

А. А. ЖАБИНСКАЯ

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ПОВЕДЕНИЯ КРЫСЯТ В ОТКРЫТОМ ПОЛЕ В МОДЕЛИ ФЕБРИЛЬНЫХ СУДОРОГ И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИНУЛИНА В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Проведены исследования изменений поведения в открытом поле у крысят в возрасте 26-ти и 33-х суток отроду в норме, в условиях модели фебрильных судорог и потребления пребиотика инулина. Установлено, что у здоровых крысят в этом возрасте происходит снижение локомоторной активности в тесте при его повторном прохождении. Развитие модели фебрильных судорог приводит к росту показателя тревожности – длительности груминга. Применение инулина приводит к более высокой исследовательской (вертикальные стойки) и эмоциональной (груминг и движение на месте) активности при первом прохождении теста только у здоровых животных, а в условиях модели фебрильных судорог несколько ослабляет характерное нарастание показателя тревожности при повторном прохождении теста. Полученные результаты позволяют заключить, что потребление инулина в ранний постнатальный период в разной степени позитивно сказывается на показателях исследовательского и эмоционального поведения в норме и в условиях модели фебрильных судорог.

Ключевые слова: фебрильные судороги, инулин, двигательная активность, исследовательская активность, эмоциональная активность.

Введение. Фебрильные судороги (ФС) являются одним из самых распространенных судорожных состояний в детском возрасте [7]. От 2 % до 5 % детей сталкиваются с данным типом судорог [21]. Фебрильные судороги – это эпизоды судорожных припадков, которые возникают при повышении температуры тела выше 38,0°C у детей в возрасте от 6 месяцев до 5 лет. При этом данный тип судорожных приступов не связан с инфекциями центральной нервной системы [8, 20, 21]. Повторные ФС отмечаются у 30 % детей, в третий раз фебрильный приступ отмечается в 15 % случаев [19]. Примерно у 1–2 % детей с простыми фебрильными припадками впоследствии отмечается развитие эпилепсии. У детей со сложными фебрильными судорогами, аномальным развитием нервной системы или с эпилепсией в семейном анамнезе более высокий риск развития последующей эпилепсии – примерно 5–10 % [14]. У большинства пациентов первопричиной повышения температуры, которая ведет к развитию фебрильных судорог, являются различные инфекции [20]. Среди таких инфекций можно выделить вирус гриппа, аденовирусы, ротавирусы, энтеровирусы [3]. Однако наиболее распространенной причиной повышения температуры, которая ведет к появлению фебрильных судорог, является вирус герпеса человека 6 и 7 типа [1, 3, 20]. Механизмы, которые приводят к нарушению развития нервной системы или эпилепсии как следствие ФС, остаются малоизученными. Исходя из этого остается актуальным исследование того, как различные воздействия могут влиять на развитие и течение фебрильных судорог и их последствия.

В последнее время становится актуальным изучение влияния кишечной микробиоты на различные системы организма, в особенности на нервную систему [2, 22]. Была выявлена тесная связь между различными неврологическими патологиями и состоянием кишечной микробиоты [4, 23]. В частности, развитие кишечного дисбиоза оказывает существенное влияние на развитие аутизма и эпилепсии, дебют которых характерен для детского возраста [13, 17]. В связи с этим важно изучить влияние факторов, которые могут положительно влиять на кишечную микробиоту, особенно в период активного роста и развития организма. В контексте изучения эффектов фебрильных судорог важно помнить, что тяжелое течение инфекционных заболеваний в детском возрасте часто сопровождается длительным применением антибиотиков, которые способны нарушить баланс кишечной микробиоты [15]. Эти нарушения в особенности могут быть судьбоносны в детском возрасте, так как в этот период постнатального развития происходит параллельное развитие как кишечной микробиоты, так и регуляторных систем организма, прежде всего нервной системы.

Одним из способов позитивного влияния на состав кишечной микробиоты является применение пребиотиков. Пребиотики представляют собой неперевариваемые пищевые компоненты, которые могут избирательно стимулировать рост и/или активность полезных для организма (пробиотических) групп бактерий в толстом кишечнике [6, 12, 18]. Одним из самых распространенных пребиотиков является инулин. Он представляет собой полисахарид, состоящий из остатков фруктозы, связанных β 1,2-гликозидной связью, который хорошо ферментируется кишечной микробиотой с образованием короткоцепочечных жирных кислот [12]. В систематическом обзоре, было показано, что применение инулина оказывает положительное влияние не только на бифидобактерии, но и на другие пробиотические микроорганизмы, такие как лактобациллы и *Faecalibacterium prausnitzii* [11].

Целью настоящего исследования было изучить влияние инулина на свободное поведение животных в тесте «открытое поле» как у здоровых животных, так и после перенесенных в более раннем возрасте фебрильных судорог.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на 29 крысах Wistar в возрасте 10–33-х суток (P10–P33). Для развития модели фебрильных судорог (ФС) применяли длительную гипертермию [5,9]. Гипертермию развивали у крысят в возрасте P10–P11 при помощи направленного потока горячего воздуха с температурой 43–45°C. Глубокую температуру тела крысят контролировали каждые две минуты ректально. Температуру потока воздуха и глубокую температуру измеряли с помощью программно-аппаратного комплекса Pico Logger (Pico Technology, Великобритания) с использованием гибких термодатчиков с диаметром 1 мм. Гипертермию фиксировали при достижении глубокой температуры тела 41°C, в этих условиях крысята находились в течение 30-и минут. При перегреве крысят выше 43°C их на 20 секунд убрали из-под потока горячего воздуха на прохладную поверхность. В течение гипертермии регистрировали клонические судороги: при их продолжительности не менее 15-и минут модель считали развившейся. По окончании 30-и минут гипертермии животных убрали из условий повышенной температуры до полного прекращения судорог и возвращения глубокой температуры к первоначальным значениям (35–36°C), после чего возвращали в клетку к кормящей самке. Контрольные группы подвергались тем же воздействиям без включения потока горячего воздуха. Начиная со следующих суток после моделирования фебрильных судорог крысят ежедневно поили раствором инулина (Beneo GmbH, Германия) в дозе 1 г/кг до конца эксперимента (возраст P33). Контрольные группы получали в течение этого времени аналогичный объем воды.

Тест «Открытое поле», позволяющий оценить пространственную ориентацию, двигательную и исследовательскую активность экспериментальных животных, проводили в возрасте P26 и P33, то есть через 14 и 21 суток после моделирования фебрильных судорог соответственно. Животное помещали в центр круглой арены диаметром 1,2 м и в течение 5 минут проводили видеорегистрацию его поведения. Далее полученные видеозаписи анализировали при помощи программы Field4 (ИЭФБ РАН, Россия), в которой фиксировали количество и длительность поведенческих актов. Для получения схем перемещения репрезентативных животных была использована программа «Круг и крест» (ИЭФБ РАН, Россия). Эксперименты проведены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986, в редакции 2005 года). Дизайн исследования одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол №1 от 26.01.2023 г.). Статистический анализ проводили в программе Statistica 10. Для оценки изменений в группах при повторном проведении теста «Открытое поле» использовали парный критерий Уилкоксона. Для сравнения показателей между группами использовали критерий Краскела-Уоллиса, попарные сравнения проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q₂₅%;Q₇₅%)). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. Результаты по наиболее информативным показателям поведения крыс в открытом поле представлены на рисунке 1. Для всех групп животных была отмечена общая тенденция к уменьшению длительности вертикальных стоек во время пребывания в открытом поле (рисунок 1, А). Тем не менее, достоверными эти изменения оказались только в случае группы «Инулин» ($p=0,014$). Здесь важно отметить, что этот показатель в группе (4,2 (2,7;7,8) с) был значительно выше контрольных значений (1,9 (1,4;2,3) с; в 2,2 раза; $p=0,006$) только при первом проведении теста в возрасте P26, тогда как при повторном тесте в возрасте P33 значения не отличались от контрольных. Таким образом, потребление инулина с раннего возраста приводило к

более высокой вертикальной двигательной активности при первом прохождении теста, что может характеризовать более высокий интерес к новому пространству. Вместе с тем, развитие модели фебрильных судорог приводило к нивелированию этого эффекта инулина.

Согласно результатам, представленным на рисунке 1, Б, потребление инулина как у здоровых крысят, так и после моделирования фебрильных судорог, приводило к повышению эмоциональной активности, что выражалось в большем количестве актов груминга при первом прохождении теста по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе количество актов груминга составило 4 (3;5), в группе «Инулин» – 8 (6,5;8,5) ($p=0,06$), в группе «ФС+Инулин» – 6,5 (4;10) ($p=0,016$).

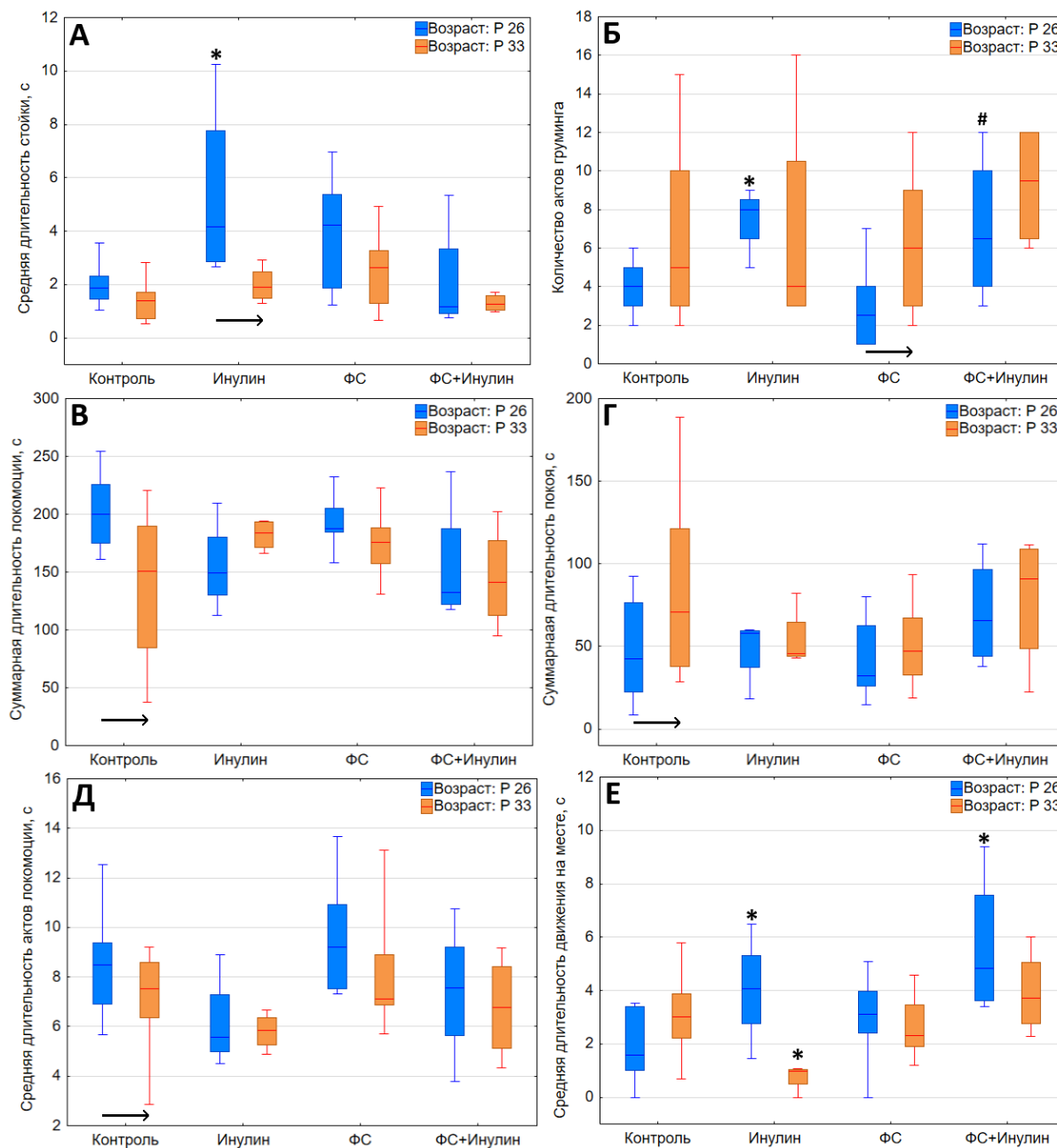


Рис. 1. Основные показатели двигательной активности крысят различных экспериментальных групп в открытом поле в возрасте P26 и P33

Примечание: → – достоверное изменение с возрастом ($p<0,05$); * – $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой; # – $p<0,05$ по сравнению с группой «ФС»

Как в контрольной группе, так и при различных воздействиях увеличения количества актов груминга с возрастом не происходило. При этом развитие модели фебрильных судорог в более раннем возрасте сказывалось на динамике этого показателя эмоциональной активности – происходило его увеличение с 2,5 (1;4) до 6 (3;9) ($p=0,005$) при попарном сравнении индивидуальных значений. Другой показатель, который в тесте можно использовать для оценки эмоциональной

активности животных – длительность движения на месте. Данный показатель включает повороты вокруг себя и выступ только передними лапами с вытягиванием тела вперед (англ. *stretch attend posture*) [10]. При анализе этого показателя значимые отличия от контрольной группы были также обнаружены для крыс, получавших инулин вне зависимости от наличия или отсутствия модели фебрильных судорог (рисунок 1, Е). В отсутствие модели медианное значение показателя – 4,1 (2,8;5,3) с, что было в 2,6 раза выше контроля (1,6 (1,0;3,4) с; $p=0,04$), а в условиях модели ФС (4,8 (3,6;7,6) с) – в 3 раза выше ($p=0,006$). При повторном проведении теста в возрасте P33 в случае здоровых животных показатель снижался (1,0 (0,5;1,5) с), становясь ниже аналогичных контрольных значений в 3 раза (3,0 (2,2;3,9) с; $p=0,01$). Таким образом, применение инулина приводило к повышенной эмоциональной активности только при первом прохождении теста, то есть в условиях новизны, тогда как развитие модели фебрильных судорог приводило к повышению группы показателей при повторном предъявлении, что может говорить о влиянии перенесенных в раннем возрасте фебрильных судорог на повышенную тревожность при нахождении в уже знакомом месте. В случае применения инулина у здоровых животных, напротив, уменьшение длительности движения на месте может говорить о более низкой тревожности животных при повторном применении теста.

При анализе локомоторной активности было установлено, что ее снижение при повторном применении теста происходит только у здоровых животных, не получавших инулин. Это выражалось в уменьшении суммарной длительности локомоции в 2 раза (рисунок 1, В, $p=0,003$), средней длительности отдельных актов передвижения на 11 % (рисунок 1, Д, $p=0,02$) и в увеличении суммарной длительности покоя на 40 % (рисунок 1, Г, $p=0,008$). На рисунке 2 представлены схемы движения в открытом поле в ходе конкретного эксперимента для отдельных репрезентативных крыс из групп «Контроль» и «Инулин» (для сравнения).

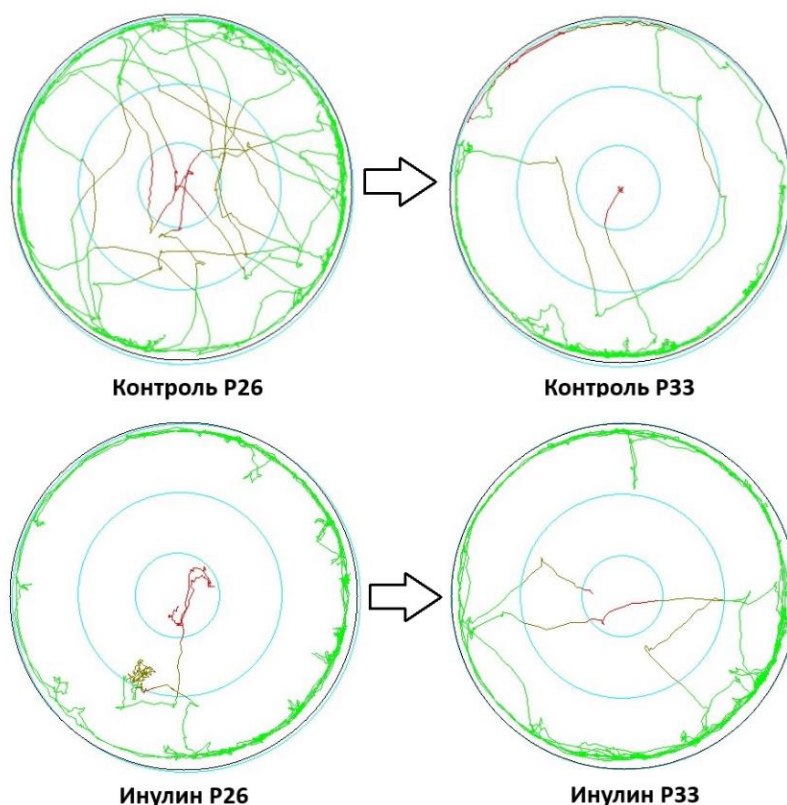


Рис. 2. Изменение с возрастом схем перемещения отдельных крыс с репрезентативными показателями в группе «Контроль» и «Инулин»

Снижение локомоторной активности контрольных животных описано нами ранее для взрослых крыс [16]. По совокупности представленных данных отсутствие таких изменений у здоровых крысят, получавших инулин, можно связать с его влиянием на эмоциональную и исследовательскую активность, а у крысят с моделью фебрильных судорог – с влиянием модели на общую тревожность животных.

Заключение. Результаты исследования указывают на то, что потребление инулина с раннего возраста приводит к повышению исследовательской и эмоциональной активности у здоровых крысят

в условиях помещения в новое пространство. При этом повторное помещение в это же пространство через неделю приводит к снижению одного из показателей тревожности ниже контрольных значений. Таким образом, потребление инулина на раннем этапе постнатального развития, вероятно, способствует усилению двух ключевых доминант в поведении молодого организма – любопытства и осторожности в новых условиях. Отсутствие характерного для контрольных животных снижения локомоторной активности при повторном прохождении теста здесь также можно объяснить все еще высоким, хоть и снижающимся, интересом к пространству открытого поля.

Развитие модели фебрильных судорог в возрасте 10–11 суток приводит к росту показателя тревожности крысят в открытом пространстве при его повторном предъявлении, что не характерно для здоровых животных и указывает на дисбаланс базовых эмоциональных реакций в условиях важнейшего этапа индивидуального развития. При этом потребление инулина не сказывается на основных показателях исследовательской активности, но модулирует эмоциональные реакции крысят в условиях стресса.

Полученные результаты позволяют заключить, что потребление инулина в ранний постнатальный период в различной степени позитивно сказывается на показателях исследовательского и эмоционального поведения в норме и в условиях модели фебрильных судорог.

Литература:

- [1] Орлова С.В., Стома И.О., Шмелева Н.П., Сивец Н.В. Современное состояние проблемы герпесвирусных инфекций 6-го и 7-го типов с разными клиническими формами, возможности лечения // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2021. № 10. С. 78–86.
- [2] Agirman G., Yu K., Hsiao E. Signaling inflammation across the gut-brain axis // *Science*. 2021. Vol. 374. P. 1087–1092.
- [3] Alekseeva L., Zheleznikova G., Gorelik E., Skripchenko N., Zhirkov A. Cytokines and neuro-specific proteins in viral encephalitis and convulsive syndrome in children. II. Convulsive syndrome // *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021. Vol. 11. P. 433–446.
- [4] Amlerova J., Šroubek J., Angelucci F., Hort J. Evidences for a Role of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Epilepsy // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22. P. 5576.
- [5] Bender R., Dubé C., Baram T. Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model // *Adv Exp Med Biol*. 2004. Vol. 548. P. 213–225.
- [6] Chudzik A., Orzyłowska A., Rola R., Stanisław G.J. Probiotics, Prebiotics and Postbiotics on Mitigation of Depression Symptoms: Modulation of the Brain-Gut-Microbiome Axis // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11. P. 1000.
- [7] Crespo M., León-Navarro A., Martín M. Hyperthermia-induced seizures during neonatal period alter the functionality of A1 and A2A receptors in the cerebellum and evoke fine motor impairment and gait disturbances in adult rats // *Physiol Behav*. 2021. Vol. 240. P. 113543.
- [8] Eilbert W., Chan C. Febrile seizures: A review // *J. Am Coll Emerg Physicians Open*. 2022. Vol. 3. P. e12769.
- [9] Griflyuk A., Postnikova T., Malkin S., Zaitsev A. Alterations in Rat Hippocampal Glutamatergic System Properties after Prolonged Febrile Seizures // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. P. 16875.
- [10] Holly K., Orndorff C., Murray T. An automated analysis of stretch-attend posture in rodent behavioral experiments // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 31286.
- [11] Hughes R., Alvarado D., Swanson K., Holscher H. The Prebiotic Potential of Inulin-Type Fructans: A Systematic Review // *Adv Nutr*. 2022. Vol. 13. P. 492–529.
- [12] Le Bastard Q., Chapelet G., Javaudin F., Lepelletier D., Batard E., Montassier E. The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020. Vol. 39. P. 403–413.
- [13] Lee K., Kim N., Shim J.O., Kim G.-H. Gut Bacterial Dysbiosis in Children with Intractable Epilepsy // *J Clin Med*. 2020. Vol. 10. P. 5.
- [14] Lee S., Byeon J., Kim G., Eun B.-L., Eun S.-H. Epilepsy in children with a history of febrile seizures // *Korean J Pediatr*. 2016. Vol. 59, 2. P. 74–79.
- [15] McDonnell L. et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis // *Gut Microbes*. Vol. 13. P. 1–18.
- [16] Melik-Kasumov T., Korneyeva M., Chuprina A., Zhabinskaya A., Rozhko A. Neuroprotective Effect of Palmitoylethanolamide in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022. Vol. 58. P. 448–456.
- [17] Mulle J., Sharp W., Cubells J. The gut microbiome: a new frontier in autism research // *Curr Psychiatry Rep*. Vol. 15. P. 337.
- [18] Patel S., Goyal A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review // *3 Biotech*. Vol. 2. P. 115–125.
- [19] Renda R., Yüksel D., Gürer Y.K.Y. Evaluation of Patients With Febrile Seizure: Risk Factors, Recurrence, Treatment and Prognosis // *Pediatr Emerg Care*. 2020. Vol. 36. P. 173–177.
- [20] Sawires R., Buttery J., Fahey M. A Review of Febrile Seizures: Recent Advances in Understanding of Febrile Seizure Pathophysiology and Commonly Implicated Viral Triggers // *Front Pediatr*. 2021. Vol. 9. P. 801321.

- [21] Syndi D., Pellock M. Recent Research on Febrile Seizures: A Review // J. Neurol Neurophysiol. 2013. Vol. 4. P. 19519.
[22] Wang Q., Yang Q., Liu X. The microbiota-gut-brain axis and neurodevelopmental disorders // Protein Cell. 2023. Vol. 14. P. 762–775.
[23] Warner B.B. The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders // Pediatr Res. 2019. Vol. 85. P. 216–224.

A. A. ZHABINSKAYA

FEATURES OF BEHAVIOR CHANGES IN RATS IN THE OPEN FIELD IN A MODEL OF FEBRILE SEIZURES AND DURING INULIN CONSUMPTION IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD

State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

Summary

Behavioral changes in the open field test were studied in rat pups on postnatal days 26 and 33 in health, in the model of febrile seizure and during daily inulin consumption. It was established that healthy rat pups of this age decrease their locomotor activity during the second test. It was also shown that the development of the febrile seizure model led to increase in anxiety parameter – grooming. Also, inulin consumption in healthy rat pups led to increase in exploration and emotional activity during first test, and decrease anxiogenic effect of the model during the second test. The results obtained allow us to conclude that inulin consumption during early postnatal development has a positive effect to varying degrees on the exploration and emotional behavior in health and in the model of febrile seizure.

Key words: febrile seizures, inulin, locomotor activity, exploration activity, emotional activity.