



УДК 612.884+612.65+615.214

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-69-79>

## Неонатальная воспалительная боль, когнитивная и стресс-реактивная функции у взрослых самцов и самок крыс

В. А. Михайленко<sup>✉1</sup>, И. П. Буткевич<sup>1</sup>, Е. А. Вершинина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

### Сведения об авторах

Виктор Анатольевич Михайленко, SPIN-код: [9111-0369](https://orcid.org/9111-0369), Scopus AuthorID: [57215986246](https://orcid.org/57215986246), ORCID: [0000-0003-4221-7702](https://orcid.org/0000-0003-4221-7702), e-mail: [viktormikhailenko@yandex.ru](mailto:viktormikhailenko@yandex.ru)

Ирина Павловна Буткевич, SPIN-код: [9248-2288](https://orcid.org/9248-2288), Scopus AuthorID: [7004037979](https://orcid.org/7004037979), ORCID: [0000-0002-1201-9185](https://orcid.org/0000-0002-1201-9185), e-mail: [irinabutkevich@yandex.ru](mailto:irinabutkevich@yandex.ru)

Елена Андреевна Вершинина, SPIN-код: [1082-8759](https://orcid.org/1082-8759), Scopus AuthorID: [6701609543](https://orcid.org/6701609543), ORCID: [0000-0002-8873-4409](https://orcid.org/0000-0002-8873-4409), e-mail: [ver\\_elen@mail.ru](mailto:ver_elen@mail.ru)

**Для цитирования:** Михайленко, В. А., Буткевич, И. П., Вершинина, Е. А. (2022) Неонатальная воспалительная боль, когнитивная и стресс-реактивная функции у взрослых самцов и самок крыс. *Интегративная физиология*, т. 3, № 1, с. 69–79. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-69-79>

**Получена** 24 января 2022; прошла рецензирование 1 марта 2022; принята 2 марта 2022.

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

**Права:** © В. А. Михайленко, И. П. Буткевич, Е. А. Вершинина (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Повторные болевые воздействия в неонатальном возрасте являются риском развития нарушений в центральной нервной системе. Клинические данные о влиянии неонатального болевого стресса на обучение, память и стресс-реактивность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГТАКС) ограничены подростковым периодом и получены преимущественно на особях мужского пола; механизм такого влияния остается неисследованным. Большое значение для прогнозирования, профилактики и лечения поведенческих адаптивных расстройств, вызванных неонатальным болевым стрессом, имеют онтогенетические исследования, проведенные на разнополых особях. Данная проблема становится особенно актуальной в настоящее время, когда коронавирус охватил и новорожденных, которым необходима интенсивная терапия. Последствия влияния воспалительной боли в новорожденном периоде на когнитивную и стресс-гормональную функции были исследованы у взрослых самцов и самок крыс. У крысят в первый и повторно второй дни жизни вызывали продолжительную болевую реакцию инъекцией воспалительного агента формалина в заднюю конечность. У взрослых крыс исследовали пространственное обучение, память в водном лабиринте Морриса, а также реактивность ГТАКС в ответ на формалиновый тест. Значимых различий в когнитивной функции между подопытными, подвергнутыми неонатальной воспалительной боли, и контрольными крысами не было обнаружено. В то же время пространственная долговременная память у животных с неонатальной болью характеризовалась более высокой производительностью у самцов, чем у самок. После тестирования долговременной памяти реактивность ГТАКС, оцененная по содержанию кортикостерона в плазме крови в ответ на формалиновый тест, была выше у самцов. Только у самок с неонатальной болью обнаружены различия между показателями кратковременной и долговременной памяти, с меньшей эффективностью долговременной памяти. Обсуждаются возможные причины половых различий в когнитивной функции и стресс-гормональном ответе у взрослых крыс, подвергнутых повторному воспалительному болевому воздействию в новорожденном возрасте.

**Ключевые слова:** болевой стресс, новорожденный период, взрослая крыса, пространственное обучение, память, кортикостерон

# The impact of neonatal inflammatory pain on cognitive and stress-reactive functions in adult male and female rats

V. A. Mikhailenko<sup>✉1</sup>, I. P. Butkevich<sup>1</sup>, E. A. Vershinina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

## Authors

Viktor A. Mikhailenko, SPIN: [9111-0369](#), Scopus AuthorID: [57215986246](#), ORCID: [0000-0003-4221-7702](#), e-mail: [viktormikhailenko@yandex.ru](mailto:viktormikhailenko@yandex.ru)

Irina P. Butkevich, SPIN: [9248-2288](#), Scopus AuthorID: [7004037979](#), ORCID: [0000-0002-1201-9185](#), e-mail: [irinabutkevich@yandex.ru](mailto:irinabutkevich@yandex.ru)

Elena A. Vershinina, SPIN: [1082-8759](#), Scopus AuthorID: [6701609543](#), ORCID: [0000-0002-8873-4409](#), e-mail: [ver\\_elen@mail.ru](mailto:ver_elen@mail.ru)

**For citation:** Mikhailenko, V. A., Butkevich, I. P., Vershinina, E. A.

(2022) The impact of neonatal inflammatory pain on cognitive and stress-reactive functions in adult male and female rats. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 1, pp. 69–79. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-69-79>

**Received** 24 January 2022; reviewed 1 March 2022; accepted 2 March 2022.

**Funding:** The study is partially supported by a grant from RFFI No. 17-04-00214a.

**Copyright:** © V. A. Mikhailenko, I. P. Butkevich, E. A. Vershinina (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](#).

**Abstract.** Repetitive neonatal pain may cause central nervous system disorders. Existing clinical data on the effect of neonatal pain on learning, memory and stress-reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (the HPA axis) are limited to adolescence and have mostly been obtained for male individuals. The mechanism of neonatal pain effect has not yet been researched. Ontogenetic studies carried out on different-sex specimen are crucial for prediction, prevention and treatment of adaptive behavioural disorders caused by neonatal pain stress. Lately, this has become even more relevant due to COVID-19 affecting new-borns in need of intensive therapy. In this study, the impact of neonatal inflammatory pain on adult cognition and hormonal stress response was investigated in male and female rats. Continuous neonatal pain was induced by hindpaw formalin injections on days one and two from birth. In adult rats, we assessed spatial learning and memory using the Morris water maze and evaluated HPA reactivity in response to the formalin test. No significant cognitive function differences were found between the experimental group of rats subjected to neonatal pain and the control group. Within the experimental group subjected to neonatal pain, males showed better long-term spatial memory than females. After testing the long-term memory, we evaluated HPA reactivity by corticosterone levels in response to a formalin test. This parameter was higher in males. Only females with neonatal pain showed differences between short-term and long-term memory, with poorer long-term memory. Possible causes of sex differences in the cognitive function and hormonal stress response in adult rats exposed to neonatal inflammatory pain are discussed.

**Keywords:** pain stress, neonatal period, adult rat, spatial learning, memory, corticosterone

## Введение

Повторные болевые воздействия в неонатальном возрасте вызывают структурные и функциональные изменения в областях мозга, связанных с адаптивным поведением (Chen et al. 2016; Xia et al. 2020). Клинические данные по исследованию влияния неонатального болевого стресса на адаптивную гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальную систему (ГТАКС) ограничены подростковым возрастом и получены на детях, которые родились раньше срока и нуждались в интенсивных терапевтических процедурах (Brummelte et al. 2015; Grunau et al. 2005; Mooney-Leber, Brummelte 2017). Обращает

на себя внимание противоречивость полученных результатов. Как увеличение, так и отсутствие изменения уровня кортизола было обнаружено после болевых процедур (Herrington et al. 2004); более низкий уровень кортизола в слюне был обнаружен у недоношенных детей с более высоким числом болевых процедур в раннем возрасте, чем у детей с меньшим их числом (Brummelte et al. 2015; Grunau et al. 2013).

Существует тесное нейроанатомическое и физиологическое взаимодействие между болью и ГТАКС, которое регулируется гипоталамусом, миндалиной, гиппокампом, префронтальной корой (Timmers et al. 2019; Ulrich-Lai, Herman 2009; Victoria et al. 2013). Особенности этого

взаимодействия в ответ на повреждающие раздражители в раннем возрасте недостаточно изучены. Данные о влиянии боли на ГТАКС, полученные как в клинике, так и в лабораторных исследованиях на животных, являются неполными (Mooney-Leber, Brummelte 2017). Необходимы дальнейшие исследования для выяснения взаимосвязи между неонатальной болью и ГТАКС с учетом многогранной взаимосвязи между типом боли, ее интенсивностью, полом, возрастом во время воздействия боли и реакцией ГТАКС.

Модификацию стрессорной реактивности ГТАКС связывают с нарушением негативной обратной связи, осуществляемой глюкокортикоидами через паравентрикулярное ядро гипоталамуса и гипофиз. Периферический стероидный гормон ГТАКС, кортизол у людей, кортикостерон у грызунов, играет важную роль в обучении и памяти (Akirav et al. 2004). Ключевыми внешними регуляторами активности ГТАКС являются гиппокамп, миндалина, префронтальная кора, структуры, вовлеченные в когнитивную сферу, поэтому изменения, вызванные неонатальным болевым стрессом в этих структурах мозга, могут модифицировать процессы обучения и памяти. Исследования на младенцах (Grunau et al. 2009) и детях школьного возраста (Ranger, Grunau 2014) подтверждают неблагоприятное влияние неонатальной боли на когнитивную сферу, однако остается до сих пор открытым вопрос о возможном долговременном влиянии перенесенной неонатальной боли на когнитивные процессы и реактивность ГТАКС.

Многочисленные работы на животных посвящены изучению влияния неболевого стресса (отнятие от матери, лимитированные жизненные условия и др.) на реактивность ГТАКС и когнитивные способности (Bonapersona et al. 2019; Fitzgerald et al. 2021; van Bodegom et al. 2017), тогда как число исследований по влиянию болевого стресса крайне ограничено (Khawla et al. 2017). Существует множество моделей неонатальной боли, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. Все они предназначены для моделирования опыта младенцев, которые каждый день подвергаются многочисленным инвазивным процедурам в отделении интенсивной терапии (Grunau et al. 2006). Нам известно лишь о нескольких исследованиях на грызунах, в которых было изучено влияние неонатальной воспалительной боли на пространственное обучение, память или ГТАКС. Например, боль, вызванная формалином у новорожденных крысят, нарушила у этих животных

в половозрелом возрасте пространственное обучение и память, тестированные в радиальном лабиринте, в котором используется пищевое подкрепление (Anand et al. 2007). В других работах инъекция воспалительных агентов каррагена или адьюванта Фрейнда в заднюю конечность новорожденным крысятам приводила к дефициту пространственной памяти у взрослых крыс (Henderson et al. 2015), нарушению регуляции ГТАКС, но не влияла на краткосрочную или долгосрочную память у крыс обоего пола (Victoria et al. 2013), однако вызывала дефицит пространственного обучения у самцов крыс (Amaral et al. 2015). Формалин, который мы использовали в качестве воспалительного агента, вызывает повреждающие последствия, которые сравнимы с повреждениями в неонатальной клинике (Tjølsen et al. 1992), тогда как вышеупомянутые воспалительные агенты карраген и адьювант Фрейнда значительно превосходят по интенсивности и продолжительности повреждения, вызванные инвазивными процедурами. Следует подчеркнуть, что данные литературы по исследуемой проблеме получены в основном на особях мужского пола, при включении в исследование разнополых особей результаты противоречивы (Chen et al. 2016; Mogil 2020; Xia et al., 2020). Для выяснения механизмов влияния болевых воздействий в раннем возрасте на когнитивную функцию и адаптивную стрессорную ГТАКС необходимо включение разнополых особей (Mooney-Leber, Brummelte 2017; van Bodegom et al. 2017).

Актуальность рассматриваемой проблемы очевидна, если принимать во внимание распространенность в неонатальной клинике инвазивных процедур, установленную связь между неонатальной болью и нарушениями в центральной нервной системе (Brewer, Vascei 2020; Schwaller, Fitzgerald 2014) и особенно современную ситуацию с коронавирусной инфекцией, охватившей и новорожденных младенцев, которым требуется интенсивное терапевтическое лечение.

В настоящей работе изучали долгосрочное влияние воспалительной боли у новорожденных крысят на пространственное обучение и память, реактивность ГТАКС в ответ на формалиновый тест у взрослых животных обоего пола.

## Материалы и методы

Работа проведена на потомстве крыс линии Вистар, полученных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных

систем» (Санкт-Петербург). Все процедуры с животными проводили в соответствии с принципами Базельской декларации; протоколы опытов утверждены биоэтическим комитетом Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. Всех животных содержали в виварии лаборатории в стандартных условиях (свободный доступ к стандартизированной пище и воде, 12:00–12:00 включение и выключение света в 8 ч, 22–23 °С). Для определения беременности у самок на следующий день после подсадки брали мазки из влагалища. Через сутки после рождения потомства в каждом помете оставляли не более восьми крысят, самцов и самок поровну по возможности. Одно- и двухдневным крысятам инъецировали подкожно раствор формалина (2,5%, 0,5 мкл) в подошву задней конечности (контроль — инъекция физиологического раствора) для создания очага воспалительной боли, после чего крысят сразу возвращали к своим матерям.

В возрасте 30 дней разнополых крыс рассаживали без матери в разные клетки. Начиная с 90–100-дневного возраста у животных исследовали процесс пространственного обучения в течение пяти дней в водном лабиринте Морриса (Morris 1981; Vorhees, Williams 2014). В исследование были включены следующие группы крыс: с неонатальной болью (подопытные) 34 самца и 30 самок, контрольные 29 самцов и 28 самок. Крысу помещали в бассейн, в котором она должна была в течение 60 с найти металлическую платформу (диаметр 10 см), расположенную на дне бассейна (диаметр 120 см, высота 72 см, температура воды 22–24 °С) ниже уровня воды на 2 см. Бассейн визуально был разделен на четыре части, в одной из них находилась платформа, местоположение которой не изменяли. Регистрировали время нахождения платформы (латентный период, с). Если попытка была неудачной, экспериментатор сам помещал крысу на платформу, в этом случае латентный период принимали за 60 с. Первые четыре попытки с перерывом между каждой в 15 с и пребыванием на платформе в 20 с составляли первую тренировочную пробу. Следующая вторая аналогичная тренировочная проба предоставлялась крысе после четырех минут отдыха в сухой клетке. Кратковременную память тестировали на пятый день после первой пробы, а через четверо суток после этого — долговременную память; в обоих случаях крысу на 60 с помещали в бассейн без платформы и регистрировали латентный период достижения целевого квадранта, места, где ранее находилась платформа, а также время пребывания в целевом

квадранте за период времени, равный 60 с. Использовали специальную компьютерную программу для регистрации траектории движения крысы с помощью веб-камеры. После завершения исследования долговременной памяти у крыс оценивали реактивность ГТАКС в ответ на боль, вызванную инъекцией формалина (2,5%, 0,5 мкл) в заднюю конечность. Через 30 мин после инъекции формалина (пик болевого ответа (Butkevich et al. 2009)) и декапитации собирали образцы крови. Плазму крови хранили при температуре –20 °С. Кортикостерон определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов («Xema-Medica Co» Cat №: K210R; Россия) с помощью спектрофотометра (Spectrostar NANO, BMG Labtech, Германия).

Полученные данные проверяли на нормальность выборок с использованием критерия Колмогорова — Смирнова. Проверка на нормальность дала несколько отклонений от нормальности для способности к обучению. Эти отклонения получились за счет одиночных выбросов (экстремальных значений). Логарифмы данных дали нормальные распределения. Анализ данных проводили с использованием разных моделей дисперсионного анализа ANOVA/MANOVA, а также с использованием смешанного дисперсионного анализа mixed ANOVA с последующими множественными сравнениями по Бонферрони. Факторами при исследовании способности к обучению выступали пол (самцы/самки), воздействие (формалин/физиологический раствор) и номер дня (1–5 для первой пробы и 1–4 для второй пробы), при исследовании пространственной памяти — пол (самцы/самки), воздействие (формалин/физиологический раствор). При исследовании способности к обучению, помимо одномерного анализа для пробы 1 (1–5 дни) и пробы 2 (1–4 день), применяли смешанный анализ mixed ANOVA для 1–4 дня и проб 1 и 2, пола и воздействия. Помимо этого, проводили анализ отдельно по попыткам первой пробы и по попыткам второй пробы. При исследовании пространственной памяти использовали многомерный дисперсионный анализ MANOVA для изучаемых параметров. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка. Статистические решения принимали на 5%-ном уровне значимости.

## Результаты исследования

В показателях пространственного обучения не было обнаружено влияния неонатальной боли

на латентный период достижения платформы в течение пяти тренировочных дней. В то же время у крыс с неонатальной болью обнаружены половые различия только в первый тренировочный день во второй пробе ( $p = 0,026$ ), более продолжительный латентный период достижения платформы выявлен у самцов (рис. 1). В остальные тренировочные дни значимых половых различий не было выявлено. Первый день принято рассматривать как самый показательный во влиянии стрессорных воздействий на процесс обучения в тесте Морриса (Morris 1981; Vorhees, Williams 2014).

В показателях пространственной памяти также не было обнаружено значимого влияния неонатальной боли у крыс обоего пола. У крыс с неона-

тальной болью обнаружены различия между самцами и самками в показателях долговременной памяти, с более высокой продолжительностью нахождения в целевом квадранте у самцов ( $p = 0,017$ ). У подопытных самок при тестировании кратковременной и долговременной памяти обнаружены значимые различия во времени нахождения в целевом квадранте. При тестировании кратковременной памяти данный показатель был более продолжительным, что указывает на более высокую эффективность кратковременной памяти, чем долговременной ( $p < 0,01$ ; рис. 2).

При исследовании реактивности ГТАКС в ответ на формалиновый тест после тестирования у животных долговременной памяти

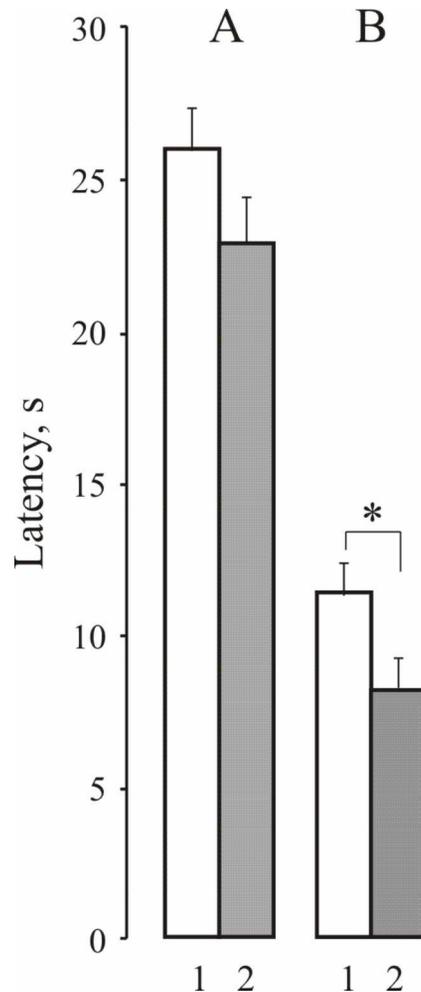


Рис. 1. Латентный период достижения платформы в водном лабиринте Морриса в первый тренировочный день в первую (А) и вторую (В) пробы пространственного обучения у самцов (1) и самок (2) взрослых крыс, подвергнутых неонатальной воспалительной боли. \* $p = 0,026$ , различия между подопытными самцами и самками в первый день во второй пробе

Fig. 1. Latency to find the platform in the Morris water maze on the first training day in the first trial (A) and the second trial (B) of spatial learning in male (1) and female (2) adult rats exposed to neonatal inflammatory pain. \* $p = 0.026$ , differences between experimental males and females on the first day of the second trial

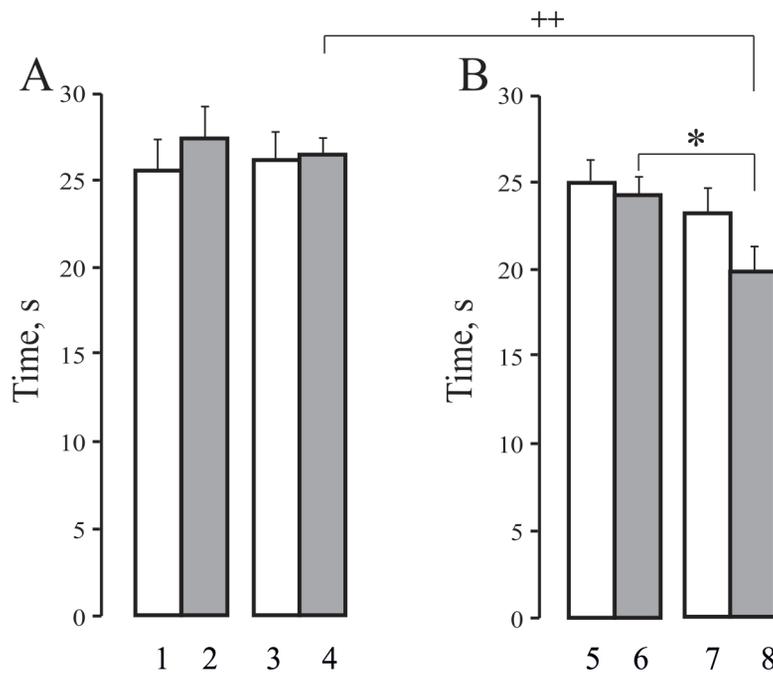


Рис. 2. Время пребывания в целевом квадранте (с) при тестировании кратковременной (А) и долговременной (В) памяти в водном лабиринте Морриса у самцов (2, 6) и самок (4, 8) взрослых крыс, подвергнутых в новорожденном состоянии воспалительной боли или инъекции физиологического раствора: самцы (1, 5) и самки (3, 7). \* $p < 0,05$ , различия между подопытными самцами и самками в показателях долговременной памяти; ++ $p < 0,01$ , различия в показателях кратковременной и долговременной памяти у подопытных самок

Fig. 2. The time spent in the target quadrant (s) during registration of short- (A) and long-term (B) memory in the Morris water maze in adult male (2 and 6) and female (4 and 8) rats subjected to neonatal pain in a newborn state: males (1 and 5) and females (3 and 7). \* $p < 0.05$ , differences between experimental males and females in long-term memory; ++ $p < 0.01$ , between indices of short-term and long-term memory in experimental females

обнаружено, что неонатальная боль увеличила у подопытных крыс содержание кортикостерона в ответ на 30-минутный формалиновый тест по сравнению с базальным уровнем гормона ( $p < 0,001$  у крыс обоего пола) и с уровнем гормона у контрольных самцов ( $p = 0,012$ ), но не у самок. У подопытных животных выявлены половые различия с более высокой реактивностью ГТАКС у самцов, чем у самок ( $p = 0,048$ ), тогда как для контрольных самцов и самок реактивность ГТАКС в подобных условиях была идентичной. Через сутки после формалинового теста уровень кортикостерона был нормализован (рис. 3).

### Обсуждение

Главные результаты настоящей работы указывают на то, что неонатальная боль, вызванная процессом воспаления в ответ на подкожную инъекцию раствора формалина на периферии в первые два дня жизни крысят, не изменила

во взрослом состоянии исследованные характеристики пространственного обучения, кратковременной и долговременной памяти в водном лабиринте Морриса у крыс обоего пола. В то же время неонатальная воспалительная боль способствовала обнаружению у взрослых крыс половых различий в показателях пространственной долговременной памяти, которые характеризовались более высоким уровнем у самцов. После регистрации долговременной памяти у самцов реактивность ГТАКС в ответ на формалиновый тест была выше, чем у контрольных самцов, тогда как у самок различий в содержании кортикостерона между подопытными и контрольными крысами не было обнаружено. Вследствие этого у крыс с неонатальной болью обнаружены половые различия в реактивности ГТАКС с более высоким ее уровнем у самцов, тогда как у контрольных крыс половые различия в содержании кортикостерона в плазме крови в ответ на формалиновый тест отсутствовали. Кроме того, только у подопытных самок,

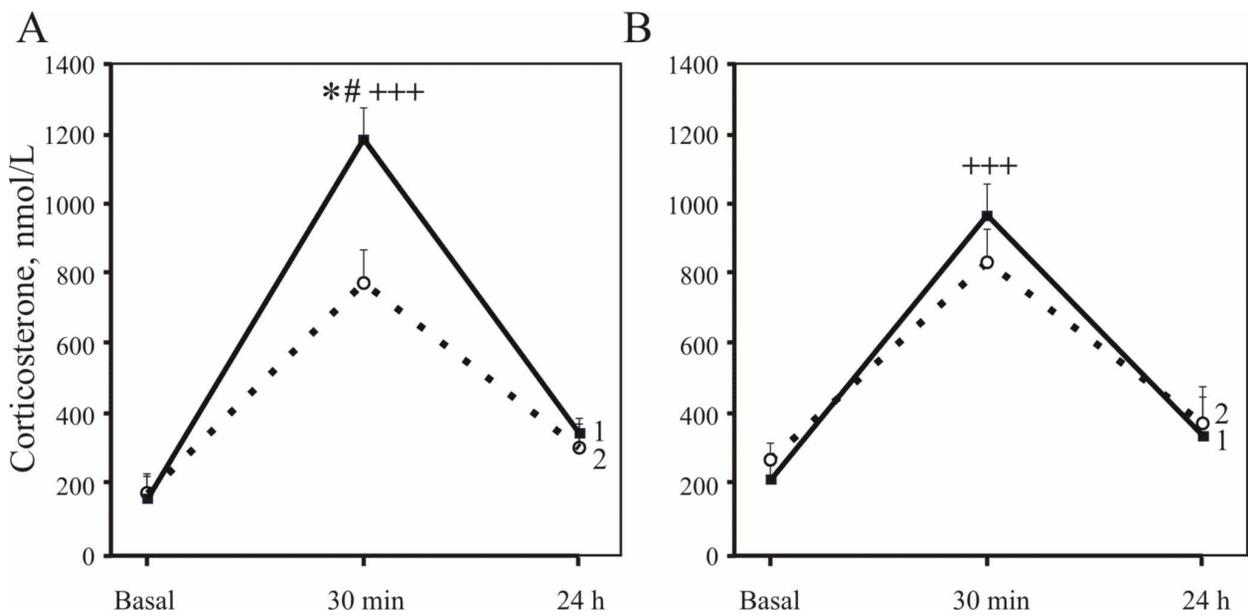


Рис. 3. Динамика содержания кортикостерона в плазме крови в ответ на формалиновый тест (базальный, через 30 мин и 24 часа после инъекции формалина) у взрослых самцов (А) и самок (В) крыс после тестирования долговременной памяти. 1 — подвергнутые в новорожденном состоянии воспалительной боли, 2 — инъекции физиологического раствора. \* $p < 0,05$ , различия между подопытными самцами и самцами с инъекцией физиологического раствора; # $p < 0,05$ , различия между подопытными самцами и самками; +++ $p < 0,001$ , различия между базальным уровнем кортикостерона и уровнем гормона через 30 мин после формалинового теста у крыс обоего пола

Fig. 3. The dynamics of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress reactivity (plasmatic corticosterone level, basal, after 30 minutes and 24 hours in response to the formalin test) after testing long-term memory in adult males (A) and females (B) rats. 1—rats subjected to inflammatory pain in newborn state, 2—rats subjected to injection of saline. \* $p < 0.05$  differences between experimental males and males with saline; # $p < 0.05$  differences between experimental males and females; +++ $p < 0.001$  differences between corticosterone basic level and corticosterone level 30 min after the formalin test in rats of both sexes

но не у подопытных самцов и не у контрольных крыс обоего пола показатель памяти, время пребывания в целевом квадранте, был выше при тестировании кратковременной памяти, тогда как при тестировании долговременной памяти время плавания подопытных самок в целевом квадранте было значительно короче.

Ранее нами было впервые показано, что новорожденные крысята в ответ на инъекцию раствора формалина в подошву задней конечности реагировали сгибанием и встряхиванием задней конечности, инъецированной формалином, что сопровождалось продолжительным (более суток) увеличением содержания кортикостерона в плазме крови; это дало нам возможность предполагать долговременное влияние данного воспалительного болевого воздействия на ГГАС и, возможно, на когнитивную функцию (Butkevich et al. 2021). Действительно, в препубертатный период развития самцы с аналогичным неонатальным воздействием, но не самки, обнаружили ухудшение в пространственном обучении

и памяти, однако реактивность ГГАС в ответ на принудительное плавание не была изменена у крыс обоего пола по сравнению с контролем (физиологический раствор) (Mikhailenko et al. 2021). Данные настоящего исследования указывают на изменение влияний неонатальной воспалительной боли на показатели долговременной памяти у крыс в процессе развития: исследованный показатель долговременной памяти у подопытных взрослых самцов увеличился и превысил данный показатель у самок.

Отсутствие влияний повторной неонатальной воспалительной боли на характеристики пространственного обучения и памяти у взрослых крыс в настоящей работе можно было бы связать с низкой концентрацией формалина, используемой нами для новорожденных крысят в первые два дня жизни. Например, при применении в качестве воспалительного агента формалина с более высокими концентрацией и объемом (4%, 5 мкл) по сравнению с данными показателями в нашей работе с более продолжительной

инъекцией (с первого по четвертый день жизни) в каждую лапу крысятам было обнаружено нарушение пространственного обучения и памяти в тесте радиального лабиринта у крыс в половозрелом возрасте (Anand et al. 2007).

Выявленные в настоящей работе половые различия во влиянии неонатальной воспалительной боли на когнитивные процессы и реактивность ГТАКС у взрослых крыс могут быть связаны со следующими факторами. Высокий и относительно длительный уровень кортикостерона, вызванный формалиновой болью у новорожденных крысят (Butkevich et al. 2021), ухудшает развитие паравентрикулярного ядра гипоталамуса (ПВЯ). Кортикотропин-релизинг-гормон (КРГ) данного ядра регулирует нейрогенез в гиппокампе, участвующем в пространственном обучении и памяти (Koutmani et al. 2019). Нейросекреторные системы ПВЯ кроме нейропептидов выделяют глутамат в гипофизарные портальные сосуды (Hrabovszky et al. 2005). Глутаматергические нейроны являются одними из основных звеньев в процессах обучения и запоминания (Mooney-Leber, Brummelte 2017). Роль глутамата во время развития в основном связана с его инотропным рецептором (НМДА-рецептором), который присутствует уже у P0 крыс (Behuet et al. 2019). При созревании возбуждающих синапсов в гиппокампе новорожденной крысы в НМДА-рецепторе преобладает NR2B-рецепторная субъединица, при активации которой быстрее, чем при активации NR2A-субъединицы, развивается долгосрочная потенция, что способствует укреплению памяти. В ходе постнатального развития происходит смена NR2B-рецепторной субъединицы на NR2A-рецепторную. Чрезмерные уровни глюкокортикоидов стимулируют высвобождение глутамата (Verhaeghe et al. 2021), вызывая нейротоксичность, усиливающую апоптоз, что показано в гиппокампе и других областях мозга в течение первой послеродовой недели у крысы (Dührsen et al. 2013; Lu et al. 2003). Показано, что избирательная потеря белка NR2B и последующая синаптическая дисфункция ослабляют активность префронтальной коры во время развития и провоцируют возникновение ранних когнитивных нарушений (Gulchina et al. 2017). Вышеописанные возрастные модификации рецепторных субъединиц НМДА-рецептора могут быть вовлечены в выявленные нами изменения в пространственном обучении, памяти и ГТАКС у взрослых подопытных крыс.

Влияние неонатальной боли на когнитивную функцию осуществляется и другими физиологическими системами. Эстрогены и андрогены

участвуют в модуляции пренатального и постнатального развития в ноцицептивной, иммунной системах, в ГТАКС и когнитивной системе (Green, McCormick 2016). Особое внимание в настоящее время уделяется половым различиям в развитии микроглии, чувствительной к стрессу и боли (Nelson, Lenz 2017). Специфическое для пола выделение эстрогенов в неонатальном периоде с доминированием женского полового гормона у самцов приводит к дифференцированному вовлечению иммунной системы у разнополых особей в ответ на болевой стресс. Неонатальная боль может неодинаково изменить у разнополых особей сбалансированное развитие тесно взаимосвязанных между собой иммунной системы, ГТАКС и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы, которые влияют на синаптическую пластичность в структурах головного мозга (Wang et al. 2020). Существует предположение, что стресс в раннем возрасте может иметь не только повреждающие последствия, но и адаптационный потенциал, который, взаимодействуя с чувствительностью индивидуума к программированию (пластичность в раннем возрасте), определяет в дальнейшем активность физиологических систем организма. На основании наших предыдущих исследований (Butkevich et al. 2020) и данных литературы (Nederhof, Schmidt 2012) мы допускаем, что обнаруженное у подопытных самцов более длительное пребывание в целевом квадрате, чем у самок при тестировании долговременной памяти, сочетающееся с более высокой реактивностью ГТАКС, свидетельствует в поддержку теории соответствия-несоответствия (Daskalakis et al. 2013). Данная теория предполагает адаптивную способность умеренного стресса в ранний критический период развития в подготовке организма к соответствующим условиям стресса (в нашем случае формалиновый тест) у взрослых крыс. Дизайн настоящего исследования включал стресс воспалительной боли в новорожденном возрасте, а во взрослом состоянии — стресс в водном лабиринте Морриса и болевой стресс в формалиновом тесте. Взаимодействие различных типов стресса, как неоднократно отмечалось в литературе, приводит к неожиданным результатам (Sokołowski et al. 2020). Можно предположить, что половые различия в показателях долговременной памяти у подопытных крыс указывают на половой диморфизм в синаптической пластичности, лежащей в основе обучения и памяти, в структурах, вовлеченных в когнитивные процессы.

Полученные данные позволяют заключить, что умеренный стресс воспалительной боли

у новорожденных крыс способствует формированию у взрослых самцов адаптивной восприимчивости к факторам окружающей среды, что в результате проявилось у них в более длительном пребывании в целевом квадранте при тестировании долговременной памяти и более высокой реактивности ГТАКС в ответ на формалиновый стресс.

### Благодарности

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

### Acknowledgements

We are grateful to E. N. Lavrova and N. A. Ulanova, senior laboratory assistants at the Laboratory of Nervous System Ontogeny, for their help in conducting the experiments and to E. I. Tyulkova, Doctor of Sciences (Biology) at the Laboratory of Brain Neurons Regulation headed by professor E. A. Rybnikova, for conducting the quantitative analysis of corticosterone.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

### Соответствие принципам этики

Все процедуры работы с животными проводили в соответствии с принципами Базельской декларации; протоколы опытов утверждены биоэтическим комитетом Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

### Ethics Approval

All animal procedures were carried out in accordance with the principles of the Basel Declaration; protocols of experiments approved by the Bioethical Committee of the Pavlov Institute of Physiology RAS.

### Вклад авторов

а. Михайленко Виктор Анатольевич — идея и планирование экспериментов, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование рукописи;

б. Буткевич Ирина Павловна — идея и планирование экспериментов, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование рукописи;

с. Вершинина Елена Андреевна — идея и планирование экспериментов, обработка данных, написание и редактирование рукописи.

### Author Contributions

а. Viktor A. Mikhailenko—experiment design and planning, data collection, data processing, manuscript writing and editing;

б. Irina P. Butkevich—experiment design and planning, data collection, data processing, manuscript writing and editing;

с. Elena A. Vershinina—experiment design and planning, data processing, writing and editing of manuscript.

### Список условных сокращений

ГТАКС — гипоталамо-гипофизарно-адренортикулярная система

ПВЯ — паравентрикулярное ядро гипоталамуса

КРТ — кортикотропин-релизинг-гормон

НМДА-рецептор — ионотропный рецептор глутамата

НР2А — рецепторная субъединица ионотропного рецептора глутамата подтипа 2А

НР2Б — рецепторная субъединица ионотропного рецептора глутамата подтипа 2В

### References

- Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D. et al. (2004) A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learning and Memory*, vol. 11, no. 2, pp. 188–195. <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.61704> (In English)
- Amaral, C., Antonio, B., Oliveira, M. G. M. et al. (2015) Early postnatal nociceptive stimulation results in deficits of spatial memory in male rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 125, pp. 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.012> (In English)

- Anand, K. J., Garg, S., Rovnaghi, C. R. et al. (2007) Ketamine reduces the cell death following inflammatory pain in newborn rat brain. *Pediatric Research*, vol. 62, no. 3, pp. 283–290. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180986d2f> (In English)
- Behuet, S., Cremer, J. N., Cremer, M. et al. (2019) Developmental changes of glutamate and GABA receptor densities in wistar rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 13, article 100. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00100> (In English)
- Bonapersona, V., Kentrop, J., Van Lissa, C. J. et al. (2019) The behavioral phenotype of early life adversity: A 3-level meta-analysis of rodent studies. *Neuroscience and Biobehavior Review*, vol. 102, pp. 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.021> (In English)
- Brewer, C. L., Bacceti, M. L. (2020) The development of pain circuits and unique effects of neonatal injury. *Neural Transmission*, vol. 127, no. 4, pp. 467–479. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02059-z> (In English)
- Brummelte, S., Chau, C. M. Y., Cepeda, I. L. et al. (2015) Cortisol levels in former preterm children at school age are predicted by neonatal procedural pain-related stress. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 51, pp. 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.018> (In English)
- Butkevich, I., Mikhailenko, V., Semionov, P. et al. (2009) Effects of maternal corticosterone and stress on behavioral and hormonal indices of formalin pain in male and female offspring of different ages. *Hormones and Behavior*, vol. 55, no. 1, pp. 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.09.008> (In English)
- Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A., Vershinina, E. A. (2020) Combination of stressors in the critical periods of development increases resistance to inflammatory pain stress in adult rats. *Neuroscience and Behavior Physiology*, vol. 50, no. 8, pp. 1090–1097. <https://doi.org/10.1007/s11055-020-01010-0> (In English)
- Butkevich, I. P., Mikhailenko, V. A., Vershinina, E. A., Barr, G. A. (2021) The long-term effects of neonatal inflammatory pain on cognitive function and stress hormones depend on the heterogeneity of the adolescent period of development in male and female rats. *Frontiers in Behavior Neuroscience*, vol. 15, article 691578. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00125> (In English)
- Chen, M., Xia, D., Min, C. et al. (2016) Neonatal repetitive pain in rats leads to impaired spatial learning and dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in later life. *Scientific Reports*, vol. 14, article 39159. <https://doi.org/10.1038/srep39159> (In English)
- Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J. (2013) The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 9, pp. 1858–1873. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.008> (In English)
- Dührsen, L., Simons, S. H., Dzierko, M. et al. (2013) Effects of repetitive exposure to pain and morphine treatment 742 on the neonatal rat brain. *Neonatology*, vol. 103, no. 1, pp. 35–43. <https://doi.org/10.1159/000341769> (In English)
- Fitzgerald, E., Sinton, M. C., Wernig-Zorc, S. et al. (2021) Altered hypothalamic DNA methylation and stress-induced hyperactivity following early life stress. *Epigenetics Chromatin*, vol. 14, no. 1, article 31. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00405-8> (In English)
- Green, M. R., McCormick, C. M. (2016) Sex and stress steroids in adolescence: Gonadal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *General and Comparative Endocrinology*, vol. 234, pp. 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.02.004> (In English)
- Grunau, R. E., Holsti, L., Haley, D. W. et al. (2005) Neonatal procedural pain exposure predicts lower cortisol and behavioral reactivity in preterm infants in the NICU. *Pain*, vol. 113, no. 3, pp. 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.10.020> (In English)
- Grunau, R. E., Holsti, L., Peters, J. W. (2006) Long-term consequences of pain in human neonates. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.02.007> (In English)
- Grunau, R. E., Whitfield, M. F., Petrie-Thomas, J. et al. (2009) Neonatal pain, parenting stress and interaction, in relation to cognitive and motor development at 8 and 18 months in preterm infants. *Pain*, vol. 143, no. 1–2, pp. 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.02.014> (In English)
- Grunau, R. E., Cepeda, I. L., Chau, C. M. et al. (2013) Neonatal pain-related stress and NFKBIA genotype are associated with altered cortisol levels in preterm boys at school age. *PLoS One*, vol. 8, no. 9, article e73926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073926> (In English)
- Gulchina, Y., Xu, S.-J., Snyder, M. A. et al. (2017) Epigenetic mechanisms underlying NMDA receptor hypofunction in the prefrontal cortex of juvenile animals in the MAM model for schizophrenia. *Journal of Neurochemistry*, vol. 143, no. 3, pp. 320–333. <https://doi.org/10.1111/jnc.14101> (In English)
- Henderson, Y. O., Victoria, N. C., Inoue, K. et al. (2015) Early life inflammatory pain induces long-lasting deficits in hippocampal-dependent spatial memory in male and female rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 118, pp. 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.010> (In English)
- Herrington, C. J., Olomu, I. N., Geller, S. M. (2004) Salivary cortisol as indicators of pain in preterm infants: A pilot study. *Clinical Nursing Research*, vol. 13, no. 1, pp. 53–68. <https://doi.org/10.1177/1054773803259665> (In English)
- Hrabovszky, E., Wittmann, G., Turi, G. F. et al. (2005) Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology*, vol. 146, no. 1, pp. 341–347. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0856> (In English)
- Khawla, Q., Alzoubi, N. K. H., Alhusban, A. et al. (2017) Sucrose and naltrexone prevent increased pain sensitivity and impaired long-term memory induced by repetitive neonatal noxious stimulation: Role of BDNF and

- $\beta$ -endorphin. *Physiology and Behavior*, vol. 179, pp. 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.06.015> (In English)
- Koutmani, Y., Gampierakis, I. A., Polissidis, A. et al. (2019) CRH promotes the neurogenic activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Reports*, vol. 29, no. 4, pp. 932–945. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.037> (In English)
- Lu, J., Goula, D., Sousa, N., Almeida, O. F. X. (2003) *Ionotropic and metabotropic glutamate receptor* mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, vol. 121, no. 1, pp. 123–131. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00421-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00421-4) (In English)
- Mikhailenko, V. A., Butkeвич, I. P., Vershinina, E. A. (2021) Studying the effect of neonatal inflammatory pain on cognitive processes and the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in rats of prepubertal age. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, vol. 57, no. 5, pp. 1031–1039. <https://doi.org/10.1134/S0022093021050057> (In English)
- Mogil, J. S. (2020) Qualitative sex differences in pain processing: Emerging evidence of a biased literature. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 21, no. 7, pp. 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0310-6> (In English)
- Mooney-Leber, S. M., Brummelte, S. (2017) Neonatal pain and reduced maternal care: Early-life stressors interacting to impact brain and behavioral development. *Neuroscience*, vol. 342, pp. 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.001> (In English)
- Morris, R. G. M. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, vol. 12, no. 2, pp. 239–260. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5) (In English)
- Nederhof, E., Schmidt, M. V. (2012) Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiology and Behavior*, vol. 106, no. 5, pp. 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.008> (In English)
- Nelson, L. H., Lenz, K. H. (2017) The immune system as a novel regulator of sex differences in brain and behavioral development. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 95, no. 1–2, pp. 447–461. <https://doi.org/10.1002/jnr.23821> (In English)
- Ranger, M., Grunau, R. E. (2014) Early repetitive pain in preterm infants in relation to the developing brain. *Pain Management*, vol. 4, no. 1, pp. 57–67. <https://doi.org/10.2217/pmt.13.61> (In English)
- Schwaller, F., Fitzgerald, M. (2014) The consequences of pain in early life: Injury-induced plasticity in developing pain pathways. *European Journal of Neuroscience*, vol. 39, no. 3, pp. 344–352. <https://doi.org/10.1111/ejn.12414> (In English)
- Sokołowski, A., Folkierska-Żukowska, M., Jednoróg, K. et al. (2020) The relationship between early and recent life stress and emotional expression processing: A functional connectivity study. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*, vol. 20, no. 3, pp. 588–603. <https://doi.org/10.3758/s13415-020-00789-2> (In English)
- Timmers, I., Quaedflieg, C. W. E., Hsu, M. C. et al. (2019) The interaction between stress and chronic pain through the lens of threat learning. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, vol. 107, pp. 641–655. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.007> (In English)
- Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S. et al. (1992) The formalin test: An evaluation of the method. *Pain*, vol. 51, no. 1, pp. 5–17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-t](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t) (In English)
- Ulrich-Lai, Y. M., Herman, J. P. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 10, no. 6, pp. 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647> (In English)
- Van Bodegom, M., Homberg, J. R., Henckens, M. J. A. G. (2017) Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 11, article 87. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087> (In English)
- Verhaeghe, R., Gao, V., Morley-Fletcher, S. et al. (2021) Maternal stress programs a demasculinization of glutamatergic transmission in stress-related brain regions of aged rats. *GeroScience*, vol. 13, pp. 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00375-5> (In English)
- Victoria, N. C., Inoue, K., Young, L. J., Murphy, A. Z. (2013) Long-term dysregulation of brain corticotrophin and glucocorticoid receptors and stress reactivity by single early-life pain experience in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 12, pp. 3015–3028. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.08.013> (In English)
- Vorhees, C. V., Williams, M. T. (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR Journal*, vol. 55, no. 2, pp. 310–332. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013> (In English)
- Wang, K., Xu, F., Campbell, S. P. et al. (2020) Rapid actions of anti-Müllerian hormone in regulating synaptic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *The FASEB Journal*, vol. 34, no. 1, pp. 706–719. <https://doi.org/10.1096/fj.201902217R> (In English)
- Xia, D., Min, C., Chen, Y. et al. (2020) Repetitive pain in neonatal male rats impairs hippocampus-dependent fear memory later in life. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 14, article 722. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00722> (In English)