижению — при хроническом ЛПС-стрессе в гиппокампе по сравнению с контрольными животными. В целом, наиболее яркие молеку-

лярно-биохимические изменения происходили в миндалине и гиппокампе, в которых наблюдалось увеличение экспрессии mRNA *TNF-α* и *IL-1β* как при остром, так и при хроническом ЛПС-стрессе и отсутствие изменений в экспрессии mRNA *BDNF* во фронтальной коре.

Вклад авторов. Зайченко М.И. — руководство экспериментальной работой, участие в опытах и обсуждении результатов; Филенко П. — участие в экспериментальной работе и выполнение биохимической части работы; Сидорина В. — участие в поведенческих опытах; Григорьян Г.А. — анализ литературы и полученных данных, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00129 А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В экспериментах соблюдались принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (2010/63/EU) и положениях ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alexander, C., and Rietschel, E. T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, *J. Endotoxin Res.*, **7**, 167–202, doi: 10.1177/09680519010070030101.
- Груздева В. А., Шаркова А. В., Зайченко М. И., Григорьян Г. А. (2021) Влияние раннего провоспалительного стресса на проявление импульсивного поведения у крыс разного возраста и пола, *Журн. высш. нервн. деят.*, **71**, 114–125, doi: 10.31857/S0044467721010056.
- Kupferschmid, B. J., and Therrien, B. A. (2018) Spatial learning responses to lipopolysaccharide in adult and aged rats, *Biol. Res. Nurs.*, **20**, 32–39, doi: 10.1177/1099800417726875.
- Зайченко М. И., Шаркова А. В., Павлова И. В., Григорьян Г. А. (2022) Половые различия во влияниях раннего провоспалительного стресса на обучение и память взрослых крыс в водном лабиринте Морриса, *Журн. высш. нервн. деят.*, **72**, 233–249, doi: 10.31857/S0044467722020125.
- Stepanichev, M. Y., Goryakina, T., Manolova, A., Lazareva, N., Kvichanskii, A., Tretyakova, L., Volobueva, M., and Gulyaeva, N. (2021) Neonatal proinflammatory challenge evokes a microglial response and affects the ratio between subtypes of GABAergic interneurons in the hippocampus of juvenile rats: sex-dependent and sex-independent effects, *Brain Struct. Funct.*, **226**, 563–574, doi: 10.1007/s00429-020-02199-z.
- Григорьян Г. А. (2020) Половые различия в поведении и биохимических маркерах у животных в ответ на нейровоспалительный стресс, *Усп. физиол. наук*, **51**, 18–32, doi: 10.31857/S0301179820010051.
- Alzahrani, N. A., Bahaidrah, K. A., Mansouri, R. A., Alsufiani, H. M., and Alghamdi, B. S. (2022) Investigation of the optimal dose for experimental lipopolysaccharide-induced recognition memory impairment: behavioral and histological studies, *J. Integr. Neurosci.*, **21**, 49, doi: 10.31083/j.jin2102049.
- Arai, K., Matsuki, N., Ikegaya, Y., and Nishiyama, N. (2001) Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice, *Jpn. J. Pharmacol.*, **87**, 195–201, doi: 10.1254/jjp.87.195.
- Couch, Y., Trofimov, A., Markova, N., Nikolenko, V., Steinbusch, H. W., Chekhonin, V., et al. (2016) Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice, *J. Neuroinflammation*, **13**, 108, doi: 10.1186/s12974-016-0572-0.
- Dang, R., Guo, Y. Y., Zhang, K., Jiang, P., and Zhao, M. G. (2019) Predictable chronic mild stress promotes

- recovery from LPS-induced depression, *Mol. Brain*, **12**, 42, doi: 10.1186/s13041-019-0463-2.
11. Shaw, K. N., Commins, S., and O'Mara, S. M. (2001) Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the water maze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus, *Behav. Brain Res.*, **124**, 47-54, doi: 10.1016/s0166-4328(01)00232-7.
 12. Sparkman, N. L., Martin, L. A., Calvert, W. S., and Boehm, G. W. (2005) Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice, *Behav. Brain Res.*, **159**, 145-151, doi: 10.1016/j.bbr.2004.10.011.
 13. Kupferschmid, B. J., Rowsey, P. J., and Riviera, M. (2020) Characterization of spatial learning and sickness responses in aging rats following recurrent lipopolysaccharide administration, *Biol. Res. Nurs.*, **22**, 92-102, doi: 10.1177/1099800419875824.
 14. Kahn, M. S., Kranjac, D., Alonzo, C. A., Haase, J. H., Cedillos, R. O., McLinden, K. A., Boehm, G. W., and Chumley, M. J. (2012) Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse, *Behav. Brain Res.*, **229**, 176-184, doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.010.
 15. Xin, Y. R., Jiang, J. X., Hu, Y., Pan, J. P., Mi, X. N., Gao, Q., Xiao, F., Zhang, W., and Luo, H. M. (2019) The Immune system drives synapse loss during lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in mice, *Front. Aging Neurosci.*, **11**, 279, doi: 10.3389/fnagi.2019.00279.
 16. Barter, J., Kumar, A., Rani, A., Colon-Perez, L. M., Febo, M., and Foster, T. C. (2020) Differential effect of repeated lipopolysaccharide treatment and aging on hippocampal function and biomarkers of hippocampal senescence, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 4045-4059, doi: 10.1007/s12035-020-02008-y.
 17. Arab, Z., Hosseini, M., Marefati, N., Beheshti, F., Anaeigoudari, A., Sadeghnia, H. R., and Boskabady, M. H. (2022) Neuroprotective and memory enhancing effects of *Zataria multiflora* in lipopolysaccharide-treated rats, *Vet. Res. Forum*, **13**, 101-110, doi: 10.30466/vrf.2020.117553.2786.
 18. Keymoradzadeh, A., Hedayati, Ch. M., Abedinzade, M., Gazor, R., Rostampour, M., and Taleghani, B. K. (2020) Enriched environment effect on lipopolysaccharide-induced spatial learning, memory impairment and hippocampal inflammatory cytokine levels in male rats, *Behav. Brain Res.*, **394**, 112814, doi: 10.1016/j.bbr.2020.112814.
 19. Jin, Y., Peng, J., Wang, X., Zhang, D., and Wang, T. (2017) Ameliorative effect of ginsenoside rg1 on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment: role of cholinergic system, *Neurochem. Res.*, **42**, 1299-1307, doi: 10.1007/s11064-016-2171-y.
 20. Sohrforouzani, A. M., Shakerian, S., Ghanbarzadeh, M., and Alaei, H. (2020) Treadmill exercise improves LPS-induced memory impairments via endocannabinoid receptors and cyclooxygenase enzymes, *Brain Res.*, **380**, 112440, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112440.
 21. Grigoryan, G. A., Mitchell, S. N., Hodges, H., Sinden, J. D., and Gray, J. A. (1994) 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.*, **49**, 511-521, doi: 10.1016/0091-3057(94)90063-9.
 22. Shanks, N., Larocque, S., and Meaney, M. J. (1995) Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress, *J. Neurosci.*, **15**, 376-384, doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00376.1995.
 23. Shanks, N., Windle, R. J., Perks, P. A., Harbuz, M. S., Jessop, D. S., Ingram, C. D., and Lightman, S. L. (2000) Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5645-5650, doi: 10.1073/pnas.090571897.
 24. Paxinos, G., and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 6th Edn, San Diego.
 25. Dobryakova, Y. V., Kasianov, A., Zaichenko, M. I., Stepanichev, M. Y., Chesnokova, E. A., Kolosov, P. M., Markevich, V. A., and Bolshakov, A. P. (2018) Intracerebroventricular administration of 192IgG-saporin alters expression of microglia-associated genes in the dorsal but not ventral hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 429, doi: 10.3389/fnmol.2017.00429.
 26. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
 27. Mizobuchi, H., Yamamoto, K., Tsutsui, S., Yamashita, M., Nakata, Y., Inagawa, H., Kohchi, C., and Soma, G. I. (2020) A unique hybrid characteristic having both pro- and anti-inflammatory phenotype transformed by repetitive low-dose lipopolysaccharide in C8-B4 microglia, *Sci. Rep.*, **10**, 8945, doi: 10.1038/s41598-020-65998-8.
 28. Hauss-Wegrzyniak, B., Vraniak, P. D., and Wenk, G. L. (2000) LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time, *Neuroreport*, **11**, 1759-1763, doi: 10.1097/00001756-200006050-00032.
 29. Tanaka, S., Ide, M., Shibutani, T., Ohtaki, H., Numazawa, S., Shioda, S., and Yoshida, T. (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats, *J. Neurosci. Res.*, **83**, 557-566, doi: 10.1002/jnr.20752.
 30. Huang, Z. B., Wang, H., Rao, X. R., Liang, T., Xu, J., Cai, X. S., and Sheng, G. Q. (2010) Effects of immune activation on the retrieval of spatial memory, *Neurosci. Bull.*, **26**, 355-364, doi: 10.1007/s12264-010-0622-z.
 31. Grigoryan, G. A., Weiss, I., and Feldon, I. (2010) Social isolation improves working memory at reversal

- but not primaty radial-arm learning in rats, *Zhurn. Vysch. Nervn. Deyat.*, **60**, 560-567.
32. Cunningham, C., and Sanderson, D. J. (2008) Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL-1 β on learning and memory, *Brain Behav. Immun.*, **22**, 1117-1127, doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.007.
 33. Zhu, B., Wang, Z. G., Ding, J., Liu, N., Wang, D. M., Ding, L. C., and Yang, C. (2014) Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus, *Exp. Ther. Med.*, **7**, 750-754, doi: 10.3892/etm.2014.1479.
 34. Sparkman, N. L., Buchanan, J. B., Heyen, J. R., Chen, J., Beverly, J. L., and Johnson, R. W. J. (2006) Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers, *Neuroscience*, **26**, 10709-10716, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3376-06.2006.
 35. Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R. A. J. O., Bromberg, E., and de Vries, E. F. J. (2019) Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation, *Mol. Neurobiol.*, **56**, 3295-3312, doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
 36. Elkabes, S., Peng, L., and Black, I. B. (1998) Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptors and neurotrophin expression, *J. Neurosci. Res.*, **54**, 117-122, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19981001)54:1<117::AID-JNR12>3.0.CO;2-4.
 37. Miwa, T., Furukawa, S., Nakajima, K., Furukawa, Y., and Kohsaka, S. (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia, *J. Neurosci. Res.*, **50**, 1023-1029, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19971215)50:6<1023::AID-JNR13>3.0.CO;2-5.
 38. Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., Lu, D., Wei, W., Wang, Y., Li, H., Fu, Y., and Zhu, L. (2019) Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice, *Sci. Rep.*, **9**, 5790, doi: 10.1038/s41598-019-42286-8.
 39. Kamdi, S. P., Raval, A., and Nakhate, K. T. (2021) Phloridzin attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment via antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory activities, *Cytokine*, **139**, 155408, doi: 10.1016/j.cyto.2020.155408.
 40. Chowdhury, A. A., Gawali, N. B., Munshi, R., and Juvekar, A. R. (2018) Trigonelline insulates against oxidative stress, proinflammatory cytokines and restores BDNF levels in lipopolysaccharide induced cognitive impairment in adult mice, *Metab. Brain Dis.*, **33**, 681-691, doi: 10.1007/s11011-017-0147-5.

ACUTE AND CHRONIC LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED STRESS CHANGES EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN THE RAT BRAIN REGION-SPECIFICALLY AND AFFECTS LEARNING AND MEMORY

M. I. Zaichenko*, P. Philenko, V. Sidorina, and G. A. Grigoryan

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; e-mail: mariya-zajchenko@yandex.ru*

The purpose of the current work was a comparative analysis of the effects of acute and chronic lipopolysaccharide stress on behavior of rats in the Morris water maze and expression of mRNA proinflammatory cytokines and *BDNF* in different brain structures. The relevance of this study is related with a weak knowledge of the effects of acute and chronic stress on manifestation of cognitive brain functions, ambiguity of influences of both stresses on the hypothalamic-pituitary axis and expression of the proinflammatory cytokines genes, as well as contradictory data in the literature. In experiments on rats, the acute lipopolysaccharide (LPS) stress improved learning in the Morris water maze. For the period of learning, the rats swam on average less distance to reach a hidden platform and spent less time in the outer zone of the pool (tigmotaxis) and had a low speed compared to the control animals and a group of rats with chronic LPS stress. In a probe trial without a platform in the pool there were no significant differences between groups on time spent in the platform quadrant and distance swum. The acute stress produced a substantial increase of *TNF- α* and *IL-1 β* concentration in the hippocampus and amygdala, but not in the frontal cortex relative to the control animals. Although the chronic stress increased the levels of *TNF- α* and *IL-1 β* in the amygdala and hippocampus compared to the control groups, the significance between the groups was only marginal and the concentration of *BDNF* did not differ from the control animals in none of the structures mentioned. The concentration of *IL-6* marginally increased in acute LPS stress in the amygdala and marginally decreased chronic LPS stress in the hippocampus relative to the saline control groups. In total, the most clear molecular-biochemical changes occurred in the amygdala and hippocampus, where the increase of interleukines *TNF- α* and *IL-1 β* were seen in the acute and chronic LPS stress and no changes in *BDNF* concentration in the frontal cortex.

Keywords: learning, memory, water maze, lipopolysaccharide, acute and chronic stress, interleukines, BDNF, PCR, amygdala, hippocampus, frontal cortex