

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ
НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 57.084.1:591.05

ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО НЕПРЕДСКАЗУЕМОГО СТРЕССА
И ОСТРОЙ НИЗКОДОЗОВОЙ ЭНДОТОКСЕМИИ
У КРЫС WISTAR HAN И SPRAGUE DAWLEY

© 2020 г. О. Д. Курко^{1,*}, Л. С. Иноземцева¹, Н. Ю. Глазова¹, Е. А. Себенцова¹, Д. Д. Марков¹,
Д. Д. Хухарева², Н. Г. Левицкая^{1,2}, И. А. Гривенников¹, О. В. Долотов^{1,**}

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

* e-mail: flaute.kurko@yandex.ru

** e-mail: dolotov@img.ras.ru

Поступила в редакцию 06.11.2018 г.

После доработки 15.04.2019 г.

Принята к публикации 03.06.2019 г.

Депрессия является комплексным, гетерогенным и многофакторным заболеванием с недостаточно изученными механизмами развития. Аутбредные крысы Sprague Dawley (SD) и Wistar Han (WH) широко применяются в биомедицинских исследованиях, в частности, в модели непредсказуемого хронического стресса (НХС) и воспалительной модели депрессии. Однако недостаточно изучены различия между SD и WH, проявляющиеся при использовании этих экспериментальных моделей. Целью работы являлось сравнение изменений в гедоническом статусе, пищевой активности и массе тела самцов крыс SD и WH, полученных из питомника Charles River Laboratories (Германия), в моделях НХС (7 нед) и острой эндотоксемии (однократное внутрибрюшинное введение низкой субсептической дозы ЛПС, 25 мкг/кг). Гедонический статус оценивали с помощью теста предпочтения сахарозы без предварительной пищевой и водной депривации. Обнаружены существенные различия между линиями в скорости прироста массы тела, относительной массе тимусов, двигательной, исследовательской и пищевой активности. Крысы WH имели более низкий порог предпочтения раствора сахарозы (0.3%), чем крысы SD (0.4%). Эффекты стресса и эндотоксемии на массу тела более выражены у крыс SD. При эндотоксемии снижение гедонического статуса более выражено у крыс WH. Через 90 мин после введения ЛПС индуцированные уровни TNF- α в сыворотке крови выше у SD, а кортикостерона – у WH. При хроническом стрессе снижение гедонического статуса и гипертрофия надпочечников обнаружены только у крыс SD, но инволюция тимуса выявлена только у крыс WH. Значительные различия в физиологических характеристиках крыс Sprague Dawley и Wistar Han и различная чувствительность их метаболического и гедонического статуса к стрессу и воспалению могут оказывать существенное влияние на результаты, получаемые в моделях соответствующих патологий, а также на их интерпретацию.

Ключевые слова: хронический стресс, острая эндотоксемия, ЛПС, сравнение линий крыс, Sprague Dawley, Wistar, депрессия, масса тела, предпочтение сахарозы

DOI: 10.31857/S0044467720010086

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия является комплексным, гетерогенным и многофакторным заболеванием с недостаточно изученными механизмами развития. В настоящее время существует ряд экспериментальных моделей, в той или иной степени отражающих патогенез и симптоматику депрессии [Krishnan, Nestler, 2011;

Stepanichev et al., 2014] и в разной степени соответствующих критериям адекватности моделируемой патологии, предложенным П. Виллнером [Willner, 1984]. Наряду с принципиальными ограничениями существующих моделей, связанными с недостаточным пониманием механизмов развития депрессии и невозможностью полного воспроизведения

ее симптоматики в экспериментах на животных (например, подавленного настроения, мыслей о суициде), важной проблемой является более или менее высокая чувствительность используемых моделей депрессии к целому ряду контролируемых и неконтролируемых факторов, связанных с характеристиками экспериментальных животных и отличиями в условиях проведения экспериментов в различных лабораториях. Так, в отношении одной из наиболее адекватных моделей депрессии – непредсказуемого хронического стресса (НХС) [Willner, 2017], отмечается недостаточно высокая воспроизводимость и надежность, что в совокупности с трудоемкостью и длительностью выполнения приводит к снижению ее популярности [Krishnan, Nestler, 2011]. Очевидна чувствительность экспериментальных моделей депрессии к виду, линии, полу и возрасту используемых животных, но наличие многих факторов, влияющих на поведение животных: происхождение животных, вариации в условиях содержания, транспортировки, адаптации и различия экспериментальных методик, затрудняет сравнение, анализ и воспроизведение результатов, полученных разными группами в одной и той же модели депрессии. В то же время применение идентичных методик и условий содержания позволяет минимизировать влияние этих факторов на поведение животных в используемой модели.

Аутбредные линии (породы) крыс-альбиносов Sprague Dawley (SD) и Wistar широко используются в биомедицинских исследованиях, в частности, для моделирования депрессивных расстройств [Marona-Lewicka, Nichols, 1997; De La Garza et al., 2005; Simmons, Broderick, 2005; Biesmans et al., 2016; Willner, 2017]. В последние годы выявлены значительные межлинейные различия между крысами SD и Wistar, что может приводить к противоречивости результатов, получаемых в разных лабораториях, и сложности в сопоставлении полученных в аналогичных моделях данных. У крыс линий SD и WH показаны отличия в содержании и скорости обмена биогенных аминов [Scholl et al., 2010], пищевой активности [Hayakawa et al., 2013], чувствительности к различным фармакологическим препаратам [Zmarowski et al., 2012; Bruzos-Cidon et al., 2014], способности к обучению [Gökçek-Saraç et al., 2015], метаболические различия [Marques et al., 2015]. Однако имеется небольшое число исследова-

ний, направленных на выявление различий между данными линиями в условиях острого или хронического стресса с использованием идентичных методик эксперимента и условий содержания. Результаты, полученные на животных из разных питомников, достаточно противоречивы. Показано, что уровни кортикостерона в крови крыс (питомник Bantin and Kingman, Великобритания), вызванные иммобилизационным стрессом, выше у Wistar, чем у SD [Harbuz et al., 1994]. При этом у инбредных линий крыс (Институт цитологии и генетики, Новосибирск) уровень вегетативной реактивности и уровни кортикостероидов в крови после иммобилизационного стресса были выше у SD, чем у Wistar [Осадчук и др., 1979; Маркель, Бородин, 1982]. Не было обнаружено различий в тесте вынужденного плавания и в горизонтальной двигательной активности (ГДА) в тесте “Открытое поле” (ОП) между SD и Wistar (питомник Charles River, Великобритания) [McDermott, Kelly, 2008]. Однако при сравнении крыс из питомника Harlan, США, более высокий уровень ГДА был обнаружен у Wistar [Tang et al., 2005]. Крысы Wistar более чувствительны, чем SD (питомник Charles River, Республика Корея) к острому воспалительному стрессу, вызванному высокими (септическими) дозами компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий липополисахарида (ЛПС) [Lee et al., 2001]. Единственным исследованием, направленным на прямое сравнение Wistar и SD в условиях НХС, является работа Bekris и соавт., проведенная с использованием крыс из популяций Афинского университета, Греция. В этом исследовании были выявлены различия между Wistar и SD в динамике потребления раствора сахарозы в первые три недели НХС и повышение вследствие НХС дофаминергической и серотонинергической активностей в гипоталамусе крыс Wistar, но не SD [Bekris et al., 2005]. Очевидно, что сравнение различных линий животных осложняется тем, что животные одной линии (породы), полученные из разных питомников, могут значительно различаться по характеристикам. Так, показано, что крысы SD, полученные из питомников Harlan и Charles River, существенно различаются по метаболическим и поведенческим параметрам и проявляют значительные различия в иммунном и нейроэндокринном ответе на воспалительные стимулы и стрессовые воздействия [Turnbull et al., 1999;

Pecoraro et al., 2006; Brower et al., 2015], а крысы Wistar из разных питомников проявляют различную чувствительность к процедуре НХС [Theilmann et al., 2016].

Питомник Charles River является одним из ведущих поставщиков лабораторных животных, однако ранее не проводилось прямого сравнения крыс Wistar и SD из данного питомника в условиях НХС и острой низкодозовой эндотоксемии, вызванной системным введением ЛПС, — модели депрессивноподобного поведения, связанного с воспалительным ответом [Yirmiya et al., 2001; De La Garza II, 2005]. Основной целью настоящей работы являлось сравнение изменений в гедоническом статусе, пищевой активности и массе тела самцов крыс линий SD и Wistar Hannover (Wistar Han, WH), полученных из питомника Charles River (Германия), в модели НХС. Нами также было проведено сравнение влияния системно вводимого ЛПС в низкой дозе (25 мкг/кг) на данные параметры, а также на поведение в тестах ОП и “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) и маркеры воспалительного ответа (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) и стресса (кортикостерон) у крыс SD и WH.

МЕТОДИКА

Животные. Работа выполнена на самцах крыс Sprague Dawley и Wistar Han, доставленных из питомника лабораторных животных Charles River Laboratories Germany (г. Зульцфельд, Германия) авиатранспортом. Средние массы тела животных на момент начала экспериментов составляли: острая низкодозовая эндотоксемия — SD 259 ± 7 г, WH 270 ± 6 г; процедура НХС — SD 265 ± 4 г, WH 313 ± 3 г. Эксперименты проводились в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных Министерства здравоохранения и регламентом ИМГ РАН.

Животных содержали в стандартных условиях вивария (21–23°C) со свободным доступом к воде и корму и 12-часовым циклом освещения (8:00–20:00 свет, 20:00–8:00 темнота) по 3–5 животных в клетках 25 × 19 × 40 см. Для всех крыс проводили 10-дневную адаптацию к условиям эксперимента — ежедневный хэндлинг в течение 1–2 мин с имитацией внутрибрюшинной инъекции. Экспериментальные манипуляции с животными проводили в светлой фазе суток.

Введение препаратов. В экспериментах использовали стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl), приготовленный на апиrogenной воде MilliQ. Препарат ЛПС (*E. coli* O55:B5) (Difco Labs, США) растворяли в стерильном физиологическом растворе, замораживали, хранили при –80°C и размораживали непосредственно перед использованием.

Острая низкодозовая эндотоксемия. Животные подопытных групп получали внутрибрюшинную инъекцию раствора ЛПС, предварительно нагретого до 37°C (доза 25 мкг/кг, объем введения 1 мл/кг массы тела). Животным контрольных групп вводили аналогичный объем стерильного физиологического раствора. После инъекций животных помещали в домашние клетки. Через 90 мин после инъекции у животных отбирали по 0.1 мл крови для определения уровней TNF- α и кортикостерона в сыворотке крови. Животных помещали в пластиковые иммобилизационные камеры и стерильным инструментом отрезали обработанный 0.05% раствором хлоргексидина кожистый конец хвоста. Кровь собирали в стерильные микропробирки “эппендорф” и помещали в тающий лед. Крыс после забора крови на 30 мин помещали в одиночные клетки для контроля прекращения кровотечения, а затем переносили в домашние клетки. Наличие воспалительного ответа через 90 мин после введения ЛПС (время, соответствующее максимальному уровню TNF- α [Asari et al., 1996]) оценивали по уровню TNF- α в периферической крови. Получивших инъекцию ЛПС животных с недетектируемым уровнем TNF- α исключали из анализа. Через 4 ч после инъекции животных подвергали тестам “Открытое поле” и “Приподнятый крестообразный лабиринт” с интервалом 10 мин. Через 6 ч после инъекции животных рассаживали в одиночные клетки для проведения теста на предпочтение сахара.

Непредсказуемый хронический стресс (НХС). Животных контрольных и стрессовых групп содержали в отдельных помещениях с идентичными температурными и световыми условиями. В течение 7 нед крыс ежедневно подвергали действию одного из нижеперечисленных стрессоров (табл. 1). Каждый стрессор предъявляли не чаще 1 раза в неделю. Ежедневно проводили взвешивание животных. Кроме того, раз в неделю оценивали гедонический статус крыс с помощью

Таблица 1. Воздействия, применявшиеся в процедуре НХС**Table 1.** Stressors used in the CUS protocol

Стрессор	Длительность, час
Депривация по воде	18
Иммобилизация при +4°C	1
Иммобилизация при +21–23°C	3
Перенаселение (12 или 15 крыс в стандартной клетке)	18
Мокрая подстилка/Замена подстилки на слой воды 1.5 см	18
Изменение светового режима с 12-часового цикла на 2-часовой	46

теста на предпочтение сахарозы. Перед проведением этого теста крысам не предъявляли никаких стрессоров на протяжении суток. В ходе теста на предпочтение сахарозы определяли потребление корма и суммарное потребление жидкости (общее количество потребленных воды и раствора сахарозы). Через сутки после окончания процедуры НХС животных декапитировали, собирали кровь, выделяли надпочечники и тимусы для дальнейшего анализа. Образцы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Тест на предпочтение сахарозы. У животных измеряли массу тела, помещали в индивидуальные клетки и на ночь (18 ч) предоставляли свободный доступ к заранее взвешенному корму и 4 идентичным шариковым поилкам, две из которых содержали питьевую воду, а две — раствор сахарозы (0.3 или 0.4%) в такой же воде. Поилки располагали с чередованием воды и раствора сахарозы. После окончания теста корм и поилки взвешивали повторно. Предпочтение сахарозы определяли как отношение потребления раствора сахарозы (г) к суммарному потреблению жидкости (г). Уровень пищевой активности вычисляли как отношение массы потребленного корма или жидкости (г) к массе тела животного перед началом теста (г).

У крыс обеих линий до начала экспериментов определяли минимальную предпочитаемую концентрацию раствора сахарозы. Для этого животным в вышеописанных условиях предлагали раствор сахарозы с возрастающей концентрацией (0.1, 0.2, 0.3, 0.4%) с перерывом не менее суток между тестами. Минимальной предпочитаемой концентрацией раствора сахарозы считали такую, при кото-

рой предпочтение сахарозы составляло для каждого животного не менее 75%. Для каждой крысы за 5–7 дней до начала эксперимента выявляли базальный уровень предпочтения сахарозы.

Тест “Открытое поле” (ОП, через 4 ч после введения ЛПС) применяли для оценки уровня исследовательской активности. Экспериментальная камера — круглое поле с отверстиями (диаметр 97 см, высота стенок 42 см, диаметр отверстий 2 см). Эксперимент проводился при однородном неярком освещении (120 люкс). Крысу помещали в центр арены и в течение 3 мин регистрировали число посещенных сегментов арены (ГДА), число стоек (подъемов на задние лапы; вертикальная двигательная активность), число обследованных норок, число выходов в центр арены, число умываний (груминг).

Тест “Приподнятый крестообразный лабиринт” применяли для оценки уровня тревожности и проводили через 10 мин после теста ОП. Экспериментальная камера состоит из четырех расходящихся из центра рукавов (длина рукавов 50 см, ширина — 15 см, высота стенок — 20 см). Два противоположных рукава закрыты с торцов и боков стенками и затемнены (5 люкс), два других открыты и освещены (600 люкс). Крысу помещали в центр лабиринта и в течение 3 мин регистрировали время, проведенное в закрытых и открытых рукавах лабиринта, число выходов на открытые рукава, число пересечений центра лабиринта, число свешиваний с открытых рукавов, число стоек и число умываний.

Определение уровней TNF- α и кортикостерона. Сыворотку крови получали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 g после инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. Измерение уровней TNF- α и кортикостерона в сыворотке периферической крови (90 мин после введения ЛПС) и кортикостерона в сыворотке постдекапитационной крови (через сутки после окончания процедуры НХС) проводили с использованием наборов “Rat TNF- α ELISA antibody pair” (“U-CyTech biosciences”, Нидерланды) и “Corticosterone Parameter Assay Kit” (“R&D Systems”, США) соответственно согласно методикам и рекомендациям производителей.

Статистическая обработка. Обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ “GraphPad Prism 7.0”. Использовали критерий Стьюдента и дис-

персионный анализ (ANOVA) (методы анализа приведены в разделе Результаты исследований). Оценку нормальности распределенных выборок проводили с помощью критерия Д'Агостино-Пирсона (D'Agostino & Pearson). Оценку однородности дисперсий выборок проводили с помощью критерия Брауна-Форсайта (Brown & Forsythe). При необходимости проводили трансформацию данных (логарифмическая, степенная, арксинус, квадратный корень) для достижения соответствия выборок указанным критериям. Использовали 3-факторный ANOVA для повторных измерений для факторов "Линия" (SD/WH), "Стресс" (Контроль/НХС) и "Время" или 2-х факторный ANOVA для факторов "Линия" (SD/WH) и "ЛПС (Стресс)" (Контроль/ЛПС(НХС)). Множественные сравнения групповых средних проводили с помощью теста Шидака (Sidak's multiple comparisons test). В случае 3-факторного ANOVA при наличии значимых взаимодействий между факторами проводили последующие 2-факторные ANOVA для различных уровней взаимодействующих факторов. При наличии взаимодействия с повторным фактором "Время" проводили множественные сравнения групповых средних для каждой временной точки. Уровень статистической значимости принимали равным 0.05. Данные на рисунках представлены в виде (Среднее \pm Стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Минимальная предпочитаемая концентрация раствора сахарозы

У крыс SD предпочтение раствора сахарозы с концентрацией 0.3% было значительно ниже ($65.3 \pm 3.1\%$), чем раствора сахарозы с концентрацией 0.4% ($73.3 \pm 3.4\%$) (парный t -тест, $t = 3.92$; $p < 0.001$) и ниже уровня предпочтения 0.3% раствора сахарозы у крыс WH ($75.6 \pm 1.8\%$) (непарный t -тест, $t = 3.29$; $p < 0.01$). Предпочтение крысами SD 0.4% раствора значимо не отличалось от предпочтения 0.3% раствора сахарозы крысами WH (непарный t -тест, $t = 0.42$; $p = 0.68$).

На основании этих данных в дальнейшем при проведении теста на предпочтение сахарозы для крыс SD использовали 0.4% раствор, а для крыс WH – 0.3% раствор сахарозы.

Острая низкодозовая эндотоксемия

Изменение массы тела. Проведенный статистический анализ (2-факторный ANOVA) выявил значимое взаимодействие факторов "ЛПС" и "Линия" ($F_{1,31} = 4.20$; $p < 0.05$). Множественные сравнения обнаружили значимое снижение массы тела под влиянием ЛПС у крыс SD, но не у крыс WH (рис. 1а).

Потребление корма и жидкости. Проведенный 2-факторный ANOVA выявил эффекты фактора "ЛПС" на относительное потребление корма ($F_{1,31} = 56.63$; $p < 0.001$) и относительное потребление жидкости ($F_{1,31} = 22.19$; $p < 0.001$). Влияния фактора "Линия" и взаимодействия факторов обнаружено не было, что свидетельствует о значимом снижении относительного потребления корма и жидкости под влиянием ЛПС у крыс обеих линий в равной степени (рис. 1б и 1в).

Предпочтение раствора сахарозы. Проведенный 3-факторный RM-ANOVA по факторам "Линия" и "ЛПС" и повторному фактору "Время" (уровни фактора: базовая точка и экспериментальная точка) выявил взаимодействие факторов "Линия" и "Время" ($F_{1,32} = 11.55$; $p < 0.01$). Отдельно для каждой линии были проведены 2-факторные RM-ANOVA по факторам "ЛПС" и повторному фактору "Время". Для SD был выявлен только эффект фактора "Время" ($F_{1,16} = 29.01$; $p < 0.001$), что свидетельствует об отсутствии влияния ЛПС на предпочтение сахарозы и значимом снижении предпочтения сахарозы у крыс SD в условиях эксперимента по сравнению с базовой точкой. Для WH было обнаружено взаимодействие факторов "ЛПС" и "Время" ($F_{1,16} = 4.95$; $p < 0.05$). Множественные сравнения не обнаружили изменения предпочтения сахарозы по сравнению с базовым значением у крыс WH, получивших инъекцию физиологического раствора, но выявили у животных, получивших инъекцию ЛПС, значимое снижение предпочтения сахарозы по сравнению с контролем (рис. 2).

Уровни TNF- α и кортикостерона в крови (90 мин после введения ЛПС). У крыс контрольных групп обеих линий уровни TNF- α в сыворотке крови были ниже чувствительности метода (2 пг/мл), поэтому не были включены в анализ. У крыс SD индуцированные ЛПС уровни TNF- α (13.9 ± 0.6 нг/мл) были значимо выше, чем у крыс WH (6.6 ± 0.8 нг/мл) (непарный t -тест, $t = 7.29$; $p < 0.001$). Для уровней кортикостерона в сыворотке крови 2-факторный

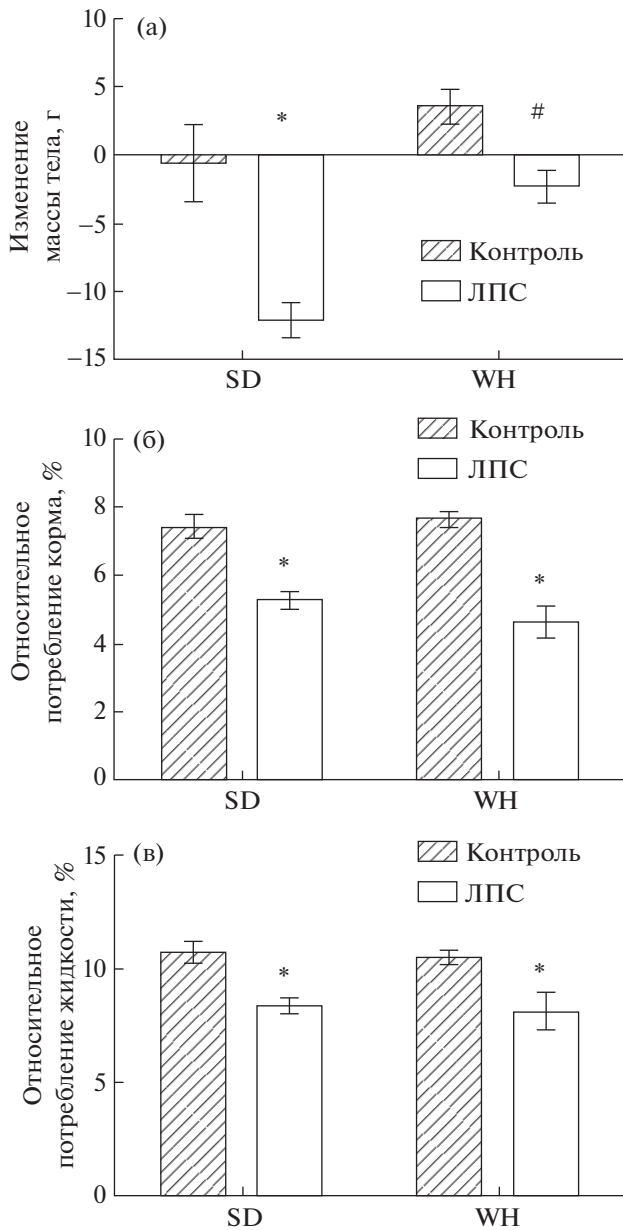


Рис. 1. Изменение массы тела (а), относительное потребление корма (б) и жидкости (в) в условиях сахарозного теста у крыс SD и WH в контроле и под влиянием инъекции ЛПС.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ по сравнению с линией SD. Количество животных: SD – N(Контроль) = 8, N(ЛПС) = 9, WH – N(Контроль) = 10, N(ЛПС) = 8.

Fig. 1. Body weight change (a), relative feed consumption (b) and relative fluid consumption (c) under the sucrose preference test in the control and LPS-injected SD and WH rats.

* $p < 0.05$ against controls, # $p < 0.05$ against SD rats. Numbers of animals: SD – N(Controls) = 8, N(LPS) = 9, WH – N(Controls) = 10, N(LPS) = 8.

ANOVA выявил значимое взаимодействие факторов “Линия” и “ЛПС” ($F_{1,31} = 6.89$; $p < 0.05$). Концентрация кортикостерона имела

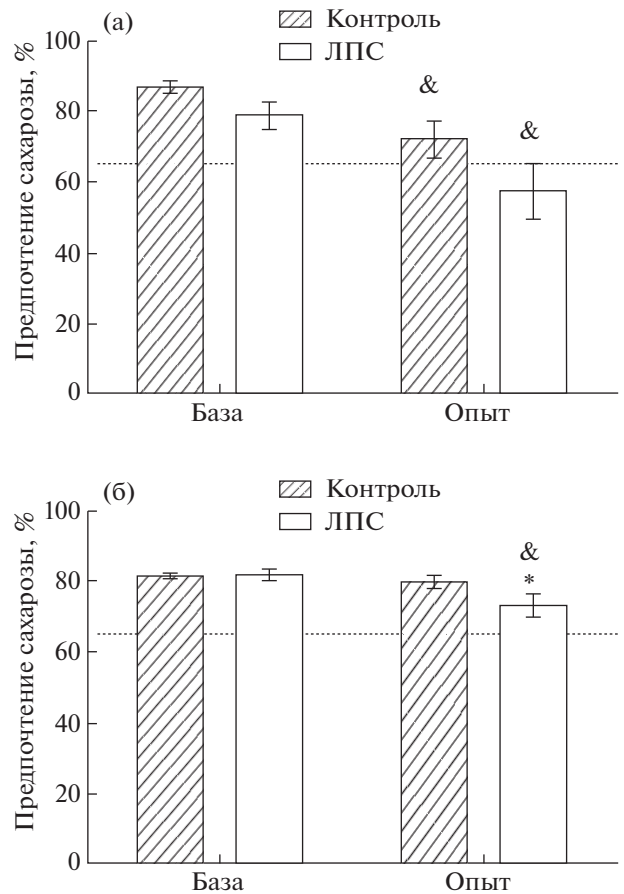


Рис. 2. Предпочтение раствора сахарозы у крыс SD (а) и WH (б) в контроле и под влиянием инъекции ЛПС. Пунктирной линией показан уровень предпочтения сахарозы, соответствующий критерию ангедонии (<65%).

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем, & $p < 0.01$ по сравнению с базальной точкой. Количество животных: SD – N(Контроль) = 8, N(ЛПС) = 9, WH – N(Контроль) = 10, N(ЛПС) = 8.

Fig. 2. Preference of the sucrose solution in the control and LPS-injected SD (a) and WH (b) rats. The dashed line shows the level of sucrose preference corresponding to the criterion of anhedonia (<65%).

* $p < 0.05$ against controls, & $p < 0.01$ against basal level. Numbers of animals: SD – N(Controls) = 8, N(LPS) = 9, WH – N(Controls) = 10, N(LPS) = 8.

следующие значения: контрольная группа SD – 51.4 ± 10.1 нг/мл, группа ЛПС SD – 128.0 ± 21.1 нг/мл, контрольная группа WH – 30.4 ± 7.1 нг/мл, группа ЛПС WH – 182.0 ± 14.3 нг/мл. Множественные сравнения выявили значимое повышение уровней кортикостерона у животных обеих линий при введении ЛПС и более высокие, индуцированные ЛПС, уровни кортикостерона у крыс WH, чем у крыс SD.

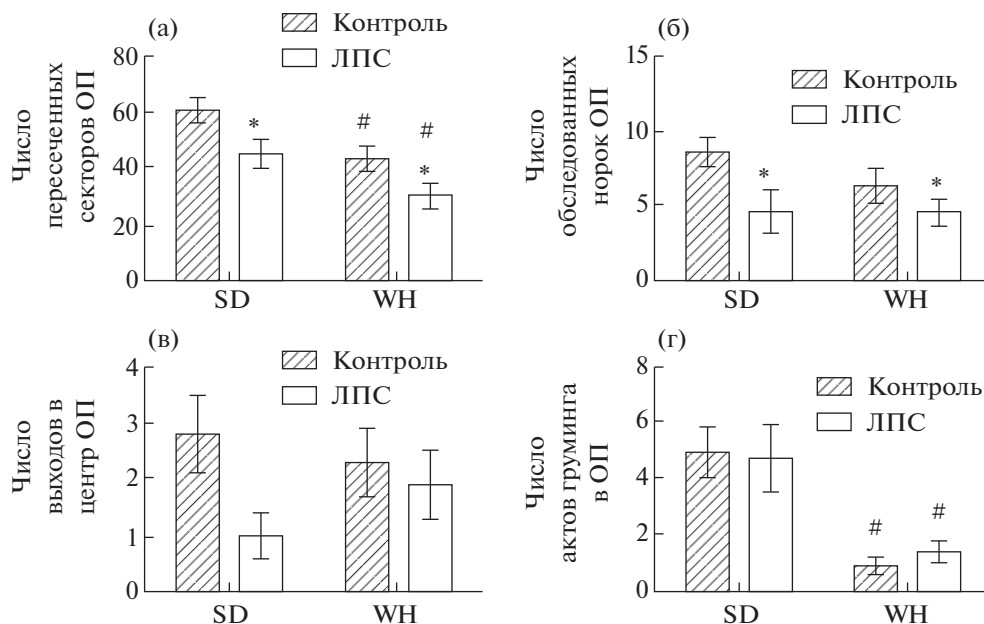


Рис. 3. Изменение параметров поведения крыс SD и WH под влиянием ЛПС в тесте “открытое поле”. (а) – число пересеченных секторов (ГДА), (б) – число обследованных норок, (в) – число выходов в центр арены, (г) – число актов груминга.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ по сравнению с линией SD. Количество животных: SD – N(Контроль) = 8, N(ЛПС) = 9. WH – N(Контроль) = 10, N(ЛПС) = 8.

Fig. 3. Results of Open Field Test in the control and LPS-injected SD and WH rats. (a) – the number of line crossings (horizontal motor activity), (b) – the number of explored holes, (c) – the number of center square entries, (d) – the number of grooming acts.

* $p < 0.05$ against controls, # $p < 0.05$ against SD rats. Numbers of animals: SD – N(Controls) = 8, N(LPS) = 9, WH – N(Controls) = 10, N(LPS) = 8.

Поведение в тесте “Открытое поле”. Проведенный 2-факторный ANOVA выявил значимый эффект фактора “ЛПС” на горизонтальную двигательную активность (ГДА), ($F_{1,31} = 9.12$; $p < 0.01$) и число обследованных норок ($F_{1,31} = 6.28$; $p < 0.05$), а также влияние этого фактора на уровне тенденции на число выходов в центр арены ($F_{1,31} = 3.52$; $p = 0.07$). Под влиянием ЛПС эти показатели снижались (рис. 3). Кроме того, был зарегистрирован значимый эффект фактора “Линия” на ГДА ($F_{1,31} = 11.71$; $p < 0.01$) и число актов груминга ($F_{1,31} = 22.37$; $p < 0.001$). У крыс SD ГДА и уровень груминга были выше, чем у крыс WH (рис. 3). Статистически значимого влияния на остальные показатели, а также значимого взаимодействия указанных факторов, отмечено не было ($F_{1,31} < 1.5$; $p > 0.25$). Характер зарегистрированных изменений свидетельствует о повышенном уровне двигательной активности и эмоциональной напряженности у крыс SD по сравнению с WH. Введение ЛПС вызывало снижение исследовательского поведения у крыс обеих линий.

Поведение в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Проведенный 2-факторный ANOVA выявил значимый эффект фактора “ЛПС” на число стоек ($F_{1,31} = 7.96$; $p < 0.02$), а также влияние этого фактора на уровне тенденции на число свешиваний с открытых рукавов лабиринта ($F_{1,31} = 3.78$; $p = 0.06$). Введение ЛПС приводило к снижению этих показателей у крыс обеих линий (рис. 4). Также был выявлен значимый эффект фактора “Линия” на число пересечений центра лабиринта ($F_{1,31} = 7.72$; $p < 0.01$) и число актов груминга ($F_{1,31} = 5.32$; $p < 0.03$). В группах крыс SD величина этих показателей превышала соответствующие значения в группах крыс WH, что указывает на повышенную двигательную активность и эмоциональную напряженность крыс SD относительно WH (рис. 4). Статистически значимого влияния на остальные показатели, а также значимого взаимодействия указанных факторов отмечено не было ($F_{1,31} < 0.5$; $p > 0.50$). Инъекция ЛПС приводила к снижению исследовательского поведения у крыс SD и WH,

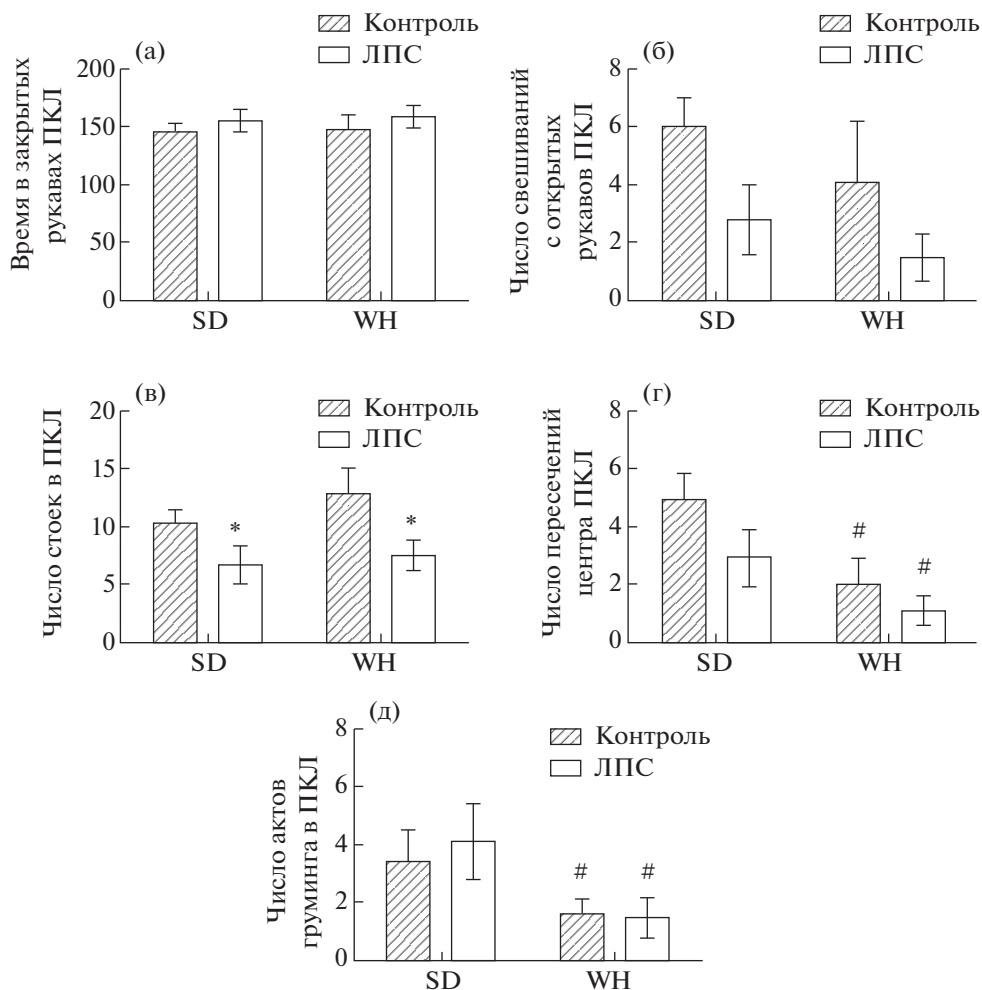


Рис. 4. Изменение параметров поведения крыс SD и WH под влиянием ЛПС в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”. (а) – время, проведенное в закрытом отсеке, (б) – число свешиваний с открытых рукавов, (в) – число стоек, (г) – число пересечений центра лабиринта, (д) – число актов груминга.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # $p < 0.05$ по сравнению с линией SD. Количество животных: SD – N(Контроль) = 8, N(ЛПС) = 9. WH – N(Контроль) = 10, N(ЛПС) = 8.

Fig. 4. Results of Elevated Plus Maze Test in the control and LPS-injected SD and WH rats. (a) – time in the closed arm, (b) – the number of head dips from the open arms, (c) – the number of rears, (d) – the number of center square crossings, (e) – the number of grooming acts. Numbers of animals: SD – N(Controls) = 8, N(LPS) = 9, WH – N(Controls) = 10, N(LPS) = 8.

* $p < 0.05$ against controls, # $p < 0.05$ against SD rats. Number of animals: SD – N(Controls) = 8, N(LPS) = 9, WH – N(Controls) = 10, N(LPS) = 8.

но не влияла на уровень тревожности животных.

Непредсказуемый хронический стресс

Изменение массы тела. Данные о влиянии процедуры НХС на массу тела животных представлены на рис. 5а. Проведенный 3-факторный RM-ANOVA по факторам “Линия” и “Стресс” и повторному фактору “Время” выявил взаимодействие всех трех факторов ($F_{6,282} = 77.11$; $p < 0.001$). Последующие 2-факторные RM-ANOVA по факторам “Стресс” и

повторному фактору “Время”, проведенные отдельно для каждой линии, выявили значимые взаимодействия двух факторов ($F_{7,175} = 96.82$; $p < 0.001$ для SD и $F_{7,154} = 45.47$; $p < 0.001$ для WH). Множественные сравнения обнаружили значимое снижение массы тела у стрессируемых животных по сравнению с контролем для всех временных точек, начиная с 3-й недели НХС у крыс SD и с 6-й недели НХС у WH. Были проведены 2-факторные RM-ANOVA по факторам “Линия” и повторному фактору “Время” отдельно для кон-

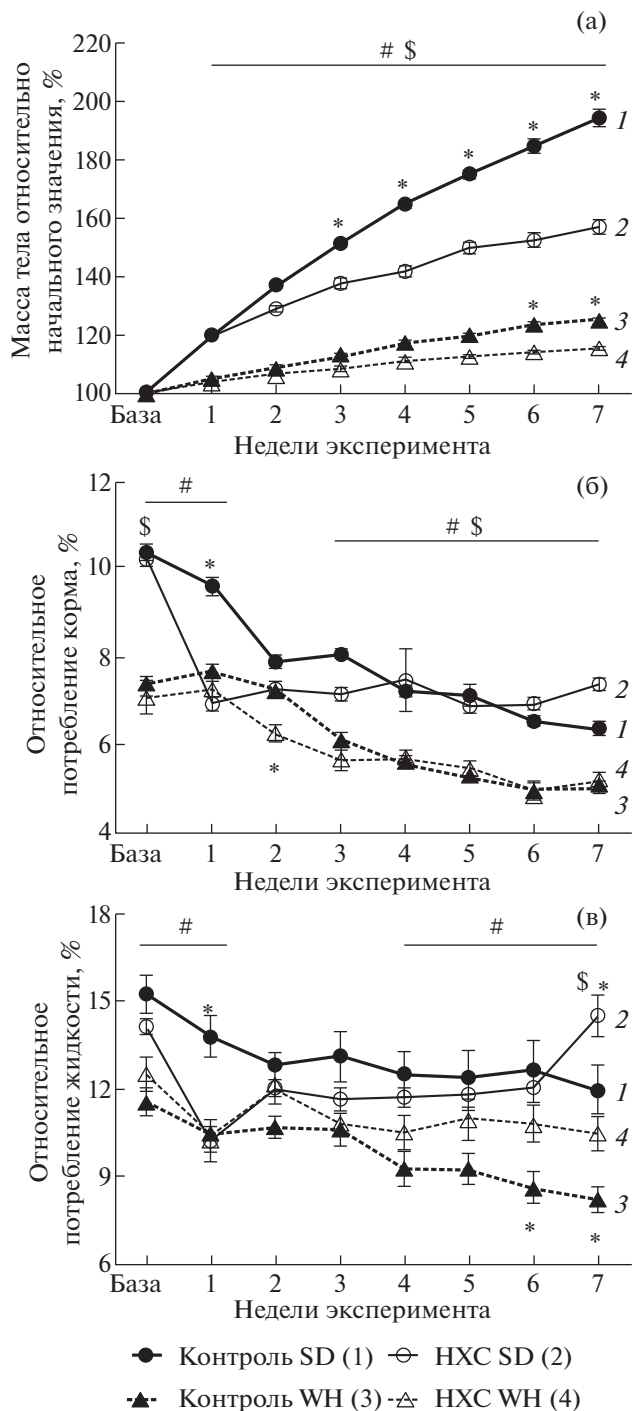


Рис. 5. Изменение массы тела (а), относительного потребления корма (б) и жидкости (в) у крыс SD и WH в контроле и под влиянием HXC.

* $p < 0.05$ HXC по сравнению с контролем внутри линии, # $p < 0.05$ контроль WH по сравнению с контролем SD, \$ $p < 0.05$ HXC WH по сравнению с HXC SD. Количество животных: SD – N(Контроль) = 12, N(HXC) = 15, WH – N(Контроль) = 12, N(HXC) = 12.

Fig. 5. Effects of the CUS procedure on body weight (a), relative feed consumption (b) and relative fluid consumption (c) in SD and WH rats.

* $p < 0.05$ against same-strain controls, # $p < 0.05$ WH controls against SD controls, \$ $p < 0.05$ CUS WH rats against CUS SD rats. Numbers of animals: SD – N(Control) = 12, N(CUS) = 15, WH – N(Control) = 12, N(CUS) = 12.

трольных и стрессируемых животных. Для контрольных животных обнаружено взаимодействие указанных факторов ($F_{7, 154} = 385.9$; $p < 0.001$), и множественные сравнения выявили более быстрый прирост массы тела у крыс SD по сравнению с WH на всем протяжении экспериментального периода. Для стрессированных животных также было обнаружено взаимодействие факторов “Линия” и “Время” ($F_{7, 175} = 163.6$; $p < 0.001$), и множественные сравнения также выявили больший прирост массы тела у крыс SD по сравнению с WH для всех временных точек процедуры НХС. Таким образом, НХС вызывал снижение прироста массы тела у крыс SD на 3 нед раньше, чем у WH. Прирост массы тела у SD выше, чем у WH как у контрольных, так и у стрессируемых животных.

Потребление корма. Данные о влиянии процедуры НХС на относительное потребление корма представлены на рис. 5б. Проведенный 3-факторный RM-ANOVA по факторам “Линия” и “Стресс” и повторному фактору “Время” выявил взаимодействие всех трех факторов ($F_{7, 329} = 6.45$; $p < 0.001$). Последующие 2-мерные RM-ANOVA по фактору “Стресс” и повторному фактору “Время”, проведенные отдельно для каждой линии, выявили значимые взаимодействия этих факторов ($F_{7, 175} = 10.45$; $p < 0.001$ для SD и $F_{7, 154} = 4.12$; $p < 0.001$ для WH). Множественные сравнения обнаружили значимое снижение относительного потребления корма у стрессируемых животных по сравнению с контролем после 1-й недели НХС у крыс SD и 2-й недели НХС у WH, а также тенденцию к повышению потребления корма после 7 нед НХС у SD ($p = 0.069$). Были проведены 2-факторные RM-ANOVA по фактору “Линия” и повторному фактору “Время” отдельно для контрольных и стрессируемых животных. Для контрольных животных было обнаружено взаимодействие указанных факторов ($F_{7, 154} = 17.66$; $p < 0.001$), и множественные сравнения показали, что у крыс SD относительное потребление корма выше, чем у WH во всех исследованных временных точках эксперимента, за исключением 2-й недели. Для стрессированных животных также было обнаружено взаимодействие “Линия × Время” ($F_{7, 175} = 7.63$; $p < 0.001$); множественные сравнения выявили более высокое потребление корма у крыс SD по сравнению с WH для всех временных точек процедуры НХС, за ис-

ключением 1-й и 2-й недель НХС. Таким образом, НХС вызывал снижение потребления корма только на ранних этапах процедуры (1 неделя крысы SD и 2 недели – WH). Потребление корма выше у SD, чем у WH как у контрольных, так и у стрессируемых животных.

Потребление жидкости. Данные о влиянии процедуры НХС на относительное потребление жидкости представлены на рис. 5в). Проведенный 3-факторный RM-ANOVA по факторам “Линия” и “Стресс” и повторному фактору “Время” выявил взаимодействие всех трех факторов ($F_{7, 329} = 2.79$; $p < 0.01$). Проведенные отдельно для каждой линии 2-факторные RM-ANOVA по фактору “Стресс” и повторному фактору “Время” выявили значимое взаимодействие двух факторов ($F_{7, 175} = 10.99$; $p < 0.001$ для SD и $F_{7, 154} = 7.11$; $p < 0.001$ для WH). Множественные сравнения обнаружили значимое снижение потребления жидкости после 1-й недели НХС и повышение после 7 нед у стрессированных животных по сравнению с контролем для SD, а для WH – значимое повышение потребления жидкости после 6-й и 7-й недель НХС. Были проведены 2-факторные RM-ANOVA по фактору “Линия” и повторному фактору “Время” отдельно для контрольных и стрессированных животных. Для контрольных животных обнаружено взаимодействие указанных факторов ($F_{7, 154} = 2.83$; $p < 0.01$), и множественные сравнения показали, что у крыс SD по сравнению с WH выше относительное потребление жидкости во всех исследованных временных точках, за исключением 2-й и 3-й недели. Для стрессированных животных также обнаружено взаимодействие данных факторов ($F_{7, 175} = 7.03$; $p < 0.001$); множественные сравнения выявили более высокое относительное потребление жидкости у крыс SD по сравнению с WH только после 7-й недели НХС. Таким образом, НХС вызывал снижение потребления жидкости только у крыс SD и только на раннем этапе процедур (1 неделя). Отмечено повышение потребления жидкости на поздних этапах процедуры НХС и у крыс SD (7-я неделя), и у WH (6-я и 7-я недели). Потребление жидкости контрольными животными выше у SD, чем у WH (кроме 2 и 3 нед эксперимента).

Предпочтение сахарозы. Данные о влиянии процедуры НХС на предпочтения раствора сахарозы представлены на рис. 6. Проведен-

ный 3-факторный RM-ANOVA по факторам “Линия” и “Стресс” и повторному фактору “Время” не обнаружил взаимодействия всех трех факторов, но выявил взаимодействие между факторами “Линия” и “Время” ($F_{7,329} = 2.175$; $p < 0.05$). Проведенные отдельно для каждой линии 2-факторные RM-ANOVA по факторам “Стресс” и повторному фактору “Время”, выявили значимое взаимодействие “Стресс x Время” для SD ($F_{7,175} = 1.99$; $p < 0.05$). Множественные сравнения обнаружили значимое снижение предпочтения раствора сахарозы у стрессированных животных по сравнению с контролем после 1-й и 3-й недель процедуры НХС. Для WH был обнаружен только эффект фактора “Время” ($F_{7,154} = 2.14$; $p < 0.05$). Таким образом, НХС вызывал снижение предпочтения сахарозы у крыс SD после 1 и 3 недель процедуры, но не влиял на предпочтение сахарозы у WH.

Масса надпочечников, тимусов, уровень кортикостерона. Проведенный 2-факторный ANOVA по факторам “Линия” и “Стресс” для влияния НХС на относительные массы надпочечников и тимусов обнаружил взаимодействие факторов (надпочечники: $F_{1,47} = 4.90$; $p < 0.05$; тимусы: $F_{1,47} = 32.75$; $p < 0.001$). Множественные сравнения выявили увеличение массы надпочечников после процедуры НХС у крыс SD, но не у крыс WH, большую массу тимусов у контрольных крыс WH по сравнению с SD и снижение массы тимусов в результате процедуры НХС у крыс WH, но не SD. Проведенный 2-факторный ANOVA по факторам “Линия” и “Стресс” для влияния НХС на уровни кортикостерона в сыворотке крови через сутки после окончания процедуры НХС не выявил эффектов факторов и их взаимодействия. Таким образом, НХС вызывал увеличение массы надпочечников у крыс SD, снижение массы тимусов у WH и не влиял на уровни кортикостерона в сыворотке крови, полученной через 1 сутки после окончания процедуры. У контрольных крыс WH масса тимусов выше, чем у SD, но не обнаружено различий в уровне кортикостерона в сыворотке крови и в массе надпочечников (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты свидетельствуют о значительных различиях по ряду поведенческих и физиологических параметров между контрольными (не подвергавшимися проце-

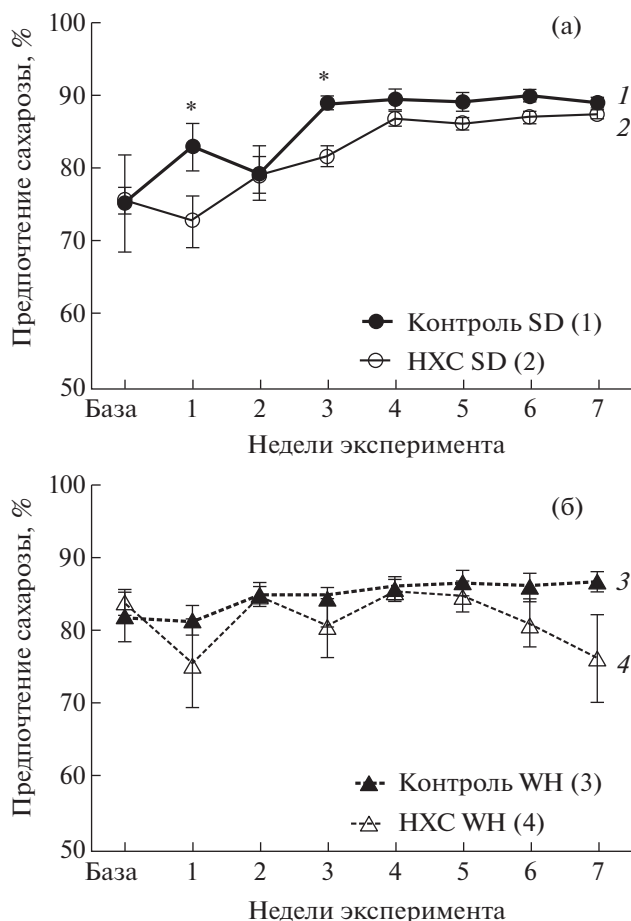


Рис. 6. Предпочтение раствора сахарозы у крыс SD (а) и WH (б) в контроле и под влиянием НХС в течение 7 недель.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем. Количество животных: SD – N(Контроль) = 12, N(НХС) = 15, WH – N(Контроль) = 12, N(НХС) = 12.

Fig. 6. Effects of the CUS procedure on sucrose preference in SD (a) and WH (b) rats.

* $p < 0.05$ against controls. Numbers of animals: SD – N(Controls) = 12, N(CUS) = 15, WH – N(Controls) = 12, N(CUS) = 12.

дуре НХС и введению ЛПС) самцами крыс Sprague Dawley (SD) и Wistar Han (WH), полученных из питомника Charles River, Германия. Нами было показано, что крысы SD демонстрировали более высокую скорость прироста массы тела по сравнению с крысами WH. Относительная масса тимусов была ниже у крыс SD, чем у WH, но относительная масса надпочечников значимо не различалась. Ранее сравнение ряда физиологических параметров крыс SD и WH проводилось с использованием животных из питомника Charles River, Япония [Hayakawa et al., 2013].

Таблица 2. Изменения относительной массы надпочечников, относительной массы тимусов и концентрации кортикостерона в сыворотке крови под влиянием НХС (7 нед) у крыс линий SD и WH**Table 2.** Effects of the CUS procedure (7 weeks) on relative adrenal gland weight, relative thymus weight and serum corticosterone levels in SD and WH rats

Показатели	SD		WH	
	Контроль (N = 12)	НХС (N = 15)	Контроль (N = 12)	НХС (N = 12)
Относительная масса надпочечников, %	0.014 ± 0.001	0.018 ± 0.001*	0.016 ± 0.001	0.016 ± 0.001
Относительная масса тимусов, %	0.121 ± 0.010	0.118 ± 0.007	0.176 ± 0.008#	0.153 ± 0.005*#
Кортикостерон в сыворотке крови, нг/мл	125.3 ± 32.91	108.8 ± 13.72	94.19 ± 14.38	86.94 ± 12.01

Примечание: * – $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим контролем, # – $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим значением у крыс SD.

Note: * – $p < 0.05$ against corresponding controls, # – $p < 0.05$ against corresponding value in SD rats.

Авторами были зарегистрированы сниженная относительная масса тимуса и увеличенная масса тела у крыс SD по сравнению с крысами WH, что согласуется с результатами, полученными в данной работе.

Сравнение параметров поведения контрольных крыс SD и WH показало, что у крыс линии SD горизонтальная двигательная активность в тесте ОП и число пересечений центра лабиринта в тесте ПКЛ были значимо выше, чем у WH, что свидетельствует о высоком уровне двигательной и исследовательской активности у крыс SD. Кроме того, у крыс SD был отмечен повышенный уровень груминга в тестах ОП и ПКЛ по сравнению с крысами WH, что является показателем высокого уровня эмоциональной напряженности при помещении в новые условия. Показатели, отражающие уровень тревожности (число выходов в центр арены в ОП и время, проведенное на открытых рукавах ПКЛ), у крыс SD и WH значимо не отличались. Ранее не было выявлено различий в параметрах поведения в ОП крыс SD и WH из питомника Charles River, Великобритания [McDermott, Kelly, 2008] и питомника Harlan, США [Tang et al., 2005]. Противоречивость полученных в ОП данных может быть связана как с различиями в условиях тестирования (яркая освещенность арены [McDermott, Kelly, 2008] и большая продолжительность тестирования [Tang et al., 2005]), так и с происхождением крыс из разных питомников. Сопоставление результатов, полученных разными авторами, изучавших поведение либо крыс SD [Bies-

mans et al., 2016; Tang et al., 2016; Liu et al., 2017], либо Wistar [Moraes et al., 2017; Zhang et al., 2017] в тесте ОП, подтверждает более высокую исследовательскую активность у крыс SD относительно крыс WH.

Отличий по уровню тревожности крыс SD и WH (питомник Charles River, Великобритания), как и в наших экспериментах, зарегистрировано не было [McDermott, Kelly, 2008]. Существенным обстоятельством является то, что и в работе [McDermott, Kelly, 2008], и в нашем исследовании тестирование поведения проводили после внутрибрюшинных инъекций физиологического раствора контрольным животным (через 30 мин [McDermott, Kelly, 2008] и через 4 ч в наших экспериментах). Хотя низкие уровни кортикостерона в крови контрольных животных указывают на отсутствие у них стрессового ответа на инъекции, отбор крови у животных проводился за 2.5 ч до тестов. Поэтому в связи с тем, что стрессогенные манипуляции могут снижать тревожность крыс SD в последующем тесте ПКЛ в зависимости от интенсивности воздействий [Doremus-Fitzwater et al., 2009], следует учитывать возможность маскировки различий в уровнях тревожности и контрольных, и получивших инъекцию ЛПС крыс SD и WH, вследствие предшествующих инъекций или процедуры отбора крови. Другим фактором, потенциально влиявшим на поведение в тесте ПКЛ, могло являться проведение теста ОП за 10 мин до ПКЛ. В нашей работе порядок тестов (ОП, а затем ПКЛ) определялся уровнем стрессорной нагрузки (однородное,

неяркое освещение арены открытого поля и контрастное освещение рукавов лабиринта). С учетом того, что 30-минутная изоляция или 30-минутное помещение в новые условия приводят лишь к умеренному снижению уровня тревожности крыс SD в лабиринте [Doremus-Fitzwater et al., 2009], проведенное перед ПКЛ тестирование в ОП (помещение в новые условия с невысокой стрессорной нагрузкой длительностью 3 мин), по-видимому, не вносило определяющий вклад в возможное вследствие предшествующих экспериментальных манипуляций изменение поведения в тесте ПКЛ.

Нами было проведено определение минимальных предпочитаемых концентраций раствора сахарозы для крыс данных линий без предварительного лишения животных воды и корма. Тест предпочтения сахарозы широко применяется в моделях депрессии для оценки у грызунов гедонического статуса и детекции ангедонии (снижение способности испытывать удовольствие), одного из ядерных симптомов депрессии. Минимальная концентрация раствора сахарозы, предпочтение которого воде превышало 65% (принятый как критерий отсутствия ангедонии в тесте предпочтения сахарозы [Strekalova et al., 2004]), была различной у крыс двух линий: 0.4% для SD и 0.3% для WH. Полученные нами значения минимальных предпочитаемых концентраций сахарозы существенно ниже обычно используемых для оценки у крыс гедонического статуса: 1% [Bekris et al., 2005; Niu et al., 2015; Zhang et al., 2016; Foyet et al., 2017; Sanna et al., 2018], 2% [Burstein et al., 2017; Morais et al., 2017], 3% [Riaz et al., 2015], 5% [Stepanichev et al., 2016] растворы сахарозы. Предполагается, что надежность детекции ангедонии снижается при использовании высоких концентраций раствора сахарозы [Willner, 2017], однако зависимость надежности детекции от концентрации сахарозы требует дальнейшего изучения. В подавляющем большинстве исследований тесту предпочтения сахарозы предшествует относительно длительное (до 24 ч) лишение контрольных и экспериментальных животных воды и корма [Willner, 2017]. При такой схеме проведения теста степень предпочтения сахарозы может отражать не только гедонический статус животного, но и энергетическую потребность, а также изменение водного баланса организма после голодания и отсутствия доступа к воде, в связи с чем энергетическая ценность слад-

кого раствора, определяемая концентрацией сахарозы, может влиять на степень его предпочтения воде. Лишение животных воды и пищи является метаболическим стрессором [Remus et al., 2015], часто используемым в процедуре НХС [Willner, 2017], и чувствительность к нему у хронически стрессированных и контрольных животных может отличаться. Так, показано, что пищевая и водная депривация приводит к снижению уровня глюкозы в крови у хронически стрессированных, но не у контрольных крыс [Remus et al., 2015]. С целью снижения возможного влияния энергетической ценности сладкого раствора на его предпочтение в сахарозном тесте, мы использовали в данной работе минимальные предпочитаемые крысами исследуемых линий концентрации сахарозы. Для исключения влияния метаболического стресса на предпочтение сахарозы мы использовали тестирование без предварительного лишения животных корма или воды, также применяемое для оценки гедонического статуса грызунов [Yirmiya, 1996; Willner, 1997; Couch et al., 2016]. Такая методика была использована нами ранее для изучения влияния НХС и острой эндотоксемии на самцов крыс Sprague Dawley [Markov et al., 2017], полученных из питомника “Пушино” ИБХ РАН (происхождение из питомника Charles River, США), в настоящее время выведенных из разведения.

В данной работе различия между линиями животных были обнаружены в условиях острой низкодозовой эндотоксемии, вызванной внутрибрюшинным введением ЛПС в низкой субсептической дозе (25 мкг/кг массы тела). Известно, что введение ЛПС вызывает синдром болезненного поведения (sickness behavior), включающего снижение двигательной активности и социального взаимодействия, потерю аппетита и уменьшение массы тела, снижение концентрации внимания, ангедонию и ряд других симптомов, аналогичных наблюдаемым при депрессии [Maes et al., 2012; Biesmans et al., 2013; Moraes et al., 2017]. Существенным ограничением данного подхода к моделированию депрессивных расстройств является невозможность воспроизведения хронического изменения поведения в связи с быстрым развитием у животных толерантности к ЛПС [Barr et al., 2003]. Однако введение ЛПС в низких дозах используется как модель острого депрессивноподобного поведения, связанного с воспалительными процессами [Yirmiya et al., 2001; De La Garza,

2005; Frenois et al., 2007; Henry et al., 2008; O'Connor et al., 2009]. Исследования на такой модели были проведены как на крысах линий SD [Yirmiya, 1996; Shen et al., 1999; Biesmans et al., 2016], так и Wistar [Moraes et al., 2017; Saeidienik et al., 2018], но авторами были использованы разные дозы ЛПС и разные интервалы времени между инъекцией ЛПС и тестированием, что не позволяет сопоставить изменения, зарегистрированные у крыс разных линий.

В нашем исследовании введение ЛПС в дозе 25 мкг/кг вызывало у крыс обеих линий увеличение содержания в крови наиболее быстро секретируемого провоспалительного цитокина TNF- α [Asari et al., 1996], что свидетельствует об индукции воспалительного ответа, а также возрастание уровня кортикостерона. При этом индуцированный ЛПС воспалительный ответ был более выражен у крыс SD. Более высокие индуцированные ЛПС уровни кортикостерона наблюдались у крыс WH, что указывает на большую чувствительность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси крыс WH к воспалению. Введение ЛПС вызывало у крыс SD более выраженное, чем у крыс WH, снижение массы тела, тогда как пищевая активность после введения ЛПС снижалась у крыс обеих линий в равной степени.

Нами было проведено сравнение изменений поведения крыс SD и WH в тестах ОП и ПКЛ под действием ЛПС. У крыс обеих линий после инъекции ЛПС отмечается снижение горизонтальной двигательной активности и числа обследованных норок в тесте ОП, а также числа стоек и свешиваний в тесте ПКЛ, то есть показателей исследовательского поведения. Ранее было показано, что введение ЛПС приводит к уменьшению исследовательской и двигательной активности, но не влияет на уровень тревожности крыс Wistar [Moraes et al., 2017]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Введение ЛПС крысам SD и WH вызывало снижение исследовательской активности, но не влияло на тревожность животных. Уменьшение исследовательского поведения определяется потерей интереса к новым условиям и свидетельствует о депрессивном состоянии животных [Liu et al., 2017]. Вызванное ЛПС снижение предпочтения раствора сахарозы в минимальной предпочитаемой концентрации было выявлено у крыс WH, но не у SD. При этом у крыс SD, в отличие от WH, в экс-

перименте было обнаружено снижение предпочтения сахарозы по сравнению с базовыми значениями, что указывает на более высокую чувствительность гедонического статуса крыс SD к стрессогенным экспериментальным манипуляциям (внутрибрюшинные инъекции, отбор крови, тесты ОП и ПКЛ).

Различия между линиями животных были также обнаружены в условиях хронического стресса. Процедура НХС вызывала у животных обеих линий существенное замедление набора массы тела. На фоне значительно более высокой скорости прироста массы тела у контрольных крыс SD, статистически значимое снижение массы тела у них наступало на 3 нед. раньше, чем у крыс WH. Потребление корма снижалось вследствие стрессирования у крыс обеих линий только на ранних этапах процедуры НХС (после первой недели у SD и второй недели у WH), и затем этот параметр значимо не различался у контрольных и стрессируемых животных. Однако у стрессируемых крыс SD отмечено повышение потребления корма на поздних этапах НХС (6–7 нед.) на уровне тенденции. На этих же этапах НХС у стрессируемых животных обеих линий возрастало и относительное потребление жидкости.

Снижение прироста массы тела является стандартно используемым показателем эффективности стрессоров, свидетельствующим об изменениях в метаболизме животных. Полученные результаты указывают на то, что примененная нами процедура приводила к хроническому стрессу у животных обеих линий, но в силу более высокой скорости прироста массы тела, вызванные НХС изменения баланса энергии значительно более выражены у крыс SD. Процедура НХС в течение 7 нед приводила к значимому снижению относительной массы тимусов только у крыс WH, что может указывать на более высокую чувствительность животных этой линии к влиянию хронического стресса на иммунную систему. Увеличение относительной массы надпочечников после НХС было выявлено только у крыс SD. При этом у животных обеих линий нами не было выявлено изменений уровней кортикостерона в сыворотке крови через сутки после окончания процедуры НХС.

Значимое снижение предпочтения раствора сахарозы по сравнению с контролем было обнаружено только у крыс SD после первой и третьей недели НХС. Динамика изменений

предпочтения сахарозы контрольными животными в первые три нед. эксперимента различалась у SD и WH сходным с описанным в работе Bekris et al., 2005 образом: крысы Wistar показывали более стабильные значения предпочтения сахарозы, чем SD. В наших экспериментах в отношении животных, в том числе, контрольных, были исключены такие стрессогенные процедуры, как предварительное лишение воды и пищи перед проведением сахарозного теста и одиночное содержание животных перед экспериментом (23 ч и две нед., соответственно [Bekris et al., 2005]). По-видимому, нестабильность предпочтения сахарозы контрольными крысами SD в первые недели эксперимента указывает на более высокую чувствительность гедонического статуса крыс SD к экспериментальным манипуляциям (в нашей работе – одиночное содержание во время проведения сахарозного теста). Это согласуется с полученными нами в модели острой эндотоксемии данными о более высокой чувствительности гедонического статуса SD, чем WH, к применявшимся в ней экспериментальным манипуляциям. В связи с этим и возможным различным влиянием тестов ОП и ПКЛ на уровни кортикостерона в крови контрольных и стрессируемых животных разных линий, в модели НХС нами были исключены данные тесты, использованные в модели острой эндотоксемии.

После первой недели НХС у крыс SD было обнаружено значимое уменьшение потребления корма и жидкости, поэтому снижение предпочтения сахарозы в этот период, вероятно, связано с вызванным процедурой НХС уменьшением аппетита. Однако после третьей недели НХС снижение предпочтения сахарозы не сопровождалось значимыми изменениями потребления корма ($p = 0.10$) и жидкости ($p = 0.92$), что свидетельствует о снижении гедонического статуса животных вследствие процедуры НХС. Таким образом, примененная в данной работе методика сахарозного теста с использованием низких концентраций сахарозы без предварительного лишения животных воды и пищи, выявила снижение гедонического статуса вследствие процедуры НХС только у крыс SD, и только после трех нед. стрессирования, но не на более поздних этапах НХС. Длительность процедуры НХС, составляющая три нед., является достаточно распространенной при моделировании депрессии [Willner, 2017], в том

числе с использованием самцов крыс SD и без оценки предпочтения сахарозы на ранних или более поздних сроках НХС (например, [Koo, Duman, 2008; Liu et al., 2018; Kim et al., 2018]). Наши результаты согласуются с этими данными о снижении гедонического статуса самцов SD после трех нед. НХС. Зарегистрированные нами изменения уровня предпочтения сахарозы у крыс SD, по-видимому, отражают более медленную адаптацию к экспериментальным условиям хронически стрессируемых крыс этой линии по сравнению с контрольными. При этом у крыс WH идентичные методики проведения НХС и теста предпочтения сахарозы не приводили к снижению гедонического статуса, что, наряду с более выраженным снижением массы тела стрессируемых крыс SD, свидетельствует о более высокой чувствительности последних к комбинации экспериментальных манипуляций и НХС по меньшей мере в рамках использованных методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Между самцами крыс Sprague Dawley и Wistar Han (питомник Charles River, Германия) имеются существенные различия в скорости прироста массы тела, относительной массе тимусов, двигательной, исследовательской и пищевой активности. Крысы данных линий демонстрируют различную чувствительность к непредсказуемому хроническому стрессу и острой низкодозовой эндотоксемии. Метаболические эффекты стресса и эндотоксемии более выражены у крыс Sprague Dawley. Снижение гедонического статуса вследствие низкодозовой эндотоксемии выявлено только у крыс Wistar Han, а при хроническом стрессе – у крыс Sprague Dawley. Вызванная хроническим стрессом инволюция тимуса выявлена только у крыс Wistar Han, а гипертрофия надпочечников – у крыс Sprague Dawley. Значительные различия в физиологических характеристиках крыс Sprague Dawley и Wistar Han могут оказывать существенное влияние на результаты, получаемые в моделях патологий, связанных со стрессом и воспалением, а также на их интерпретацию.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10199).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Маркель А.Л., Бородин П.М. Проблемы генетики стресса. Сообщение V. Генетика реактивности

- коры надпочечников при эмоциональном стрессе у крыс. Генетика. 1982. 18 (8): 1326–1333.
- Осадчук А.В., Маркель А.Л., Хусаинов Р.А., Науменко Е.В., Беляев Д.К.* Проблемы генетики стресса. Сообщение IV. Генетический анализ уровня вегетативной реактивности при эмоциональном стрессе у крыс. Генетика. 1979. 15 (10): 1847–1851.
- Asari Y., Majima M., Sugimoto K., Katori M., Ohwada T.* Release site of TNF alpha after intravenous and intraperitoneal injection of LPS from *Escherichia coli* in rats. Shock. 1996. 5 (3): 208–212.
- Barr A.M., Song C., Sawada K., Young C.E., Honer W.G., Phillips A.G.* Tolerance to the anhedonic effects of lipopolysaccharide is associated with changes in syntaxin immunoreactivity in the nucleus accumbens. Int. J. Neuropsychopharmacol. 2003. 6 (1): 23–34.
- Bekris S., Antoniou K., Daskas S., Papadopoulou-Daifoti Z.* Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. Behav. Brain Res. 2005. 161 (1): 45–59.
- Biesmans S., Matthews L.J., Bouwknecht J.A., De Haes P., Hellings N., Meert T.F., Nuydens R., Ver Donck L.* Systematic analysis of the cytokine and anhedonia response to peripheral lipopolysaccharide administration in rats. Biomed. Res. Int. 2016. 2016.
- Biesmans S., Meert T.F., Bouwknecht J.A., Acton P.D., Davoodi N., De Haes P., Kuijlaars J., Langlois X., Matthews L.J., Ver Donck L., Hellings N.* Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. Mediators Inflamm. 2013. 2013.
- Brower M., Grace M., Kotz C.M., Koya V.* Comparative analysis of growth characteristics of Sprague Dawley rats obtained from different sources. Lab. Anim. Res. 2015. 31 (4): 166–173.
- Bruzos-Cidon C., Miguez C., Rodriguez J.J., Gutierrez-Lanza R., Ugedo L., Torrecilla M.* Altered neuronal activity and differential sensitivity to acute antidepressants of locus coeruleus and dorsal raphe nucleus in Wistar Kyoto rats: a comparative study with Sprague Dawley and Wistar rats. Eur. Neuropsychopharmacol. 2014. 24 (7): 1112–1122.
- Burstein O., Franko M., Gale E., Handelsman A., Barak S., Motsan S., Shamir A., Toledano R., Simhon O., Hirshler Y., Chen G.* Escitalopram and NHT normalized stress-induced anhedonia and molecular neuroadaptations in a mouse model of depression. PLoS ONE. 2017. 12 (11): e0188043.
- Couch Y., Trofimov A., Markova N., Nikolenko V., Steinbusch H.W., Chekhonin V., Schroeter C., Lesch K.P., Anthony D.C., Strekalova T.* Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. J. Neuroinflammation. 2016. 13 (1): 108.
- De La Garza II R.* Endotoxin-or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. Neurosci. Biobehav. Rev. 2005. 29 (4–5): 761–770.
- De La Garza R., Asnis G.M., Fabrizio K.R., Pedrosa E.* Acute diclofenac treatment attenuates lipopolysaccharide-induced alterations to basic reward behavior and HPA axis activation in rats. Psychopharmacology. 2005. 179 (2): 356–365.
- Doremus-Fitzwater T.L., Varlinskaya E.I., Spear L.P.* Effects of pretest manipulation on elevated plus-maze behavior in adolescent and adult male and female Sprague–Dawley rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 2009. 92 (3): 413–423.
- Foyet H.S., Deffo S.T., Yewo P.K., Antioch I., Zingue S., Asongalem E.A., Kamtchouing P., Ciobica A.* Ficus sycomorus extract reversed behavioral impairment and brain oxidative stress induced by unpredictable chronic mild stress in rats. BMC Complement. Altern. Med. 2017. 17 (1): 502.
- Frenois F., Moreau M., O'Connor J., Lawson M., Micon C., Lestage J., Kelley K.W., Dantzer R., Castanon N.* Lipopolysaccharide induces delayed FosB/Delta-FosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. Psychoneuroendocrinology. 2007. 32 (5): 516–531.
- Gökçek-Saraç Ç., Wesierska M., Jakubowska-Doğru E.* Comparison of spatial learning in the partially baited radial-arm maze task between commonly used rat strains: Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, and outcrossed Wistar/Sprague-Dawley. Learn Behav. 2015. 43 (1): 83–94.
- Harbuz M.S., Jessop D.S., Lightman S.L., Chowdrey H.S.* The effects of restraint or hypertonic saline stress on corticotrophin-releasing factor, arginine vasopressin, and proenkephalin A mRNAs in the CFY, Sprague-Dawley and Wistar strains of rat. Brain Res. 1994. 667 (1): 6–12.
- Hayakawa K., Mimura Y., Tachibana S., Furuya M., Kodama T., Aoki T., Hosokawa S., Fukui M., Shibata S., Yoshida M., Masuyama T.* A Study for collecting background data on Wistar Hannover [Crl: WI (Han)] rats in general toxicity studies-comparative data to Sprague Dawley rats. J. Toxicol. Sci. 2013. 38 (6): 855–873.
- Henry C.J., Huang Y., Wynne A., Hanke M., Himler J., Bailey M.T., Sheridan J.F., Godbout J.P.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. J. Neuroinflammation. 2008. 5 (1): 15.
- Kim C.S., Brager D.H., Johnston D.* Perisomatic changes in h-channels regulate depressive behaviors following chronic unpredictable stress. Mol. Psychiatry. 2018. 23 (4): 892–903.
- Koo J.W., Duman R.S.* IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. 105 (2): 751–756.
- Krishnan V., Nestler E.J.* Animal models of depression: molecular perspectives. Curr. Top. Behav. Neurosci. 2011. 7: 121–147.

- Lee K.Y., Perretta S.G., Zar H., Mueller R.A., Boysen P.G. Increase in rat plasma antioxidant activity after *E. coli* lipopolysaccharide administration. *Yonsei Med J.* 2001. 42 (1): 114–119.
- Liu C., Gu J.Y., Han J.H., Yan F.L., Li Y., Lv T.T., Zhao L.Q., Shao Q.J., Feng Y.Y., Zhang X.Y., Wang C.H. Enriched environment combined with fluoxetine ameliorates depression-like behaviors and hippocampal SYP expression in a rat CUS model. *Brain Res. Bull.* 2017. 135: 33–39.
- Liu Z., Liu H., Zeng Z.H. Chronic Unpredictable Mild Stress Causing Cardiac and Thoracic Spinal Cord Electrophysiological Abnormalities May Be Associated with Increased Cardiac Expression of Serotonin and Growth-Associated Protein-43 in Rats. *Biomed. Res. Int.* 2018. 2018: 8697913.
- Maes M., Berk M., Goehler L., Song C., Anderson G., Galecki P., Leonard B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med.* 2012. 10 (1): 66.
- Markov D.D., Yatsenko K.A., Inozemtseva L.S., Grivennikov I.A., Myasoedov N.F., Dolotov O.V. Systemic N-terminal fragments of adrenocorticotropin reduce inflammation-and stress-induced anhedonia in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2017. 82: 173–186.
- Marona-Lewicka D., Nichols D.E. The Effect of Selective Serotonin Releasing Agents in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats. *Stress.* 1997. 2 (2): 91–99.
- Marques C., Meireles M., Norberto S., Leite J., Freitas J., Pestana D., Faria A., Calhau C. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte.* 2015. 5 (1): 11–21.
- McDermott C., Kelly J.P. Comparison of the behavioural pharmacology of the Lister-Hooded with 2 commonly utilised albino rat strains. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008. 32 (8): 1816–1823.
- Moraes M.M., Galvão M.C., Cabral D., Coelho C.P., Queiroz-Hazarbassanov N., Martins M.F., Bondan E.F., Bernardi M.M., Kirsten T.B. Propentofylline prevents sickness behavior and depressive-like behavior induced by lipopolysaccharide in rats via neuroinflammatory pathway. *PLoS ONE.* 2017. 12 (1): e0169446.
- Morais M., Patricio P., Mateus-Pinheiro A., Alves N.D., Machado-Santos A.R., Correia J.S., Pereira J., Pinto L., Sousa N., Bessa J.M. The modulation of adult neuroplasticity is involved in the mood-improving actions of atypical antipsychotics in an animal model of depression. *Transl. Psychiatry.* 2017. 7 (6): e1146.
- Niu L., Jin L., Zhang Y., Liu B., Li C. Feasibility of focal cerebral ischemia and reperfusion surgery combined with chronic unpredictable mild stress to simulate the post-stroke depressive state in rats. *Behav. Brain Funct.* 2015. 11 (1): 39.
- O'Connor J.C., Lawson M.A., Andre C., Moreau M., Lestage J., Castanon N., Kelley K.W., Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase activation in mice. *Mol. Psychiatry.* 2009. 14 (5): 511.
- Pecoraro N., Ginsberg A.B., Warne J.P., Gomez F., la Fleur S.E., Dallman M.F. Diverse basal and stress-related phenotypes of Sprague Dawley rats from three vendors. *Physiol. Behav.* 2006. 89 (4): 598–610.
- Remus J.L., Stewart L.T., Camp R.M., Novak C.M., Johnson J.D. Interaction of metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference. *Behav. Neurosci.* 2015. 129 (3): 321.
- Riaz M.S., Bohlen M.O., Gunter B.W., Henry Q., Stockmeier C.A., Paul I.A. Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiol. Behav.* 2015. 152: 128–134.
- Saeidienik F., Shahraki M.R., Fanaei H., Badini F. The Effects of Iron Oxide Nanoparticles Administration on Depression Symptoms Induced by LPS in Male Wistar Rats. *Basic Clin. Neurosci.* 2018. 9 (3): 209–216.
- Sanna M.D., Quattrone A., Galeotti N. Antidepressant-like actions by silencing of neuronal Elav-like RNA-binding proteins Hub and Huc in a model of depression in male mice. *Neuropharmacology.* 2018. 135: 444–454.
- Scholl J.L., Renner K.J., Forster G.L., Tejani-Butt S. Central monoamine levels differ between rat strains used in studies of depressive behavior. *Brain Res.* 2010. 1355: 41–51.
- Shen Y., Connor T.J., Nolan Y., Kelly J.P., Leonard B.E. Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat. *Life Sci.* 1999. 65 (17): 1773–1786.
- Simmons D.A., Broderick P.A. Cytokines, stressors, and clinical depression: augmented adaptation responses underlie depression pathogenesis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2005. 29 (5): 793–807.
- Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014. Article ID 932757.
- Stepanichev M.Y., Tishkina A.O., Novikova M.R., Levshina I.P., Freiman S.V., Onufriev M.V., Levchenko O.A., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. *Acta Neurobiol. Exp.* 2016. 76: 324–333.
- Strekalova T., Spanagel R., Bartsch D., Henn F.A., Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 2004. 29 (11): 2007.
- Tang M.M., Lin W.J., Pan Y.Q., Guan X.T., Li Y.C. Hippocampal neurogenesis dysfunction linked to

- depressive-like behaviors in a neuroinflammation induced model of depression. *Physiol. Behav.* 2016. 161: 166–173.
- Tang X., Liu X., Yang L., Sanford L.D. Rat strain differences in sleep after acute mild stressors and short-term sleep loss. *Behav. Brain Res.* 2005. 160 (1): 60–71.
- Theilmann W., Kleimann A., Rhein M., Bleich S., Frieling H., Löscher W., Brandt C. Behavioral differences of male Wistar rats from different vendors in vulnerability and resilience to chronic mild stress are reflected in epigenetic regulation and expression of p11. *Brain Res.* 2016. 1642: 505–515.
- Turnbull A.V., Rivier C.L. Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli. *Neuroendocrinology.* 1999. 70 (3): 186–195.
- Willner P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: a user survey. *Neurobiol. Stress.* 2017. 6: 68–77.
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology.* 1984. 83 (1): 1–16.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology.* 1997. 134 (4): 319–329.
- Yirmiya R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res.* 1996. 711 (1–2): 163–174.
- Yirmiya R., Pollak Y., Barak O., Avitsur R., Ovadia H., Bette M., Weihe E., Weidenfeld J. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. *Neuropsychopharmacology.* 2001. 24 (5): 531.
- Zhang F., Shao J., Tian J., Zhong Y., Ye L., Meng X., Liu Q., Wang H. Antidepressant-like effects of LPM580153, a novel potent triple reuptake inhibitor. *Sci. Rep.* 2016. 6: 24233.
- Zhang L.M., Wang Y.L., Liu Y.Q., Xue R., Zhang Y.Z., Yang R.F., Li Y.F. Antidepressant-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa) in chronically stressed rats. *Neuropharmacology.* 2017. 113: 567–575.
- Zmarowski A., Beekhuizen M., Lensen J., Emmen H. Differential performance of Wistar Han and Sprague Dawley rats in behavioral tests: differences in baseline behavior and reactivity to positive control agents. *Reprod. Toxicol.* 2012. 34 (2): 192–203.

EFFECTS OF CHRONIC UNPREDICTABLE STRESS AND ACUTE LOW-DOSE ENDOTOXEMIA ON WISTAR HAN AND SPRAGUE DAWLEY RATS

O. D. Kurko^{a, #}, L. S. Inozemtseva^a, N. Yu. Glazova^a, E. A. Sebentsova^a, D. D. Markov^a,
D. D. Khukhareva^b, N. G. Levitskaya^{a, b}, I. A. Grivennikov^a, and O. V. Dolotov^{a, ##}

^a Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^b Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

[#] e-mail: flaute.kurko@yandex.ru

^{##} e-mail: dolotov@img.ras.ru

Depression is a complex, heterogeneous and multifactorial disease with poorly understood pathophysiological mechanisms. Outbred Sprague Dawley (SD) and Wistar Han (WH) rats are widely used in biomedical research, in particular, in the model of chronic unpredictable stress (CUS) and in the inflammatory model of depression. However, the differences between SD and WH in these experimental models are not well studied. The aim of the present study was to compare alterations in the hedonic status, food consumption and body weight of male SD and WH rats obtained from Charles River Laboratories (Germany), in the CUS model (7 weeks) and in acute low-dose endotoxemia (single intraperitoneal injection of a low subseptic dose of LPS, 25 µg/kg). Hedonic status was assessed using the sucrose preference test without prior food and water deprivation. Significant differences were found between SD and WH in the body weight gain, food consumption, locomotor and exploratory activity, and in the mass of the thymus. WH rats demonstrated a lower threshold of sucrose preference (0.3%) compared to SD rats (0.4%). The effects of both CUS and endotoxemia on body weight were more pronounced in SD rats. In endotoxemia, a decrease in hedonic status was more pronounced in WH rats. LPS-induced serum levels of TNF-α were higher in SD, and corticosterone was higher in WH (90 min after LPS). In the CUS model, changes in hedonic status and adrenal hypertrophy were detected only in SD rats, but thymic involution was detected only in WH. Significant differences in the physiological characteristics of Sprague Dawley and Wistar Han rats and the different sensitivity of their metabolic and hedonic status to stress and inflammation can have a significant impact on the results obtained in the models of the corresponding pathologies, as well as on their interpretation.

Keywords: chronic unpredictable stress, acute endotoxemia, LPS, rat strains comparison, Sprague Dawley, Wistar Han, depression, body weight, sucrose preference