

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

На правах рукописи

Ширенова Софья Дмитриевна

**КОГНИТИВНЫЕ И ЭМОЦИОНАЛЬНО-МОТИВАЦИОННЫЕ
НАРУШЕНИЯ У САМЦОВ И САМОК КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ
ДЛИТЕЛЬНОЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ:
ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Научный руководитель:

доктор биологических наук **Крупина Наталия Александровна**

Официальные оппоненты:

Григорьян Григорий Агаларович – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Абрамова Анастасия Юрьевна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией системных механизмов эмоционального стресса Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Защита состоится « 15 » декабря 2022 г. в 12 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.1.180.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://www.niiopp.ru/>.

Автореферат разослан « 11 » ноября 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Расстройства психоэмоциональной сферы, часто сопровождающиеся когнитивными нарушениями, широко распространены и входят в ряд основных причин ухудшения состояния здоровья населения, снижая качество жизни заболевших (Ястребов и др., 2012). Каждый четвёртый-пятый человек в разных регионах мира страдает тем или иным психическим или поведенческим расстройством (Крот и др., 2016). Распространенность психических расстройств в отдельных странах в 2021 г. превышала 11%, а в России составляла 2,6% (ВОЗ Европейское региональное бюро, 2021). Социально-экономическое бремя психических расстройств велико во всех слоях населения, независимо от пола (Hancock M., 2018): эти расстройства постоянно составляют более 14% стандартизованных по возрасту лет, прожитых с инвалидностью (GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators). Однако гендерный аспект психических расстройств выражен: мужчины и женщины различаются по частоте встречаемости ряда психических нарушений, восприимчивости и уязвимости к стрессу (Сайт врачей-психиатров).

В действующей Международной классификации болезней МКБ-10, и её новейшей версии МКБ-11, которая принята на Всемирной ассамблее ВОЗ 25 мая 2019 г. и рекомендована к постепенному внедрению в странах-членах ВОЗ с 1 января 2022 г., выделяют классы психических и поведенческих расстройств, а также расстройств развития нервной системы, которые представляют собой синдромы, характеризующиеся клинически значимыми нарушениями когнитивной, эмоциональной регуляции или поведения, отражающие дисфункцию психологических, биологических процессов или процессов развития, лежащих в основе психического и поведенческого функционирования (ICD-11). Эти расстройства обычно, так или иначе, связаны с дистрессом, так как психическое здоровье зависит не только от индивидуальных особенностей, но и от социальных обстоятельств, в которых оказываются люди.

Несмотря на то, что в последние годы интенсивность изучения патогенеза связанных со стрессом психоэмоциональных расстройств, сопровождающихся когнитивными нарушениями, растет, по-прежнему остаются не ясными молекулярные механизмы их развития, что препятствует разработке патогенетической терапии таких расстройств. Важным направлением в решении этой биомедицинской проблемы является экспериментальное моделирование расстройств психоэмоциональной сферы, открывающее путь к трансляционным исследованиям в нейropsychиатрии (Cattane et al., 2022). К числу важных критериев адекватности экспериментальной модели ее клиническому прообразу относится сходство этиологии нарушений (Belzung, Lemoine, 2011). С этих позиций особого интереса заслуживает экспериментальная модель психоэмоционального стресса социальной изоляции как частного случая социальной депривации, с которой люди сталкиваются в жизни, как в раннем онтогенезе, так и в старческом возрасте, в экстремальных условиях, в случае инвалидизации, пандемии и др.

У человека стресс социальной и сенсорной депривации на ранних этапах развития приводит к нарушениям способностей сенсорной модуляции (Wilbarger 2010), социальной и эмоциональной регуляции, и, как любой ранний стресс, отражается на развитии мозга и нейропластичности, проявляясь в ухудшении адаптивного поведения и выработки навыков (Bauer et al., 2009; Lupien et al., 2009; Bick, Nelson., 2015; McLaughlin et al., 2017; Mumtaz et al., 2018; Naumova et al., 2019; Mackes et al., 2020). Впоследствии формируется поведенческий фенотип, для которого характерно снижение когнитивных способностей: нарушения ассоциативного обучения и пространственной памяти, исполнительных функций (нарушение тормозного контроля, когнитивной гибкости, поддержания внимания и т.п.) на фоне нарушения аффективной регуляции (Pechtel, Pizzagalli, 2011; McLaughlin et al., 2017; Bick et al., 2018). Такие изменения открывают путь к социальной дезадаптации и развитию психопатологии.

Модель социальной изоляции (post-weaning social isolation) достаточно хорошо разработана. Как правило, ее создают путем изолированного содержания животных в течение 6-8 недель, начиная с возраста отсаживания от матери (Wongwitdecha, Marsden, 1996; Brenes et al., 2008, 2009; Grippo et al., 2008; Ago et al., 2014). Это патогенное воздействие сочетает в себе два фактора, имеющих самостоятельное значение: изоляционный стресс и стресс в раннем периоде жизни (early-life stress), приводящий к эпигенетическим изменениям (Card, 2005; Gapp et al., 2014). Многими авторами показано, что у социально изолированных животных может повышаться тревожность в сочетании с развитием гиперактивного фенотипа (Karim, Arslan, 2000; Fone, Porkess, 2008), усиливаться агрессивность (Wongwitdecha, Marsden, 1996; Karim, Arslan, 2000; Fone, Porkess, 2008), могут появляться признаки развития психотического состояния (Domeney, Feldon, 1998; Varty et al., 2000; Fone, Porkess, 2008). В отношении индукции депрессивноподобного поведения данные противоречивы: есть свидетельства об отсутствии изменений по показателю иммобильности в тесте принудительного плавания (Karim, Arslan, 2000) и, напротив, о развитии «поведенческого отчаяния» в этом тесте без признаков ангедонии (по показателям в тесте на потребление/предпочтение сахарозы) (Brenes, Fornaguera, 2009; Yildirim et al., 2012). Сообщается о снижении болевой чувствительности после 3-7 недель социальной изоляции (Coudereau et al., 1997; Tuboly et al., 2009; Meng et al., 2010). Выявлены когнитивные нарушения разной направленности в тесте на пространственную память – в водном лабиринте Морриса (Wongwitdecha, Marsden, 1996; Fone, Porkess, 2008). Показано ухудшение привыкания (неассоциативная память) (Brenes et al., 2008) и формирования условных рефлексов (ассоциативная память) (Levshina et al., 2006).

У социально изолированных крыс выявлены нарушения функционирования центральных моноаминергических систем в ЦНС (Fone, Porkess, 2008; Brenes & Fornaguera, 2009), нейропластические изменения в структурах мозга (Pechtel, Pizzagalli, 2011; McEwen et al., 2015) и нарушения эпигенетического программирования активности генома в раннем возрасте (Gapp et al., 2014; Kumsta et al., 2016). Есть данные о снижении провоспалительного

ответа на введение инородной субстанции у самцов и самок крыс после двух мес. социальной изоляции (Hermes et al., 2006).

В исследованиях лаборатории общей патологии нервной системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» было показано, что двух- и трехмесячная ранняя социальная изоляция самцов крыс Вистар приводит к росту агрессивности, усилению неагрессивного социального взаимодействия и сопровождается нарушением неассоциативного обучения – кратковременного привыкания по показателям акустического стартл-ответа (Крупина и др., 2015; Хлебникова и др., 2018). У социально изолированных животных были отмечены особенности выработки пространственной памяти. Обнаружено изменение уровня серотонина и его оборота в эмоциогенных структурах мозга – гиппокампе и миндалине – после двух и трех мес. социальной изоляции самцов крыс (Крупина и др., 2019). Показано, что пролинспецифические пептидазы (сериновые протеазы) пролилэндопептидаза (PREP) и дипептидилпептидаза IV (DPP4) принимают участие в развитии тревожно-депрессивных состояний (Кушнарева и др., 2011; Крупина и др., 2012). После десяти недель ранней социальной изоляции относительный уровень экспрессии гена, кодирующего PREP, во фронтальной коре мозга самцов крыс был выше, чем у контрольных животных, содержащихся в группах, уровень мРНК гена транспортера серотонина в стриатуме и гипоталамусе также был выше, чем в контроле (Зубков и др., 2018). Результаты молекулярно-генетических исследований подтверждали взаимосвязь развития нарушений поведения, индуцированных социальной изоляцией, с изменением активности пролинспецифических пептидаз и функционированием центральной серотонинергической системы.

Однако до настоящего времени нет ясности в вопросе о том, какого рода молекулярно-генетические изменения лежат в основе эмоционально-мотивационных нарушений, возникающих у животных после пролонгированной до многих месяцев социальной изоляции, начинающейся в раннем возрасте.

Важным аспектом изучения патофизиологических механизмов нарушений психоэмоциональной и когнитивной сферы под влиянием стресса социальной изоляции является сравнительный анализ таких нарушений у социально изолированных животных разного пола. В настоящее время экспериментальные исследования в большинстве случаев проводят на самцах. Недавно показано, что нейропластические изменения, возникающие у подопытных животных в обогащенной среде, различны у самцов и самок (Kokras et al., 2019). Получены свидетельства того, что функциональные и молекулярные аспекты функционирования ГГА-оси у самцов и самок крыс также различаются (Goel et al., 2014). Сказанное свидетельствует о необходимости учета особенностей поведенческих, нейрохимических и молекулярных изменений при выработке стратегии терапии психоэмоциональных расстройств у особей разного пола.

Цель работы:

изучить особенности когнитивных, эмоционально-мотивационных нарушений и нейрохимических механизмов их развития у самцов и самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции, начинающейся в раннем возрасте.

Задачи исследования:

1. Исследовать особенности эмоционально-мотивационного поведения по показателям тревожности и депрессивности у самцов и самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции с возраста 1 мес.
2. Исследовать когнитивные функции социально изолированных самцов и самок крыс по показателям ассоциативного обучения и пространственной памяти.
3. Изучить изменения болевой чувствительности у социально изолированных самцов и самок крыс.
4. У социально изолированных самцов и самок крыс изучить особенности социального поведения в специальных тестах.
5. У самцов и самок крыс, подвергнутых длительному изолированному содержанию, оценить уровень кортикостерона в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, экспрессию глюкокортикоидных рецепторов (GR) в мозге методом Вестерн-блот анализа и вес органов-маркеров стресса – надпочечников, селезенки и тимуса.
6. У крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции, методом Вестерн-блот анализа изучить во фронтальной коре, гиппокампе и стриатуме:
 - экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6;
 - экспрессию белков-маркеров нейропластичности – предшественника нейротрофического фактора мозгового происхождения (proBDNF) и синаптофизина (SYP);
 - экспрессию пролинспецифических пептидаз DPP4 и PREP.
7. Определить уровень моноаминов и их метаболитов в структурах мозга социально изолированных крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).
8. Провести сравнительный анализ выявленных изменений в поведении и изученных физиологических и биохимических показателей у самцов и самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции.

Научная новизна

На модели пролонгированной социальной изоляции, начинавшейся с возраста отсаживания крысят от матери и непрерывно продолжавшейся в течение 9 мес., проведен сравнительный анализ нейрорепарационных характеристик у самцов и самок крыс.

Впервые выявлено повышение неагрессивного и агрессивного социального взаимодействия у самок крыс не только после 2, но и после 4,5 мес. социальной изоляции, тогда как у самцов обнаружено только увеличение неагрессивных социальных контактов после 2 мес. социальной изоляции. У крыс обоего пола, подвергнутых длительной социальной

изоляции, были обнаружены признаки развития гиперактивного фенотипа и снижение моторного компонента ориентировочной реакции на новизну. Впервые показано, что при более длительной изоляции стратегия социального поведения у самок менялась, развивались признаки снижения предпочтения «социальной новизны».

Двухмесячная социальная изоляция у самок могла повышать уровень тревожности. Впервые при увеличении длительности социальной изоляции до 4,5 мес. и более было отмечено снижение тревожности у крыс, более выраженное у самок. Ни на одном из сроков социальной изоляции не было выявлено признаков депрессивности в поведении крыс обоего пола.

Впервые показано, что повышение с возрастом болевой чувствительности в тесте «Hot Plate» у крыс, которых содержали в социальной изоляции, происходило медленнее, чем у крыс, которых содержали в группах. После 4,5 мес. социальной изоляции болевая чувствительность у самок была ниже, чем у самцов.

Впервые у самцов и самок крыс после 4,5 и 8 мес. социальной изоляции выявлено нарушение ассоциативного обучения, а также нарушение пространственной памяти. Показано, что напоминание через 4 мес. после обучения было менее эффективно для восстановления пространственного навыка у крыс обоего пола, живших в условиях социальной изоляции. На самках также показано, что напоминание через 4 мес. после обучения было менее эффективным для восстановления ассоциативной памяти у крыс, подвергнутых социальной изоляции.

Выявлены половые различия в состоянии ГГА-оси у крыс на поздних сроках социальной изоляции: только у самок после 9 мес. социальной изоляции был увеличен вес селезенки, после 9 и 10 мес. – вес надпочечников. У крыс обоего пола обнаружено увеличение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во фронтальной коре мозга, но только у самцов выявлено увеличение их экспрессии в гиппокампе.

Впервые показано, что девятимесячная социальная изоляция у самок приводит к снижению экспрессии proBDNF во фронтальной коре мозга и стриатуме, снижению экспрессии провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1 β и увеличению экспрессии дипептидилпептидазы-4 в гиппокампе, а у самцов – к снижению экспрессии пролилэндопептидазы в стриатуме.

У самок впервые прослежена динамика экспрессии GR, белков-маркеров нейро- и синаптопластичности proBDNF и SYP, провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1 β , а также пролинспецифических пептидаз DPP4 и PREP в структурах мозга при увеличении длительности социальной изоляции от 5 мес. до 9 мес. Показано сохранение высокого уровня экспрессии GR во фронтальной коре мозга и PREP в гиппокампе на разных сроках социальной изоляции. Обнаружено, что увеличение длительности изоляции сопровождается снижением экспрессии IL-6 и IL-1 β в стриатуме, увеличением экспрессии SYP и IL-1 β – в гиппокампе, увеличением экспрессии DPP4 во фронтальной коре.

Впервые проведена оценка состояния основных моноаминергических систем мозга у крыс после девятимесячной социальной изоляции. У крыс обоего пола обнаружено

повышение уровня дофамина и его оборота во фронтальной коре мозга, повышение DA в гипоталамусе, повышение серотонина – во фронтальной коре, стриатуме и гипоталамусе, норадреналина – в стриатуме. Только у самок был снижен уровень норадреналина в гиппокампе и повышен уровень метаболита дофамина 3-МТ в гипоталамусе.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные расширяют представления о патофизиологических механизмах развития когнитивных и аффективных нарушений, а также о механизмах адаптации к длительному стрессу СИ. Модель длительной СИ, начинающейся у самцов и самок крыс с раннего возраста, может быть использована в трансляционных исследованиях для дальнейшего изучения половых различий в патофизиологических механизмах когнитивных нарушений и изменениях эмоционально-мотивационного поведения, индуцированных стрессом длительной СИ. Эта модель может быть полезной также для поиска новых фармакологических соединений с ноотропными свойствами и соединений, оказывающих влияние на психоэмоциональную сферу, с целью разработки комплексной патогенетической терапии таких расстройств, учитывающей половые особенности реагирования на стресс и действие препаратов.

Положения, выносимые на защиту

1. Длительная социальная изоляция, начинающаяся с возраста отсаживания крысят от матери и продолжающаяся в течение 8 и более мес., сопровождается изменениями эмоционально-мотивационного статуса и социального поведения, ассоциативного обучения и пространственной памяти, более выраженными у самок крыс по сравнению с самцами.
2. Длительная социальная изоляция сопровождается повышением уровня рецепторов глюкокортикоидов во фронтальной коре мозга у крыс обоего пола. Изменения веса органов-маркеров стресса более выражены у самок крыс.
3. Патофизиологические механизмы развития когнитивных нарушений и изменений поведения, индуцированных длительной социальной изоляцией, различаются у крыс в зависимости от пола: только у самок выявлены изменения уровня предшественника нейротрофического фактора мозга и синаптофизина, а также экспрессии интерлейкинов IL-6, IL-1 β и дипептидилпептидазы-4 в мозге. У крыс обоего пола изменено содержание основных моноаминов в структурах мозга.

Апробация

Основные положения и результаты исследования были доложены на конференции «European pain federation Krakow pain school. Translational pain research: from lab to clinic» (Краков, 22-27 июня, 2019), на XXVI Научно-практической конференции с международным участием «Медицина боли: от понимания к действию» (Владивосток, 17-19 сентября, 2020), на III Международном форуме по когнитивным наукам «Cognitive Neuroscience – 2020» (Екатеринбург, 11-12 декабря, 2020), на международном вебинаре по неврологии и терапии «Emerging Challenges and Advances in Neurology & Therapeutics» (Лондон, 8-9 марта, 2021), на XVII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 4-10 июня, 2021), на 2-м конгрессе по клинической неврологии и

нейрохирургии «Unravel the Recent Advancements and Novel Discoveries in Neurology and Neurosurgery» (Берлин, 15-16 июля, 2021) и VI Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященной 90-летию со дня рождения академика К. В. Судакова. (Москва, 6-8 июля, 2022).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности 3.3.3. Патологическая физиология, и приравненные к ним публикации, и 7 сообщений – в сборниках докладов научных конференций и конгрессов.

Объем и структура работы

Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий работы на русском (33 источника) и иностранном (313 источников) языках. Работа изложена на 215 страницах, включая список литературы, и содержит 9 таблиц и 14 рисунков.

Личный вклад автора

Разработка основной научной идеи и планирование диссертационного исследования выполнено при непосредственном активном участии автора. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Иммуноферментный анализ содержания кортикостерона в сыворотке крови и Вестерн-блот анализ экспрессии белков в структурах мозга крыс проведены автором самостоятельно. Анализ моноаминов и их метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выполнен автором совместно с к.м.н. В.С. Кудриным на базе лаборатории нейрохимической фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова». Часть вошедших в диссертационную работу данных получена в соавторстве с другими исследователями. Автором проведен анализ данных научной литературы, полученных результатов, выполнена их статистическая обработка, предложена интерпретация, сформулированы выводы, подготовлены материалы для публикации. Автору принадлежит ведущая роль в написании научных публикаций по теме диссертации. Результаты представлены лично автором в докладах на международных конференциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 190 белых крысах популяции Вистар (36 самцов и 154 самки). Животные были рождены и выращены в питомнике ФГБНУ «НИИОПП» (система «Меркурий», номер в реестре: RU 1487336). На протяжении всего обследования животных содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещенности и свободным доступом к воде и пище (ООО «Лабораторкорм», Россия). Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежащей

лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, ГОСТ 33215-2014, 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

Моделирование социальной изоляции

Три серии многомесячных исследований проведены последовательно в течение трех лет по схожей схеме. Крысята были рождены в одно и то же время года (конец декабря – начало января). День рождения крыс считали нулевым постнатальным днём (ПНД). В первый ПНД каждой самке для вскармливания оставляли по 5-7 крысят из разных пометов, чтобы уменьшить влияние генетического фактора и уровня материнской заботы на поведение потомства. Крысят отсаживали от матерей на 26-й ПНД в серии 1, на 35-36-ой ПНД в серии 2 и на 27-ой ПНД в серии 3, что соответствовало подростковому возрасту (Lukkes et al., 2009; McCormick, Mathews, 2010; Green, McCormick, 2013). После первичной оценки поведения в возрасте крыс приблизительно 1 мес. животных распределяли на контрольную (К) и экспериментальную группы (СИ) таким образом, чтобы между этими группами не было статистически значимых различий по измеренным показателям поведения и по весу животных.

На протяжении всего эксперимента животных контрольных групп содержали по 4-6 особей в клетках размером 57×37×19 см, животных опытных групп содержали поодиночке в клетках размером 36×20×14 см до достижения животными возраста 10 мес. в серии 1 и 2, и 11 мес. в серии 3. На протяжении всего эксперимента крыс содержали в одинаковых условиях, в одной и той же комнате вивария. Крысы группы СИ имели возможность воспринимать обонятельные, слуховые и, в меньшей степени, визуальные сигналы от других крыс, но были полностью лишены возможности тактильных социальных контактов.

Размеры выборок животных опытных и контрольных групп после первичного тестирования в возрасте 1 мес. и формирования групп приведены на **Рис. 1**.

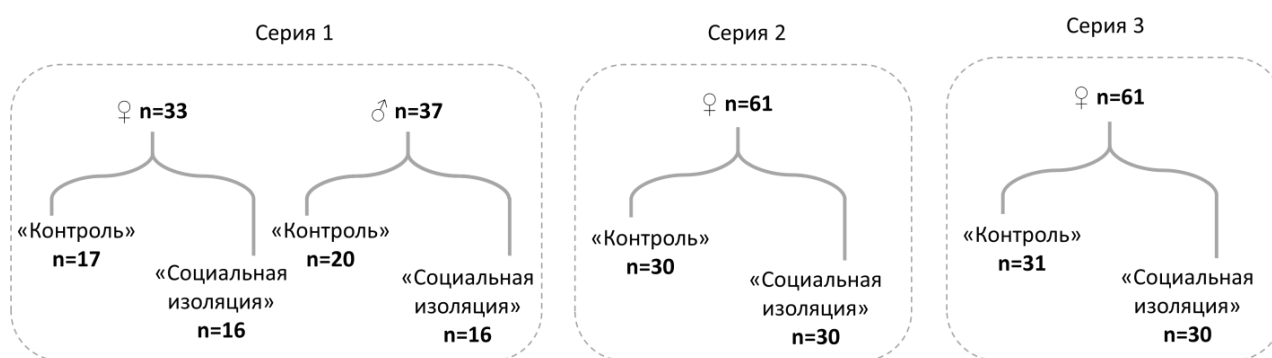


Рис. 1. Размеры выборок в трех сериях исследования. Возраст крыс на момент распределения на группы составлял примерно 1 мес.

Дизайн исследования представлен на **Рис. 2**. Для упрощения изложения сроки обследования указаны приблизительно, в месяцах (ПНД 26-44 условно считали равным 1 мес., ПНД 87-108 – 3 мес., ПНД 152-203 – 5,5 мес., ПНД 232-269 – 8,5 мес., ПНД 260-301 – 9 мес. и ПНД 300-343 – 10,5 мес.).

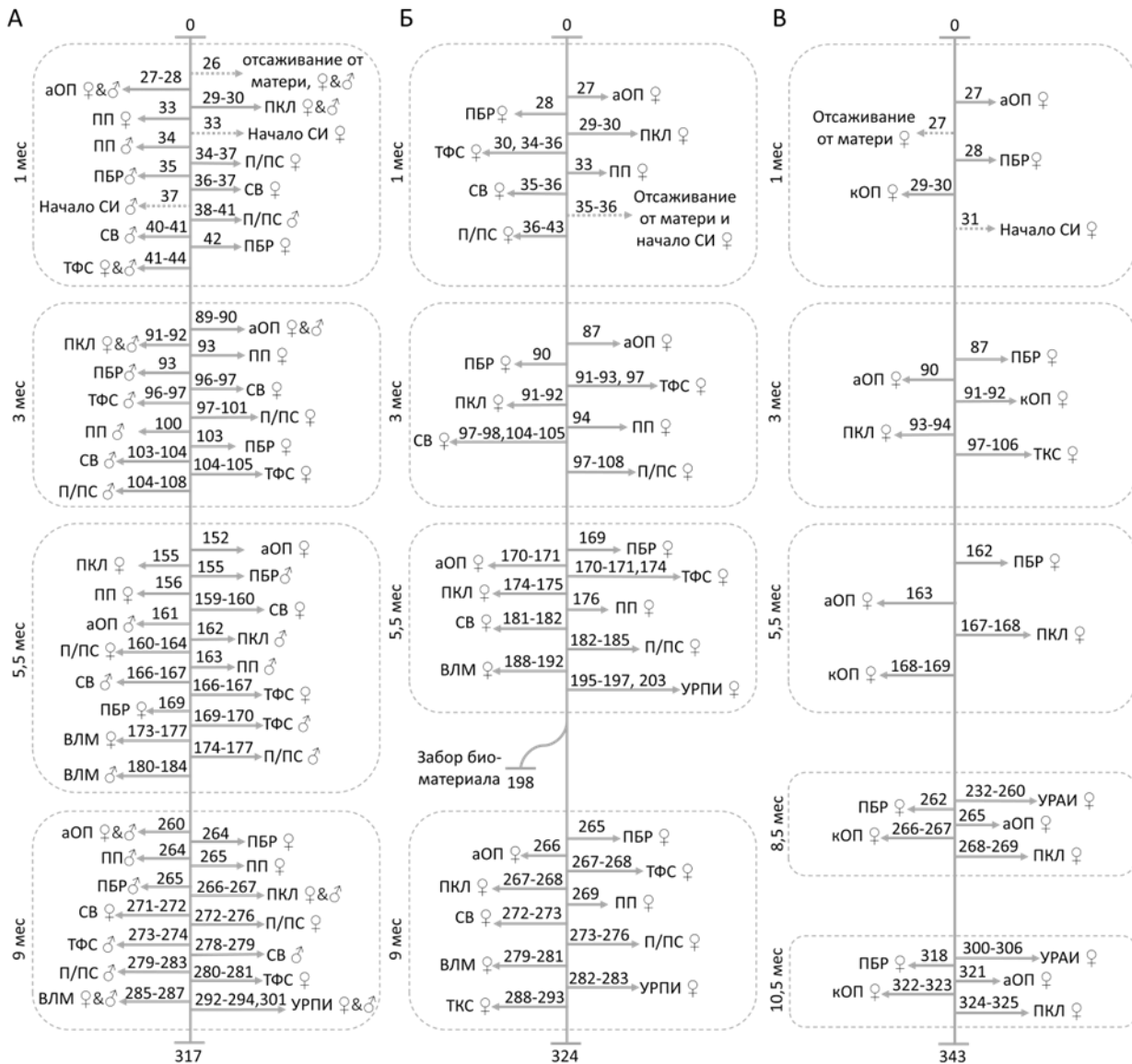


Рис. 2. Дизайн исследования. А – серия 1, Б – серия – 2, В – серия 3. На шкале указаны ПНД проведения тестов. СИ – социальная изоляция, ♀ – самки, ♂ – самцы, аОП – тест автоматизированного Открытого Поля, кОП – тест классического Открытого Поля, ПБР – измерение порогов болевых реакций в тестах «Hot Plate» и «Tail Flick», ПКЛ – тест Приподнятый Крестообразный Лабиринт, ПП – тест Принудительного плавания, СВ – тест Социального взаимодействия, П/ПС – тест Потребления/Предпочтения сахарозы, ТФС – метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний, ВЛМ – тест Водный Лабиринт Морриса, ТКС – Трех-камерный социальный тест, УРПИ – Условный рефлекс пассивного избегания, УРАИ – условный рефлекс активного избегания.

Сбор биологического материала

По завершении тестирования поведения животных декапитировали с помощью гильотины и немедленно отбирали образцы крови для анализа уровня кортикостерона в сыворотке крови. Дополнительно измеряли вес стресс-компетентных органов (надпочечники, селезенка, тимус). Структуры головного мозга (фронтальная кора, гиппокамп, стриатум и гипоталамус) выделяли на льду и сразу замораживали в жидком азоте. Пробы хранили в холодильнике при температуре -80°C .

В серии 2 перед декапитацией как в возрасте 6 мес., так и в возрасте 10 мес. проводили дополнительное стрессирование у половины животных (иммобилизация в течение 60 мин).

Определение уровня кортикостерона

Образцы крови были собраны в вакуумные пробирки с активатором свертывания. Сыворотку, полученную после центрифугирования, собирали в отдельные пробирки и хранили при температуре -80°C . Для проведения иммуноферментного анализа использовали набор ELIZA (DRG Instruments GmbH, Германия). Все измерения были выполнены в соответствии с инструкцией производителя. Использовали микропланшетный фотометр (ридер) для иммуноферментных анализов Immunochem-2100 (High Technology, Inc., USA).

Определение экспрессии белков в структурах мозга

Для определения экспрессии белков в структурах мозга крыс использовали образцы ткани 20 крыс, полученные в серии 1, и образцы ткани 28 крыс, полученные в серии 2. Концентрацию общего белка в образцах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда. Белки подготовленных проб разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле. Разделённые образцы переносили на целлюлозную мембрану («Bio-Rad» при помощи электроэлюции). Использовали первичные моноклональные антитела мыши к SYP (2): sc-136271, 38–48, антитела мыши к proBDNF (5H8): sc-65514, антитела мыши к PREP (C-12): sc-365416, антитела мыши к DPP4 (5E8): sc-52642, антитела мыши к IL-1 β (B122): sc-12742, антитела мыши к IL-6 (10E5): sc-57315, антитела мыши к GR (G-5): sc-393232 и антитела мыши к β -Actin (C4): sc-47778 («Santa Cruz Biotechnology Inc.», США). Для каждого белка использовали отдельную мембрану. После промывания блоты инкубировали в растворе вторичных антител (goat anti-mouse IgG-HRP: ab6789 («Abcam», США). Белки выявляли при помощи ECL-реагента («Pierce Biotechnology», США). Затем мембрану помещали под фотоплёнку («Kodak», США) на 10 мин. Для денситометрии полученных результатов использовали программу Adobe Photoshop 7.0 («Adobe Systems», США). Результаты выражали в относительных денситометрических единицах. В качестве дополнительного контроля равномерности загрузки проб производили окрашивание нитроцеллюлозной мембраны на общий белок (Ponceau S) и измеряли экспрессию β -актина (белок внутреннего контроля).

Определение содержания моноаминов и их метаболитов в структурах мозга

Измерения проводили на базе лаборатории нейрхимической фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова». Использовали образцы ткани 40 крыс, полученные в серии 1. Уровень моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) на хроматографе LC_304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке ReproSil_Pur, ODS_3, 4×100 мм, размер частиц 3 мкм (Dr. Majsch GMBH, “Элсико”, Москва). Для определения количества моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий в качестве внутреннего стандарта ДОБА, НА, 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (DOPAC), DA,

гомованилиновую кислоту (HVA), 5-НТ, 3-метокситирамин (3-МТ), 5-оксииндолуксусную кислоту (5-НИАА) в концентрации 500 пкмоль/мл. Регистрацию образцов проводили с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1,5 (АМПЕРСЕНД). Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков ($mV \cdot c$) в стандартной смеси и в образце, по формуле:

$$[KA]_{оп} = S_{Каоп} \cdot S_{ДОБА(ст)} \cdot [KA]_{ст} \cdot [ДОБА_{оп}] / \{S_{Ка(ст)} \cdot S_{ДОБА_{оп}} \cdot [ДОБА_{(ст)}]\} / \text{вес ткани (г)},$$

где $[KA]$ – концентрация катехоламина (нмоль/г ткани), $S_{Каоп}$ и $S_{Ка(ст)}$ – площадь пика катехоламина в опыте и в стандарте ($mV \cdot c$), $S_{ДОБА_{оп}}$ и $S_{ДОБА(ст)}$ – площадь пика ДОБА в опыте и в стандарте ($mV \cdot c$), $[ДОБА_{оп}]$ и $[ДОБА_{(ст)}]$ – концентрация ДОБА в опыте и в стандарте (нмоль/мл), $[KA]_{ст}$ – концентрация катехоламина в стандартной смеси (нмоль/мл).

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили по алгоритмам программы Statistica 12.0. Для проверки гипотезы о нормальном распределении данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Если гипотезу о нормальности распределения данных принимали, то для сравнения средних значений нескольких независимых выборок применяли одно- или многофакторный дисперсионный анализ ANOVA, а также дисперсионный анализ с повторными измерениями (Repeated Measures ANOVA) с последующим сравнением средних значений дисперсионного комплекса по тесту Ньюмана-Кеулса (Н-К тест). При отвержении этой гипотезы использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни для независимых переменных. Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение p ($p_{кр}$) для каждого сравнения по методу FDR-контроля (Benjamini, Hochberg, 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вес крыс

В серии 2 выявлено снижение веса крыс после 2, 4,5 и 8 мес. СИ (взаимодействие факторов «Возраст» $\times$ «Содержание» $F_{(3,204)}=4,388$, $p=0,005$). В серии 1 влияние фактора «Содержание» было статистически значимым (Two-Way ANOVA: $F_{(1,64)}=4,5868$, $p=0,036$) в возрасте крыс 9 мес. В обеих сериях вес крыс, подвергнутых СИ, был ниже. В серии 3 различий между группами в зависимости от условий содержания не выявлено.

Двигательная активность

В данной работе двигательную и исследовательскую активность самцов и самок крыс, подвергнутых длительной СИ, оценили в двух ситуациях с разным уровнем стресса – в аОП, кОП. Ни в одной из серий не выявлено повышения двигательной активности в аОП. Однако в серии 1 были выявлены половые различия: у самок двигательная активность в тестах аОП и тесте ПКЛ была выше, чем у самцов ($F_{(1,63)}=25,244$, $p<0,001$ и $F_{(1,63)}=26,775$, $p<0,001$, соответственно). Эффект имеет подтверждение в литературе (например, Archer, 1975; Weiss et al., 2004).

Только в кОП, где уровень стрессирования был значительно выше за счет яркого освещения арены, в серии 1 удалось зарегистрировать повышение двигательной активности вследствие СИ независимо от пола животных ($F_{(1,64)}=4,337$, $p=0,041$). В тесте ПП в этой серии выявлено более позднее снижение двигательной активности у крыс, подвергнутых изолированному содержанию (взаимодействие факторов «Возраст» × «Содержание»: $F_{(3,180)}=3,298$, $p=0,022$). Результаты настоящей работы свидетельствуют о развитии признаков гиперактивного фенотипа вследствие длительной изоляции, причем увеличение двигательной активности у социально изолированных крыс более вероятно в стрессогенной ситуации.

Болевая чувствительность

В сериях 1 и 2 были получены данные о повышении порогов болевых реакций у крыс после 2 мес. ($F_{(1,40)}=4,883$, $p=0,033$ и $F=15,665$, $p<0,001$, соответственно) и после 4,5 мес. СИ ($F_{(1,59)}=6,883$, $p=0,011$ и $F=16,117$, $p<0,001$, соответственно), но эффект выявлен только в тесте «Hot Plate».

Эмоционально-мотивационное поведение

В серии 3 были выявлены признаки развития тревожности: снижение предпочтения открытых рукавов после 2 мес. СИ (взаимодействие факторов «Возраст» × «Содержание»: $F_{(3,189)}=14,687$, $p<0,001$) и увеличение времени, проведенного в краевой зоне кОП после 4,5 мес. СИ ($U=265$, $p=0,025$) по сравнению с контрольной группой. В двух других сериях, в которых уровень тревожности определяли также с использованием комплексной оценки тревожно-фобических состояний, данные свидетельствовали о снижении тревожности у крыс вследствие длительной СИ (Рис. 3). Учитывая большое количество работ, в которых приводятся свидетельства развития признаков тревожности у крыс после 6-8 недель СИ, можно предполагать, что продление СИ до 8 мес. привело к адаптации с гиперкомпенсацией признаков тревожности в этой серии вплоть до ее снижения.

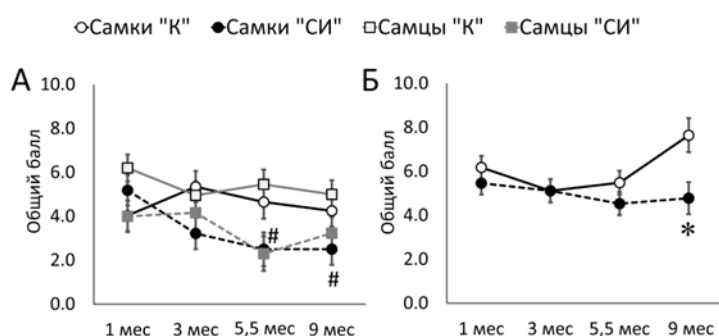


Рис. 3. Уровень тревожности крыс. К – Контроль, СИ – Социальная изоляция, А – серия 1, Б – серия 2. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p<0,05$ по сравнению с возрастом 1 мес. (Н-К тест); * $p<0,05$ по сравнению с группой «Контроль» (U-критерий Манна-Уитни).

Признаков депрессивности у крыс, подвергнутых длительной СИ в настоящей работе выявлено не было.

Социальное взаимодействие

Выявлено повышение числа и длительности социального взаимодействия после 2 мес. СИ как у самцов (серия 1: $U=6,0$, $p=0,013$ и $U=5,0$, $p=0,008$, соответственно), так и у самок (серия 1: $U=0,0$, $p<0,001$ и $U=4,0$, $p=0,008$; серия 2: $U=6,5$, $p<0,001$ и $U=7,5$, $p<0,001$, соответственно). После 4,5 мес. СИ повышение социального взаимодействия обнаружено

только у самок по увеличению числа (серия 1: $U=3,5$, $p=0,001$; серия 2: $U=17,0$, $p<0,001$) и длительности неагрессивных контактов (серия 2: $U=5,5$, $p<0,001$). Только у самок выявлено повышение числа и длительности агрессивных социальных контактов после 2 мес. (серия 1 – $U=4,0$, $p=0,008$ и $U=4,0$, $p=0,008$; серия 2 – $U=22,5$, $p<0,001$ и $U=22,5$, $p<0,001$, соответственно) и 4,5 мес. изоляции (серия 2: $U=55,5$, $p=0,029$ и $U=53,5$, $p=0,022$, соответственно).

В ТКС тесте самки демонстрировали повышенное предпочтение социального объекта после 2 мес. изоляции (серия 3: $U=205$, $p=0,006$). После 8 мес. СИ у самок выявлено снижение предпочтения «социальной новизны» (серия 2: $U=17$, $p=0,016$).

Когнитивные функции

В сериях 1 и 2 выявлено снижение реакции на новизну (резкую смену освещения) в тесте КОП ($F_{(1,63)}=19,907$, $p<0,001$ и $F_{(1,203)}=8,428$, $p=0,004$). В серии 3 различий между группами по этому показателю не выявлено (Рис. 4).

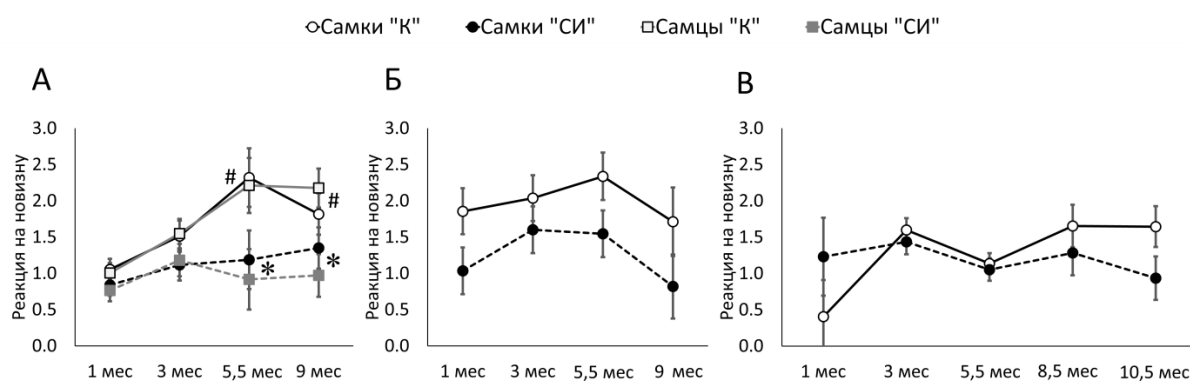


Рис. 4. Реакция на новизну в тесте аОП. К – Контроль, СИ – Социальная изоляция, А – серия 1, Б – серия 2, В – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p<0,05$ по сравнению с животными той же группы в возрасте 1 мес., * $p<0,007$ по сравнению с крысами группы «Контроль» (Н-К тест).

В настоящей работе в тесте ВЛМ к стандартной процедуре, которая включает проверку выработки навыка через 24 ч после последней обучающей сессии (тест 1), добавили отсроченную проверку памяти через 4 мес. (тест 2), за которой следовало напоминание, состоящее из двух попыток найти платформу, и проверка памяти через 24 ч после напоминания (тест 3).

В сериях 1 и 2 при обучении крысы группы СИ позже достигали приплатформенной зоны и проводили больше относительного времени в краевой зоне ВЛМ (Рис. 5). В серии 1 выявлены половые различия: в 3 день обучения самки позже достигали платформы, чем самцы, а в тесте 3 – проводили больше времени в краевой зоне ($F_{(1,65)}=7,781$, $p=0,007$ и $F_{(1,65)}=6,569$, $p=0,013$, соответственно). Это согласуется с данными научной литературы о более успешном обучении самцов в тесте ВЛМ (Jonasson, 2005; Vorhees et al., 2008).

При напоминании у самок был увеличен латентный период достижения приплатформенной зоны по сравнению с самцами. В тесте 3 величина этого показателя была больше у крыс группы СИ. В обоих случаях наибольший вклад внесли самки группы СИ (Рис. 5, А). Данные свидетельствуют в пользу большей уязвимости пространственной памяти самок к стрессу СИ.

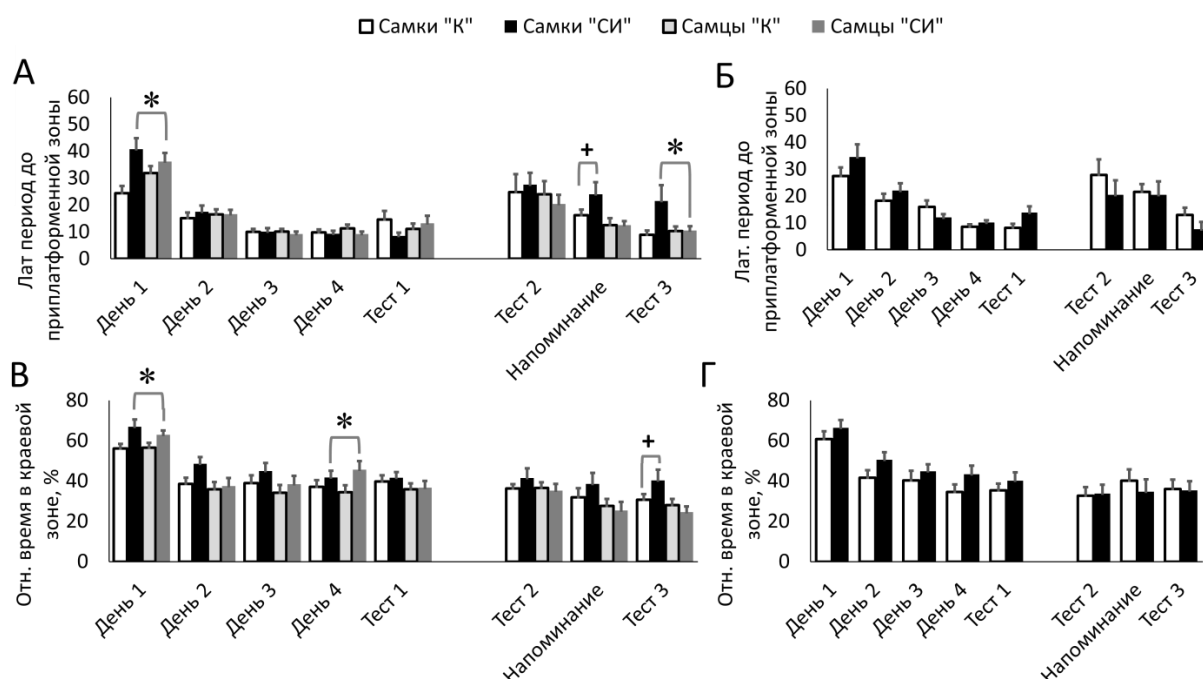


Рис. 5. Поведение крыс в тесте ВЛМ. К – Контроль, СИ – Социальная изоляция А,В – серия 1; Б,Г – серия 2. А,Б – латентный период достижения приплатформенной зоны, В,Г – относительное время, проведенное в краевой зоне. * $p < 0,05$ по сравнению с крысами группы «Контроль», + $p < 0,05$ по сравнению с самцами (Н-К тест).

Для оценки сохранности памяти спустя 4 мес. после обучения был проведен сравнительный анализ латентного периода достижения приплатформенной зоны на первой попытке в первый день обучения (в возрасте крыс 5,5 мес.) и при тестировании перед напоминанием (в возрасте крыс 9 мес.). В двух сериях влияние фактора повторных измерений «Возраст» было статистически значимым (в серии 1 – $F_{(1,44)}=32,921$, $p < 0,001$; в серии 2 – $F_{(1,15)}=20,393$, $p < 0,001$): спустя 4 мес. после обучения крысы быстрее достигали приплатформенной зоны, чем при первой попытке обучения. Этот результат свидетельствует в пользу сохранения памяти о местоположении платформы даже через продолжительное время после обучения. Эффект не зависел от пола животных и условий содержания.

В данной работе показано нарушение формирования УРПИ у самцов и самок крыс, после 8-месячного изолированного содержания (серия 1), и у самок крыс после 4,5 мес. СИ (серия 2) (взаимодействие факторов «Содержание» и «Этап эксперимента»: $F_{(3,55)}=12,527$, $p < 0,001$; $F_{(5,255)}=4,250$, $p < 0,001$, соответственно): выявлено снижение латентного периода перехода в темный отсек камеры, через 24 ч после того как крыса получила в этом отсеке болевое подкрепление (тест 1) (**Рис. 6**). При тестировании через 7 дней после обучения эффект СИ выявлен только после 8 мес. СИ в серии 1.

В серии 2 в данном тесте тоже применили подход с дополнительной проверкой памяти через 4 мес. после обучения (тест 3) и через 24 ч после напоминания (тест 4), которое крыса получала после перехода в темный отсек в тесте 3. В тесте 4 латентный период перехода был больше, чем при обучении, как в контрольной группе, так и в группе СИ, однако различия между группами вновь были статистически значимыми.

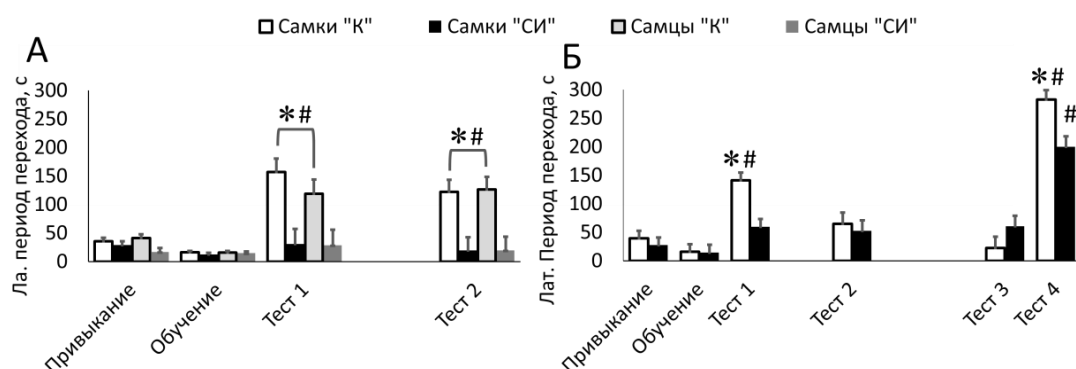


Рис. 6. Латентный период перехода в темный отсек камеры в тесте УРПИ. К – Контроль, СИ – Социальная изоляция, А – серия 1, Б – серия 2, * $p<0,05$ по сравнению с крысами группы «Социальная изоляция» на том же этапе эксперимента, # $p<0,05$ по сравнению с крысами группы «Контроль» на этапе обучения (Н-К тест).

В серии 3 на самках показано, что СИ нарушала обучение в тесте «Условный рефлекс активного избегания» увеличивая число реакций избавления и уменьшая число реакций избегания ($F=6,346$, $p=0,015$ и $F=7,356$, $p=0,009$, соответственно), но не влияла на поведение крыс при тестировании через 24 ч (тест 1) и через 2 мес. (тест 2) (Рис. 7).

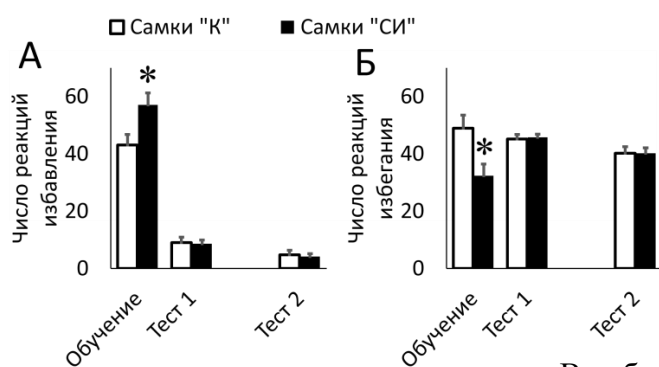


Рис. 7. Поведение крыс в тесте «Условный Рефлекс Активного Избегания». К – Контроль, СИ – Социальная изоляция А – число реакций избавления, Б – число реакций избегания, * $p<0,05$ по сравнению с самками группы «Контроль».

В работе Levshina et al. (2006) показано ухудшение обучения в тесте УРАИ у самцов Wistar в возрасте 3 мес. после 70-дневной СИ, начинавшейся в раннем возрасте. Этап тестирования в данной работе не проводили. Авторы предполагают, что ухудшение обучения в этом тесте связано с повышенной чувствительностью крыс, подвергнутых социальной изоляции, к стрессогенной ситуации.

Состояние ГГА-оси

Обнаружено повышенное содержание базового уровня кортикостерона у самок по сравнению с самцами ($F_{(1,36)}=25,565$, $p<0,001$), а также повышение уровня кортикостерона у самок после иммобилизационного стресса (серия 2). Однако различий между крысами в зависимости от условий содержания не было выявлено.

В серии 1 на вес селезенки оказывали влияние факторы «Пол» ($F_{(1,64)}=10,208$, $p=0,002$) и «Содержание» ($F_{(1,64)}=8,286$, $p=0,005$): относительный вес этого органа был больше у самок, чем у самцов, и меньше у крыс группы СИ по сравнению с крысами группы «Контроль». Изменения относительного веса надпочечников были выявлены во всех сериях. В серии 1 выявлено взаимодействие факторов «Пол» $\times$ «Содержание» ($F_{(1,64)}=9,370$, $p=0,003$): величина этого показателя была выше у самок по сравнению с самцами, и у самок группы СИ – больше, чем у самок группы К. В серии 2 у самок группы СИ, не подвергавшихся дополнительному

иммобилизационному стрессу, уровень кортикостерона был повышен по сравнению с величиной показателя в соответствующей контрольной группе (взаимодействие факторов «Содержание» и «Стрессирование»: $F_{(1,64)}=10,208$, $p=0,002$) после 9 мес. СИ. В серии 3 относительный вес надпочечников у самок группы «Социальная изоляция» также был повышен ($F=6,770$, $p=0,012$) после 9,5 мес. СИ. Различий в относительном весе тимуса не было обнаружено ни в одной из серий.

Во фронтальной коре методом Вестерн-блот анализа было выявлено увеличение экспрессии GR у самцов после 9 мес. СИ и у самок в серии 2 после 5 и 9 мес. СИ (таблица 1). Только у самцов было обнаружено снижение уровня GR в гиппокампе после 9 мес. СИ.

Таблица 1 – Изменение уровня белков в структурах мозга крыс при СИ разной длительности.

Фронтальная кора		Гиппокамп	Стриатум
5 мес. СИ, ♀ (серия 2)	↓IL-1β (U=7, p=0,026)	↓IL-6 (U=6, p=0,017)	↓IL-6 (U=4, p=0,011)
	↑GR (U=7, p=0,0026)	↑DPP4 (U=4, p=0,007) ↑PREP (U=6, p=0,017) ↓proBDNF (U=5, p=0,011)	↓DPP4 (U=6, p=0,017) ↓PREP (U=4, p=0,007)
9 мес. СИ, ♀ (серия 2)	↑DPP4 (U=3, p=0,008)	↑IL-1β (U=5, p=0,011)	↓IL-1β (U=5, p=0,022)
	↑GR (U=3, p=0,008)	↑PREP (U=1, p=0,001) ↑SYP (U=4, p=0,007)	↓IL-6 (U=4, p=0,014) ↑PREP (U=4, p=0,014) ↓proBDNF (U=6, p=0,035)
9 мес. СИ, ♀ (серия 1)	↓proBDNF (U=2, p=0,032)	↓IL-1β (U=1, p=0,016) ↓IL-6 (U=0, p=0,008) ↑DPP4 (U=2, p=0,032)	
9 мес. СИ, ♂ (серия 1)	↑GR (U=2, p=0,016)	↓GR (U=2, p=0,032)	↓PREP (U=0, p=0,029)

Примечание – СИ – социальная изоляция, ♀ - самки, ♂ - самцы.

Экспрессия белков в структурах мозга

Методом Вестерн-блот анализа выявлено изменение экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6, маркеров нейропластичности proBDNF и SYP, пролинспецифических пептидаз DPP4 и PREP во фронтальной коре, гиппокампе и стриатуме вследствие СИ. Сводные данные о различиях приведены в таблице 1. Обнаружено повышение экспрессии GR во фронтальной коре крыс. У самок в структурах мозга преимущественно выявлено снижение экспрессии провоспалительных цитокинов и повышение уровня пролинспецифических пептидаз. У самцов в гиппокампе обнаружено снижение экспрессии GR, а в стриатуме – снижение уровня PREP.

Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга

Обнаружены эффекты СИ на содержание NA, DA и 5-НТ и их метаболитов во фронтальной коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние фактора «Содержание» на уровень моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс.

	Фронтальная кора	Гиппокамп	Стриатум	Гипоталамус
Фактор «Содержание»	↑DA ($F_{(1,36)}=5,185$, $p=0,029$)	↓NA ($F_{(1,36)}=4,677$, $p=0,037$)	↑NA ($F_{(1,36)}=4,254$, $p=0,047$)	↑DA ($F_{(1,36)}=8,123$, $p=0,007$)
	↑3-МТ ($F_{(1,36)}=10,464$, $p=0,003$)	↓DOPAC ($F_{(1,36)}=9,137$, $p=0,005$)	↑5-НТ ($F_{(1,36)}=8,914$, $p=0,005$)	↑5-НТ ($F_{(1,36)}=3,851$, $p=0,058$)
	↑3-МТ/DA ($F_{(1,36)}=4,230$, $p=0,048$)	↓HVA ($F_{(1,36)}=8,086$, $p=0,067$)	↓5-НIAA/5-НТ ($F_{(1,36)}=9,298$, $p=0,004$)	
	↑5-НТ ($F_{(1,36)}=22,466$, $p<0,001$)	↑3-МТ/DA ($F_{(1,36)}=6,705$, $p=0,014$)		
	↑5-НIAA ($F_{(1,36)}=14,686$, $p<0,001$)			

Кроме того, выявлены половые различия в содержании моноаминов в структурах мозга крыс. У самок было снижено содержание НА во фронтальной коре ($F_{(1,36)}=4,458$, $p=0,042$), гиппокампе ($F_{(1,36)}=5,264$, $p=0,028$) и гипоталамусе ($F_{(1,36)}=6,197$, $p=0,018$), содержание 3-МТ ($F_{(1,36)}=8,032$, $p=0,008$) и 5-НТ ($F_{(1,36)}=4,561$, $p=0,040$) в стриатуме. В гиппокампе и гипоталамусе взаимодействие факторов «Пол» × «Содержание» достигло уровня статической значимости по уровню НА ($F_{(1,36)}=4,005$, $p=0,053$) и 3-МТ ($F_{(1,36)}=4,429$, $p=0,043$), соответственно. Только у самок в группе СИ выявлено снижение НА в гиппокампе и повышение 3-МТ в гипоталамусе после 8 мес. СИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе получены приоритетные данные о воздействии продолжительной социальной изоляции на поведение и биологические показатели самцов и самок крыс в динамике стрессогенного воздействия. Особенностью проведенного исследования является сопоставление комплексных оценок нарушения поведения и памяти у крыс обоего пола в разные периоды социальной изоляции – от 2 мес. до 9 мес., что восполняет недостаток данных о половых различиях реактивности мозга при данном типе стрессирования, существующий в современной научной литературе. С одной стороны, этот подход позволил получить данные об эффектах 6-8 недельной социальной изоляции, сопоставимые по некоторым показателям с накопленными ранее данными, полученными в многочисленных исследованиях других авторов. С другой стороны, были получены новые данные о последствиях ранней социальной изоляции у самок крыс по сравнению с самцами. Получены принципиально новые данные о воздействии пролонгированного стресса социальной изоляции на крыс обоего пола.

В работе получены данные, подтверждающие стрессогенность социальной изоляции при ее многомесячном неизбежном воздействии у крыс обоего пола. Об этом свидетельствует изменение массы органов-маркеров стресса – селезенки и надпочечников, а также повышение уровня глюкокортикоидных рецепторов в мозге. В целом, эти результаты отражают нарушение состояния ГГА-оси как у самцов, так и у самок крыс. Обращает на себя внимание тот факт, что увеличение веса надпочечников было более выражено у самок крыс. Кроме того, только у самок было обнаружено изменение экспрессии цитокинов с провоспалительным действием – интерлейкинов IL-1 β и IL-6 – в структурах мозга. В

совокупности, эти результаты свидетельствуют о большей уязвимости самок к действию стресса социальной изоляции.

Эта особенность самок проявлялась и в поведении. На ранних сроках социальной изоляции самки могли реагировать повышением уровня тревожности, а после 4,5 мес изоляции проводили больше времени в краевой зоне классического «Открытого поля» и «Водного лабиринта Морриса» по сравнению с самками, которых содержали в группах. Эту зону принято считать зоной тигмотаксиса. Известно, что анксиолитики облегчают выход из зоны тигмотаксиса, причем этот эффект связывают не с анксиолитическим действием как таковым, а со снижением стресс-индуцированного торможения исследовательской активности в опасной незнакомой обстановке (Pruet, Belzung, 2003). Исходя из этих представлений, можно предположить, что социальная изоляция, приводя к увеличению времени пребывания в краевой зоне, то есть, усиливая тигмотаксис, фактически усиливает стресс-индуцированное торможение исследовательской активности у животных в опасной обстановке.

Несмотря на то, что ухудшение обучения и памяти под влиянием социальной изоляции в тестах УРПИ и ВЛМ демонстрировали как самцы, так и самки крыс, когнитивные нарушения у самок были выявлены по большему числу показателей.

В работе был применен новый методический подход к изучению долговременной памяти у крыс, который заключался в дополнительном тестировании животных через 4 мес. после обучения, напоминании и проверки памяти после напоминания. Этот подход оказался эффективным для выявления последствий пролонгированного стресса социальной изоляции и может быть рекомендован к использованию в нейрпатофизиологических исследованиях.

Пролонгирование хронической непрерывной социальной изоляции позволило выявить у самок изменение поведения от усиления социальности после 2 и 4,5 мес. изоляции до снижения предпочтения «социальной новизны» после 8 мес. изоляции, то есть, обнаружить смену стратегий преодоления (coping strategy). Использование такого подхода в будущих исследованиях позволит выявить патогенетические механизмы адаптации/дезадаптации организма к хроническому социальному стрессу.

Результаты настоящего исследования показали, что у самок, в отличие от самцов, длительная социальная изоляция сопровождается изменением уровня белков-маркеров нейропластичности proBDNF и SYP, причем повышение уровня одного из основных маркеров синаптической пластичности SYP обнаружено только после 8 мес. социальной изоляции. Еще предстоит найти ответ на вопрос о том, какой вклад в изменение поведения и когнитивных процессов, вызванных пролонгированной социальной изоляцией, вносят нейротрофические факторы.

В работе высказано предположение о том, что развитие когнитивных нарушений у самок крыс, которых содержали в условиях социальной изоляции, может быть опосредовано участием пролинспецифических пептидаз PREP и DPP4.

Выявлено участие основных моноаминергических систем – DA-ергической, NA-ергической и 5-НТ-ергической – в развитии последствий длительной социальной изоляции. Оценка состояния этих систем на разных уровнях их функционирования может быть

перспективным направлением дальнейших исследований эффектов пролонгированной социальной изоляции.

Обобщая вышесказанное, среди наиболее вероятных патофизиологических механизмов, обусловивших более выраженные нарушения поведения у социально изолированных самок крыс в сравнении с самцами, можно отметить те изменения активности катехоламинергических систем, которые обнаружены только у самок – снижение уровня NA в гиппокампе и усиление метаболизма DA в гипоталамусе, а также снижение экспрессии провоспалительных цитокинов и активацию пролинспецифических пептидаз в структурах мозга.

ВЫВОДЫ

1. Социальная изоляция длительностью 8 мес. приводила к снижению уровня тревожности у крыс Wistar. Признаков депрессивности в поведении крыс не обнаружено.

2. Социальная изоляция приводила к нарушениям ассоциативного обучения и пространственной памяти у крыс обоего пола. Эти нарушения были в большей степени выражены у самок крыс.

3. Повышение с возрастом болевой чувствительности в тесте «Hot Plate» у крыс, которых содержали в социальной изоляции, происходило медленнее, чем у крыс, которых содержали в группах.

4. Социальная изоляция приводила к выраженным расстройствам социального поведения: после 2 мес. изоляции у крыс обоего пола было повышено социальное взаимодействие, но только у самок выявлены признаки агрессивности. После 8 мес. изоляции у самок развивались признаки снижения предпочтения «социальной новизны».

5. Обнаружено увеличение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во фронтальной коре мозга у социально изолированных крыс обоего пола, но только у самцов выявлено снижение экспрессии этих рецепторов в гиппокампе. У самок изоляция приводила к увеличению веса надпочечников. Социальная изоляция не изменяла уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс.

6. Методом Вестерн-блот анализа показано, что:

➤ у самок социальная изоляция изменяла экспрессию провоспалительных цитокинов – интерлейкинов IL-1 β и IL-6 – в структурах мозга: после 5 мес. изоляции уровень IL-1 β во фронтальной коре и IL-6 в гиппокампе и стриатуме был снижен; после 9 мес. изоляции уровень IL-6 был снижен в стриатуме и гиппокампе, в стриатуме также был снижен уровень IL-1 β ;

➤ у самок, но не у самцов социальная изоляция изменяла уровень маркеров нейропластичности в структурах мозга: уровень предшественника нейротрофического фактора мозга был снижен в гиппокампе после 5 мес. изоляции, а во фронтальной коре и

стриатуме – после 9 мес.; в гиппокампе выявлен повышенный уровень синаптофизина после 9 мес. изоляции;

➤ социальная изоляция изменяла уровень пролинспецифических пептидаз в структурах мозга: у самок экспрессия дипептидилпептидазы-4 и пролилэндопептидазы после 5 мес. изоляции в гиппокампе была повышена, а в стриатуме – снижена; после 9 мес. изоляции экспрессия обеих пептидаз была повышена в гиппокампе и стриатуме, во фронтальной коре была также повышена экспрессия дипептидилпептидазы-4; у самцов после 9 мес. социальной изоляции экспрессия пролилэндопептидазы в стриатуме была ниже, чем у животных, которых содержали в группах.

7. У крыс независимо от пола после 9 мес. социальной изоляции выявлено повышенное содержание дофамина и его метаболита 3-метокситирамина, серотонина и его метаболита 5-оксииндолуксусной кислоты во фронтальной коре мозга, повышенное содержание дофамина в гипоталамусе, норадреналина и серотонина в стриатуме. У социально изолированных самок было снижено содержание норадреналина в гиппокампе и повышено содержание 3-метокситирамина в гипоталамусе.

8. Сравнительный анализ эффектов длительной социальной изоляции у самцов и самок крыс выявил более выраженные нарушения обучения и памяти, эмоционального и социального поведения у самок, что сопровождалось изменением уровня молекулярных маркеров нейропластичности, снижением уровня провоспалительных цитокинов, повышением экспрессии пролинспецифических пептидаз, а также более выраженным изменением активности катехоламинергических систем в структурах мозга.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности 3.3.3. Патологическая физиология, и приравненные к ним публикации:

1. Ширенова С.Д., Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Динамика болевой чувствительности у самцов и самок крыс в условиях длительной социальной изоляции // Росс. журн. боли. – 2019. Т. 17, № 4. – С. 27-34. doi: 10.26731/RASP.2019.04.38
2. Krupina, N. A., Shirenova, S. D., Khlebnikova, N.N. Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex // Brain Sci. – 2020. Vol. 10, 799. doi: 10.3390/brainsci10110799
3. Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Длительная социальная изоляция приводит к снижению экспрессии предшественника BDNF и пролилэндопептидазы в структурах мозга крыс // Биохимия. – 2021. – Т. 86, № 6. – С. 857-870. doi: 10.31857/S0320972521060087
Shirenova S.D., Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Long-Term Social Isolation Reduces Expression of the BDNF Precursor and Prolyl Endopeptidase in the Rat Brain. // Biochemistry (Moscow). – 2021. – Vol. 86, № 6. – P. 704-715. doi: 10.1134/S0006297921060080
4. Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Изменения социальности и предпочтения социальной новизны у самок крыс в условиях пролонгированной

социальной изоляции // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. – 2022. – Т. 72, № 4. – С. 520-542. doi: 10.31857/S0044467722040104

Тезисы докладов:

1. Shirenova S.D., Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Sex differences in emotional behavior and pain sensitivity in rats exposed to long-term post-weaning social isolation. Translational Pain Research: from Lab to Clinic. European Pain Federation. Krakow Pain School. Krakow, Poland. June 22-27 2019. Ból. Vol. 20: Special Issue. EFIC School 2019. P. 40. ISSN: 1640-324X
2. Ширенова С.Д., Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Изменения болевой чувствительности в тесте «Tail-Flick» у самцов и самок крыс вследствие длительной социальной изоляции. Росс. журн. боли. 2020. Т. 18, специальный выпуск. – С. 13-14. Тезисы XXVI Российской научно-практ. конф. с международным участием «Медицина боли – от понимания к действию». 17–19 сентября 2020 г. г. Владивосток
3. Ширенова С.Д. Социальная изоляция ухудшает выработку условного рефлекса пассивного избегания у самок крыс. (Shirenova S.D. Social isolation negatively affects passive avoidance in female rats). Cognitive Neuroscience — 2020: материалы международного форума, 11–12 декабря 2020 г., Екатеринбург / [отв. ред. Э. Э. Сыманюк]; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет. — Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2021. — 330 с. — ISBN 978-5-7996-3178-9. — Текст: электронный // Электронный научный архив УрФУ. — URL: <http://hdl.handle.net/10995/95329>. С. 285-288
4. Shirenova S.D., Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Heat nociception in socially isolated female rats: The estrus cycle effects. International Webinar on Neurology & Therapeutics (IWNT). Theme: “Emerging Challenges and Advances in Neurology & Therapeutics”, March 08-09, 2021. <https://frontiersmeetings.com/webinars/neurology-march/> Conference brochure, Day 1, p. 22
5. Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Тревожно-депрессивный профиль самцов и самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции. (Shirenova Sophie D., Khlebnikova Nadezhda N., Krupina Nataliya A. Anxiety- and depressive-like profiles in male and female rats subjected to prolonged social isolation). Тезисы XVII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии» XVII International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology» 4-10 июня 2021 г., г. Судак, Крым, Россия, 30 мая – 10 июня 2021 года. С. 438-439. doi: 10.29003/m2417.sudak.ns2021-17/438-43
6. Shirenova S., Khlebnikova N., Krupina N. Glucocorticoid receptor expression in brain structures of socially isolated rats. In Book: «2nd Clinical neurology and neurosurgery congress». Theme: «Unravel the Recent Advancements and Novel Discoveries in Neurology and Neurosurgery». Clinical Neurology 2021. Virtual event. July 15-16. 2021. С. 10

7. Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Экспрессия интерлейкинов il-1 β и il-6 и рецепторов глюкокортикоидов в структурах мозга самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции. Тезисы VI Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященной 90-летию со дня рождения академика К. В. Судакова. С. 552-553. Июль, 6-8, 2022. Москва.
Shirenova S.D., Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Interleukin il-1 β , il-6, and glucocorticoid receptor expression in brain structures of female rats subjected to long-term social isolation. Sixth International Interdisciplinary conference «Modern problems in systemic regulation of physiological functions», dedicated to the 90 th anniversary of the birth of Academician K.V. Sudakov. P. 554-555. July, 6-8, 2022, Moscow.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГГА-ось – гипоталамо-гипофизарно-адреналовая ось
 ПНД – постнатальный день
 3-МТ – 3-метокситирамин (3-methoxytyramine)
 5-НІАА – 5-оксииндолуксусная кислота (5-hydroxyindoleacetic acid)
 5-НТ – 5-гидрокситриптамин (5-hydroxytryptamine), серотонин
 BDNF – нейротрофический фактор мозга (brain derived neurotrophic factor)
 DPP4 – дипептидилпептидаза-4 (dipeptidyl peptidase 4)
 DA – дофамин (dopamine)
 DOPAC – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (3,4-dihydroxyphenylacetic acid)
 GR – глюкокортикоидный рецептор (glucocorticoid receptor)
 HVA – гомованилиновая кислота (homovanillic acid)
 IL-1 β – интерлейкин-1 β (interleukin-1 β)
 IL-6 – интерлейкин-6 (interleukin-6)
 NA – норадреналин (noradrenalin)
 PREP – пролилэндопептидаза (prolyl endopeptidase)
 proBDNF – предшественник нейротрофического фактора мозга (brain derived neurotrophic factor precursor)
 SYP – синаптофизин (synaptophysin)

Sophie Dmitrievna Shirenova

Cognitive and emotional-motivational impairments in male and female rats subjected to long-term social isolation: pathophysiological mechanisms

Early life social isolation (SI) stress impairs sensory modulation, social and emotional regulation, alters brain development and neuroplasticity, and decreases adaptive behavior and skill development. Such changes can lead to deficient social adaptation and psychopathology. Molecular and neurochemical mechanisms underlying the impairments that occur under SI are not yet understood. For most SI experiments, only male animals are used, despite large amount of data confirming sex differences in SI effects. In this study, SI was prolonged up to 9,5 months and the effects were observed in both male and female Wistar rats.

An increase in social interaction was revealed in male and female rats, while only in females, aggressive behavior was increased. SI lasting more than 8 months caused a reduction in anxiety-like behavior in rats of both sexes. Associative learning and spatial memory were impaired with the effect being more pronounced in females. Reminder trials 4 months after training were less effective in single-housed compared with group-housed rats. Changes in the glucocorticoid receptor expression in brain structures and weights of stress-marker organs indicated sex-dependent alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis caused by SI. The expression of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 and neuroplasticity markers proBDNF and SYP was changed only in female rats' brain structures after 8 months of SI. In males, SI decreased prolyl endopeptidase level in the striatum. The levels of main monoamines and their metabolites were evaluated in rat brain structures after 8 months of SI stress. In socially isolated rats, serotonin level was higher in the frontal cortex, striatum, and hypothalamus, dopamine level was increased in the frontal cortex and hypothalamus, noradrenalin level was reduced in the hippocampus and elevated in the striatum.

A model of prolonged SI starting early in life may be useful when screening for new pharmacological compounds with nootropic properties and compounds affecting the psychoemotional sphere to develop pathogenetic therapy adjusted for sex differences in response to stress and drug treatment.