

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П. ПАВЛОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

**СМАГИН
ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ПОВТОРНЫЙ ОПЫТ АГРЕССИИ И ПОСЛЕДСТВИЯ ЕЁ ДЕПРИВАЦИИ У
САМЦОВ МЫШЕЙ: ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ И
НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ**

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2016

Работа выполнена в Секторе нейрогенетики социального поведения, Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», город Новосибирск.

Научный руководитель: **Кудрявцева Наталия Николаевна**
доктор биологических наук, профессор

Консультант **Ениколопов Григорий Николаевич**
кандидат биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский физико-технический институт», Москва, заведующий Лабораторией стволовых клеток мозга; Университет Стони Брука, Центр генетики развития, Стони Брук, США, профессор

Официальные оппоненты: **Клименко Виктор Матвеевич**
доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, заведующий Физиологическим отделом им. И.П. Павлова и Лабораторией нейробиологии интегративных функций мозга

Николаева Елена Ивановна
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Петербургский государственный университет путей сообщения Императора Александра I», Санкт-Петербург, профессор кафедры «Прикладная психология»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 г. в ____ на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 002.020.01) при ФГБУН Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова д.6) и на сайте <http://infran.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В природных условиях демонстрация сильной агрессии встречается редко в силу существования множества механизмов, подавляющих ее проявление (Меннинг, 1982). Однако в человеческом обществе повышенная агрессивность является одной из основных социальных проблем и проблем здравоохранения. Ежегодно более миллиона человек в мире погибает в результате агрессивных столкновений (Siever, 2008). Агрессия является одной из основных причин смертности среди людей в возрасте от 15 до 44 лет (WHO, 2014). Но это – лишь верхушка айсберга, так как по оценке экспертов Всемирной организации здравоохранения, на каждую такую смерть приходится 20 госпитализаций, связанных с физической агрессией (Krug, 2002). Хорошо известно, что повторяющаяся агрессия у людей может быть следствием развития многих психических болезней, таких как маниакально-депрессивный психоз, эпилепсия, посттравматический синдром, аутизм, болезнь Альцгеймера, шизофрения, дефицит внимания и другие (DSM-V, 2013). Однако помимо клинических и криминальных случаев проявления агрессивного поведения, в человеческом обществе часто формируются социальные условия, которые требуют проявления выраженной агрессии в течение длительного времени, например, при участии в военных действиях, в профессиональном спорте (хоккей, бокс и т. д.), в службах социальной безопасности и т.д. Известно, что у людей, длительно участвовавших в военных конфликтах, развивается так называемый поствоенный синдром, сопровождающийся повышенной агрессивностью, неврозами, немотивированной злобностью, нарушениями сна, они способны на неадекватные действия (Gray et al., 1999; Heyman, Neidig, 1999; Teten et al., 2009). Очевидно, что исследование нейробиологических механизмов и факторов, провоцирующих проявление агрессии, является актуальной фундаментальной задачей, решение которой, возможно, предложит пути снижения проявлений агрессии у отдельного индивида и, как следствие, в обществе.

Ранее было показано, что повторный опыт агрессии, сопровождаемый победами, приводит к изменению поведения у самцов мышей (Kudryavtseva, 2006), которое сопровождается повышенной раздражительностью, выраженной тревогой, появлением стереотипий. Агрессивные самцы теряют способность к социальному распознаванию: не

отличают самца от самки, нападают на самцов, демонстрирующих полное подчинение, или ювенильных особей. Нарушается индивидуальное и социальное поведение. Некоторые самцы демонстрируют выраженную агрессивность и враждебность по отношению к партнеру в любой ситуации. Во всех случаях социальных взаимодействий преобладает агрессивная мотивация. В мозге животных с длительным опытом агрессии происходят изменения активности серотонергической и дофаминергических систем на уровне синтеза, катаболизма и рецепции, а также изменений экспрессии генов, вовлеченных в работу этих медиаторных систем (Kudryavtseva, 2006; Caramaschi et al., 2008; Bondar et al., 2009; Smagin et al., 2013).

Первые наблюдения показали, что самцы мышей с длительным повторным опытом агрессии, лишенные возможности участвовать в агонистических взаимодействиях в течение 2-х недель (период депривации), демонстрируют более высокий уровень агрессивности, чем до периода депривации (Кудрявцева, 2004). В данной работе проводится подробное исследование этого феномена.

Целью работы было изучить особенности изменения поведения и психоэмоционального состояния у самцов мышей с повторным опытом агрессии после периода депривации, в течение которого они были лишены возможности участвовать в агонистических взаимодействиях, исследовать возможные пути коррекции повышенной агрессивности, а также изменения нейрогенеза и нейрональной активности в структурах лимбической системы мозга, принимающих участие в регуляции агрессивного поведения: миндалевидном теле и в гиппокампе.

Исходя из цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать поведение самцов мышей линии C57BL/6J с длительным опытом агрессии (20 дней) в поведенческих тестах, оценивающих тревожность, двигательную и исследовательскую активность, уровень агрессивности и агрессивной мотивации до и после периода депривации (14 дней);

2. Исследовать влияние естественных источников положительного подкрепления (половых взаимодействий и раствора сахарозы), предлагаемых агрессивным самцам во время периода депривации, на постдепривационное усиление агрессивности;

3. Исследовать изменение поведения самцов мышей с повторным опытом агрессии разной длительности под влиянием вальпроата натрия, хлорида лития и налтрексона, обладающих антиагрессивным действием;

4. Исследовать влияние повторного опыта агрессии разной длительности и периода депривации на нейрогенез и нейрональную активность в зубчатой извилине гиппокампа и нейрональную активность в миндалевидном комплексе.

Научная новизна. Впервые было показано, что период депривации от агонистических взаимодействий, усиливая агрессивность самцов мышей, не влияет на измененные под влиянием повторного опыта агрессии показатели двигательной и исследовательской активности, уровень тревожности и агрессивной мотивации.

Предоставление самцам с повторным опытом агрессии во время периода депривации источника положительного подкрепления – раствора сахарозы ослабляет проявление агрессивного поведения после депривации, а проживание в комфортных условиях с самками приводит к усилению агрессивной мотивации и агрессивности.

Повторный опыт агрессии модифицирует эффекты препаратов, используемых в клинике в комплексной терапии патологических состояний, сопровождающихся повышенной агрессивностью: вальпроата натрия, хлорида лития и налтрексона.

У самцов с 20-ти дневным опытом агрессии увеличивается пролиферация клеток, оцениваемая числом Brdu-положительных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа, которая сохраняется и после периода депривации. У самцов с 10-ти дневным опытом агрессии в этой области увеличивается нейрональная активность, оцениваемая по числу c-Fos-положительных клеток, которая затем динамически снижается у самцов с 20-ти дневным опытом и после депривации. Под влиянием повторного опыта агрессии нейрональная активность в базолатеральной области миндалины снижается.

Теоретическая и практическая значимость. Работа посвящена актуальной проблеме нейробиологии, исследующей влияние длительного воздействия негативной социальной среды на последующее поведение и психоэмоциональное состояние индивидов. Экспериментальный подход, позволяющий исследовать последствия повторного опыта агрессии у самцов мышей, может быть полезен для изучения механизмов развития повышенной агрессивности и при разработке адекватных способов

ее фармакологической коррекции. Исследование пролонгированных последствий повторяющейся агрессии, являющейся симптомом патогенеза многих психоэмоциональных и неврологических заболеваний, позволяет расширить современные представления о механизмах нейрональной пластичности, вовлекающей молекулярно-клеточный уровень регуляции поведения в мозге. Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в установлении долговременных изменений нейрогенеза и нейрональной активности в структурах лимбической системы мозга.

Положения, выносимые на защиту:

1. Период депривации от агонистических взаимодействий, усиливая агрессивность самцов мышей, не восстанавливает измененные под влиянием повторного опыта агрессии показатели двигательной и исследовательской активности, уровень тревожности и агрессивной мотивации. Предоставление источников положительного подкрепления в период депривации, таких как раствор сахарозы несколько ослабляет, а половые взаимодействия с самками не снижают агрессивность самцов мышей.

2. Повторный опыт агрессии модифицирует эффекты препаратов, обладающих антиагрессивным действием. При однократном введении вальпроат натрия и налтрексон снижают агрессивность самцов мышей с небольшим опытом агрессии и не эффективны у самцов мышей с длительным опытом агрессии. Период депривации повышает чувствительность к антиагрессивному действию налтрексона.

3. Повторный опыт агрессии усиливает пролиферацию клеток в зубчатой извилине гиппокампа, которая сохраняется после периода депривации, при этом нейрональная активность увеличивается у самцов с 10-дневным опытом агрессии, динамически снижаясь у самцов с 20-дневным опытом и после депривации. Нейрональная активность в базолатеральной области миндалины снижается.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Международной Школе-конференции «Поведение человека и животных: психологические, эволюционные и генетико-физиологические аспекты» (Новосибирск 2008), на международной конференции «Гены, мозг и поведение» Международного общества поведения и нейрогенетики («Genes, Brain & Behaviour», IBANGS, Дрезден, Германия, 2009), на международной конференции «Контекст, причины и последствия

конфликта» («Context, Causes and Consequences of Conflict», Лейден, Нидерланды 2009), на отчетной Сессии в Институте цитологии и генетики СО РАН в 2010, на Всероссийском XXI Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010), на VII Всемирном Конгрессе по изучению стресса («7th World Congress on Stress», Лейден, Нидерланды 2010), на VII Сибирском физиологическом съезде (Красноярск, 2012), на X Международном Междисциплинарном Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2014), на IX Международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома. Системная биология» (Новосибирск, 2014), на 28-м Конгрессе Европейской коллегии нейропсихофармакологии (Амстердам, Нидерланды 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 10 статей в рецензируемых зарубежных (5) и отечественных (5) журналах.

Личный вклад диссертанта. Все представленные в диссертации результаты получены и обработаны автором самостоятельно.

Объём и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 123-х страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 14 таблиц. Список литературы включает 259 источников, из них 230 иностранных.

Работа поддержана: Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ), гранты № 13-04-00072а, 14-04-31299 мол_а, 10-04-00083 и, частично, Российским научным фондом (грант № 14-15-00063).

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились на самцах мышей линии C57BL/6J. Возраст мышей к началу поведенческих экспериментов составлял 10-12 недель. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes), и были одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол заседания № 4 от 1.11.2010 г.).

Формирование агрессивного типа поведения у самцов мышей. Для получения мышей с повторным опытом агрессии в агонистических взаимодействиях использовали

модель сенсорного контакта (Kudryavtseva, 1991). Самцов попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перфорированной перегородкой. Ежедневно перегородку убирали на 10 минут, что приводило к агонистическому взаимодействию самцов. Опыт побед в первых конфронтациях закрепляли в дальнейшем при взаимодействии с партнерами противоположного типа поведения с опытом социальных поражений. В зависимости от эксперимента, в данной работе исследовались следующие группы животных: 1) Контрольная группа – самцы мышей без опыта агонистических взаимодействий (контроль); 2) Группа самцов с 2-3-х дневным опытом агрессии (A2); 3) Группа самцов с 10-ти дневным опытом агрессии (A10); 4) Группа самцов с 20-ти дневным опытом агрессии (A20); 5) Группа самцов A20 после 14-ти дневного периода депривации, в течение которого самцы не имели возможности вступать в агрессивные взаимодействия (A20-Д). Для изучения влияния источников положительного подкрепления самцы A20 во время периода депривации помещались в клетку с самками; другим самцам A20 во время депривации предоставляли 1%-й раствор сахарозы и обычную воду в условиях свободного выбора.

Поведенческие тесты: 1) *Тест «агонистические взаимодействия»* (Kudryavtseva, Smagin et al., 2014) оценивает уровень прямой (атаки), ритуальной (агрессивный груминг), и не прямой форм агрессии (разбрасывание чужой подстилки, угрозы), а также стереотипного поведения у самцов мышей. Сумма общего времени атак, агрессивного груминга и разбрасывания чужой подстилки была использована как показатель враждебного поведения, в той или иной мере наносящего вред партнеру; 2) *Тест «перегородка»* (Kudryavtseva, 2003) позволяет количественно оценить поведенческую реакцию животных на партнера в соседнем отсеке. Показатели теста отражают уровень агрессивной мотивации у самцов мышей, поскольку коррелируют с выраженностью агрессивного поведения, которое демонстрируют самцы в последующей конфронтации; 3) *Тест «открытое поле»* (Bures et al., 1983) оценивает двигательную и исследовательскую активность, а также эмоциональность самцов мышей; 4) *Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»* (далее ПКЛ) (Lister, 1987) был использован для оценки уровня тревожности у самцов мышей и ассоциированных с ней форм поведения.

Поведение мышей всех экспериментальных групп исследовали в последовательном режиме один тест в день, начиная с момента окончания 2-х, 10- и 20-ти дневного опыта агрессии и периода депривации. Во время всех тестов осуществлялась видеозапись поведения животных с последующей обработкой видеоматериалов в программах EthoVision 3.1 и Observer XT 7.0 («Noldus», The Netherlands).

Исследование влияния повторного опыта агрессии на антиагрессивные свойства препаратов (Sigma Chemical Co., USA), выявленные, как в клинических исследованиях, так и в эксперименте: 1) Вальпроат натрия вводили однократно (100 или 300 мг/кг/в.б.) самцам из групп А2 и А20; 2) Налтрексон вводили однократно (1 и 2 мг/кг, п.к.) самцам из групп: А2, А10, А20 и А20-Д и хронически (2 мг/кг/ п.к.); 3) Хлорид лития вводили самцам (100 мг/кг/день, в.б.) хронически. При превентивном хроническом введении препарат начинали вводить с 7-го дня на фоне продолжающихся агонистических взаимодействий в течение двух недель. При хроническом лечебном способе воздействия препарат вводили 14 дней самцам А20 во время периода депривации.

Иммуногистохимический анализ срезов мозга был выполнен в соответствии со стандартной процедурой (Park, Enikolopov, 2010; Park et al., 2013). За 2 часа до декапитации самцам мышей вводили бромдезоксисуридин (BrdU, Sigma Chemical Co., USA) в дозе 150 мг/кг. Животных усыпляли 3% раствором авертина (2, 2, 2-Tribromoethanol, Sigma-Aldrich, Canada) и подвергали транскардиальной перфузии. Затем мозг извлекали и хранили в растворе PBS с 0.1% азидом натрия до процедуры получения срезов мозга на вибраторе (Vibratome, St. Louis, MO). Для каждой мыши были получены 8-10 сагиттальных секций (толщиной 50 мкм), содержащих зубчатую извилину гиппокампа и 3-4 корональных секций, содержащих область миндалины. Все флуоресцентные изображения были сделаны с использованием лазерного конфокального микроскопа Ultra View spinning disk (PerkinElmer, Wellesley, MA). Клетки, меченые BrdU (BrdU+) и c-Fos (c-Fos+) были проанализированы с использованием программного обеспечения Volocity v.6.0. C-Fos+ клетки в зубчатой извилине гиппокампа были проанализированы с использованием программного обеспечения ZEN (Zeiss) и лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss).

Статистическая обработка данных. В тех случаях, когда все сравниваемые выборки удовлетворяли критериям использования параметрических методов анализа, был применен однофакторный анализ ANOVA с последующим множественным парным сравнением групп тестами: Ньюмана-Кейлса, Бонферрони, или t-критерием Стьюдента в случае сравнения 2-х независимых групп. В случаях, когда выборки не удовлетворяли условиям применения параметрических критериев, были использованы их непараметрические аналоги: для независимых выборок однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с фактором “экспериментальные группы” с последующим сравнением между группами с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для зависимых выборок использовали дисперсионный анализ повторных измерений Фридмана и критерий Вилкоксона для парных сравнений. Анализ корреляций был выполнен с использованием коэффициента корреляций Спирмана. Сравнение групп по качественному признаку (число животных, проявивших ту или иную форму поведения) проводилось с использованием точного критерия Фишера. Анализ данных производился с помощью программы Statistica 6.0. Различия между экспериментальными группами считались статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. В экспериментальных группах было от 4 до 18 животных.

Результаты

Исследование влияния депривации на поведение самцов мышей с длительным опытом агрессии. В эксперименте исследовали следующие группы животных: 1) Контроль; 2) A20; 3) A20-Д. Экспериментальные группы исследовались в поведенческих тестах в следующей последовательности: приподнятый крестообразный лабиринт, открытое поле, тест «перегородка», агонистические взаимодействия.

Тест «агонистические взаимодействия». Большинство самцов (67%) после депривации стали более агрессивными, чем до депривации: у них повысились показатели числа и времени атак, времени враждебного поведения и числа угроз (рис.1).

В среднем повышение суммарного времени атак после депривации за время теста было $41,1 \pm 9,9$ с. по сравнению со временем атак до депривации. Латентное время атак и враждебного поведения стало существенно короче.

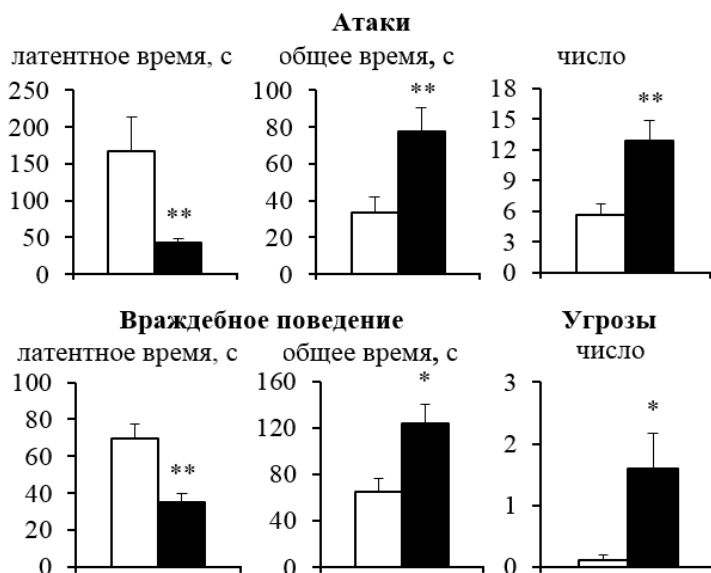


Рисунок 1. Поведение самцов до и после депривации в тесте «агонистические взаимодействия». Белые столбы – группа A20, черные – A20-Д; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Тест ПКЛ. По сравнению с контролем в группе A20 и A20-Д был повышен уровень тревожности, оцениваемый по снижению числу выходов в центр ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно), снижению числу входов в закрытые рукава ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно) и повышенному среднему времени пребывания в них ($p < 0,05$ для A20-Д). У обеих групп животных по отношению к контролю были также снижены: общее число входов/выходов ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно), число переходов ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно), число ($p < 0,05$ для A20-Д) и время ($p < 0,05$ для обеих групп) вставаний на задние лапы. Таким образом, у самцов мышей с 20-ти дневным опытом агрессии повышается уровень агрессивности после депривации на фоне сохраняющейся повышенной тревожности (Смагин и др., 2010; Kydryavtseva, Smagin et.al., 2011).

Влияние потребления 1%-го раствора сахарозы в условиях свободного выбора во время периода депривации на поведение самцов мышей. Данные свидетельствуют о некотором снижении агрессивности у самцов мышей, которые во время периода депривации дополнительно пили раствор сахарозы: только у 50% агрессивных самцов (8 из 16), потреблявших раствор сахарозы, уровень агрессивности стал выше, причем увеличение числа и общего времени атак было меньше (в среднем на $32,3 \pm 8,2$ с) и после депривации не произошло усиление выраженности других форм враждебного поведения, что наблюдалось у самцов, потреблявших только воду.

Были найдены статистически значимые положительные корреляции латентного времени атак и латентного времени враждебного поведения с показателем потребления

и/или предпочтения раствора сахарозы и отрицательные корреляции времени атак с показателем предпочтения и потребления раствора сахарозы, числом атак и потреблением раствора (рис. 2). Таким образом, агрессоры, которые меньше пьют раствор сахарозы, атакуют чаще, чем агрессоры, потребляющие больше сахарозы во время депривации.

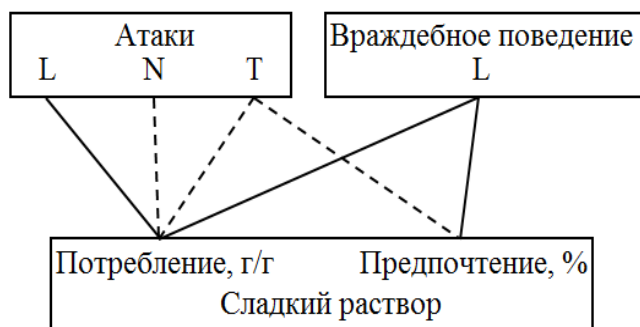


Рисунок 2. Статистически значимые корреляции между показателями агрессивности самцов А20 и потреблением/предпочтением раствора сахарозы. Сплошные линии – положительные корреляции; пунктирные – отрицательные, $p < 0,05$. L – латентное время, N – число, T – общее время атак.

В тесте ПКЛ у самцов А20, потреблявших раствор сахарозы, по сравнению с самцами А20, потреблявшими только воду в период депривации, было больше число вставаний на задние лапы, число заглядываний под лабиринт и меньше время выглядывания из закрытых рукавов, что может свидетельствовать об анксиолитическом эффекте сахарозы.

После депривации (рис. 3) положительные корреляции были найдены между числом входов в закрытые рукава и общим временем враждебного поведения, временем нахождения в закрытых рукавах и общим временем атак; отрицательные корреляции времени враждебного поведения с временем нахождения в открытых рукавах, с числом выходов в открытые рукава и общим числом входов/выходов в рукава лабиринта, а также времени нахождения в центре с общим временем атак.

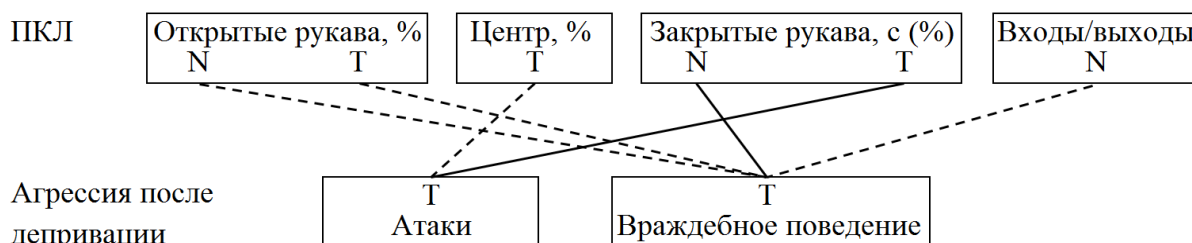


Рисунок 3. Статистически значимые корреляции между поведенческими параметрами, оценивающими состояние тревожности, и показателями агрессивности после депривации в группе мышей, потреблявших раствор сахарозы. Сплошные линии – положительные корреляции; пунктирные – отрицательные, коэффициент корреляции Спирмана, $p < 0,05$. N – число, T – общее время.

Данные свидетельствуют о том, что чем выше уровень тревожности у самцов мышей, тем они более агрессивны. Потребление раствора сахарозы во время периода депривации, приводит к меньшему усилению агрессивности у самцов мышей, возможно, за счет ее анксиолитического действия (Смагин, Кудрявцева, 2012).

Влияние половых взаимодействий во время депривации на поведение самцов мышей. После периода депривации агрессивность увеличилась у 71% самцов (10/14), находившихся с самками. Среднее время увеличения агрессии было равно $53,9 \pm 13,3$ с. По сравнению с показателями агрессивности до депривации у этих самцов снизилось: латентное время атак ($p < 0,05$), разбрасывания чужой подстилки ($p < 0,01$) и враждебного поведения ($p < 0,05$); и увеличились число ($p < 0,01$) и продолжительность ($p < 0,01$) атак. В тесте «перегородка» после периода депривации реакция на партнера в соседнем отсеке, оцениваемой по времени пребывания возле нее стала существенно выше (рис. 4), что говорит об увеличении агрессивной мотивации. Был сделан вывод, что проживание в комфортных условиях с самками увеличивает уровень агрессивности у самцов с повторным опытом агрессии, при этом уровень агрессивной мотивации возрастает (Kudryavtseva, Smagin et al., 2011).

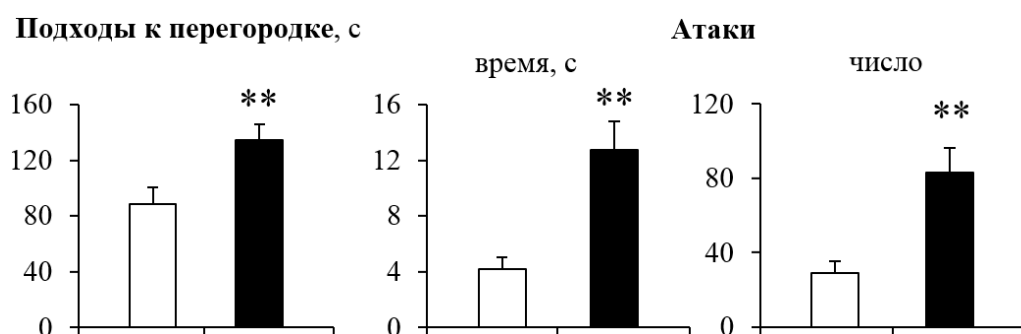


Рисунок 4. Поведение самцов после проживания с самками. Белые столбы – самцы А20, черные – самцы А20-Д (N = 15). ** $p < 0,01$ по сравнению с А20.

Изменение поведения самцов мышей с разным опытом агрессии под влиянием вальпроата натрия (рис. 5). У самцов А2 и А20 вальпроат в дозе 300 мг/кг существенно снижал время поведенческой реакции на партнера в тесте «перегородка». При этом у 44 % самцов А20 препарат в дозе 100 мг/кг вызывал состояние полной неподвижности, а в дозе 300 мг/кг у 73% самцов - падения. В агонистических взаимодействиях у самцов мышей с небольшим опытом агрессии по сравнению с введением физиологического раствора вальпроат в дозе 100 мг/кг оказал слабый эффект, в то время как в дозе 300 мг/кг оказывал антиагрессивный эффект, оцениваемый по

снижению агрессивной мотивации, снижению числа атак, увеличению латентного времени атак, и, главное, по снижению числа самцов, демонстрирующих атаки (100% vs 67%, соответственно, $p < 0,05$). Таким образом, у самцов с длительным опытом агрессии вальпроат снизил агрессивность, однако, возможно, этот эффект вызван токсическим действием препарата (Смагин и др., 2010).

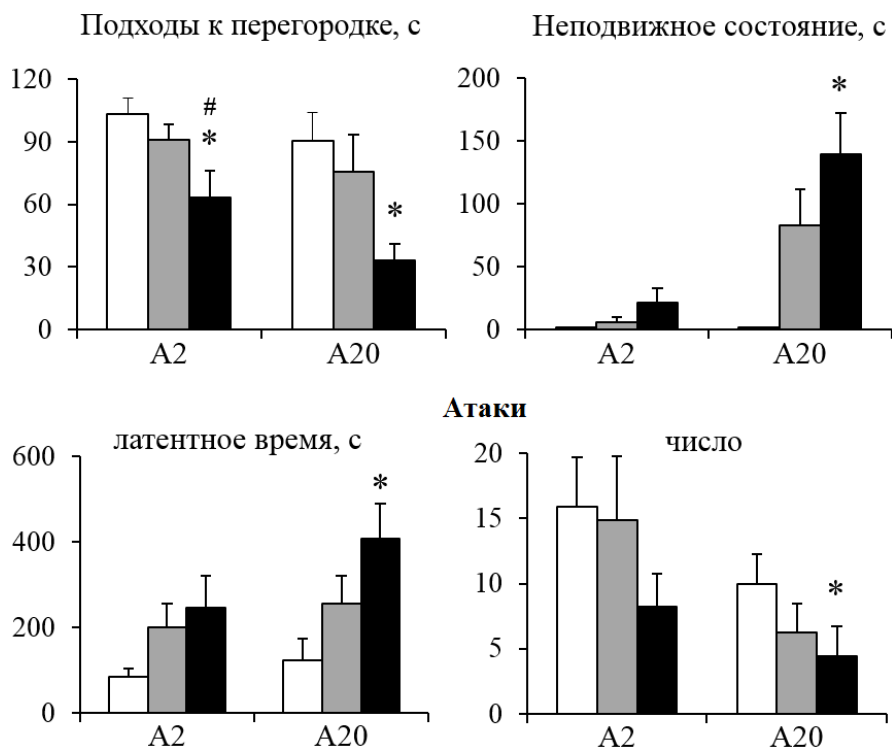


Рисунок 5. Поведение самцов мышей после введения вальпроата натрия. Белые столбы – физиол. р-р, серые – вальпроат в дозе 100 мг/кг, черные – вальпроат в дозе 300 мг/кг. * $p < 0,01$ по сравнению с введением физиол. р-ра; # $p < 0,05$ по сравнению с введением вальпроата в дозе 100 мг/кг.

Изменение поведения самцов мышей с разным опытом агрессии под влиянием налтрексона (рис. 6).

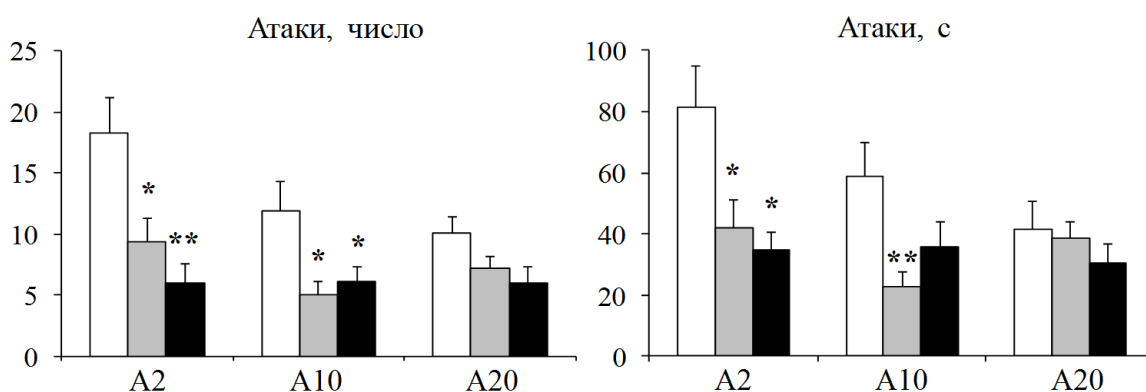


Рисунок 6. Влияние однократного введения налтрексона на поведение самцов мышей с различным опытом агрессии в тесте «агонистические взаимодействия» Белые столбы – физиол. р-р; серые – налтрексон в дозе 1 мг/кг; черные – налтрексон в дозе 2 мг/кг; сравнение внутри групп A2, A10, A20: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с введением физиол. р-ра в соответствующей группе.

При однократном введении у самцов А2 и А10 налтрексон в используемых дозах вызвал снижение числа и времени атак, а также времени демонстрации враждебного поведения. У самцов А20 налтрексон не оказал влияния на параметры агрессивности.

У самцов после депривации налтрексон вызвал выраженный антиагрессивный эффект: снижалось время демонстрации атак, число и время разбрасывания чужой подстилки и общее время враждебного поведения (табл. 1).

Таблица 1. Поведение в тесте «агонистические взаимодействия» после однократного введения налтрексона самцам А20-Д

Параметры поведения	А20-Д Физиол. р-р	А20-Д Налтрексон
Атаки, латентное время, сек	28,5 ± 6,4	38,1 ± 12,5
Атаки, N	14,0 ± 2,2	9,4 ± 1,8
Атаки, с	72,1 ± 9,7	43,5 ± 6,9*
Разбрасывание чужой подстилки, N	22,9 ± 2,4	14,7 ± 2,2*
Разбрасывание чужой подстилки, с	59,4 ± 7,4	33,7 ± 5,5*
Враждебное поведение, с	133,4 ± 8,4	77,1 ± 8,1**
Число животных в группе	14	15

Примечание: * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ по сравнению с введением физиол. р-ра. N – число эпизодов поведения.

Таким образом, длительный повторный опыт агрессии модифицирует эффекты налтрексона при однократном введении. Хроническое введение препарата самцам в течение двух недель превентивно, на фоне продолжающихся агонистических взаимодействия и лечебно, в период депривации, не оказало антиагрессивного эффекта, скорее, усилив агрессивную мотивацию и проявление некоторых форм агрессии (Бондарь, Смагин и др., 2011).

Изменение поведения самцов мышей с разным опытом агрессии под влиянием хронического введения хлорида лития. Хроническое превентивное и лечебное введение хлорида лития не оказало какого-либо статистически значимого влияния на большинство параметров поведения самцов в тесте «агонистические взаимодействия»: число и время атак, агрессивный груминг, разбрасывание чужой подстилки, а также враждебное поведение (подробные данные по эффектам лития приведены в диссертации) (Смагин, Кудрявцева, 2014).

Принимая во внимание эти и предыдущие данные, полученные ранее с препаратами с другим спектром действия, используемыми в клинике для купирования агрессии (галоперидол, диазепам, буспирон) (Kudryavtseva et al., 2008), можно сделать общий вывод: препараты эффективны в снижении агрессии у самцов с небольшим опытом агрессии и малоэффективны у самцов с длительным опытом агрессии, что свидетельствует об изменении нейрохимического фона под влиянием повторного опыта агрессии, который модифицирует эффекты препаратов. Необходимо применять или более высокие дозы, или искать препараты нового поколения.

Влияние повторного опыта агрессии на пролиферацию клеток в зубчатой извилине гиппокампа и нейрональную активность. Количество c-Fos⁺ клеток считали параметром нейрональной активности в миндалевидном комплексе и зубчатой извилине гиппокампа. Изменение пролиферации клеток в гиппокампе оценивали по количеству BrdU⁺ клеток у самцов мышей групп A10, A20, а также у A20-Д по сравнению с контролем.

В базолатеральной области миндалины было выявлено снижение числа c-Fos⁺ клеток у самцов A10 и A20 по сравнению с контролем (рис. 7). Можно полагать, что выраженное снижение нейрональной активности в миндалине, которая принимает участие в механизмах эмоциональной регуляции, агрессивного поведения, поведения защиты и отвечает за эмоции страха (Lopez et al., 2004), может быть следствием длительных агонистических взаимодействий, приводящих к изменению психоэмоционального состояния и ассоциированного с ним поведения у самцов мышей с опытом агрессии. В зубчатой извилине гиппокампа число c-Fos⁺ клеток было выше у самцов A10, затем снижается динамически у самцов A20 и A20-Д. (рис. 8).

В то же самое время длительный повторный опыт агрессии, сопровождаемый победами, стимулирует пролиферацию клеток в мозге: у самцов групп A20 и A20-Д по сравнению с контролем происходит увеличение числа BrdU⁺ клеток в зубчатой извилине гиппокампа (рис. 9), в которой находится скопление стволовых клеток (Gage, 2000) и которая является одной из немногих областей мозга, где постоянно идет образование новых нервных клеток у взрослых организмов (Cameron, Ronald, 2001; Kempermann et al., 2004; Abrous et al., 2005; Ming, Song, 2005).

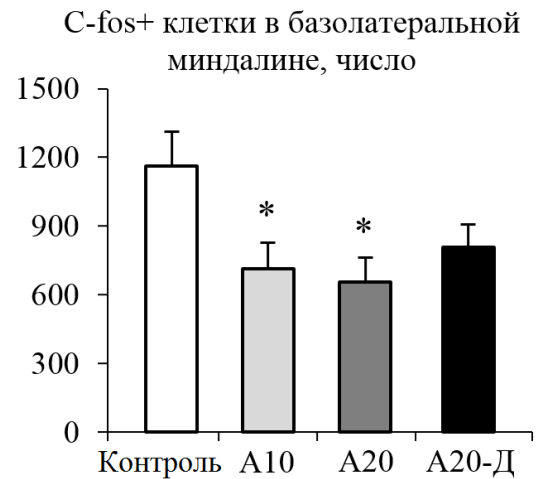
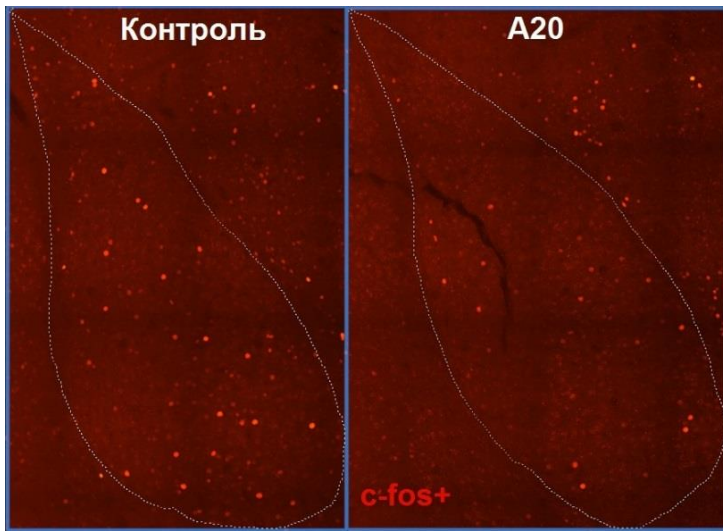


Рисунок 7. Число c-Fos+ клеток в базолатеральной области миндалины. $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Выделена базолатеральная область миндалины.

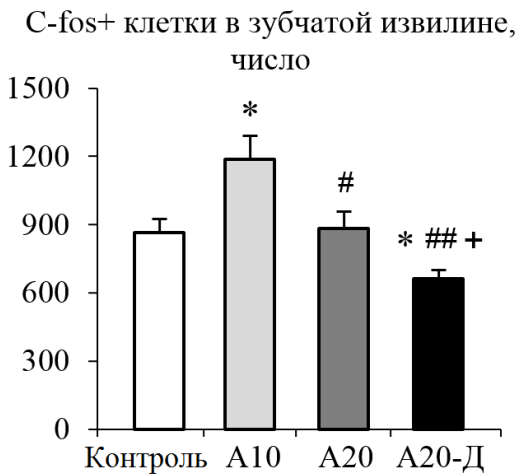


Рисунок 8. Число c-Fos+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ по сравнению с самцами A10; + $p < 0,05$ по сравнению с A20.

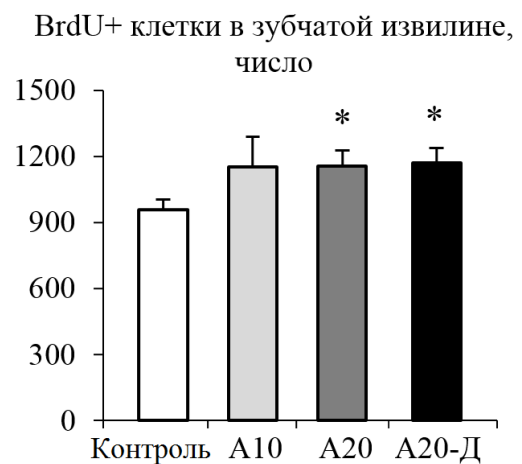
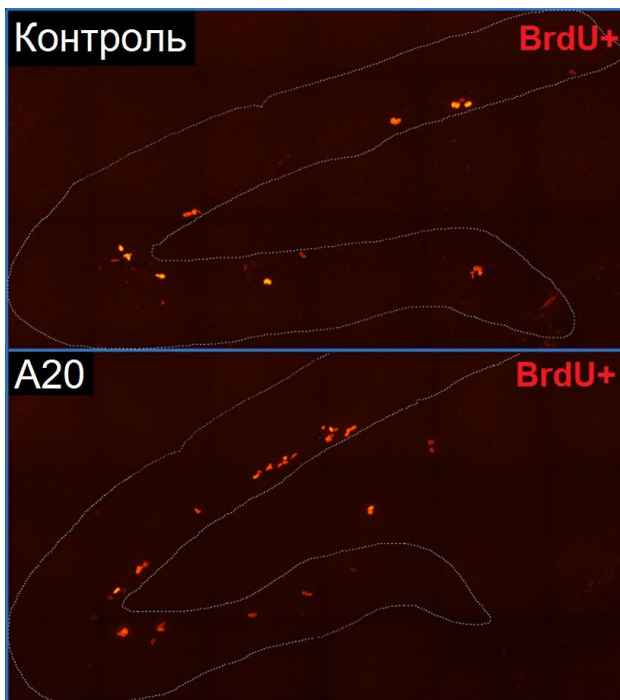


Рисунок 9. Число BrdU+ клеток в зубчатой извилине гиппокампа самцов мышей с разным опытом агрессии. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Выделена зубчатая извилина гиппокампа.

Нашими последними исследованиями выявлено, что число новых нейронов в этой области под влиянием повторного опыта агрессии увеличивается (Smagin et al., 2015), что, несомненно, является следствием усилившейся пролиферативной активности клеток. Поскольку демонстрация агрессивного поведения сопровождается активацией дофаминергических систем мозга на уровне метаболизма, рецепции и изменения экспрессии генов (Кудрявцева, Бакштановская, 1991; Девойно и др., 1998; van Egr, Miczek, 2000; Bondar et al., 2009; Ginsberg et al., 2011), наши результаты подтверждают полученные ранее данные об усилении пролиферативной активности в зубчатой извилине гиппокампа под действием фармакологической активации дофаминергических систем (Hiramoto et al., 2007; Park, Enikolopov, 2010; Merlo et al., 2011; Lao et al., 2013).

Можно предположить, что изменения клеточной пролиферации и нейрональной активности в структурах мозга агрессивных самцов мышей обусловлены формированием нейрогенной среды в мозге, изменяющейся под влиянием повторного опыта агрессии. В целом, данные свидетельствуют о том, что повторный опыт агрессии формирует у самцов мышей постдепривационный синдром, сопровождающийся усилением агрессивности, увеличением пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа, и снижением нейрональной активности в базолатеральной области миндалины.

Выводы:

1. Период депривации от агонистических взаимодействий усиливает агрессивность самцов мышей, при этом повышенный уровень тревожности сохраняется.
2. Предоставление самцам с повторным опытом агрессии во время периода депривации раствора сахарозы ослабляет проявление агрессивного поведения, а проживание в комфортных условиях с самками приводит к усилению агрессивной мотивации и агрессивности.
3. Повторный опыт агрессии модифицирует эффекты препаратов, обладающих антиагрессивным действием, о чем свидетельствуют различные их эффекты у самцов мышей с разным опытом агрессии. При однократном введении вальпроат натрия и налтрексон снижают агрессивность самцов мышей с небольшим опытом агрессии и не эффективны у самцов мышей с длительным опытом агрессии. Период депривации повышает чувствительность к антиагрессивному действию налтрексона.

4. У самцов с повторным опытом агрессии число BrdU-положительных клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа повышается, а число c-Fos-положительных клеток увеличивается у самцов с небольшим опытом агрессии, в последующем динамически снижаясь под влиянием длительного повторного опыта агрессии и периода депривации. В базолатеральной области миндалины происходит уменьшение c-Fos-положительных клеток у самцов с опытом агрессии.
5. Повторный опыт агрессии формирует у самцов мышей постдепривационный синдром, сопровождающийся усилением агрессивности, увеличением пролиферации клеток в зубчатой извилине гиппокампа, и снижением нейрональной активности в базолатеральной области миндалины.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Научные статьи в рецензируемых журналах:

1. Bondar, N.P. Anhedonia in the shadow of chronic social defeat stress, or When the experimental context matters / N.P. Bondar, I.L. Kovalenko, D.F. Avgustinovich, **D.A. Smagin**, N.N. Kudryavtseva // The Open Behavioral Science Journal. – 2009. – № 3. – P. 17-27.
2. **Смагин, Д.А.** Влияние вальпроата натрия на агрессивное поведение самцов мышей с разным опытом агрессии / **Д.А. Смагин**, Н.П. Бондарь, Н.Н. Кудрявцева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 1. – С. 10-15.
3. **Смагин, Д.А.** Повторный опыт агрессии и последствия депривации у самцов мышей / **Д.А. Смагин**, Н.П. Бондарь, Н.Н. Кудрявцева // Психофармакология и биологическая наркология. – 2010. – Т. 10, № 1. – С. 2636-2648.
4. Бондарь, Н.П. Эффекты однократного и хронического введения налтрексона на агонистическое поведение самцов мышей с повторным опытом агрессии / Н.П. Бондарь, **Д.А. Смагин**, Н.Н. Кудрявцева // Психофармакология и биологическая наркология. // – 2011. – Т. 11, № 1. – С. 2688-2700.
5. Kudryavtseva, N.N. Modeling fighting deprivation effect in mouse repeated aggression paradigm / N.N. Kudryavtseva, **D.A. Smagin**, N.P. Bondar // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. – 2011. – V. 35, № 6. – P. 1472-1478.
6. **Смагин, Д.А.** Ослабляющее влияние сахарозы на пост-депривационное усиление агрессивности у самцов мышей с повторным опытом побед / **Д.А. Смагин**, Н.Н. Кудрявцева // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2012. – Т. 62, № 5. – С. 591-601.
7. **Smagin, D.** Reduction of serotonergic gene expression in the raphe nuclei of the midbrain under positive fighting experience in male mice / **D. Smagin**, U. Boyarskikh, N.

Bondar, M. Filipenko, N. Kudryavtseva // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2013. – V. 4. – P. 36-44.

8. **Смагин, Д.А.** Анксиогенный и анксиолитический эффекты хлорида лития при превентивном и лечебном способах введения самцам мышей с повторным опытом агрессии / **Д.А. Смагин**, Н.Н. Кудрявцева // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2014. – Т. 64, № 6. – С. 646-659.

9. Kudryavtseva, N. N. Repeated positive fighting experience in male inbred mice / N.N. Kudryavtseva, **D.A. Smagin**, I.L. Kovalenko, G.B. Vishnivetskaya // *Nature Protocols*. – 2014. – V. 9, № 11. – P. 2705-2717.

10. **Smagin, D.A.** Altered hippocampal neurogenesis and amygdalar neuronal activity in adult mice with repeated experience of aggression / **D.A. Smagin**, J-H Park, T.V. Michurina, N. Peunova, Z. Glass, K. Sayed, N.P. Bondar, I.L. Kovalenko, N.N. Kudryavtseva, G. Enikolopov // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – V. 9. – P. 1-15.

Тезисы конференций:

1. **Smagin, D.A.** Effects of aggression deprivation on behavior of victorious male mice / **D.A. Smagin**, N.P. Bondar, N.N. Kudryavtseva // *Genes, Brain and Behaviour*. Dresden. – 2009. – P. 106.

2. Kudryavtseva, N.N. Involvement of brain opioidergic system in the effects of repeated aggression / N.N. Kudryavtseva, N.P. Bondar, **D.A. Smagin**, J.M. Van Ree // *Discussions on Context, Causes and Consequences of Conflict*. Leiden. – 2009. – P. 123.

3. Бондарь, Н.П. Влияние блокады опиоидных рецепторов на поведение самцов мышей с разным опытом агрессии / Н.П. Бондарь, **Д.А. Смагин**, А.Е. Григорьева, А.Г. Галямина, Н.Н. Кудрявцева // XXI съезд физиологического общества им. И.П. Павлова. Калуга. – 2010. – С. 79.

4. **Smagin, D.A.** Behavioral and neurobiological changes under repeated experience of aggression in male mice / **D.A. Smagin**, G.N. Enikolopov, N.N. Kudryavtseva // X International congress Neuroscience for medicine and psychology. Sudak. – 2014. – P. 307.

5. Kudryavtseva, N.N. Repeated positive fighting experience in male mice: the tool for the study of movement disorders / N.N. Kudryavtseva, **D.A. Smagin**, I.L. Kovalenko, G.B. Vishnivetskaya, A.G. Galyamina, G. Enikolopov // The 9th International conference on bioinformatics and genome regulation and structure/system biology. Novosibirsk. – 2014. – P. 186.

6. **Smagin, D.A.** Activation of hippocampal cell proliferation and decrease of c-Fos expression in the amygdala under positive fighting experience in male mice / **D.A. Smagin**, N.N. Kudryavtseva, G.N. Enikolopov // The 9th International conference on bioinformatics and genome regulation and structure/system biology. Novosibirsk. – 2014. – P. 56.

7. **Smagin D.A.** Correction of fighting deprivation effect in male mice with repeated experience of aggression / **D.A. Smagin**, N.N. Kudryavtseva // *European College of Neuropsychopharmacology*. Amsterdam. – 2015. – P. S282.