

**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

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

**Крупина Наталия Александровна
доктор биологических наук**

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность исследования	8
Научная новизна	14
Теоретическая и практическая значимость	16
Методология и методы исследования	16
Положения, выносимые на защиту	17
Апробация	19
Публикации результатов исследования	19
Объем и структура работы	20
ГЛАВА 1. Обзор литературы	21
1.1. Понятие социальной изоляции	21
1.2. Последствия социальной изоляции у человека	22
<i>1.2.1. Психические расстройства эмоционального спектра</i>	22
<i>1.2.2. Когнитивные способности</i>	24
<i>1.2.3. Болевая чувствительность</i>	25
<i>1.2.4. Соматические заболевания</i>	26
<i>1.2.5. Смертность</i>	28
1.3. Экспериментальное моделирование социальной изоляции у животных	29
<i>1.3.1. Развитие гиперактивного фенотипа и повышение агрессивности</i>	31
<i>1.3.2. Исследовательская активность</i>	32
<i>1.3.3. Эмоционально-мотивационное поведение</i>	33
<i>1.3.4. Изменения пищевого и сексуального поведения</i>	37
<i>1.3.5. Когнитивные функции</i>	41
<i>1.3.6. Сенсомоторная реактивность</i>	44
<i>1.3.7. Болевая чувствительность</i>	45
<i>1.3.7. Итоги экспериментальных работ</i>	45
<i>1.3.8. Переменные, опосредующие влияние социальной изоляции</i>	46

1.4. Патологические механизмы развития нарушений вследствие социальной изоляции	49
1.4.1. <i>Функция гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси</i>	49
1.4.2. <i>Органы-маркеры стресса</i>	51
1.4.3. <i>Нейротрансмиттеры, рецепторы и сигнальные молекулы в головном мозге</i>	52
1.4.4. <i>Цитокины с про- и противовоспалительным действием</i>	55
1.4.5. <i>Пластические изменения в структурах мозга</i>	57
1.5. Пролинспецифические пептидазы и их роль в патологических процессах	60
1.6. Краткие итоги	63
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	65
2.1. Моделирование социальной изоляции	65
2.2. Оценка поведения	68
2.2.1. <i>Ориентировочно-исследовательская деятельность</i>	68
2.2.2. <i>Болевая чувствительность</i>	69
2.2.3. <i>Тревожность</i>	69
2.2.4. <i>Депрессивно-подобное поведение</i>	70
2.2.5. <i>Социальное взаимодействие</i>	71
2.2.6. <i>Пространственная память</i>	74
2.2.7. <i>Условный рефлекс пассивного избегания</i>	75
2.2.8. <i>Условный рефлекс активного избегания</i>	77
2.2.9. <i>Определение стадии эстрального цикла</i>	78
2.3. Анализ биологического материала	79
2.3.1. <i>Сбор биологического материала</i>	79
2.3.2. <i>Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови</i>	79
2.3.3. <i>Определение уровня экспрессии белков в структурах мозга крыс ..</i>	80
2.3.4. <i>Определение уровня содержания моноаминов и их метаболитов ..</i>	81
2.4. Статистическая обработка	83
ГЛАВА 3. Результаты исследования	84
3.1. Вес крыс	84

3.2. Эстральный цикл	85
3.3. Ориентировочно-исследовательская деятельность.....	86
3.3.1. Тест «автоматизированное Открытое Поле»	86
3.3.2. Тест «классическое Открытое Поле».....	88
3.4. Болевая чувствительность	91
3.4.1. Тест «Hot Plate».....	91
3.4.2. Тест «Tail Flick».....	94
3.5. Тревожность.....	95
3.5.1. Тест «Приподнятый Крестообразный Лабиринт»	95
3.5.2. Комплексная оценка тревожно-фобических состояний	97
3.5.3. Оценка тревожности в тесте «классическое Открытое Поле» ..	98
3.6. Депрессивно-подобное поведение	100
3.6.1. Тест «Принудительное Плавание»	100
3.6.2. Тест «Потребление/Предпочтение Сахарозы»	102
3.7. Социальное взаимодействие.....	103
3.7.1. Тест «Социальное взаимодействие»	103
3.7.2. Трехкамерный Социальный Тест	105
3.8. Обучение и память.....	106
3.8.1. Тест «Водный Лабиринт Морриса»	106
3.8.2. Условный рефлекс пассивного избегания	111
3.8.3. Условный рефлекс активного избегания.....	114
3.9. Вес органов-маркеров стресса и уровень кортикостерона в крови	115
3.10. Экспрессия белков в структурах мозга крыс.....	117
3.11. Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга	123
ГЛАВА 4. Обсуждение результатов.....	127
4.1. Вес крыс.....	127
4.2. Эстральный цикл	127
4.3. Ориентировочно-исследовательская деятельность.....	129
4.3.1. Двигательная активность	129
4.3.2. Исследовательская активность	130

4.4. Болевая чувствительность	132
4.5. Эмоционально-мотивационное поведение	133
4.6. Социальное взаимодействие.....	135
4.7. Когнитивная деятельность.....	138
4.7.1. Реакция на новизну.....	138
4.7.2. Пространственная память.....	138
4.7.3. Условный рефлекс пассивного избегания.....	142
4.7.4. Условный рефлекс активного избегания.....	145
4.8. Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая ось	146
4.9. Молекулярные изменения в структурах мозга	149
4.9.1. Цитокины с провоспалительным действием.....	149
4.9.2. Маркеры нейропластичности	151
4.9.3. Пролинспецифические пептидазы.....	154
4.9.4. Моноамины и их метаболиты.....	157
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	163
ВЫВОДЫ	166
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	168

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

10%С – 10%-раствор сахарозы

аОП – тест «автоматизированное Открытое Поле»

ВЛМ – тест «Водный Лабиринт Морриса»

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГГА-ось – гипоталамо-гипофизарно-адреналовая ось

ДОБА – 3,4-диоксибензиламин

кОП – тест «классическое Открытое Поле»

ПБР – порог болевой реакции

ПКЛ – тест «Приподнятый Крестообразный Лабиринт»

ПНД – постнатальный день

ПП – тест «Принудительное Плавание»

П/ПС – тест «Потребление / Предпочтение Сахарозы»

СВ – тест «Социальное Взаимодействие»

СИ – социальная изоляция

ТКС – Трехкамерный Социальный тест

ТФС – метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний

УРАИ – Условный рефлекс активного избегания

УРПИ – Условный рефлекс пассивного избегания

фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография

ЭД – электрохимическая детекция

β -act – β -актин (β -actin)

3-МТ – 3-метокситирамин (3-methoxytyramine)

5-HIAA – 5-оксииндолуксусная кислота (5-hydroxyindoleacetic acid)

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (5-hydroxytryptamine), серотонин

BDNF – нейротрофический фактор мозга (brain derived neurotrophic factor)

COVID-19 – вирус SARS-CoV-2

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)

SYN – синаптофизин (synaptophysin)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность 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 (Hampock 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 схожесть 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 Wistar 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 гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (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 диссертационного исследования:

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 тестах социального взаимодействия.
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 нейропатофизиологических характеристик у самцов и самок крыс.

Впервые выявлено повышение неагрессивного и агрессивного социального взаимодействия у самок крыс не только после 2, но и после и 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 социальной изоляции. Модель длительной социальной изоляции, 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 изменений эмоционально-мотивационного поведения, индуцированных стрессом длительной социальной изоляции. 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.

Методология и методы исследования

Объектом исследования были крысы Wistar (n=190). Проведены три серии многомесячных исследований. Серия 1 проведена на 36 самцах (16 самцов группы «Социальная Изоляция» и 20 самцов группы «Контроль») и 33 самках (16 самок группы «Социальная Изоляция» и 17 самок группы

«Контроль»). Серии 2 и 3 проведены только на самках (серия 2: 30 самок группы «Социальная Изоляция» и 30 самок группы «Контроль», серия 3: 31 самка группы «Социальная Изоляция» и 30 самок группы «Контроль»).

Планирование и проведение исследований осуществляли согласно поставленной цели с использованием общепринятых методов оценки поведения (тесты автоматизированного и классического «Открытого Поля», тест «Принудительное плавание», «Потребление/Предпочтение Сахарозы», тест социального взаимодействия и трехкамерный социальный тест, тест «Приподнятый Крестообразный Лабиринт» и комплексная оценка тревожно-фобических состояний по специализированной ранжированной шкале), порогов болевых реакций (тесты «Hot Plate» и «Tail Flick»). Нейрохимические показатели в структурах мозга оценивали с помощью Вестерн-блот анализа с использованием моноклональных антител и методом ВЭЖХ, уровень кортикостерона в крови определяли с помощью иммуноферментного анализа ELISA. Статистический анализ данных проводили по алгоритмам программы Statistica 12.0 с использованием параметрических и непараметрических методов.

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. Патологические 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.

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 нейробиологической 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.

Степени достоверности результатов проведенных исследований.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов исследования и статистического

анализа большого экспериментального материала. Исследование спланировано и выполнено с одобрения и под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП». Выводы полноценно отражают полученные результаты.

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 источник) и иностранном (313 источников) языках. Диссертация изложена на 215 страницах, включая список литературы, и содержит 9 таблиц и 14 рисунков.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Понятие социальной изоляции

Социальная изоляция – это объективно оцененный недостаток социальных отношений индивида, часто измеряемый в таких показателях как размер социальной сети, разнообразие и частота социальных контактов. Одиночество – это воспринимаемая недостаточность реального количества и качества социальных связей по сравнению с желаемым (цит. по обзору Malcom et al., 2019). Социальная изоляция и одиночество представляют собой два отдельных понятия. Люди могут находиться в ситуации социальной изоляции, но не испытывать чувства одиночества, или чувствовать себя одинокими несмотря на адекватное количество социальных связей. Исследования показывают, что социальная изоляция и одиночество часто не коррелируют (Coyle, Dugan, 2012, Perissinotto et al., 2012).

Единственный способ исследовать одиночество и его последствия для здоровья в силу определения этого понятия является субъективный отчет испытуемого (пациента). По понятным причинам исследование одиночества в моделях на животных не представляется возможным, поэтому, такие экспериментальные работы, концентрируют внимание на исследовании социальной изоляции.

В основном социальная изоляция достигается путем ограничения количества социальных контактов, хотя попытки манипулировать качеством социальных контактов в моделях на животных тоже имеют место. Например, в работе Schneider et al. (2016) самок крыс линии Wistar в подростковом возрасте (21-50 дни постнатального развития, ПНД) содержали в группах той же линии, или с самками линии Фишер, т.е., с неадекватными по линии социальными партнерами. У самок, выросших с неадекватными социальными партнерами, во взрослом возрасте выявлены нарушения

социальных навыков, болевой чувствительности и изменения в работе эндоканнабиноидной системы мозга.

1.2. Последствия социальной изоляции у человека

Данные о воздействии социальной изоляции и одиночества на здоровье человека широко представлены в литературе. Свидетельства воздействия социальной изоляции и одиночества на психическое здоровье наиболее сильны и связаны с такими расстройствами как депрессия, тревожность, суицидальное поведение и деменция, включая синдром Альцгеймера (цит. по обзору Malcolm et al., 2019). Развитие дистресса у человека в условиях вынужденной длительной социальной изоляции подтверждено наблюдениями в период пандемии COVID-19 (Gorenko et al., 2020; Mann, Walker, 2022; Karpenko, 2020). Распространенность социальной изоляции в последние десятилетия только увеличивается, достигая наиболее высоких значений среди пожилых людей в связи с потерей партнера, снижением когнитивных способностей и утратой социальных ролей (Victor et al., 2005). В связи с этим большинство исследований нацелены на изучение влияния социальной изоляции на здоровье пожилых людей. Однако в ряде исследований было показано негативное влияние социальной изоляции/депривации у детей (Sheridan, 2012; Hostinar, 2015; Naumova et al., 2019) и людей раннего взрослого возраста (Matthew et al., 2016).

1.2.1. Психические расстройства эмоционального спектра

Социальная изоляция является сильным предиктором нарушений психического здоровья, в то время как социальная поддержка – напротив оказывает протективное действие. Показано, что социальная изоляция связана с повышенным риском депрессии и суицидального поведения у подростков (Hall-Lande et al., 2007). Авторы обзора, посвященного влиянию вынужденной социальной изоляции на психическое здоровье детей и

подростков (Loades et al., 2020), показали, что риск развития депрессии и тревожности повышается у ранее здоровых детей в период социальной изоляции и в течение 3 мес. – 9 лет после него. Кроме того, отмечается, что продолжительность социальной изоляции связана с развитием психических расстройств сильнее, чем интенсивность переживания одиночества. Мета-анализ Preston, Lew (2022), в котором собраны и обобщены работы, посвященные психическому здоровью подростков на фоне ограничений социальных контактов во время пандемии, выявил факторы, оказывающие защитное действие против развития чувства одиночества, симптомов тревожности и депрессии и суицидального поведения вследствие социальной изоляции. Авторы отнесли к таким факторам социальную вовлеченность, высокую самооценку и просоциальное поведение (например, помощь другим людям). Интересно отметить, что просоциальное поведение было свойственно девочкам-подросткам в большей степени, чем мальчикам.

В работе Evans, Fisher (2021) взрослые испытуемые (средний возраст 42 года), живущие в социальной изоляции, имели более высокие баллы тревожности и депрессии, чем контрольная группа (88% выборки составили женщины), но наличие социальной поддержки купировало негативное влияние социальной изоляции. Valiensi et al. (2022) показали, что вынужденная социальная изоляция, связанная с пандемией COVID-19, привела к нарушениям сна и развитию симптомов тревожности и депрессии у 15-25% участников опроса.

Связь социальной изоляции и суицидального поведения подтверждают результаты мета-анализа Calati et al. (2018). Авторы отмечают, что предиктором суицидального и парасуицидального поведения взрослых людей может быть отсутствие неформальной группы в детском возрасте. Среди пожилых людей неразвитая социальная сеть коррелирует с желанием смерти. В обзоре Chang et al. (2017) показана связь социальной изоляции и суицидальных мыслей. Авторы отмечают защитное действие социальной поддержки. Интересно отметить, что в данном обзоре отсутствие супруга во

взрослом возрасте является предиктором суицидального поведения в пожилом возрасте.

Согласно обзору Traganzapoulou et al. (2020) в пожилом возрасте социальная изоляция и одиночество тоже являются предиктором депрессии. Кроме того, пожилые люди, живущие в социальной изоляции, в большей степени подвержены развитию психотической симптоматики и психосоматических расстройств.

1.2.2. Когнитивные способности

В период ограничений социального взаимодействия из-за пандемии COVID-19 было собрано большое количество данных, которые свидетельствуют о снижении внимания и когнитивных способностей в связи с социальной изоляцией. По результатам опроса Labos et al. (2019) эти нарушения были более выраженными у женщин по сравнению с мужчинами. Сообщается, что среди пожилых людей (70-94 года) мужчины чаще оказываются в социальной изоляции и получают меньше социальной поддержки, но только у женщин эти факторы связаны со снижением когнитивных функций (Joyce et al., 2021). Снижение когнитивных способностей у социально изолированных пожилых людей также было показано в лонгитюдном исследовании (Noguchi et al., 2021). В другом лонгитюдном исследовании сообщается, что среди пожилых людей с выраженными симптомами депрессии социальная изоляция приводит к дефициту когнитивных способностей только у женщин, но не у мужчин (Guo et al., 2021). В исследовании пожилых граждан США корейского происхождения приведены данные, свидетельствующие о том, что социальная изоляция, но не одиночество, приводит к снижению когнитивных функций при их измерении объективными методами, в то время как субъективное ощущение утраты когнитивных способностей (по отчетам испытуемых) было связано с чувством одиночества, но не с ситуаций

социальной изоляции (Jang et al. 2021). Сходные результаты были получены в лонгитюдном исследовании жителей Китая (Yu et al., 2021): социальная изоляция, но не одиночество являлась предиктором снижения объективно измеренной эпизодической памяти.

Ingram et al. (2021) показали, что снижение когнитивных способностей происходит вследствие пролонгированной (до 3 мес.) социальной изоляции и не связано с возрастом людей.

Согласно мета-анализу (van Ijzendoorn et al., 2008) дети, живущие в детских домах в условиях депривации стимулирующих сигналов окружающей среды (то есть сенсорной депривации), имеют более низкие баллы IQ, чем дети, живущие в приемных семьях. В исследовании Bos (2009) приемные дети школьного возраста, прожившие в детских домах от 9 до 33 мес. (ср. знач. 23,6 мес.), хуже справлялись с задачами на ассоциативное научение и рабочую пространственную память, чем школьники, выросшие в родных семьях.

1.2.3. Болевая чувствительность

Боль признана сложным, многопараметровым конструктом, включающим поведенческий, эмоциональный, перцептуальный, двигательный, вегетативный, когнитивный и иммунный компоненты (Яхно, Кукушкин, 2011). Значимость психологических компонентов боли отражена в одной из применяемых классификаций боли, согласно которой различают физическую и психогенную боль (Дегтярев, Раевская, 2011). Для психогенной боли характерно отсутствие явного повреждающего воздействия. Согласно одной из основных моделей восприятия боли, ноцицептивные сигналы могут быть модулированы нисходящими ингибирующими процессами высших отделов головного мозга (Melzack, 1999), которые могут активироваться в результате действия психологического стресса социальной изоляции. В последние годы особый

интерес исследователей привлекает вопрос о взаимосвязи ощущения боли и условий социальной среды. В частности, в фМРТ-исследовании (Eisenberger, 2003) было показано, что структуры головного мозга, которые традиционно ассоциировали с подавлением боли и дистрессом, вызванным болевыми ощущениями – дорзальный отдел передней цингулярной коры и вентральный отдел префронтальной коры, были активированы в экспериментах, разработанных с целью вызвать ощущение социального отвержения. Согласно обзору Davis et al. (2005) люди, которые в детском возрасте имели опыт абьюзивных отношений или пренебрежения, во взрослом возрасте попадали в группу риска развития хронической боли. Авторы другого обзора (Riva et al., 2014) предполагают, что корреляция между социальной и физической болью может объясняться тем, что развитие этих состояний вызвано схожими факторами, в частности недостатком саморегуляции, личностными или генетическими особенностями.

В качестве одного из потенциальных механизмов связи боли и социальной изоляции предлагаются эволюционные модели, в которых болевые ощущения являются важными сигналами о безопасности организма. Так же как физическая боль стимулирует защитные ответы организма, восприятие изоляции от социальной группы сигнализирует об угрозе выживания организма (цит. по обзору Sturgeon, Zautra, 2016).

1.2.4. Соматические заболевания

Существуют данные о связи социальной изоляции с повышенным риском развития сердечно-сосудистых (Knox, Unvas-Moberg, 1998; Hawkey et al., 2010; обзор Valtorta et al., 2016), инфекционных заболеваний (Cohen et al., 1997), диабета 2-го типа (Meisinger et al., 2009; Brinkhues et al., 2017). В недавнем исследовании (Zhang et al., 2022) показано, что пожилые резиденты Китая, живущие в социальной изоляции, чаще сообщают о хронических заболеваниях и нарушении сна.

Мета-анализ Majmudar et al. (2022) был нацелен на выявление связи между социальной изоляцией и одиночеством и индексом оценки общего состояния здоровья, где 1 – состояние абсолютного здоровья, 0 – смерть. У людей, живущих в социальной изоляции, индекс варьировал от 0,30 до 0,87 и был ниже, чем у участников исследований, составивших группу контроля. Оценки людей, сообщивших о себе, что они находятся в условиях выраженной социальной изоляции, были ниже, чем у людей, сообщивших, что находятся в группе риска социальной изоляции (0,50 и 0,59 против 0,65 и 0,67, измерено по двум шкалам).

Поскольку соматические заболевания могут быть как следствием, так и причиной социальной изоляции, большинство исследований не дает ответа на вопрос о причинно-следственной связи между этими показателями.

Связь социальной изоляции и заболеваний показана и на уровне биологических механизмов: нейроэндокринного, метаболического и иммунного функционирования организма, эпигенетических молекулярных нарушений (см. обзор Holt-Lunstad, Steptoe, 2022). В частности показано, что у молодых людей, имеющих небольшое количество социальных связей, снижен иммунный ответ на компонент вакцины против гриппа (Pressman et al., 2005). Этот показатель не зависел от ощущения одиночества. В исследовании Walker et al. (2019) приведены свидетельства того, что у людей, которые живут в одиночестве, повышен уровень содержания С-реактивного белка, фибриногена и лейкоцитов в крови вне зависимости от гендерной принадлежности участников.

Показано, что у людей социальная изоляция, приводящая к нарушениям психоэмоционального статуса, расстройствам деятельности сердечно-сосудистой системы, увеличению риска ранней смертности, сопровождается повышением уровня маркеров воспаления в крови (Shankar et al., 2011). Развивается дисбаланс взаимодействия нервной и иммунной систем (Gądek-Michalska et al., 2013). При действии различных стрессоров как дестабилизирующих факторов изменяются лиганд-рецепторные

отношения на мембранах лимфоидных клеток, реагирующих на регуляторный сигнал (в частности, на действие интерлейкинов) (цит. по обзору Корневой и соавт., 2017). При хроническом стрессовом воздействии социальной изоляции нарушение активности ГГА-оси рассматривают как результат перепроизводства провоспалительных цитокинов, в том числе IL-1 β (Gądek-Michalska et al., 2013).

1.2.5. Смертность

В 1979 Беркман и Сим разработали способ объективной оценки социальных отношений (Berkman, Syme, 1979) и исследовали его связь с общей смертностью (all-cause mortality). Авторы показали, что снижение социальных контактов приводит к увеличению риска общей смертности в два-три раза, вне зависимости от состояния здоровья, образа жизни и социально-экономического положения. Увеличение риска смертности было наиболее выраженным в группе холостых мужчин в возрасте от 30 до 49 лет по сравнению с женатыми мужчинами того же возраста. В работе Barefoot et al. (2005) также было показано, что влияние социальной изоляции на общую смертность более выражено у мужчин, чем у женщин. При этом в более поздней работе (Pantell et al., 2013) гендерных различий в увеличении риска смертности у людей, живущих в социальной изоляции, выявлено не было. Повышение риска смертности вследствие социальной изоляции, описанное в этой работе, сопоставимо с повышением риска смертности, вызванного курением. В недавнем исследовании (Laugen et al., 2019) приведены свидетельства того, что из всех показателей социальной изоляции, наибольший вклад в увеличение риска общей смертности вносит отсутствие супруга.

1.3. Экспериментальное моделирование социальной изоляции у животных

Изучение патофизиологических механизмов воздействия социальной изоляции на человека невозможно без моделирования в экспериментах на животных. Многие виды млекопитающих живут в группах, и социальная принадлежность к группе является залогом выживания. К таким животным относятся, например, крысы (Schweinfurth, 2020).

В естественных условиях крысы живут в группах, в которых поддерживается социальная иерархия, поэтому изоляция крысы от других представителей вида является стрессующим воздействием. Моделирование социальной изоляции на лабораторных крысах предоставляет возможность выявить причинно-следственные связи в возникновении изменений, которыми сопровождается социальная изоляция. Развитая методология работы с лабораторными животными позволяет оценить поведенческие, мотивационно-эмоциональные и когнитивные особенности, изменения в анатомическом строении и физиологическом функционировании организма. Однако существует ряд ограничений при моделировании социальной изоляции на лабораторных крысах. У человека родительская опека является более продолжительной (до 18 лет и более) и накладывается на периоды повышенного интереса ребенка к общению со сверстниками. У крыс период, когда особь не может жить без материнской опеки, длится 3-4 недели с момента рождения. А затем наступает период активного общения и игры с крысятами того же возраста. Кроме того, человек может дать субъективный отчет о переживании изоляции и одиночества. На крысах исследовать субъективные аспекты социальной изоляции не представляется возможным.

Несмотря на ограничения, с которыми связано моделирование социальной изоляции на крысах, в рамках этого подхода был накоплен большой объем научных знаний.

Первое систематическое исследование последствий социальной изоляции у крыс было проведено Hatch et al. (1965). Работа выполнена на самцах и самках крыс, линии Wistar. Подопытных животных содержали в изоляции с момента отлучения от матери в течение 3 мес. По истечении этого срока животных умерщвляли путем обескровливания из брюшной аорты, затем исследовали изменения в крови и анатомические изменения внутренних органов. Авторы показали, что 1) социальная изоляция приводила к снижению массы тела у крыс обоих полов; 2) уровень гемоглобина был выше у социально изолированных крыс обоих полов, однако, объем эритроцитов был увеличен только у социально изолированных самок; 3) только у самцов изоляция приводила к развитию лейкопении и снижению содержания гликогена в печени; 4) уровень холестерина в надпочечниках был снижен у изолированных самок, но повышен у изолированных самцов по сравнению с крысами соответствующего пола, которые жили в группах; 5) вес надпочечников, щитовидной железы и гипофиза был увеличен у изолированных самок, но не у изолированных самцов; 6) вес селезенки и тимуса был меньше у изолированных крыс; 7) у изолированных самок вес яичников был снижен, и в них было меньше фолликулов, чем у групповых самок; 8) у изолированных крыс наблюдалось ороговение чешуек хвоста; 9) изолированные крысы были более агрессивными по отношению к экспериментаторам: авторы отмечают, что изолированных крыс было сложнее поймать и держать, они чаще пытались укусить руку экспериментатора. По итогам данного исследования авторами был предложен термин «изоляционный синдром». Эти результаты свидетельствуют о том, что изолированное содержание крыс, которое часто необходимо, например, в исследованиях токсичности веществ или особенностей усвоения пищи, само по себе приводит к гормональным, морфологическим и поведенческим изменениям.

Интерес исследователей к этой модели проявился в большом числе работ, нацеленных на изучение особенностей поведения и биологических

показателей крыс, живущих в условиях социальной изоляции. В большинстве случаев крыс подвергают социальной изоляции, начиная с подросткового возраста, после отлучения от матери.

1.3.1. Развитие гиперактивного фенотипа и повышение агрессивности

В работе Nishikawa et al. (1976) было изучено влияние ранней социальной изоляции на двигательную активность и агрессивное поведение крысы по отношению к мыши у самцов и самок крыс Wistar. Однако половые различия в статье не анализировали. Было показано, что социальная изоляция, которая продолжается более 1 мес., приводит к снижению массы тела. Кроме того, после 1,5 мес. социальной изоляции у изолированных крыс наблюдалось увеличение двигательной активности и агрессии по отношению к мыши. Среди изолированных крыс было больше животных, которые убили мышь за 30 минут тестирования. У изолированных крыс был повышенный уровень норадреналина в целом мозге (без мозжечка); различий в уровнях дофамина и серотонина этими авторами выявлено не было. В работах последующих лет двигательную гиперактивность и повышенную агрессию отмечают, как классические проявления синдрома социальной изоляции у крыс.

Развитие гиперактивности вследствие социальной изоляции было воспроизведено и другими авторами (например, Garzon et al., 1979; Wongwitdech et al., 2006). Однако, в некоторых работах на социально изолированных крысах не удавалось показать увеличение двигательной активности в «Открытом Поле». Например, в работе Weiss et al. (2004) сообщается, что ни у самцов, ни у самок крыс Sprague-Dawley не развивался гиперактивный фенотип после 13 недель изолированного содержания, которому крыс подвергали с ПНД 21. Другими авторами сообщается даже о снижении двигательной активности в этом тесте (Stern et al, 1960 – на самцах крыс; Archer, 1969 – на самках крыс). Исследователи Dalrymple-Alford,

Benton (1981) отлучали самцов и самок крыс от матери на ПНД 22 и в течение 1 мес. содержали или в однополых группах или поодиночке. В отличие от предшествующих исследователей Dalrymple-Alford, Benton оценивали двигательную активность крыс в «Открытом Поле» в темноте при красном освещении, чтобы снизить стрессирующее воздействие самой ситуации тестирования. Регистрировали дистанцию, пройденную в открытом поле за 18 минут. Начиная с 6 минуты и до истечения времени тестирования, у социально изолированных крыс обоих полов наблюдалось увеличение двигательной активности по сравнению с контрольными животными, которых содержали в группах. Таким образом, авторы показали, что в условиях минимального стрессирующего воздействия процедуры тестирования у социально изолированных крыс выявляется нарушение привыкания по показателю двигательной активности в «Открытом Поле».

1.3.2. Исследовательская активность

В исследовании Morinan et al. (1992) сравнивали исследовательское поведение в темно-светлой камере у изолированных самцов и самцов, которых содержали в группах. Дополнительно оценивали состояние бензодиазепиновых рецепторов во фронтальной коре, миндалине, гиппокампе и мозжечке крыс. Самцов отлучали от матери на ПНД 21 и содержали изолированно или в группах в течение 3 недель. Исследовательскую активность оценивали в двух условиях: при освещении средней яркости (41 лк) и при ярком свете (200 лк). Было показано, что при ярком свете изолированные самцы совершали меньше переходов между отсеками камеры, проводили меньше времени в светлом отсеке и проходили меньшую дистанцию за 5 минут наблюдения. При более слабом освещении различий между группами не было выявлено. Никаких различий в плотности и аффинности бензодиазепиновых рецепторов между изолированными и групповыми самцами не наблюдалось. На основе этих результатов авторы

высказали предположение, что социальная изоляция не является стрессующим воздействием в том же смысле, как, например, удар электрическим током или рестрикция движений, но скорее может нарушать способность крысы адаптироваться к изменяющимся стрессогенным ситуациям. Видимое противоречие между отсутствием изменений в плотности и аффинности бензодиазепиновых рецепторов, опосредующих реализацию тревожного состояния, и наличием признаков тревожности, проявлявшейся у крыс снижением активности в светлом отсеке при ярком освещении, поставило перед исследователями новые вопросы о механизмах развития этих нарушений, ответы на которые следует искать в продолжении работ в данном направлении.

1.3.3. Эмоционально-мотивационное поведение

Тревожность

Serra et al. (2002) на самцах крыс Sprague-Dawley показали, что ранняя социальная изоляция приводит к развитию повышенной тревожности. Крыс отлучали от матери на 30-й день постнатального развития и содержали изолированно или в группах на протяжении 1 мес. Уровень тревожности оценивали в тесте Фогеля и в тесте «Приподнятый Крестообразный Лабиринт» (ПКЛ). Оба теста связаны с конфликтом мотивации: в тесте Фогеля подход к поилке сопровождается электрическим током, что формирует конфликт питьевой мотивации и страха аверсивного подкрепления, а в тесте ПКЛ крыса попадает в ситуацию конфликта мотиваций страха открытого пространства/высоты, с одной стороны, и исследования незнакомого пространства, с другой. Serra et al. показали, что изолированное содержание крыс приводит к повышению у них уровня тревожности в тестах, основанных на помещении крыс в ситуацию конфликта мотиваций. Это исследование выявило еще одно немаловажное следствие социальной изоляции у крыс – развитие тревожного поведения.

В работе Weiss et al. (2004) у социально изолированных самцов, но не у самок, линии Sprague-Dawley наблюдалось снижение относительного числа заходов в ОР приподнятого крестообразного лабиринта. И у самцов, и у самок изоляция приводила к снижению числа заглядываний за края ОР, но этот эффект был более выражен у самцов, что свидетельствовало о повышении уровня тревожности животных, более выраженном у самцов. В данном исследовании крыс подвергали социальной изоляции с момента отлучения от матери на ПНД 21. Оценку поведения проводили через 13 недель после отлучения крысят от матери.

Депрессивно-подобное поведение

Исследователи Garzon & Del Rio (1979) предприняли попытку модифицировать модель социальной изоляции, чтобы использовать ее для поиска новых потенциальных препаратов для лечения депрессии. Авторы пролонгировали социальную изоляцию до 10 мес. При ежемесячном измерении двигательной активности выраженность различий между изолированными и групповыми самцами нарастала с увеличением длительности изоляции. Через 10 мес. у социально изолированных крыс отмечали повышенную двигательную активность и снижение числа стоек. Если двигательную активность оценивали однократно, после 10 мес. изоляции, то у изолированных крыс отмечали выраженную реакцию страха при хендлинге, которая проявлялась в компульсивном зарывании в опилки или в реакции затаивания. Отмечалось повышение двигательной активности, но агрессивное поведение не развивалось. Повышение двигательной активности у социально изолированных крыс удавалось купировать, применив трициклические (амитриптелин, кломипрамин, дезипромин, доксерпин) или атипичные (виллоксазин, тразодон) антидепрессанты. Напротив, ни антипсихотические препараты (хлорпромазин, галоперидол), ни анксиолитики (хлордиазепоксид, диазепам) не оказывали селективного

влияния на гиперактивность, которую наблюдали у социально изолированных крыс. На основании этих данных авторы предложили использовать модель пролонгированной социальной изоляции, сопровождающейся моторной гиперактивностью, как нефармакологическую модель для выявления этиологии и потенциальных путей лечения определенных подтипов депрессивных расстройств. Стоит отметить, что гиперактивность не отвечает критерию «внешней схожести» (face validity) (Belzung & Lemione, 2011) с клиническим прообразом классической депрессии у человека. Однако депрессивное расстройство является гетерогенным, существуют разновидности этого заболевания, (например, ажитированная депрессия), симптомы которых внешне более сопоставимы с особенностями поведения крыс в условиях пролонгированной социальной изоляции.

В работе Niesink & Van Ree также исследовалось влияние различных препаратов на поведение социально изолированных самцов крыс (1982b). Ранее эти авторы показали, что краткосрочная социальная изоляция (7 дней) у взрослых самцов крыс приводит к увеличению числа контактов с партнером в тесте социального взаимодействия, но не оказывает влияния на двигательную активность (Niesink & Van Ree, 1982a). Препараты разных фармакологических групп за исключением антидепрессантов - морфин, налоксон, амфетамин, диазепам и галоперидол не влияли на число социальных контактов ни у изолированных крыс, ни у контрольных животных. Однократное введение антидепрессантов (кломипрамин, нортриптилин, миансерин) приводило к снижению числа социальных контактов у изолированных крыс, но не у контрольных крыс. После ежедневного введения антидепрессантов на протяжении 7 дней снижения числа социальных контактов не наблюдалось. На основании полученных результатов авторы считают, что модель социальной изоляции можно использовать как модель депрессии. При сопоставлении данных, полученных на модели пролонгированной социальной изоляции, с результатами

клинических исследований можно отметить следующее существенное различие. В клинической практике положительные изменения вследствие введения антидепрессантов наблюдаются только после длительного применения препаратов (не менее двух недель). При этом в экспериментальном исследовании Niesink & Van Ree только однократное, а не субхроническое введение антидепрессантов привело к изменению поведения животных. Ввиду этого расхождения стоит помнить, что модель пролонгированной социальной изоляции является применимой для практических задач поиска новых препаратов, но не вполне удовлетворяет требованиям валидности модели для поиска ответов на фундаментальные вопросы об этиологии и патогенезе депрессии.

Wongwitdecha et al. (2006) оценили воздействие дезипрамина, ингибитора селективного захвата норадреналина на поведение крыс, подвергнутых социальной изоляции. Дезипрамин относится к лекарственным средствам из группы антидепрессантов. Исследование проводили на самцах крыс линии Wistar. Крысят отлучали от матери на ПНД 21, после чего подопытных животных содержали изолированно на протяжении 4 недель. Контрольных самцов содержали в группах по 6 животных. Поведение оценивали в тесте «Принудительное плавание» (Porsolt R.D. et al., 1978). Известно, что продолжительность иммобильности в тесте Порсолта снижается после введения препаратов из класса антидепрессантов, поэтому этот тест используют для оценки уровня депрессивности животного. В данной работе половине животных вводили дезипрамин за 24 ч, 5 ч и 1 ч до 5-минутного тестирования. Остальным животным вводили физиологический раствор по той же схеме. Wongwitdecha et al. (2006) показали, что социально изолированные самцы проводят больше времени в состоянии активного плавания и меньше времени в состоянии иммобильности, чем самцы, которых содержали в группах. В контексте теста это свидетельствует о снижении уровня депрессивности вследствие социальной изоляции, однако это также может свидетельствовать о развитии гиперактивности как признака

депрессивности (см. выше). Дезипрамин приводил к увеличению продолжительности активного плавания и у изолированных, и у контрольных животных, причем эффект был более выраженным в группе изолированных самцов. Минимальная доза дезипрамина, которую использовали в этой работе (5 мг/кг), снижала продолжительность иммобильности у изолированных крыс, но не изменяла величину этого показателя у контрольных животных. Введение препарата в более высоких дозах приводило к снижению времени иммобильности как у изолированных, так и у контрольных самцов. Это может свидетельствовать об изменениях в норадренергических нейронах, вызванных воздействием социальной изоляции. Авторы предлагают интерпретировать снижение продолжительности иммобильности у изолированных крыс как еще одно свидетельство нарушения привыкания у таких животных. Действительно, существует такое альтернативное объяснение повышения времени иммобильности в тесте Порсолта, иммобильность можно рассматривать не как проявление депрессивноподобного поведения – «поведенческого отчаяния», а как адаптацию после привыкания к ситуации вынужденного плавания. Учитывая, что у изолированных крыс наблюдается нарушение привыкания в тесте «Открытое Поле», такое объяснение может быть вполне применимо для этой модели.

1.3.4. Изменения пищевого и сексуального поведения

Поскольку было показано, что социальная изоляция у крыс может приводить к изменению массы тела, изучение пищевого поведения как реализации одной из жизненно важных мотиваций у социально изолированных крыс вызвало большой интерес.

Основываясь на результатах, сделанных ранее наблюдений, Fiala et al. (1977) на ПНД 23-26 отлучали от матери самцов и самок крыс Long-Evans и распределяли на группы с учетом массы тела. Часть крыс содержали в

обогащенных условиях (в группах по 12 крыс в просторных клетках с игрушками, которые ежедневно меняли), остальных крыс содержали в условиях социальной изоляции на протяжении 4 недель. По еженедельным оценкам вес и потребление пищи были больше у социально изолированных самцов уже после одной недели социальной изоляции, а у самок – после двух недель социальной изоляции. Авторы предположили, что увеличение массы тела у социально изолированных крыс связано с увеличением потребления пищи, а не с нарушением метаболизма. В работе Hatch et al. (1965), напротив, сообщалось о снижении веса крыс, подвергнутых социальной изоляции, по сравнению с крысами, которые жили в стандартных условиях. Однако в работе Fiala et al. (1977) не было контрольной группы крыс, которых содержали в стандартных условиях, поэтому нельзя исключить, что различие по массе тела вызвано тем, что крысы в обогащенных условиях проявляют больше физической активности. За последние десятилетия накоплены противоречивые данные об изменении массы тела при социальной изоляции (Fone, Porkess, 2008, Trabace et al., 2012, Cruz et al., 2015, Nakagawa et al., 2019).

В исследованиях Sakharian et al. (1982) было проверено предположение об изменении двигательной активности и пищевой мотивации под влиянием социальной изоляции самок крыс линии Lister Hooded. Сразу после отлучения от матери на ПНД 17 распределяли на 4 группы: 2 группы крыс содержали в условиях изоляции и кормили либо только стандартным лабораторным кормом, либо стандартным кормом и высококалорийной пищей (диета кафетерия); еще две группы крыс содержали в группах на стандартной диете или на диете кафетерия. Вес крыс и потребление пищи оценивали ежедневно. Дополнительно, через 3, 5 и 7 дней соответствующего содержания, на протяжении 30 минут оценивали двигательную активность. Авторам не удалось выявить различий ни по массе тела, ни по потреблению пищи между социально изолированными самками, и самками, которых содержали в группах. Основное влияние фактора «Содержание» заключалось

в том, что изолированные самки были более подвижны. При этом диета кафетерия у изолированных крыс приводила к дополнительному увеличению двигательной активности, а у групповых крыс – напротив, к снижению двигательной активности. Эти результаты свидетельствуют о взаимовлиянии изолированного содержания и диеты на двигательную активность крыс. Причем, это взаимовлияние не сводится только лишь к суммарному эффекту двух воздействий.

Сексуальное поведение социальных животных во взрослом возрасте может нарушаться в результате отсутствия адекватного взаимодействия с представителями своего вида на ранних этапах жизни. Поскольку модель социальной изоляции подразумевает депривацию такого взаимодействия, ряд работ раннего периода развития этой модели был посвящен изучению влияния ранней социальной изоляции на сексуальное поведение у крыс. Было показано, что такая социальная изоляция может приводить к нарушениям сексуального поведения у самцов крыс, однако не всем авторам удавалось воспроизвести этот эффект. Поэтому Spevak et al. (1973) провели исследование социальной изоляции на сексуальное и социальное поведение у самцов крыс. Изоляция у подопытных животных начиналась с момента отлучения крысят от матери на ПНД 23-26 и продолжалась до конца исследования. Поведенческие тесты проводили на взрослых самцах в возрасте около 4 мес. Градации социальной изоляции были следующие: полная социальная изоляция (одиночное содержание, отсутствие визуального контакта с другими крысами); частичная изоляция с сохранением визуального контакта с другим самцом; частичная изоляция с сохранением визуального контакта с самкой. Контрольных самцов содержали в парах с другим самцом или с другой самкой. Социальное поведение оценивали в отношении интактного самца или самки, а сексуальное – в отношении овариоэктомированной самки, которой вводили эстрадиол и прогестерон. Оказалось, что все градации социальной изоляции снижали частоту анального груминга в тесте социального взаимодействия. В тесте

сексуального взаимодействия процент самцов, у которых наблюдали эякуляцию, был больше в группе самцов, живших в паре с самкой, по сравнению с самцами, жившими в полной социальной изоляции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие с представителями своего вида (конспецификами) в ранний период развития является важным условием нормального сексуального поведения у самцов во взрослом возрасте. Однако наличие визуального контакта с конспецификом снижает выраженность нарушений сексуального поведения, которые наблюдаются у социально изолированных крыс.

В том же году была опубликована работа, в которой было изучено влияние социальной изоляции на сексуальное поведение также у самок крыс (Duffy, Hendricks, 1973). В этом исследовании самцов и самок крыс линии Wistar отлучали от матери в очень раннем возрасте (на ПНД 14) и кормили молоком каждые 4 ч до ПНД 18-20. Изоляция начиналась с момента отлучения от матери и продолжалась не менее 3 мес. на момент начала поведенческих тестов. За неделю до оценки поведения всех самок овариоэктомировали. Сексуальное поведение самцов оценивали по отношению к интактной самке в искусственно вызванной стадии эструса. Для оценки сексуального поведения самок использовали интактных сексуально активных самцов. У самок при этом тоже искусственно вызывали стадию эструса. Было показано, что такая модель социальной изоляции с очень ранним отлучением от матери, связана с высокой смертностью у самцов крыс: из 78 животных 17 самцов не дожили до возраста 3 мес. (14 самцов, подвергнутых социальной изоляции, и 3 самца из группы контроля); 1 самка из контрольной группы умерла в первые дни после отлучения от матери. У изолированных самцов наблюдалось выраженное снижение сексуальных контактов по сравнению с самцами, жившими в группах. Поведенческих различий между изолированными и контрольными самками не было выявлено, однако интактные самцы были менее активны по отношению к изолированным самкам, чем к контрольным. Возможно,

отсутствие различий в сексуальном поведении самок было связано с тем, что стадию эструса вызывали искусственно, путем введения половых гормонов. Авторы также отмечают, что у крыс сексуальное поведение самок является более простым, рефлекторным, в отличие от сексуального поведения самцов.

1.3.5. Когнитивные функции

Исследование двигательной активности у социально изолированных крыс показало, что повышенная активность у крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции, наблюдается на последних минутах тестирования в открытом поле, что может свидетельствовать о нарушении развития привыкания (неассоциативного обучения) к новой ситуации у социально изолированных крыс (Einon et al., 1975). С учетом этих наблюдений в работах Einon et al. было изучено влияние ранней социальной изоляции на когнитивные функции у крыс. Было показано, что, если в «Открытом Поле» присутствуют различные объекты, у социально изолированных крыс происходит более медленное снижение количества подходов к этим объектам со временем (Einon, Morgan 1976). Эти результаты свидетельствуют о том, что социальная изоляция в раннем периоде развития приводит к нарушению привыкания к новой обстановке, а гиперактивный фенотип может являться проявлением этого нарушения. В работе Morinan, Leonard (1980) было показано, что социальная изоляция у самцов крыс Wistar, которая начиналась с ПНД 21 и продолжалась 3 недели, приводит к снижению толщины коры головного мозга. Авторы предположили, что это может быть причиной нарушения привыкания, которое наблюдается у социально изолированных крыс.

Viveros et al. (1990) показали, что у самцов крыс, подвергнутых 2-месячной социальной изоляции, нарушается выработка условного рефлекса активного избегания (УРАИ) – то есть, нарушается ассоциативное обучение с

отрицательным подкреплением. Навык предполагает переход крысы в другой отсек камеры в ответ на световой стимул (условный раздражитель), чтобы избежать действия электрического тока (безусловный раздражитель). У самок нарушения выработки УРАИ вследствие социальной изоляции такой продолжительности выявлено не было. Ранее другими авторами было показано, что самки крыс справляются с задачей теста активного избегания лучше, чем самцы (Grey, Lalljee, 1974). Viveros et al. (1990) получили схожие результаты: превосходство самок сохранялось вне зависимости от условий содержания (изоляция или перенаселение в течение двух мес.). Число дефекаций было меньше у самок, что свидетельствует о меньшем уровне стрессирования самок в данном тесте. Среди самцов, животные, которых содержали в условиях перенаселения, показали лучшие результаты, чем изолированные самцы, однако число дефекаций у последних было меньше. Это может быть следствием того, что два исследованных типа социального воздействия – изоляция и перенаселение – приводят к нарушениям в разных звеньях нейроэндокринной системы. Авторы высказали предположение, что основным механизмом, объединяющим эмоциональные и когнитивные изменения, которые наблюдаются у социально изолированных крыс, является нарушение функциональной пластичности гипофизарно-адреналовой системы.

В исследовании Juraska et al. (1984) показано, что как самцы, так и самки крыс, которых содержали в социальной изоляции на протяжении 1 мес., начиная с ПНД 23-25, медленнее обучались находить пищевое подкрепление в радиальном лабиринте, чем крысы, которые жили в обогащенной среде, то есть социальная изоляция приводила к ухудшению пространственной памяти в данном тесте.

На самцах крыс Sprague-Dawley после 4 и 8 недель ранней социальной изоляции также было показано ухудшение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса - увеличение латентного периода достижения платформы и дистанции до платформы. Однако 4-недельная ресоциализация

после 4 недель изоляции, как сообщается в этой работе, была способна полностью компенсировать нарушения пространственной памяти (Lu et al., 2003).

Проведены детальные исследования, в которых показано, что увеличение продолжительности поиска платформы в лабиринте Морриса может быть вызвано другой стратегией поведения в водном лабиринте у социально изолированных крыс (Perrot-Sinal et al., 1996; Hellemans et al., 2004). Животные, которых содержали в социальной изоляции, проводили больше времени в краевой зоне лабиринта, что может быть связано с усилением тигмотаксиса. Тигмотаксис – это поведение, направленное на снижение стресса новой обстановки, в данном тесте - за счет поддержания тактильного контакта со стенкой бассейна. Поскольку платформу обычно располагают на некотором отдалении от стенки бассейна, у крыс, которые плавают, в основном, в краевой зоне, меньше шансов ее обнаружить. Для уменьшения влияния тигмотаксиса на исследуемые показатели, исследователи, использующие модель социальной изоляции, часто используют модификации лабиринта. Например, в работе Hellemans et al. (2004) было показано, что при большем количестве попыток при обучении, различия в пространственной памяти у групповых и изолированных самцов крыс пропадают. Более сложный подход применялся в работе Perrot-Sinal et al. (1996). Работа была выполнена на самцах и самках крыс, которые жили в условиях социальной изоляции. У самок явление тигмотаксиса встречается чаще, чем у самцов. Чтобы исключить влияние этого фактора на показатели, используемые для оценки пространственной памяти, авторы проводили дополнительный этап привыкания к процедуре тестирования в водном лабиринте. Привыкание занимало 4 дня, каждый день крысе давали одну попытку найти платформу. Среди крыс, у которых не было этого дополнительного периода привыкания, самцы показали лучшие результаты, чем самки. Однако, на крысах, которые имели эти 4 дня привыкания, были показаны противоположные результаты. К сожалению, в этой работе не было

контрольной группы животных, которых содержали бы в стандартных условиях, то есть, по несколько крыс в клетке.

Однако существуют работы, результаты которых свидетельствуют об отсутствии различий в пространственной памяти у грызунов в зависимости от условий содержания. Так, в экспериментах Schrijver et al. (2002) не было выявлено влияния фактора «Содержание» на пространственную память у самцов крыс после 2 мес. ранней социальной изоляции в водном лабиринте Морриса. В более поздней работе той же группы (Schrijver et al., 2004) также не было выявлено различий между крысами, которых содержали в изоляции 3,5 мес. и контрольными животными.

1.3.6. Сенсомоторная реактивность

В работе Geyer et al. (1993) у самцов крыс Lister, живших в социальной изоляции с 20-го по 62-й ПНД, было показано снижение предстимульного торможения. Для оценки формирования предстимульного торможения используют стартл-рефлекс - рефлекс сокращения скелетных или мимических мышц в ответ на сильный сенсорный раздражитель, в качестве которого у крыс обычно используют надпороговый звуковой стимул. Амплитуда стартл-рефлекса снижается, если ему предшествует некий слабый подпороговый стимул той же или иной модальности, который подается за 30-500 миллисекунд до основного стимула. Geyer et al. показали, что снижение предстимульного торможения вследствие социальной изоляции наблюдается и у самцов крыс Sprague-Dawley, причем, даже после более короткого периода социальной изоляции (34-36 дней вместо 42, как в первом эксперименте). Позже та же исследовательская группа оценивала выраженность предстимульного торможения у самцов крыс после 8 недель социальной изоляции, которая начиналась либо с ПНД 20, либо во взрослом возрасте крыс (Wilkinson et al., 1994). Было показано, что нарушения предстимульного торможения происходят только у крыс, живших в изоляции

с момента отлучения от матери. Тот факт, что у крыс, изолированных с момента отлучения от матери, развиваются нарушения предстимульного торможения, в совокупности с данными о срыве предстимульного торможения у больных в психиатрической клинике (Swerdlow et al., 2017) позволяет рассматривать модель ранней социальной изоляции как модель развития расстройств психотического типа (Tapias-Espinosa et al., 2019), что дает возможность использовать ее для изучения патофизиологических механизмов психозоподобных состояний.

1.3.7. Болевая чувствительность

В исследованиях болевой чувствительности у крыс, подвергнутых социальной изоляции, были выявлены изменения разной направленности. Panksepp (1980) показал, что у самцов и самок крыс кратковременная социальная изоляция (24 ч) приводит к снижению порогов появления вокализации в ответ на электрическую стимуляцию хвоста через вживленные электроды. Через 3 и 5 дней социальной изоляции различий между изолированными и групповыми животными в этой работе не отмечалось. В исследовании Adler et al. (1975) на самцах крыс Wistar не было выявлено различий по латентному периоду порогов болевых реакций в ответ на тепловое раздражение лап (тест «Hot Plate») и на сдавление кончика хвоста между групповыми крысами и крысами после 2 мес. социальной изоляции. Meng et al. (2010) удалось выявить повышение порогов болевой реакции в ответ на раздражение поверхности лапы инфракрасным лучом у самцов крыс Sprague-Dawley после 4 недель социальной изоляции.

1.3.7. Итоги экспериментальных работ

Подводя итог ранних исследований на этой модели, можно с уверенностью сказать, что модель ранней социальной изоляции у крыс приводит к развитию стойких поведенческих изменений, которые удается

выявить у взрослых животных. К этим изменениям относятся двигательная гиперактивность (Nishikawa et al., 1976; Heidbreder et al., 2000; Zhao et al., 2009), нарушения пищевого и сексуального поведения (Bauer, Angelo, 1971; Fiala et al. 1977; Sakharian et al., 1982; Spevak et al., 1973; Duffy, Hendricks, 1973; Gorzalka, Raible, 1980), срыв предстимульного торможения (Geyer et al., 1993; Wilkinson et al., 1994) более медленное формирование привыкания (Einon et al., 1975; Einon, Morgan, 1976), нарушения становления условных рефлексов (Viveros et al., 1990) и пространственной памяти (Perrot-Sinal et al., 1996; Lu et al., 2003; Hellemans et al., 2004), развитие повышенной тревожности (Dalrymple-Alford, Benton, 1981; Weiss et al., 2004), агрессивного поведения и усиление социального интереса (обзор Sandi, Haller, 2015). Проведены исследования, направленные на выявление нейрофизиологических механизмов этих изменений (Crespi et al., 1992; Fone et al., 1996; Jaffe et al., 1993). Показано, что некоторые антипсихотические препараты и антидепрессанты могут частично или полностью купировать развитие нарушений, вызванных ранней социальной изоляцией (Garzon, Del Rio, 1979; Niesink, Van Ree, 1982; Serra et al., 2003). Однако данных об эффектах длительной, многомесячной социальной изоляции, и опосредующих их нейробиологических механизмах не достаточно.

1.3.8. Переменные, опосредующие влияние социальной изоляции

Наиболее подробное изучение причин расхождения результатов оценки поведения и нейрофизиологических показателей у крыс, подвергнутых социальной изоляции, было проведено на примере развития предстимульного торможения.

В работе Varty, Greyer (1998) исследовалось влияние изолированного содержания на предстимульное торможение в акустическом стартл-ответе у крыс разных линий. Оказалось, что изоляция вызывала нарушения предстимульного торможения только у самцов крыс линий Sprague-Dawley и

Fisher-344, но не у самцов линии Lewis. В работе Varty et al. (1999a) было показано, что нарушения предстимульного торможения возникают только после изоляции, которая начинается с момента отсаживания крыс от матери и продолжается не менее 4 недель, причем важен ПНД, в который крыс переводили на изолированное содержание: если крысят переводили на изолированное содержание не сразу после отсаживания от матери (ПНД 21), а через 2 недели (ПНД 35), то нарушения предстимульного торможения не развивались. Однако, согласно отчетам Cilia et al. (2001, 2005), изолированное содержание, только в случае его начала с ПНД 28, стабильно приводило к развитию нарушений предстимульного торможения. Более широко применяемый подход, в котором изолированное содержание животных начинают раньше (с ПНД 21-22), не всегда позволяет выявить нарушение предстимульного торможения у изолированных крыс (Bashki et al., 1988; Weiss et al., 2000; Krebs-Tomson et al., 2001). Результаты приведенных исследований свидетельствуют о том, что при изучении возникновения нарушений предстимульного торможения (и, вероятно, и других нейрофизиологических показателей) необходимо учитывать ПНД начала социальной изоляции.

Важное исследование было выполнено Domeney, Feldon (1998). Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar. Экспериментальных животных содержали в социальной изоляции 3 мес. с момента отлучения от матери (ПНД 21). Авторы показали, что нарушения предстимульного торможения у изолированных крыс наблюдались только в том случае, если для животных этот тест был первым. В случае если предстимульное торможение оценивали после оценки двигательной активности в открытом поле, различия между изолированными и контрольными крысами не выявлялись даже через несколько недель после тестирования в открытом поле.

Кроме того, было показано, что возникновение нарушений предстимульного торможения у изолированных самцов Wistar зависело от

того, каким был пол в клетках, в которых содержали крыс (Weiss et al., 1999). Нарушения предстимульного торможения наблюдались только у изолированных крыс, которые жили в клетках с опилками. В случае если крыс содержали в клетках с решетчатым металлическим полом, нарушений предстимульного торможения не возникало.

Бразильскими учеными было проведено исследование влияния увеличения хэндлинга на развитие нарушений предстимульного торможения у социально изолированных крыс (Rosa et al., 2005a, 2005b). Эксперименты были проведены на самцах крыс Wistar. Социальная изоляция начиналась с 21 дня постнатального развития и продолжалась 10 недель. Снижение предстимульного торможения у социально изолированных крыс не наблюдалась, если для очистки клеток режим изоляции нарушали больше одного раза в неделю.

Другой группой ученых (Tomazini et al., 2006) было проведено сравнительное исследование влияния кратковременной социальной изоляции (24 ч) и более длительной социальной изоляции (2 недели) на величину предстимульного торможения у самцов Wistar подросткового возраста, которых до этого не оценивали в других поведенческих тестах. Различий по выраженности предстимульного торможения на этих сроках социальной изоляции не было выявлено между изолированными и контрольными крысами. Однако в упомянутой выше работе Domeney, Feldon (1998), при таких же условиях эксперимента, как и в работе Tomazini et al. (2006), за исключением более длительной социальной изоляции (3 мес.), нарушение предстимульного торможения было обнаружено. Таким образом, по крайней мере, у самцов Wistar развитие нарушений предстимульного торможения зависит от длительности изолированного содержания.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что влияние социальной изоляции может опосредоваться многими факторами, что, вероятно, является причиной расхождения результатов, полученных в разных лабораториях, и даже в одной лаборатории в разные

годы. Такими факторами являются 1) линия крыс, 2) период развития, на который приходится начало социальной изоляции, 3) длительность социальной изоляции, 4) тип клеток, в которых содержат животных, 5) хэндлинг в период социальной изоляции и 6) последовательность поведенческих тестов.

1.4. Патофизиологические механизмы развития нарушений вследствие социальной изоляции

Работы последних лет направлены на выявление нейрохимических, нейрофизиологических и молекулярных механизмов воздействия социальной изоляции (Adams, Rosenkranz, 2015; Tada et al., 2017; Sun et al., 2018; Nakagawa et al, 2019; Zubkov et al., 2019). Результаты этих исследований углубляют существующие представления о патогенезе индуцируемых изоляцией расстройств. Одновременно накапливаются примеры противоречий в полученных данных. В их основе могут лежать особенности развития нарушений на разных моделях социальной изоляции.

В ранние периоды жизни острый или хронический стресс может приводить к психическим расстройствам эмоционального спектра (см. обзор Nugent et al., 2011). В подростковом возрасте в гиппокампе, префронтальной коре и миндалине активно происходят нейропластические процессы, связанные с формированием исполнительных функций (цит. по обзору Selemon, 2013).

1.4.1. Функция гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси

Одним из ключевых механизмов воздействия социальной изоляции на организм признается ответ ГГА-оси (цит. по обзору Veenema, 2009). Ранняя социальная изоляция приводит к повышению базового уровня АКТГ и повышению секреции кортикостерона и АКТГ в ответ на стресс только у взрослых самцов крыс. У самок изменения секреции этих гормонов

вследствие изоляции не выявлено (Weiss et al., 2004). В обзоре Veenema, (2009) также приведены данные о снижении базового уровня АКТГ и кортикостерона, а также снижении уровня кортикостерона в ответ на иммобилизационный стресс у грызунов, подвергнутых социальной изоляции. Интрацеребровентрикулярное введение кортикотропин-рилизинг-гормона приводило к более выраженному повышению уровня кортикостерона в крови у социально изолированных крыс.

В исследовании на мартышках было показано, что в первые дни социальной изоляции у животных повышается уровень кортизола (Cinini et al., 2014).

Согласно недавнему обзору при ранней социальной изоляции, наблюдается нормальное базовое состояние ГГА-оси, но увеличен глюкокортикоидный ответ на стресс. Изменения глюкокортикоидного ответа могут быть связаны с адаптацией различных компонентов ГГА-оси и структур головного мозга на молекулярном и клеточном уровнях к состоянию, индуцированному социальной изоляцией. В частности, стресс в раннем возрасте приводит к изменению экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, префронтальной коре и миндалине (обзор Sandi, Haller, 2015).

В другом обзоре сообщается, что экспериментальное моделирование нарушения социальной среды у животных может приводить к снижению эффективности функционирования глюкокортикоидных рецепторов, в результате чего усиливается воспалительный ответ организма. Этот механизм может лежать в основе развития таких патологических изменений как диабет II типа, атеросклероз, нейродегенерация и метастазирование опухоли (цит. по обзору Cacioppo et al., 2015).

Serra et al. провели несколько исследований на самцах крыс Sprague-Dawley с целью определить состояние ГГА-оси при социальной изоляции. В работах этих авторов 2000 и 2003 годов у изолированных крыс отмечали гиперсенситивность ГГА-оси: выделение нейроактивных стероидов в ответ

на удар электрического тока было выражено сильнее у самцов, которых содержали в социальной изоляции. В работе Serra et al. (2005) показано, что базовый уровень содержания нейроактивных стероидов в мозгу и плазме крови у социально изолированных крыс понижен по сравнению с величиной этого показателя у крыс, которых содержали в группах.

1.4.2. Органы-маркеры стресса

Начиная с исследований Н. Selye (1950), изменения внутренних органов под воздействием патогенных факторов (увеличение надпочечников, уменьшение тимуса и поражения слизистой оболочки желудка) рассматривают как классические проявления общего адаптационного синдрома при стрессе.

В ранней работе Hatch et al. (1963) сообщалось о более выраженных изменениях в надпочечниках – классическом органе-маркере стресса – и в щитовидной железе у самок крыс Wistar по сравнению с самцами после 3 мес. социальной изоляции. Увеличение веса надпочечников у самок после 13 и 14 недель социальной изоляции было зарегистрировано и в других ранних работах (Hatch et al., 1965; Syme, 1973). Отсутствие изменений веса этого органа у самцов после 5, 6 и 8 недель социальной изоляции также хорошо задокументировано (Gamallo et al., 1986; Ness et al., 1995; Sanchez et al., 1998; Maslova et al., 2010). Данных о влиянии социальной изоляции продолжительностью больше четырех мес. на вес органов-маркеров стресса у самцов и самок крыс в научной литературе найти не удалось.

В работах Hatch et al. (1963, 1965) сообщается о снижении веса селезенки и тимуса как у самок, так и у самцов крыс Wistar после 3 мес. социальной изоляции. Однако данные последующих работ не всегда подтверждают эти результаты. В работе, проведенной на самцах Wistar, сообщается об увеличении веса тимуса после 2 мес. социальной изоляции (Sanchez et al., 1998). У крыс-самцов линии Sprague-Dawley 5-недельная

социальная изоляция также приводила к увеличению веса тимуса (Ness et al., 1995). Однако в работе Maslova et al. (2010) у самцов Sprague-Dawley после 6 недель социальной изоляции не было выявлено изменений веса тимуса.

Данные об изменении веса органов-маркеров стресса под воздействием социальной изоляции немногочисленны и противоречивы. Не известно, как изменяется вес этих органов при социальной изоляции продолжительностью более 3 мес.

1.4.3. Нейротрансмиттеры, рецепторы и сигнальные молекулы в головном мозге

Показано, что у крыс вследствие ранней социальной изоляции изменяется уровень содержания нейромедиаторов, которые непосредственно участвуют в эмоциональной регуляции. Например, Crespi et al. (1992) на самцах крыс Lister показали, что социальная изоляция в течение 1 мес., начиная с момента отлучения животных от матери, приводит к увеличению выброса дофамина и серотонина в ответ на местное введение KCl через имплантированную канюлю во фронтальной коре головного мозга крыс. Fone et al. (1996) на той же линии крыс показали, что после 5 недель ранней социальной изоляции у самцов повышается чувствительность серотониновых рецепторов. Авторы предложили рассматривать это, как потенциальный механизм повышенной реакции на стресс и неофобию, которую отмечают у социально изолированных крыс. Повышение уровня мРНК транспортера серотонина обнаружено в стриатуме и гипоталамусе самцов крыс после 10 недель социальной изоляции (Зубков и соавт., 2018). В работе Jaffe et al. (1993) на модели депрессии, предложенной Garzon, Del Rio (1979), было показано, что длительная социальная изоляция (9 мес.), начатая в раннем постнатальном периоде, приводит к снижению содержания серотонина в гиппокампе самцов крыс линии Sprague-Dawley.

Согласно обзору Fone, Porkess (2008) в исследованиях *post mortem* выявляются изменения концентрации DA и DOPAC в стриатуме и прилежащем ядре у крыс после полуторамесячной социальной изоляции, базальный уровень DA в префронтальной коре может быть повышен. Результаты исследований иммунореактивности белков, модулирующих DA-передачу, позволяют предположить усиление дофаминергической активности в прилежащем ядре и вентральном стриатуме наряду со снижением DA-функции в префронтальной коре крыс после ранней 12-недельной социальной изоляции. Данные об изменении конкретных DA-рецепторов противоречивы. В обзоре также приводятся свидетельства снижения оборота 5-НТ в прилежащем ядре, но не в префронтальной коре. При этом ответ на болевой раздражитель (электрический ток, подаваемый на лапки крыс) приводил к более сильному выбросу 5-НТ в прилежащем ядре социально изолированных крыс, по сравнению с крысами, которые росли в группах. В работе Fitzgerald et al. (2013) сообщается о снижении плотности постсинаптических D2-рецепторов дофамина вследствие 8-недельной ранней социальной изоляции крыс. У животных было выявлено нарушение предстимульного торможения.

Существуют данные о различных эффектах социальной изоляции на экспрессию моноаминов в зависимости от линии крыс. Так, Trabace et al. (2012), сравнив две линии крыс, показали, что ранняя социальная изоляция длительностью 6-8 недель приводила к повышению содержания дофамина в префронтальной коре только у крыс линии Lister-Hooded, и только у крыс линии Wistar было выявлено пониженное содержание серотонина в гиппокампе вследствие социальной изоляции.

В работе Atmore et al. (2020) на изолированной ткани префронтальной коры самцов и самок крыс показано, что социальная изоляция в течение 3 мес. приводит к изменению выделения норадреналина в ответ на стимуляцию глутаматом и ГАМК. В префронтальной коре социальная изоляция снижала глутамат-стимулированный выброс норадреналина и повышала ГАМК-

стимулированный выброс этого медиатора. Социальная изоляция в течение 6,5 мес. приводила к сенсibilизации сосудов к сосудосуживающему действию 5-НТ у самцов крыс в возрасте 12 мес. за счет повышения экспрессии генов 5НТ2А-рецептора и дисбаланса экспрессии ЕТА- и ЕТВ-рецепторов эндотелия, что является ранним признаком старения сосудов (Kozhevnikova et al., 2021).

Исследований глутаматергической системы мозга при социальной изоляции малочисленны и проведены на небольшом количестве крыс, однако результаты свидетельствуют в пользу предположения о гипофункции этой системы в префронтальной коре после 4 и 6 недель социальной изоляции (см. обзор Fone, Porkess, 2008). В работе Zhao et al. (2009) приведены свидетельства повышения экспрессии генов NMDA-рецепторов и двух киназ, связанных с развитием нервной системы (PSD-95 и SAP-102), в гиппокампе самцов крыс линии Sprague-Dawley после 8 недель ранней социальной изоляции. Во фронтальной коре исследователи выявили снижение экспрессии гена одной из субъединиц NMDA-рецептора (NR2A). В стриатуме и префронтальной коре показано снижение экспрессии мРНК другой субъединицы этого рецептора (NR1A).

В нескольких исследованиях было показано (например, Zlatkovic, Filipovic, 2013), что социальная изоляция может изменить продукцию оксида азота (NO), важной сигнальной молекулы нитрергической системы, участвующей в регуляции тонуса сосудов, иммунного ответа и синаптических связей. В недавнем исследовании (Vrankova et al., 2021) на самцах крыс было показано, что социальная изоляция длительностью 2 мес. приводила к снижению активности NO-синтазы, а социальная изоляция в течение 6,5 мес. – к повышению ее активности.

Изменения выявлены в работе пуринергической системы: 8-недельная социальная изоляция вызывала повышение экспрессии пуринергических рецепторов в префронтальной коре, и снижение – в гиппокампе и стриатуме

самцов крыс Wistar (Andrejew et al., 2021). Эти изменения сопровождались нарушением предстимульного торможения и социального взаимодействия.

На самцах крыс показано, что 8 недель ранней социальной изоляции снижают экспрессию глутамина, глутамата, биомаркера психических и неврологических нарушений в головном мозге N-ацетил-L-аспартата (NAA) и фосфокреатина в дорсальной части гиппокампа. Изменений экспрессии этих сигнальных молекул в коре головного мозга выявлено не было (Shao et al., 2015). Дефицит NAA и фосфокреатина свидетельствует о недостаточности энергетического обмена в нервных клетках. Снижение содержания глутамина и глутамата в гиппокампе авторы связывают с нарушением взаимодействия между нейронами и клетками глии.

1.4.4. Цитокины с про- и противовоспалительным действием

В модельных экспериментах показано, что изменение функции воспалительных факторов является патофизиологическим последствием социальной изоляции. По данным Pugh et al. (1999) социальная изоляция самцов взрослых крыс, продолжавшаяся в течение 1 или 3 ч после выработки условного контекстуального страха, нарушала формирование условного страха, и вызывала повышение уровня провоспалительного цитокина IL-1 β в коре головного мозга и гиппокампе. Авторы связали выявленные в случае социальной изоляции когнитивные нарушения с повышением уровня этого цитокина в структурах мозга. У взрослых мышей на модели социальной изоляции, которая длилась 1-42 дня, не было выявлено иммунных нарушений, но после дополнительного воздействия острого стресса при помещении животных в новую среду после трехнедельной социальной изоляции авторы наблюдали снижение у них уровней плеiotропных цитокинов IL-2, IL-4 и повышение базального уровня кортикостерона в крови (Bartolomucci et al., 2003). Этот результат свидетельствовал о том, что социальная изоляция сама по себе не нарушала иммунокомпетентность, то

есть функциональное состояние иммунной системы, при котором обеспечивается эффективная защита организма от действия патогенов с антигенными свойствами, но изменяла реакцию животных на стресс.

Подтверждение важной роли IL-1 β в осуществлении когнитивных функций у социально изолированных животных было получено в работе Hueston et al. (2017): 4-недельный стресс социальной изоляции самцов мышей в подростковом возрасте с последующим интрагиппокампальным действием IL-1 β вызывал дефицит спонтанной альтернации и распознавания нового объекта. Социальная изоляция самцов мышей, начинавшаяся в подростковом возрасте и длившаяся 8 недель, значительно нарушала когнитивные функции и по результатам Вестерн-блот анализа повышала уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 в гиппокампе без существенных изменений уровня IL-1 β в сыворотке крови (Niu et al., 2020). Это наблюдение позволило авторам говорить о центральном механизме индуцированного социальной изоляцией воспаления, связанного с IL-1 β .

Недавно показано, что повышение тревожности и нарушение социального поведения, вызванное у взрослых самцов мышей 10-недельным ограничением социальных контактов, сопровождается повышением в гиппокампе уровня мРНК гена, кодирующего цитокин IL-6, который может оказывать провоспалительное действие (Boshtam et al., 2016), что также дает основание предполагать развитие нейровоспаления вследствие социальной изоляции (Yu-Kai Ma et al., 2022). Однако у самцов крыс Wistar 10-недельная социальная изоляция, начинавшаяся сразу после отсаживания от матери и приводившая к нарушению привыкания в «Открытом Поле», снижала уровень мРНК гена, кодирующего цитокин IL-6, и его экспрессию в префронтальной коре, также был снижен уровень цитокина IL-10 и уровень мРНК кодирующего его гена в плазме крови, и уровень IL-10 в гиппокампе (Corsi-Zuelli et al., 2019). На самцах Sprague-Dawley показано, что социальная изоляция в течение 8 недель приводила к снижению содержания IL-6 и IL-4 в плазме крови и повышению содержания TNF- α и ILF- γ (Möller et al., 2013).

Вклад цитокиновой сети в генез нарушений поведения при длительной социальной изоляции предстоит выяснить в будущих исследованиях.

1.4.5. Пластические изменения в структурах мозга

В упомянутой выше работе Cinini et al. (2014) обнаружено снижение нейрогенеза в гиппокампе в первые дни социальной изоляции у мартышек. Day-Wilson et al. (2006) приводят свидетельства снижения объема медиальной префронтальной коры у крыс линии Lister Hooded после 8-недельной социальной изоляции. С помощью МРТ на самцах Lister Hooded показано, что ранняя социальная изоляция в течение 7 недель приводит к билатеральному снижению объема префронтальной коры более чем на 5% (Schubert et al., 2009). В другой работе показано, что ранняя социальная изоляция приводит к снижению объема постеродорсального компонента медиальной части миндалины и медиальной префронтальной коры в правом полушарии крыс (см. обзор Sandi, Haller, 2015). Alcquicer et al. (2008) показали, что 8-недельная социальная изоляция приводит к снижению плотности дендритных шипиков, уменьшает их длину и ветвление в префронтальной коре и прилежащем ядре у самцов крыс линии Sprague-Dawley. Выявлено изменение экспрессии большого числа белков и мРНК ряда генов в медиальной части миндалины после 7-дневной социальной изоляции у самцов крыс (Lavenda-Grosberg et al., 2021). Ресоциализация животных в течение 1 дня приводила к возвращению большинства выявленных молекулярных изменений к нормальному уровню, однако изменения экспрессии некоторых генов, в частности генов, вовлеченных в развитие нейродегенеративных заболеваний, сохранялись после ресоциализации. Эти результаты свидетельствуют о развитии пластических изменений в структурах мозга под воздействием социальной изоляции.

К фундаментальным компонентам нейропластичности относится пластичность синаптических связей, изменение которых зависит, в первую

очередь, от активности нейронов; эти процессы, в свою очередь, определяются регуляцией синаптических белков (Гуляева, 2017). Основным интегральным белком мембран малых синаптических везикул нейронов является синаптофизин (SYP) – трансмембранный гликопротеин, к функциям которого относят формирование синаптических пузырьков, выделение из них нейромедиаторов и синаптогенез (Коржевский и соавт., 2010; Колос и соавт., 2015). Однако, данных литературы о влиянии социальной изоляции на SYP немного, и они неоднозначны. Так, Varty et al. (1999) показали, что у самцов Lister Hooded 8-недельная ранняя социальная изоляция приводит к снижению экспрессии SYP в зубчатой извилине гиппокампа. На взрослых крысах Sprague-Dawley было показано, что 8-недельная социальная изоляция самок, которая приводила к увеличению депрессивности, но снижению тревожности, не изменяла экспрессию SYP в гиппокампе и гипоталамусе крыс (Ramos-Ortolaza et al., 2017), а двухнедельная социальная изоляция самцов крыс, которая приводила к повышению тревожности и депрессивности, снижала экспрессию SYP в гиппокампе (Das et al., 2016). В этой работе также были выявлены нарушения синаптической плотности и морфологии нейронов (усиление пикноза) в гиппокампе. У самцов мышей, подвергнутых 8-недельной социальной изоляции с подросткового возраста, обнаруженное нарушение когнитивных функций не сопровождалось изменением экспрессии SYP в гиппокампе (Niu et al., 2020).

Другой хорошо известный маркер и регулятор синаптической и нейрональной пластичности – BDNF, нейротрофин, который относят к ключевым медиаторам стресс-ответа (Bondar et al., 2016). BDNF оказывает влияние на нейрогенез в гиппокампе взрослых особей, синаптогенез, выживание нейронов и формирование шипиков (Hempstead, 2015, см. обзор Mumtaz et al., 2018). Li et al. (2016) выявили повышение экспрессии мРНК BDNF и его экспрессии в префронтальной коре и снижение мРНК BDNF и его экспрессии в гиппокампе самцов Sprague-Dawley после 3 недель ранней социальной изоляции, которая привела к нарушениям предстимульного

торможения у этих животных. Авторы предположили, что эпигенетическая регуляция BDNF может быть одним из молекулярных механизмов, опосредующих когнитивную дисфункцию, а взаимодействие префронтальной коры и гиппокампа может играть важную роль в регуляции когнитивного поведения.

Известно, что регулирующее действие предшественника нейротрофического фактора мозга proBDNF и зрелой формы BDNF (mBDNF) на синаптическую пластичность отличается, часто противоположно (см. обзоры Giacobbo et al., 2019; Wang et al., 2021). Предполагается, что proBDNF может быть ключевым регулятором синаптической пластичности и формирования нервных цепей в подростковом возрасте, а эффекты сохраняются у взрослых животных (см. обзор Hempstead, 2015). Нарушение баланса proBDNF и mBDNF, предполагающее торможение конверсии предшественника до зрелого BDNF, обнаружено в гиппокампе крыс на модели стресса «двойного удара», включавшего неонатальную депривацию крысят от матери и питье раствора кортикостерона взрослыми животными (Hill et al., 2014). Данных о том, изменяется ли уровень предшественника BDNF и его зрелой формы при стрессе длительной социальной изоляции, в настоящее время нет.

Интересное исследование было проведено Barrientos et al. (2003). Авторы изучали механизмы участия провоспалительного цитокина IL-1 β в нарушении памяти. Ранее было показано, что социальная изоляция, длившаяся несколько часов после выработки условного рефлекса страха, нарушала обусловленный контекстом рефлекс (Rudy et al., 1999) и повышала экспрессию IL-1 β в гиппокампе (см. выше Pugh et al., 1999). Barrientos et al. (2003) вырабатывали условный рефлекс страха у взрослых самцов Sprague-Dawley, после чего половине животных вводили антагонист IL-1 β в гиппокамп. Затем крыс возвращали в группы или подвергали 6 ч социальной изоляции. При тестировании условный рефлекс страха был менее выражен у крыс, подвергнутых социальной изоляции. Кроме того, у животных этой

группы была снижена экспрессия мРНК BDNF в зубчатой извилине гиппокампа. Однако оба этих эффекта – снижение условного рефлекса страха и снижение экспрессии мРНК BDNF – были купированы в группе крыс, которым перед изоляцией ввели антагонист IL-1 β . Эти результаты свидетельствуют об участии IL-1 β в нарушениях памяти, возникающих при воздействии социальной изоляции.

1.5. Пролинспецифические пептидазы и их роль в патофизиологических процессах

Пролинспецифические пептидазы пролилэндопептидаза (PREP; EC 3.4.21.26) и дипептидилпептидаза-4 (DPP4; CD26, EC 3.4.14.5) входят в семейство сериновых протеаз, которые осуществляют метаболизм пролинсодержащих пептидов (Yaron, Naider, 1993).

PREP – эндопептидаза, которая гидролизует короткие пептиды (менее 30 аминокислот) с карбоксильной стороны остатков пролина (Pro), расщепляя пептид по связи -Pro-Xaa-, где -Xaa- – остаток любой аминокислоты, кроме пролина (см. обзор Kumar et al., 2019). Эта протеаза участвует в метаболизме многих биологически активных пептидов, которые опосредуют развитие психоэмоционального ответа, обучение и память и ассоциируются со старением и нейродегенеративными расстройствами (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера): это нейротензин, субстанция P, аргинин-вазопрессин, тиролиберин, ангиотензин I и II, окситоцин, тафцин, брадикинин и др. (Szeltner, Polgar, 2008; см. обзоры Myöhänen et al., 2009; Крупина, Хлебникова, 2010; Kumar et al., 2019). Есть данные об участии PREP в развитии таких психических расстройств, как депрессия, мания, биполярное расстройство, шизофрения (Maes et al., 1995). В экспериментах показана вовлеченность PREP в развитие депрессивноподобного состояния, индуцированного стрессогенной обстановкой теста «Принудительное плавание» (Крупина и соавт., 2012), а также когнитивных нарушений при

выработке УРПИ (Назарова и соавт., 2007) и формировании пространственной памяти (D'Agostino et al., 2013). Эти эффекты часто связывают с действием PREP на нейропептиды, опосредующие эмоционально-мотивационную деятельность, обучение и память. Однако преимущественно цитозольная локализация PREP ставит под вопрос фермент-субстратное взаимодействие как основной физиологический/патофизиологический механизм действия данной протеазы. Предполагается, что данная протеаза может участвовать во взаимодействиях типа белок-белок, регулируя инозитол-1,4,5-фосфат сигналинг и такие функции, как клеточная пролиферация и дифференциация, трансдукция сигнала в ЦНС или модулируя функции некоторых белков (см. обзоры Myöhänen et al., 2009; Kumar et al., 2019). Показана роль PREP в нейровоспалении, которое представляет собой сложный клеточный и молекулярный защитный механизм в ответ на травму, стресс или инфекцию (Penttinen et al., 2011).

Распределение PREP в мозге человека и крысы схоже: PREP экспрессируется в коре, гиппокампе, стриатуме (хвостатое ядро и скорлупа), гипоталамусе, структурах нигростриатного пути, мозжечке (Myöhänen et al., 2007, 2009; Szeltner, Polgar, 2008), у человека наибольшая плотность протеазы наблюдается в структурах стриатума, отделах коры и гиппокампе, у крысы – в черной субстанции, гиппокампе, мозжечке и структурах каудато-путаменального комплекса (стриатум).

DPP4 – это широко распространенная в организме трансмембранная протеаза II типа, которая является внутримембранным гликопротеином и сериновой экзопептидазой, и высвобождает дипептиды Xaa-Pro/Ala (Ala – аланин), расщепляя пептидную связь, если Pro/Ala находятся в предпоследнем положении от N-конца полипептидов и белков (см. обзор Matteucci, Giampietro, 2009). Субстраты DPP4 многочисленны: это нейропептид Y, субстанция P, представители опиатного класса нейропептидов эндоморфины, экзорфин с опиоидной активностью β -

казоморфин, гипоталамический рилизинг-гормон соматолиберин, пептидный гормон пептид YY, вазоинтестинальный пептид, инкретиновые гормоны глюкозозависимый инсулиотропный полипептид, глюкагоноподобные пептиды 1,2 и др., а также хемокины, представляющие группу низкомолекулярных цитокинов, участвующих в процессах передвижения и регуляции миграции лейкоцитов из крови в ткани. (Ahmad et al., 1992; Mentlein et al., 1993; Zhu et al., 2003; Sakurada et al., 2003). DPP4 существует в мембраносвязанной и растворимой формах, физиологическую активность проявляет в форме гомодимера (Matteucci, Giampietro, 2009).

Большой спектр субстратов DPP4 и широкая представленность фермента в организме млекопитающих указывает на участие данной протеазы в регуляции множества физиологических функций и развитии патологических процессов: это иммунная регуляция (созревание / дифференциация лимфоцитов, активация Т-клеток, регуляция функций антиген-презентирующих клеток, миграция лейкоцитов, фагоцитоз) и, как следствие, участие в воспалительном ответе, клеточная адгезия, миграция эндотелиальных клеток, гематопоез, метаболизм глюкозы, функционирование печени, легких, сердечно-сосудистой системы нейроиммунное взаимодействие, нейроэндокринная секреция, процессы канцерогенеза, ноцицепции, организация пищевого поведения, регуляция психомоторной активности и тревожности, участие в когнитивной деятельности (опосредовано через влияние на обмен глюкозы), (Sakurada et al., 2003; Matteucci, Giampietro, 2009; Itou et al., 2013; Zhong, Rajagopalan, 2015; Enz et al., 2019; Sim et al., 2021). В экспериментах с генетически модифицированными животными показано, что крысы, дефицитные по гену, кодирующему DPP4, демонстрируют повышенную болевую чувствительность в тесте «Hot Plate», а также снижение стресс-реактивности в тестах «Открытое поле», «Социальное взаимодействие» и УРПИ (Karl T. et al., 2003a, 2003b). У мышей с инактивированным геном DPP4 (CD26^{-/-}) формируется антидепрессантоподобный и гиперактивный фенотип (El

Yacoubi M. et al., 2006). Установлено, что неонатальное действие ингибиторов DPP4 приводит к развитию тревожно-депрессивного состояния у самцов и самок крыс в подростковом и взрослом возрасте, что сопровождается изменением активности DPP4 и PREP в структурах мозга (Крупина и соавт., 2009; Кушнарева и соавт., 2011; Krupina, Khlebnikova, 2016). Эти данные свидетельствуют о том, что ингибирование DPP4 в раннем онтогенезе может служить триггером длительных поведенческих нарушений, а изменение активности DPP4 и PREP является одним из механизмов патогенеза эмоционально-мотивационных и когнитивных расстройств. В мозге крысы белок DPP4 обнаружен в коре, каудато-путаменальном комплексе (стриатум), черной субстанции (Gallegos et al., 1999), мозжечке (Mentzel et al., 1996). Активность DPP4 выявлена в гиппокампе, фронтальной коре, стриатуме, гипоталамусе, прилежащем ядре мозга крыс (Кушнарева и соавт., 2011).

Несмотря на то, что PREP и DPP4 опосредуют многие процессы в организме, связанные с нарушением психической деятельности, когнитивных функций и воспаления, данные о вовлеченности этих пептидов в развитие последствий социальной изоляции единичны. Недавно было показано, что 10-недельная социальная изоляция самцов крыс Wistar сопровождалась повышением относительного уровня экспрессии гена, кодирующего PREP, во фронтальной коре мозга, тогда как уровень мРНК гена, кодирующего DPP4, во фронтальной коре, стриатуме миндалины, гиппокампе и гипоталамусе не изменялся (Зубков и др., 2018). До настоящего времени остается не ясным, изменяется ли экспрессия данных пептидаз в ЦНС при многомесячной социальной изоляции.

1.6. Краткие итоги

Социальная изоляция представляет собой патогенное воздействие для человека и животных. Экспериментальное моделирование социальной изоляции в лабораторных условиях позволило получить новые научные

данные, немаловажной особенностью которых является этиологическая схожесть развития нарушений. Однако большинство работ выполнены только на самцах. Это смещение особенно заметно в нейробиологии и биомедицинских исследованиях (Beery, Zucker, 2011). Для восполнения пробела в изучении половых различий в реактивности мозга предлагается применять биопсихосоциальный подход (Hirnsstein, Hausmann, 2021), акцентируя внимание на исследованиях с использованием самок (Couzin-Frankel, 2014). Такой подход позволит выявить механизмы, определяющие различную предрасположенность особей разного пола к развитию психоневрологических нарушений, этиологически связанных со стрессом (Bangasser et al., 2018; Heck, Handa, 2019).

Как правило, в экспериментальных исследованиях длительность социальной изоляции не превышает трех мес., работы, в которых социальная изоляция длится дольше, немногочисленны. Однако пролонгирование социальной изоляции на срок до полугода и более, а также изучение ее воздействия на крыс в динамике, может быть перспективным подходом, который позволит расширить научные представления о механизмах развития индуцированных изоляцией нарушений поведения и когнитивных функций и повысить трансляционную валидность модели социальной изоляции.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 190 белых крысах популяции Wistar (36 самцов и 154 самки). Животные были рождены и выращены в виварии 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».

2.1. 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), таким образом, все последующие оценки поведения крыс на каждом сроке в трех сериях получены в течение одного и того же сезона. День рождения крыс считали нулевым постнатальным днём (ПНД). В первый ПНД каждой самке для вскармливания оставляли по 5-7 крысят из разных помётов, 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 и экспериментальную группы таким образом, чтобы между этими группами не

было статистически значимых различий по измеренным показателям поведения и по весу животных. В серии 1 крысы были распределены на группы таким образом, чтобы половые различия в поведении, выявленные внутри всей когорты крыс, были представлены как в контрольной, так и в опытной группе. На протяжении всего эксперимента животных контрольных групп содержали по 4-6 особей в клетках, изготовленных из непрозрачного полипропилена, 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. Крыс контрольных и опытных групп на протяжении всего эксперимента содержали в одинаковых условиях, в одной и той же комнате вивария. Крысы, которых содержали поодиночке, имели возможность воспринимать обонятельные, слуховые и, в меньшей степени, визуальные сигналы от других крыс, но были полностью лишены возможности тактильных социальных контактов. Режим социальной изоляции у крыс опытных групп нарушали при чистке клеток дважды в неделю и при плановом тестировании. Кроме того, этих крыс по сравнению с групповыми животными содержали в клетках меньшей высоты, что могло в некоторой степени ограничивать их моторную активность. В периоды тестирования один раз в неделю крыс всех групп взвешивали. Размеры выборок животных опытных и контрольных групп после первичного тестирования в возрасте 1 мес. и формирования групп приведены на **Рис. 1**.

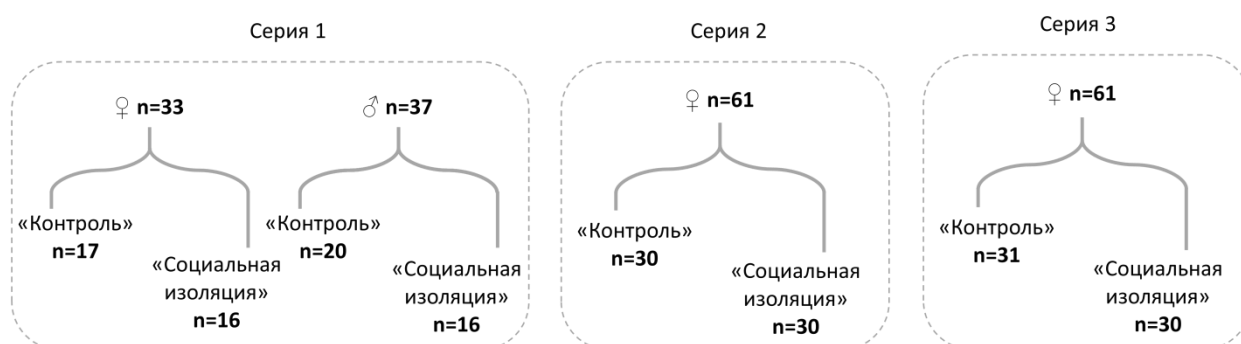


Рис. 1. Размеры выборок в трех сериях исследования. Возраст крыс на момент распределения на группы составлял примерно 1 мес.

[illegible]

67

комплексной оценки тревожно-фобических состояний, ВМЛ – тест «Водный Лабиринт Морриса», ТКС – Трехкамерный социальный тест, УРПИ – Условный рефлекс пассивного избегания, УРАИ – условный рефлекс активного избегания.

2.2. Оценка поведения

2.2.1. Ориентировочно-исследовательская деятельность

Тест классического «Открытого поля» (кОП) на основе модификации классической методики (Hall, Ballachey, 1932) проводили в круглой белой арене диаметром 120 см, разделенной на 20 квадратов со стороной 20 см и окруженной непрозрачными стенками высотой 28 см, при ярком освещении (500–510 люкс в центре, 400–410 люкс на периферии ОП). Центром поля считали внутреннюю центральную круглую зону диаметром 28,3 см, краевой зоной считали наружную зону, прилежащую к стенке ОП, и составлявшую 20% от радиуса ОП, то есть 12 см). Общее время тестирования составляло 5 мин. На 4-й мин измерения яркий белый свет заменяли слабым красным светом (лампа накаливания с красным стеклом мощностью 40 ватт). Изменение освещенности использовали, чтобы оценить реакцию на новизну, которую рассчитывали по формуле: пройденный путь на 4-й мин измерения / пройденный путь на 1-й мин измерения. Наряду с оценкой двигательной активности по числу пересеченных квадратов и исследовательской активности по числу вертикальных стоек, в серии 3 дополнительно оценивали латентный период захода в краевую зону ОП (с); время, проведенное в краевой зоне (с); время, проведенное в центре ОП за вычетом латентного периода выхода из центра после помещения крысы в ОП (далее – время в центре). По этим показателям оценивали уровень тревожности крыс.

В автоматизированном «Открытом поле» (аОП) с прозрачными стенками (арена размером 48×48×21 см) в течение 10 мин при мягком комнатном освещении (17 люкс) оценивали двигательную (горизонтальную) и исследовательскую (вертикальную) активность крыс, соответственно, по

пройденному пути в см и по числу стоек с помощью программного обеспечения системы Opto-Varimex, «Columbus Instruments», США.

2.2.2. Болевая чувствительность

Пороги болевых реакций (ПБР) оценивали в тесте «Hot Plate» при $t=55^{\circ}$ ($\pm 0,3^{\circ}\text{C}$) («TSE Systems», Германия). Регистрировали латентный период для каждой из избегающих реакций: облизывание передней лапки, облизывание задней лапки и выпрыгивание. Максимальная длительность тестирования составляла 30 с.

ПБР также измеряли в тесте «Tail Flick» с использованием инфракрасного излучения («Ugo Basile», Италия). Интенсивность была подобрана так, чтобы латентный период отдёргивания хвоста у контрольных животных составлял 2-4 с. Если болевая реакция не возникала в течение 15 с, тестирование прекращали.

2.2.3. Тревожность

Использовали стандартный подход для оценки тревожности в тесте «Приподнятый Крестообразный Лабиринт» (ПКЛ) (Pellow et al., 1985) с применением современного протокола (Ari et al., 2019), оборудование и программное обеспечение видеосистемы «VideoMot2» («TSE Systems», Германия). Размеры и структура лабиринта, имеющего 2 открытых рукава (ОР) и 2 закрытых рукава (ЗР), подробно описаны в статье (Крупина и др., 2015). Освещенность над центральной зоной ПКЛ составляла 24 лк. Крысу помещали в центр лабиринта головой в сторону одного из ОР. Определяли длительность пребывания животного в ОР и ЗР и рассчитывали предпочтение ОР как отношение длительности пребывания крысы в ОР к суммарной длительности пребывания в рукавах ПКЛ; по величине общего пробега в ПКЛ (см) судили о двигательной активности животных. Длительность тестирования составляла 5 мин.

Дополнительно в сериях 1 и 2 применяли метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний (ТФС) у крыс (в баллах). Метод основан на количественной оценке изменения поведенческих ответов у животных в серии этологически адекватных тест-стимулов, оказывающих мягкое стрессогенное воздействие, что провоцирует проявление у животных состояний страха и тревожности (Родина и др., 1993). В условиях кОП оценивали выраженность реакций, связанных с преодолением страха и тревожности, в девяти экспериментальных ситуациях по ранжированной шкале (в баллах от 0 до 3 для каждой ситуации). Сумму баллов, выставленных животному, использовали как комплексную оценку тревожно-фобического уровня у крыс.

2.2.4. Депрессивно-подобное поведение

Был применен классический тест Порсолта (Porsolt R.D. et al., 1978) в более поздней модификации Щетинина Е.В. с соавт. (Щетинин Е.В. и др., 1989). В условиях комнатной освещенности крысу однократно помещали в бак, заполненный водой на 30-35 см. Время наблюдений составляло 10 мин. Температура воды соответствовала 24 ± 1 °С. Оценивали число и суммарную продолжительность эпизодов активного плавания, число и продолжительность каждого эпизода иммобильности. Продолжительность пассивного плавания рассчитывали путем вычитания времени, проведенного в активном плавании и иммобильности, из общего времени эксперимента. Критерием для определения активного плавания считали плавание, с вовлечением всех 4 лап. Иммобильностью считали состояние, при котором не наблюдалось движения ни одной из конечностей крысы. Индекс депрессивности рассчитывали путем деления числа эпизодов иммобильности продолжительностью менее 6 с на число эпизодов активного плавания (Щетинин Е.В. и др., 1989).

В сериях 1 и 2 также применили тест «Предпочтения/Потребления Сахарозы» (Willner, P. Et al., 1992) в двух вариациях. В серии 1 измерение потребления сахарозы длилось 4 суток. На протяжении этого времени всех крыс рассаживали поодиночке, со свободным доступом к пище. В на каждой клетке были установлены 2 поилки: с водой и с 10%-ным раствором сахарозы (10%C). Один раз в сутки в одно и тоже время поилки взвешивали и меняли местами. Первые 24 теста считали адаптационным периодом, данные, собранные на этой временной отметке, в дальнейшем не анализировали. Рассчитывали суточное потребление воды, 10%C и суммарное потребление жидкости (вода + 10%C). Предпочтение раствора сахарозы (в процентах) вычисляли по формуле: $10\%C / (\text{вода} + 10\%C) * 100$ (Frenois et al., 2007). Для расчета относительного потребления 10%C использовали вес животного в день измерения. Затем данные по этим показателям, полученные для трех дней измерения, следовавших за адаптационным периодом, усредняли. В серии 2 адаптационный период проводили также, как и в серии 1 в течение 24 ч. По истечении суток, крыс переводили на депривацию пищи и жидкости на 24 ч (Hu et al., 2017). После депривационного периода, корм и поилки с водой и 10%C возвращали. Измерения потребления жидкостей проводили через 1, 3 и 24 ч после окончания депривации. Для расчета относительного потребления 10%C использовали вес животных в день до начала пищевой депривации. Продолжительность тестирования в серии 2 составила 3 дня.

2.2.5. Социальное взаимодействие

В сериях 1 и 2 использовали тест «Социальное взаимодействие» (СВ), который позволяет оценить социальные контакты крыс с конспецификом в условиях свободного поведения обоих животных. Тестирование проводили в незнакомой для крыс клетке из плексигласа (37×57×19 см) в экспериментальной комнате при красном свете: освещенность над центром клетки составляла 7 лк. По методу Schneider, Przewłocki (2004) с небольшими

модификациями сравнивали поведение пар крыс, которые формировали из животных либо опытной, либо контрольной группы, то есть единицей для сбора данных была пара крыс (Hermes et al., 2011; Campos et al., 2013). Подбор пар осуществляли таким образом, чтобы животные из одной группы на каждом сроке тестирования не встречались друг с другом ранее и различие в их весе не превышало 15%. Длительность тестирования составляла 15 мин. Оценивали длительность активных неагрессивных социальных контактов: вынюхивание, социальный груминг (вылизывание), залезание под или налезание на партнера, преследование, не заканчивавшееся проявлением агрессии, и агрессивных контактов: преследование, переходящее в агрессивное взаимодействие, атаки/драки, укусы, агрессивный груминг (выкусывание, вызывающее вокализацию крысы-партнера) за время тестирования.

В сериях 2 и 3 использовали трехкамерный социальный тест (ТКС), в котором оценивали социальность крыс, то есть выбор между незнакомым социальным объектом (конспецификом, находящимся в условиях ограничения двигательной активности) и несоциальным объектом, а также предпочтение «социальной новизны» – выбор между знакомым и незнакомым конспецификами. Для тестирования использовали аппарат, представлявший собой серый пластиковый ящик размером 120×80 см, разделенный двумя перегородками с дверцами на 3 равные части-камеры (40×40×80 см). За 24 ч до тестирования крыс опытных и контрольных групп для адаптации помещали по одной в пустой трехкамерный ящик, предоставляя животным возможность его исследовать в течение 5 мин. Интактных крыс того же пола и возраста, предназначавшихся для тестирования в качестве социальных объектов и не входивших в экспериментальные группы, за 24 ч до тестирования также адаптировали к обстановке, помещая их на 5 мин. В клетку-цилиндр (диаметром 20 см и высотой 30 см). Стенки цилиндра были образованы металлическими прутьями. На следующий день во время эксперимента центральную камеру

оставляли пустой, в две крайние камеры помещали клетки-цилиндры, в один из которых сажали крысу в качестве социального объекта (этих крыс на протяжении исследования содержали в другой комнате вивария), второй цилиндр оставляли пустым. Подопытную крысу помещали в центральную камеру на 1 мин для адаптации, затем дверцы открывали, и подопытная крыса могла исследовать все три камеры в течение 10 мин (этап 1). По истечении 10 мин дверцы снова закрывали и возвращали подопытную крысу в центральную камеру. В это время во второй, ранее пустой, цилиндр сажали вторую крысу (новый, незнакомый социальный объект). Затем дверцы открывали, и подопытная крыса могла исследовать все три камеры в течение 10 мин (этап 2). На каждом этапе оценивали время, проведенное тестируемой крысой в каждой камере с объектами, и число заходов в эти камеры; время, проведенное крысой у каждого из объектов, и число подходов к объектам. Подходом к объекту считали приближение носа крысы к другой крысе, находившейся в цилиндре, или к пустому цилиндру, то есть активное изучение объекта на расстоянии не далее двух см от металлических прутьев цилиндров.

Социальность на этапе 1 тестирования оценивали по предпочтению социальной камеры и социального объекта по формулам (McKibben et al., 2014):

(1)
$$\left[\left(\text{время, проведенное в камере с социальным объектом} \right) - \left(\text{время, проведенное в камере с пустым цилиндром} \right) \right] / \left(\text{суммарное время, проведенное в этих двух камерах} \right) \times 100\%,$$

(2)
$$\left[\left(\text{время, проведенное около социального объекта} \right) - \left(\text{время, проведенное около пустого цилиндра} \right) \right] / \left(\text{суммарное время, проведенное около двух объектов} \right) \times 100\%.$$

Аналогично рассчитывали показатели «социальной новизны» на этапе 2 тестирования: по предпочтению камеры с новым социальным объектом (незнакомой крысой) и самого нового социального объекта уже знакомому социальному объекту.

2.2.6. Пространственная память

В сериях 1 и 2 для оценки пространственной памяти использовали бассейн черного цвета, круглой формы (160 см в диаметре, внешняя высота бортов 75 см, внутренняя высота бортов 60 см), который заполняли водой с температурой $25 \pm 1^\circ\text{C}$ до высоты 30 см (оборудование является частью автоматизированной видеосистемы “VideoMot2”, TSE System, Германия). Бассейн был виртуально разделен на квадранты. Во время обучения прозрачную платформу диаметром 14 см располагали на 1,5 см ниже уровня воды всегда в одном и том же месте лабиринта (в целевом квадранте). Местоположение платформы, зона вокруг нее (отступ на 10 см от края платформы), и краевая зона (20% от радиуса бассейна, прилежащие к стенке) также были отмечены виртуально. Визуальные ориентиры (конструкции, изображения) были расположены вне лабиринта.

Обучение крыс проводили по алгоритму, приведенному в статье Chakravarthi, Avadhani (2013). На этом этапе течение четырех последовательных дней крысе ежедневно давали по 4 попытки найти платформу, каждый раз помещая крысу в разные квадранты бассейна в псевдослучайном порядке. Максимальная продолжительность попытки составляла 2 мин. Если крыса находила платформу за меньшее время, животное оставляли на платформе еще на 15 с, после чего попытка завершалась. В случае, если по истечении 2 мин крыса так и не обнаруживала платформу, животное направляли к ней, и также оставляли на платформе на 15 с. После каждой попытки крысу вытирали и возвращали в контейнер с опилками. Интервал между попытками для одной крысы составлял не менее

5 мин. На 5 день (через 24 ч после последней попытки) проводили тестирование (Тест 1). Платформу в день тестирования убирали из лабиринта. Крысу один раз сажали в наиболее удаленный квадрант от того места, где раньше находилась платформа. Продолжительность тестирования составляла 2 мин. Через 4 мес. (в серии 1) и через 3 мес. (в серии 2), тестирование повторяли (Тест 2). Затем, через 24 ч, следовал этап напоминания. В день, когда проводили напоминание, платформу возвращали в целевой квадрант лабиринта. Напоминание состояло из 2 попыток по 2 мин с 5-минутным интервалом между попытками. Крысу выпускали сначала в одном квадранте, смежном с целевым, затем – во втором, также смежном с целевым. Процедура попытки при напоминании не отличалась от попыток при обучении. Через 24 ч после напоминания снова проводили тестирование (Тест 3). Процедура тестирования и положение платформы были одинаковыми на протяжении всего эксперимента.

Анализ проводили по следующим показателям: 1) общий пробег, 2) средняя скорость, 3) латентность достижения приплатформенной зоны, 4) латентность достижения платформы (или – при тестировании – места, где она находилась во время обучения), 5) относительное время, проведенное в целевом квадранте, 6) относительное время, проведенное в краевой зоне.

2.2.7. Условный рефлекс пассивного избегания

В сериях 1 и 2 у крыс вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Использовали темно-светлую камеру с решетчатым металлическим полом, разделенную перегородкой с дверцей (Multi Conditioning System, TSE, Германия). Камеру располагали в звукоизолированном шкафу. Все этапы эксперимента проводили на фоне белого шума 60 дБ. Эксперимент состоял из трех этапов: привыкания, обучения и тестирования. Протокол проведения теста УРПИ принципиально соответствовал алгоритму, приведенному в статье Akbarabadi et al. (2018).

Привыкание проводили для снижения стрессующего воздействия ситуации эксперимента. Крысу помещали в светлый отсек камеры, через 60 с дверца автоматически открывалась и оставалась открытой до перехода животного в темный отсек, но не более 120 с. Через 1 с после перехода крысы в темный отсек дверца закрывалась. На исследование темного отсека крысе давали 60 с. Если за 120 с крыса не переходила в темный отсек, этап привыкания на этом завершался, и таких животных исключали из эксперимента. Через 24 ч после проведения этапа привыкания проводили этап обучения. Каждую крысу однократно помещали в светлый отсек камеры. Через 5 с дверца автоматически открывалась и оставалась открытой до перехода животного в темный отсек, но не более 120 с. Через 1 с после перехода дверца закрывалась, через 5 с после этого на пол камеры подавали переменный ток 0,5 мА с частотой 1 Гц в течение 5 с. Через 30 с после прекращения действия тока крысу забирали из камеры и помещали в домашнюю клетку. Крыс, у которых электрическая стимуляция не вызвала выраженной двигательной реакции, исключали из последующего анализа. В серии 1 тестирование проводили 2 раза: через 24 ч и через 7 дней после обучения. Процедура тестирования была аналогичной процедуре обучения за исключением того, что при тестировании ток был отключен от пола камеры и время для перехода в темный отсек было продлено до 300 с. УРПИ оценивали по показателю длительности латентного периода перехода в темный отсек. В серии 2 животных дополнительно тестировали через 3 мес. после обучения по той же процедуре (тест 3), но после перехода в темный отсек на пол камеры снова подавали ток с целью напоминания. Через 24 ч повторяли процедуру тестирования (тест 4).

Дополнительно на этапе тестирования отслеживали число заглядываний в темный отсек камеры, и число неполных переходов в темный отсек (переход 1-3 лапами). По этим показателям проводили качественную оценку выработки УРПИ по методу, предложенному Павловой и соавт. (2020). Оценку осуществляли по 5-балльной шкале: крыса не заходит и не

заглядывает в темный отсек, 4 – крыса не заходит, но заглядывает в темный отсек, 3 – крыса не заходит, но совершает неполные переходы, 2 – крыса переходит в темный отсек, но с большим латентным периодом, чем при обучении (если латентный период как минимум в 4 раза превышает среднее значение этого показателя в данной группе на этапе обучения), 1 – крыса переходит в темный отсек с таким же латентным периодом, как и при обучении.

2.2.8. Условный рефлекс активного избегания

В серии 3 у крыс вырабатывали условный рефлекс активного избегания (УРАИ). Использовали светлую камеру с решетчатым металлическим полом, разделенную перегородкой с отверстием для перехода между отсеками (Multi Conditioning System, TSE, Германия). Камера располагалась в звукоизолированном шкафу. Все этапы эксперимента проводили на фоне белого шума 60 (дБ). Эксперимент состоял из трех этапов: обучения, тестирования через 24 ч (тест 1) и тестирования через 2 мес. (тест 2). Крысу помещали в один из отсеков камеры и позволяли свободно исследовать камеру в течение 10 мин. Затем в камеру одновременно подавали световой и звуковой сигналы в течение 10 с. Если во время действия этих сигналов крыса не переходила в другой отсек камеры, на пол камеры подавали переменный ток 0,5 мА с частотой 1 Гц в течение 8 с или до перехода крысы в другой отсек камеры. При воздействии электрического тока действие светового и звукового сигналов продолжалось. Таким образом, максимальная продолжительность одной попытки составляла 18 с. Попытки были разделены 20-секундными интервалами. Сессия обучения для всех крыс состояла из 100 попыток. Активным избеганием считали переход крысы в другой отсек камеры после подачи светового и звуковых сигналов, но до начала действия электрического тока. Переход во время действия электрического тока считали реакцией избавления. Критерием научения

считали активное избегание в течение 6 попыток подряд. Тестирования были проведены по той же схеме, но число попыток сокращали до 50.

Анализ проводили по следующим показателям: 1) число реакций избегания за сессию, 2) число реакций активного избегания за сессию 3) число попыток, которое потребовалось животному для достижения критерия научения.

2.2.9. Определение стадии эстрального цикла

В сериях 2 и 3 у самок крыс начиная с возраста 3 мес. в дни тестирования показателей поведения, а также в дни сбора биологического материала, определяли стадию эстрального цикла по цитологическим показателям (Cora et al., 2015). Вагинальные мазки брали пипеткой с использованием физиологического раствора и сразу изучали под микроскопом с $\times 20$ увеличением. Различали три стадии эстрального цикла: Диэструс (при наличии в мазке большого количества лейкоцитов), Проэструс (при высокой концентрации круглых эпителиальных клеток и отсутствии или незначительном количестве лейкоцитов) и Эструс (при высокой концентрации чешуйчатых эпителиальных клеток) (**Рис. 3.**).

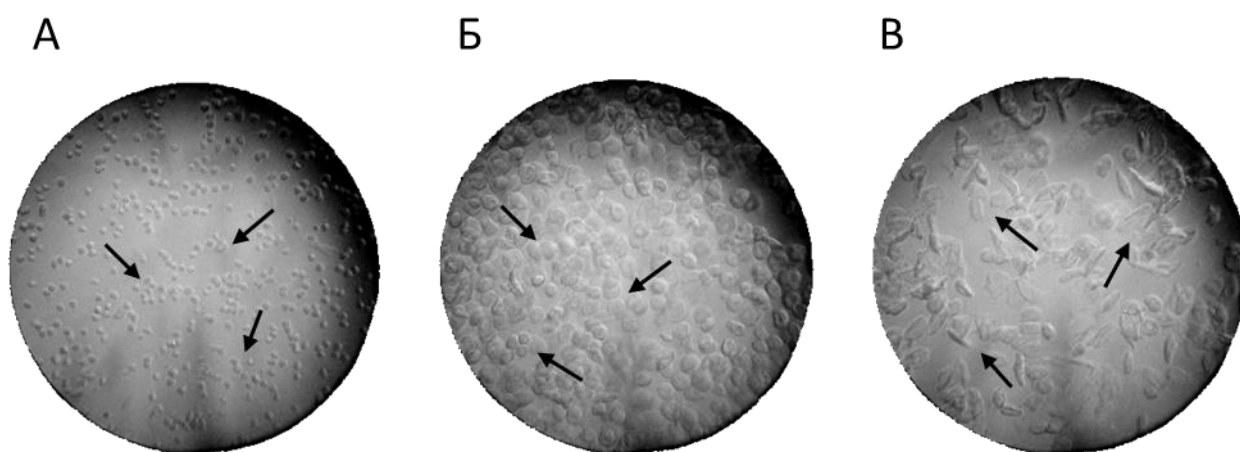


Рис. 3. Вагинальные мазки, взятые у крыс на разных стадиях эстрального цикла. А – диэструс, стрелками обозначены лейкоциты; Б – проэструс, стрелками обозначены круглые эпителиальные клетки; В – эструс, стрелками обозначены чешуйчатые эпителиальные клетки.

2.3. Анализ биологического материала

2.3.1. Сбор биологического материала

По завершении тестирования поведения животных декапитировали с использованием гильотины. Сразу после этого были отобраны образцы крови для последующего иммуноферментного анализа уровня кортикостерона в сыворотке крови. Структуры головного мозга (фронтальная кора, гиппокамп, стриатум и гипоталамус) выделяли на льду, согласно стандартной методике (Glowinski J., Iversen L.L., 1966), замораживали в жидком азоте, взвешивали, после чего снова помещали в жидкий азот. Пробы хранили в холодильнике при температуре -80°C . Дополнительно взвешивали органы-маркеры стресса (надпочечники, селезенка, тимус). Сбор биологического материала в разных группах проводили в один день, в первой половине дня.

В серии 2 оценку уровня кортикостерона в крови у половины животных проводили после дополнительного стрессирования непосредственно перед декапитацией как в возрасте крыс 6 мес., так и в возрасте 10 мес. В качестве стрессирующего фактора использовали иммобилизацию в течение 60 мин.

2.3.2. Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови

Образцы крови были собраны в вакуумные пробирки с активатором свертывания (SiO_2) и разделительным гелем (Sanamedical, Россия). Сыворотку, полученную после центрифугирования (2000 g, 15 мин, Eppendorf Centrifuge 5702R), собирали в отдельные пробирки и хранили при температуре -80°C . Для проведения иммуноферментного анализа использовали кит ELIZA (DRG Instruments GmbH, Германия). Для каждой крысы и каждого измерения брали отдельные аликвоты образцов. Все измерения были выполнены в соответствии с инструкцией производителя. Использовали микропланшетный фотометр (ридер) для иммуноферментных

анализов Immunochem-2100 (High Technology, Inc., USA). Для экстраполяции данных была построена 4-параметровая логическая кривая с использованием ресурса Myassays.com.

2.3.3. Определение уровня экспрессии белков в структурах мозга крыс

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 (Bradford, 1976). В каждую лунку 8%-ного (w/v) полиакриламидного разрешающего геля загружали подготовленные образцы всех исследованных белков (140 мкг общего белка/проба) и проводили электрофорез (120 V, 90 мин), после чего разделённые образцы переносили на целлюлозную мембрану («Bio-Rad» при помощи электроэлюции (100 V, 60 мин). Блокирование неспецифического связывания антител проводили путём погружения мембраны в 5%-ный раствор обезжиренного молока в PBS («Bio-Rad»), содержащий 0,1% (v/v) Tween 20 и 0,02% азид Na, на 1 ч при 4 °C. Одновременно с этим 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, 43 кДа («Santa Cruz Biotechnology Inc.», США) были преинкубированы при 4 °C в растворе молока (5% обезжиренного молока, 0,1% (v/v) Tween 20 и 0,02% азид Na, PBS). Для каждого белка использовали отдельную мембрану. Затем мембрану инкубировали в растворе первичных антител ещё 15 ч при 4 °C. После промывания блоты в течение 60 мин инкубировали в растворе вторичных антител (goat anti-mouse IgG-HRP: ab6789 («Abcam», США) при 4 °C. 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 приведены в относительных денситометрических единицах (ОДЕ). Помимо оценки концентрации белка в образцах по методу Брэдфорда, в качестве дополнительного контроля равномерности загрузки проб производили окрашивание нитроцеллюлозной мембраны на общий белок (Ponceau S) и измеряли экспрессию β -актина (белок внутреннего контроля).

2.3.4. Определение уровня содержания моноаминов и их метаболитов

Измерения проводили на базе лаборатории нейрохимической фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» (зав. Лаб. В.С. Кудрин). Выделенные структуры размельчали в гомогенизаторе «стекло-тефлон» (0,2 мм) при скорости вращения пестика 3000 об/мин в 1 мл 0,1н. HClO_4 с добавлением в качестве внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) (Sigma, США) в количестве 500 пкмоль/мл.

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). Насос PM-80 (BAS, США), скорость элюции подвижной фазы 1,0 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1,1 mM октансульфоновой кислоты, 0,1 mM ЭДТА и 9% ацетонитрила (pH 3,0). Измерение проводили с

помощью электрохимического детектора LC-4В (BAS, США) на стеклоугольном электроде (+0,85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Подвижную фазу фильтровали с помощью вакуумного насоса через целлюлозные фильтры (диаметр пор 0,2 мкм) при P = 20–40 мм Hg столба и перед каждым хроматографическим определением тщательно дегазировали под вакуумом с одновременной обработкой на ультразвуковой бане (“Серьга”, Россия) в течение 40–50 с. Для определения количества моноаминов в структурах мозга крыс использовали раствор, содержащий в качестве внутреннего стандарта ДОБА, норадреналин (NA), 3,4-дигидроксифенилукусусную кислоту (DOPAC), дофамин (DA), гомованилиновую кислоту (HVA), 5-гидрокситриптамиин (5-НТ), 3-метокситириптамиин (3-МТ), 5-оксииндолукусусную кислоту (5-HIAA) в концентрации 500 пкмоль/мл. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1,5 (АМПЕРСЕНД). Все использованные для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о.с.ч., х.ч. или analytical grade. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом «внутреннего стандарта», исходя из отношений площадей пиков (mV*c) в стандартной смеси и в образце, по следующей формуле:

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

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

2.4. 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) или по LSD-тесту Фишера. При отвержении этой гипотезы использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна-Уитни для независимых переменных или непараметрический факторный анализ Kruskal-Wallis с последующим множественным сравнением средних рангов. Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение p ($p_{кр}$) для каждого сравнения по методу FDR-контроля (Benjamini, Hochberg, 1995). Значения уровней значимости, достигнутых при всех сравнениях, выстраивали в ряд по возрастанию. Для наименьшего из этих значений $p_{кр}$ рассчитывали путем деления принятого уровня значимости ($p=0,05$) на число сравнений, для следующего значения $p_{кр}$ было в 2 раза больше, для третьего значения в ряду – в три раза больше и т.д. Так, для последнего значения в ряду $p_{кр}=0,05$. Частоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера (ТМФ). Для оценки случайности события использовали одновыборочный параметрический t-критерий Стьюдента (сравнение с критическим значением).

ГЛАВА 3. Результаты исследования

3.1. Вес крыс

В сериях 1 и 3 для анализа показателей ориентировочно-исследовательской деятельности применили Repeated Measures ANOVA: в серии 1 – фактор «Пол» [градации (2): самцы, самки], фактор «Содержание» [градации (2): «Контроль», «Социальная Изоляция»] и фактор повторных измерений «Возраст» [градации (4): 1 мес., 3 мес., 5,5 мес., 9 мес.]; в серии 3 – фактор «Содержание» [градации (2): «Контроль», «Социальная Изоляция»] и фактор повторных измерений [градации (5): 1 мес., 3 мес., 5,5 мес., 8,5 мес., 10,5 мес.]. В серии 2 в связи с тем, что часть животных вывели из эксперимента после 6 мес., для анализа данных показателей использовали Two-Way ANOVA без повторных измерений: фактор «Содержание» [градации (2): «Контроль», «Социальная Изоляция»] и фактор «Возраст» [градации (4): 1 мес., 3 мес., 5,5 мес. и 9 мес.]. Для последующего сравнения средних применили тест Ньюмана-Кеулса.

Во всех сериях было выявлено влияние фактора «Возраст» (в серии 1 – $F_{(3,195)}=2262,234$, $p<0,001$; в серии 2 – $F_{(3,204)}=1662,205$, $p=0,005$; в серии 3 – $F_{(4,180)}=1626,370$, $p<0,001$) (результаты *post hoc* анализа по этому показателю и остальным указанным ниже показателям приведены на соответствующих рисунках) (Рис. 4.).

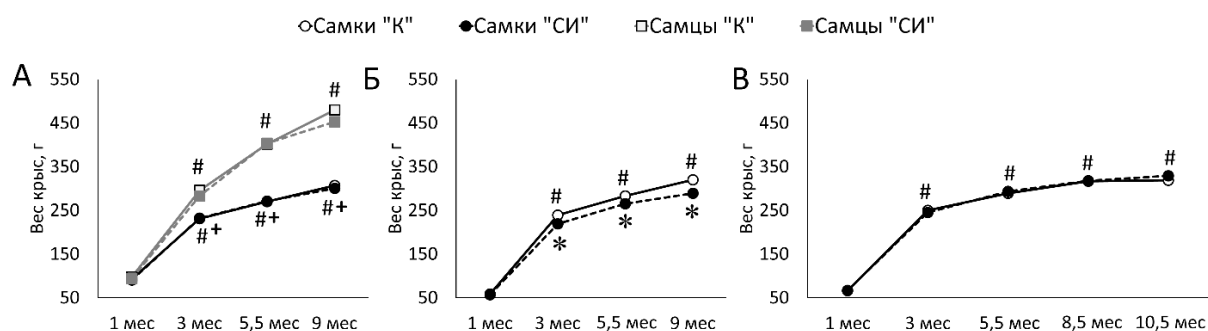


Рис. 4. Вес крыс. А – серия 1, Б – серия 2, В – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p<0,001$ по сравнению с животными той же группы на предыдущем сроке обследования, * $p<0,001$ по сравнению с самками группы

«Контроль» на том же сроке обследования, $+p < 0,001$ по сравнению с самцами на том же сроке обследования (Н-К тест).

Кроме того, в серии 1 статистически значимым было влияние фактора «Пол» ($F_{(1,65)}=182,824$, $p < 0,001$), и взаимодействие факторов «Пол» $\times$ «Возраст» ($F_{(3,195)}=179,154$, $p < 0,001$): вес самок был меньше, чем вес самцов, начиная с возраста крыс 3 мес. и на последующих сроках обследования. Однако на последнем сроке обследования влияние фактора «Содержание» было статистически значимым (Two-Way ANOVA: $F_{(1,64)}=4,5868$, $p=0,036$). Крысы, содержащиеся в условиях длительной социальной изоляции, весили меньше контрольных животных. В серии 2 на вес крыс оказывал влияние фактор «Содержание» ($F=38,548$, $p < 0,001$). Взаимодействие факторов «Возраст» и «Содержание» также было статистически значимым ($F_{(3,204)}=4,388$, $p=0,005$): начиная с возраста крыс 3 мес. и на последующих сроках вес крыс группы «Социальная изоляция» был меньше, чем вес контрольных животных.

3.2. Эстральный цикл

В сериях 2 и 3 в периоды проведения тестирований отслеживали стадии эстрального цикла у самок. Для каждого срока обследования рассчитывали долю крыс (в %), находившихся в стадии диэструса, проэструса или эструса, для 5 дней обследования в серии 2 (тесты аОП, кОП, ПБР, ПКЛ и ПП) или 4 дней обследования в серии 3 (тесты аОП, кОП, ПБР и ПКЛ). Затем, долю крыс, находящихся на каждой из этих стадий, сравнивали в группах «Контроль» и «Социальная изоляция» с помощью U-критерия Манна-Уитни. Анализ не выявил различий в представленности стадий эстрального цикла между группами ни на одном из сроков обследования ($p > 0,1$ для всех сравнений).

3.3. Ориентировочно-исследовательская деятельность

3.3.1. Тест «автоматизированное Открытое Поле»

В сериях 1 и 3 показатели ориентировочно-исследовательской деятельности анализировали теми же статистическими методами, что и вес животных: Repeated measures ANOVA в сериях 1 и 3, Two-Way ANOVA в серии 2, для апостериорного анализа применили тест Ньюмана-Кеулса.

Влияние фактора «Возраст» на двигательную активность было показано во всех сериях (серия 1 – $F_{(3,189)}=10,051$, $p<0,001$; серия 2 – $F_{(3,203)}=4,771$, $p=0,003$; серия 3 – $F_{(4,200)}=15,395$, $p<0,001$): пик двигательной активности приходится на возраст 3 мес. ($p<0,001$ по сравнению с возрастом крыс 1 мес. во всех сериях), затем двигательная активность снижается, и к возрасту 9 мес. (10,5 мес. в серии 3) вновь достигает значений, регистрируемых для крыс в возрасте 1 мес. ($p>0,05$ по сравнению с возрастом крыс 1 мес. во всех сериях). В серии 1 анализ выявил влияние фактора «Пол» ($F_{(1,63)}=25,244$, $p<0,001$): двигательная активность самок была выше, чем у самцов. Взаимодействие факторов «Пол» $\times$ «Возраст» также было статистически значимым ($F_{(3,189)}=13,650$, $p<0,001$): у самок двигательная активность в возрасте 3 мес. увеличилась по сравнению с исходным значением этого показателя ($p<0,001$), после чего сохранялась на одном уровне, а у самцов двигательная активность в возрасте 1-5,5 мес. не изменялась, а на последнем сроке статистически значимо снизилась ($p=0,055$ по сравнению с возрастом 1 мес., и $p=0,044$ по сравнению с возрастом 3 мес.). Ни в одной из серий влияние фактора «Содержание» не было статистически значимым. Однако, в серии 3 анализ выявил взаимодействие факторов «Возраст» и «Содержание» ($F_{(4,200)}=4,469$, $p=0,002$): у самок группы «Контроль» повышение двигательной активности относительно величины этого показателя в возрасте 1 мес. было статистически значимым на двух сроках обследования – в возрасте крыс 3 и 8,5 мес., а у самок группы

«Социальная изоляция» увеличение двигательной активности отмечалось только на одном сроке – в возрасте крыс 3 мес. Динамика двигательной активности в тесте аОП приведена на **Рис. 5, А, Б, В.**

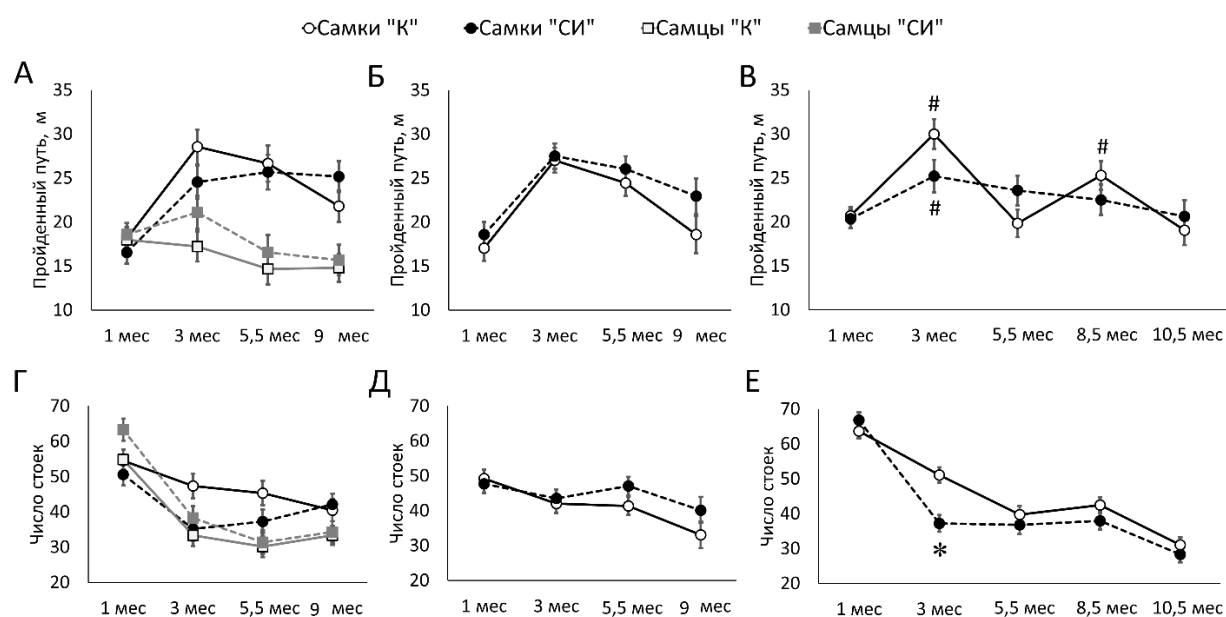


Рис. 5. Двигательная и исследовательская активность в тесте «автоматизированное Открытое Поле». А, Г – серия 1; Б, Д – серия 2; В, Е – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p < 0,05$ по сравнению с животными той же группы в возрасте 1 мес., * $p < 0,001$ по сравнению с самками группы «Контроль» на том же сроке обследования (Н-К тест).

Влияние фактора «Возраст» на исследовательскую активность было статистически значимым во всех сериях (серия 1 – $F_{(3,189)}=48,642$, $p < 0,001$; серия 2 – $F_{(3,203)}=4,771$, $p=0,003$; серия 3 – $F_{(4,200)}=93,278$, $p < 0,001$): с возрастом исследовательская активность снижалась (в сериях 1 и 3 $p < 0,001$ для возраста крыс 1 мес. по сравнению со всеми последующими сроками, в серии 2 $p < 0,001$ для возраста крыс 1 мес. по сравнению с последним обследованием) (**Рис. 5, Г, Д, Е**). В серии 1 анализ выявил взаимодействие факторов «Пол» × «Возраст» ($F_{(3,189)}=7,865$, $p < 0,001$): исследовательская активность самок в возрасте 5,5 мес. была выше, чем у самцов ($p=0,008$). Также было выявлено взаимодействие факторов «Пол» × «Содержание» ($F_{(3,189)}=4,807$, $p=0,032$): в группе «Контроль» у самок исследовательская активность была выше, чем у самцов, а в группе «Социальная изоляция» половых различий не обнаружено. В серии 3 статистически значимым было взаимодействие факторов

«Возраст» × «Содержание» ($F_{(4,200)}=5,003$, $p<0,001$): в возрасте крыс 3 мес. исследовательская активность самок группы «Социальная изоляция» была ниже, чем у самок группы «Контроль», то есть снижение исследовательской активности с возрастом у крыс опытной группы произошло более резко (**Рис. 5, Е**).

3.3.2. Тест «классическое Открытое Поле»

Двигательную и исследовательскую активность (за 3 мин наблюдения при ярком свете) в тесте кОП анализировали теми же статистическими методами, как в тесте аОП: Repeated measures ANOVA в сериях 1 и 3, Two-Way ANOVA в серии 2, для апостериорного анализа применили тест Ньюмана-Кеулса.

Фактор «Возраст» оказывал влияние на двигательную активность во всех сериях (в серии 1 – $F_{(3,192)}=38,012$, $p<0,001$; в серии 2 – $F_{(3,204)}=6,641$, $p<0,001$; в серии 3 – $F_{(4,204)}=8,142$, $p<0,001$): с возрастом двигательная активность снижалась (**Рис. 6, А, Б, В**). В серии 1 статистически значимое снижение двигательной активности отмечалось уже в возрасте крыс 3 мес. ($p<0,001$), а сериях 2 и 3 – начиная с возраста крыс 5,5 мес. ($p=0,017$ и $p=0,008$, соответственно). В серии 1 также было выявлено влияние фактора «Пол» ($F_{(1,64)}=23,230$, $p<0,001$) и фактора «Содержание» ($F_{(1,64)}=4,337$, $p=0,041$): двигательная активность была выше у самок, чем у самцов, и у крыс группы «Социальная изоляция», чем у крыс группы «Контроль». В серии 3 анализ выявил взаимодействие факторов «Возраст» × «Содержание» ($F_{(4,204)}=3,632$, $p=0,007$): снижение двигательной активности наблюдалось только у самок группы «Контроль», у самок группы «Социальная изоляция» двигательная активность не изменялась с возрастом.

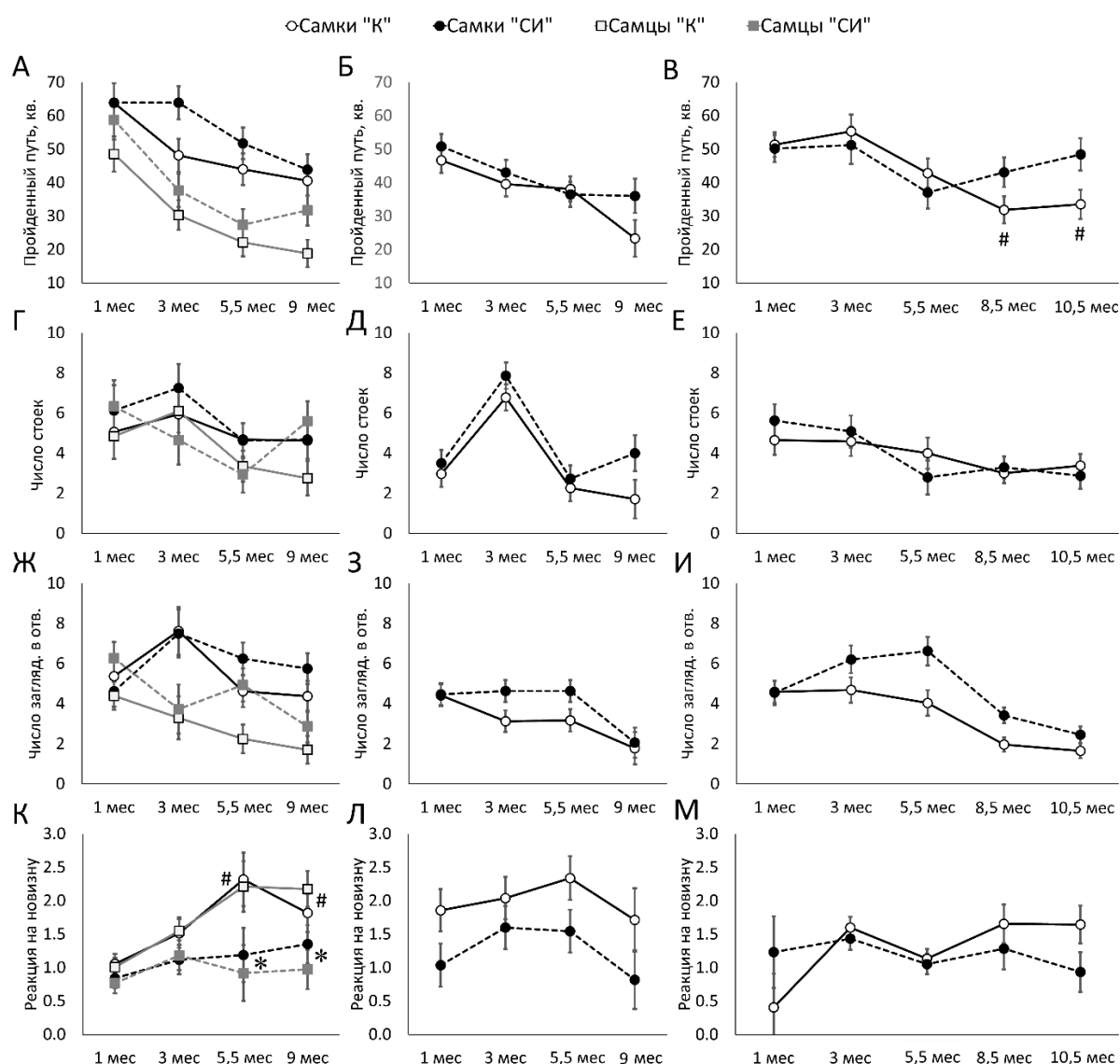


Рис. 6. Поведение крыс в тесте «классическое Открытое Поле». А, Г, Ж, К – серия 1; Б, Д, З, Л – серия 2; В, Е, И, М – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p < 0,05$ по сравнению с животными той же группы в возрасте 1 мес., * $p < 0,007$ по сравнению с крысами группы «Контроль» на том же сроке обследования (Н-К тест).

Исследовательскую активность в данном тесте оценивали по двум показателям – по числу стоек, как и в тесте аОП, а также, по числу заглядываний в отверстия, которые были выточены в полу арены на расстоянии 20 см друг от друга. Во всех сериях на число стоек оказывал влияние только фактор «Возраст» (в серии 1 – $F_{(3,189)}=5,718$, $p < 0,001$; в серии 2 – $F_{(3,204)}=6,641$, $p < 0,001$; в серии 3 – $F_{(4,204)}=6,183$, $p < 0,001$): в сериях 1 и 3 число стоек снижалось с возрастом, начиная с возраста крыс 5,5 мес. ($p=0,011$ и $p=0,009$, соответственно), а в серии 2 наибольшее число стоек

крысы совершали в возрасте 3 мес. ($p < 0,001$ по сравнению с остальными сроками обследования) (**Рис. 6, Г, Д, Е**). Фактор возраст также оказывал влияние на число заглядываний в отверстия (серия 1 – $F_{(3,189)}=4,274$, $p=0,006$; в серии 2 – $F_{(3,203)}=4,883$, $p=0,003$; в серии 3 – $F_{(4,204)}=19,895$, $p < 0,001$): в возрасте крыс 8,5 и 10,5 мес. (в серии 3) число заглядываний в отверстия было ниже, чем на предыдущих сроках обследования ($p < 0,020$ по сравнению с возрастом крыс 1 мес. во всех сериях). (**Рис. 6, Ж, З, И**). В серии 3 анализ выявил статистически значимое влияние фактора «Содержание» ($F_{(1,51)}=7,424$, $p=0,009$). В сериях 1 и 2 влияние этого фактора не достигло уровня статистической значимости ($F_{(1,63)}=3,400$, $p=0,070$; в серии 2 – $F_{(1,203)}=3,3629$, $p=0,058$), но направление действия фактора было таким же, как и в серии 3 – число заглядываний в отверстия было выше у крыс группы «Социальная изоляция». Кроме того, в серии 1 было выявлено влияние фактора «Пол» ($F_{(1,63)}=13,805$, $p < 0,001$), самки чаще заглядывали в отверстия; и взаимодействие факторов «Пол» $\times$ «Возраст» ($F_{(3,189)}=5,439$, $p=0,001$). У самок пик исследовательской активности по числу заглядываний в отверстия приходился на возраст крыс 3 мес. ($p < 0,001$ по сравнению с другими сроками обследования). У самцов этот пик не был выражен, кроме того, именно у самцов наблюдалось снижение числа заглядываний в отверстия в возрасте 9 мес. ($p=0,002$). На этих двух сроках различия между самцами и самками были статистически значимыми ($p < 0,001$ и $p=0,010$, соответственно).

Реакцию на новизну оценивали по повышению двигательной активности в ответ на резкую смену освещения с белого света на красный (см. раздел 2.2.1.) (**Рис. 6, К, Л, М**). В серии 1 было выявлено влияние фактора «Содержание» ($F_{(1,63)}=19,907$, $p < 0,001$), фактора «Возраст» ($F_{(3,189)}=7,191$, $p < 0,001$), и взаимодействие этих факторов ($F_{(3,189)}=2,736$, $p=0,045$): у крыс группы «Контроль», в отличие от крыс группы «Социальная изоляция» реакция на новизну увеличивалась с возрастом, и на сроках обследования в 5,5 и 9 мес. статистически значимо превышала величину реакции на новизну у животных опытной группы ($p < 0,001$ и $p=0,004$,

соответственно). В серии 2 только влияние фактора «Содержание» было статистически значимым ($F_{(1,203)}=8,428$, $p=0,004$): как и в серии 1, у крыс группы «Социальная изоляция» реакция на новизну была ниже, чем у животных контрольной группы. В серии 3 различий между группами не выявлено.

Представленные в разделе 3.3. результаты опубликованы в статьях Ширеновой и соавт., (2022) и Krupina et al., (2020).

3.4. Болевая чувствительность

3.4.1. Тест «Hot Plate»

Болевыми реакциями в тесте «Hot Plate» считали облизывание передней и задней лапки и выпрыгивание. Частота встречаемости этих реакций зависела от возраста крыс. Приведены результаты статистического анализа только по порогам тех болевых реакций, которые демонстрировали более 50% крыс на определенном сроке обследования. Число крыс, демонстрировавших каждую из болевых реакций, представлено в таблице 1.

Таблица 1. – Частота встречаемости болевых реакций в зависимости от возраста крыс.

		1 мес	3 мес	5,5 мес	9 (8,5) мес	10,5 мес
Облизывание передней лапки	Серия 1, n=63	54	40	8	2	
	Серия 2, n=61	44	39	11	3 (n=30)	
	Серия 3, n=60	45	42	19	17	12
Облизывание задней лапки	Серия 1, n=63	47	44	12	0	
	Серия 2, n=61	30	44	10	3 (n=30)	
	Серия 3, n=60	26	44	25	21	20
Выпрыгивание	Серия 1, n=63	22	59	63	63	
	Серия 2, n=61	28	51	50	30 (n=30)	
	Серия 3, n=60	28	51	40	54	53

Примечание – В серии 2 после оценки поведения в возрасте крыс 5,5 мес. часть животных использовали для сбора биологического материала, поэтому на последнем этапе обследования число крыс меньше.

В сериях 1 и 3 не было выявлено различий между группами «Контроль» и «Социальная изоляция» по частоте встречаемости ни одной из болевых реакций ни на одном из сроков. Различий между самцами и самками

в серии 1 также не было выявлено (ТМФ, двусторонний критерий, $p > 0,1$ для всех сравнений). В серии 2 различия в частоте встречаемости болевых реакций были выявлены в возрасте крыс 3 и 5,5 мес. В 3 мес. самки группы «Социальная изоляция» реже выпрыгивали из цилиндра (70% против 100%), а в 5,5 мес. – чаще облизывали переднюю лапку (30% против 6%).

В возрасте 1 мес. частота встречаемости выпрыгивания у крыс оказалась наименьшей во всех сериях: эту реакцию совершили менее 50% животных. В сериях 2 и 3 реакция облизывания задней лапки тоже встречалась менее, чем у 50% крыс. В возрасте 3 мес. более 50% крыс демонстрировали все три реакции избавления. В возрасте 5,5, 9 (или 8,5) и 10,5 мес. в основном крысы демонстрировали только выпрыгивание. В связи с этим во всех сериях латентный период облизывания передней лапки анализировали только в возрасте крыс 1 и 3 мес., а задней лапки – в 1 мес. в серии 1 и в 3 мес. во всех трех сериях (Two-Way ANOVA и тест Ньюмана-Кеулса в серии 1, One-Way ANOVA в сериях 2 и 3), а латентный период выпрыгивания анализировали в возрасте крыс 3 мес. и на последующих сроках (Two-Way ANOVA в серии 1, One-Way ANOVA в серии 2 и 3). В серии 1 на сроках обследования крыс в 1 и 3 мес. было возможно проанализировать также и облизывание задней лапки. Влияние фактора «Возраст» на величину этого показателя оценивали с помощью Repeated Measures ANOVA в сериях 1, 3, и Two-Way ANOVA в серии 2 с последующим использованием теста Ньюмана-Кеулса.

Исходно, в возрасте крыс 1 мес., между контрольной и опытной группами не было различий по ПБР ни в одной из серий (Таблица 2). После 2 мес. социальной изоляции животных опытной группы в сериях 1 и 2 было выявлено влияние фактора «Содержание»: в серии 1 – на латентный период облизывания задней лапки ($F_{(1,40)}=4,883$, $p=0,033$), в серии 2 – на латентный период выпрыгивания ($F=15,665$, $p<0,001$). В обоих случаях ПБР был выше у крыс группы «Социальная изоляция».

Таблица 2. – Латентный период облизывания лапок, с.

		1 мес				3 мес			
		Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»
Серия 1	Передняя лапка	9,2±1,2	9,6±1,3	9,6±1,2	11,9±1,4	8,4±1,1	8,3±0,9	5,8±0,9	8,2±1,0
	Задняя лапка	10,9±1,4	14,3±1,5	14,1±1,3	15,8±1,5	8,4±0,9	9,6±1,0	6,9±0,8	10,0±0,9
		Самки «К»		Самки «СИ»		Самки «К»		Самки «СИ»	
Серия 2	Передняя лапка	12,0±1,4		12,1±1,7		7,8±0,5		9,7±1,2	
	Задняя лапка					7,2±8,6		8,6±0,7	
Серия 3	Передняя лапка	11,2±6,4		12,9±6,1		11,1±4,3		12,5±5,6	
	Задняя лапка					12,2±1,2		13,7±1,2	

Примечание – Данные приведены в виде $M \pm SEM$.

На следующем сроке обследования (возраст крыс 5,5 мес.) влияние фактора «Содержание» на латентный период выпрыгивания было статистически значимым как в серии 2 ($F=16,117$, $p<0,001$), так и в серии 1 ($F_{(1, 59)}=6,883$, $p=0,011$): ПБР был выше у крыс опытной группы. Кроме того, в серии 1 на этом сроке было выявлено влияние фактора «Пол» ($F_{(1, 59)}=8,624$, $p=0,005$): ПБР у самок был выше, чем у самцов. В возрасте крыс 9 мес. влияние фактора «Содержание» было статистически значимым в серии 1 ($F_{(1,59)}=9,239$, $p=0,004$): латентный период выпрыгивания был выше у крыс группы «Социальная изоляция». В серии 2 влияние этого фактора не достигло уровня статистической значимости ($F=3,243$, $p=0,082$), но направление изменений сохранялось. В серии 3 ни на одном из сроков обследования не было выявлено различия между группами. Во всех сериях влияние фактора «Возраст» было статистически значимым (в серии 1 – $F_{(2, 110)}=116,951$, $p<0,001$; в серии 2 – $F_{(2, 136)}=92,079$, $p<0,001$; в серии 3 – $F_{(3, 78)}=6,250$, $p<0,001$): с возрастом латентный период выпрыгивания снижался (Рис. 7).

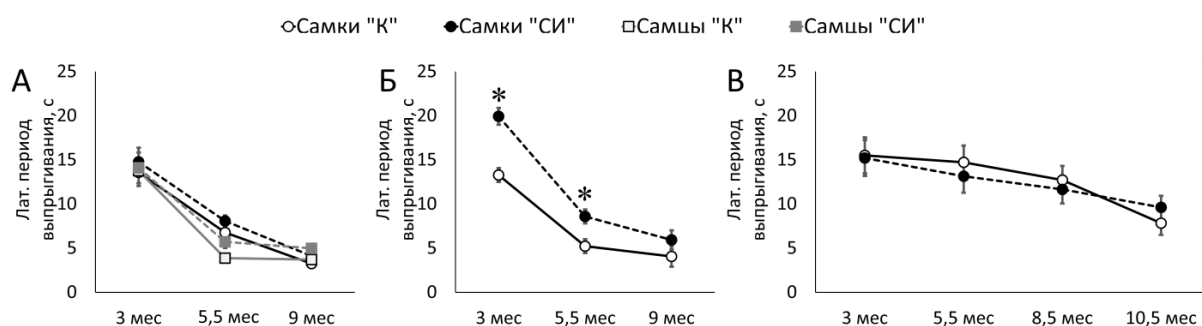


Рис. 7. Латентный период выпрыгивания в тесте «Hot Plate». А – серия 1, Б – серия 2, В – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс. * $p < 0,05$ по сравнению с крысами контрольной группы на том же сроке обследования (One-Way ANOVA, постдисперсионный анализ по тесту Ньюмана-Кеулса).

3.4.2. Тест «Tail Flick»

Для анализа ПБР в тесте «Tail Flick» использовали Repeated measures ANOVA в сериях 1, 3 и Two-Way ANOVA в серии 2. Последующее сравнение средних значений в группах проводили по тесту Ньюмана-Кеулса.

В сериях 1 и 2 было выявлено только влияние фактора «Возраст» (в серии 1 – $F_{(9, 177)} = 15,553$, $p < 0,001$; $F_{(3,203)} = 14,116$, $p < 0,001$): с возрастом латентный период отдергивания хвоста повышался. В серии 3 влияние этого фактора не достигло уровня статистической значимости ($F_{(4, 164)} = 2,405$, $p = 0,052$), но направление изменений было таким же, как и в сериях 1 и 2 (Рис. 8). Ни в одной из серий анализ не выявил влияния фактора «Содержание» на ПБР в данном тесте.

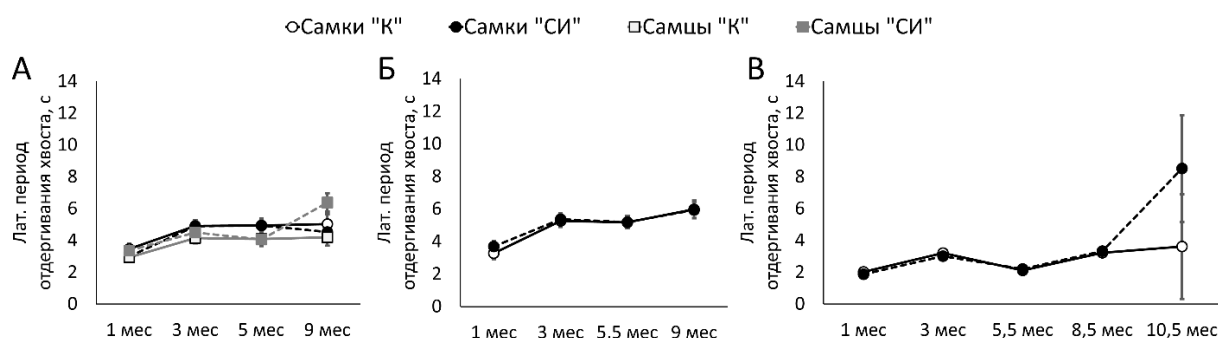


Рис. 8. Латентный период отдергивания хвоста в тесте «Tail Flick». А – серия 1, Б – серия 2, В – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс.

Представленные в разделе 3.4 результаты опубликованы в статье Ширеновой и соавт. (2019) и тезисах Shirenova et al., (2019, 2020) и Ширенова и соавт., (2020).

3.5. Тревожность

3.5.1. Тест «Приподнятый Крестообразный Лабиринт»

Тревожность в тесте ПКЛ анализировали по показателю предпочтения ОР лабиринта с помощью Repeated measures ANOVA в сериях 1, 3 и Two-Way ANOVA в серии 2. Последующее сравнение средних в группах проводили по тесту Ньюмана-Кеулса (Рис. 9, А, Б, В).

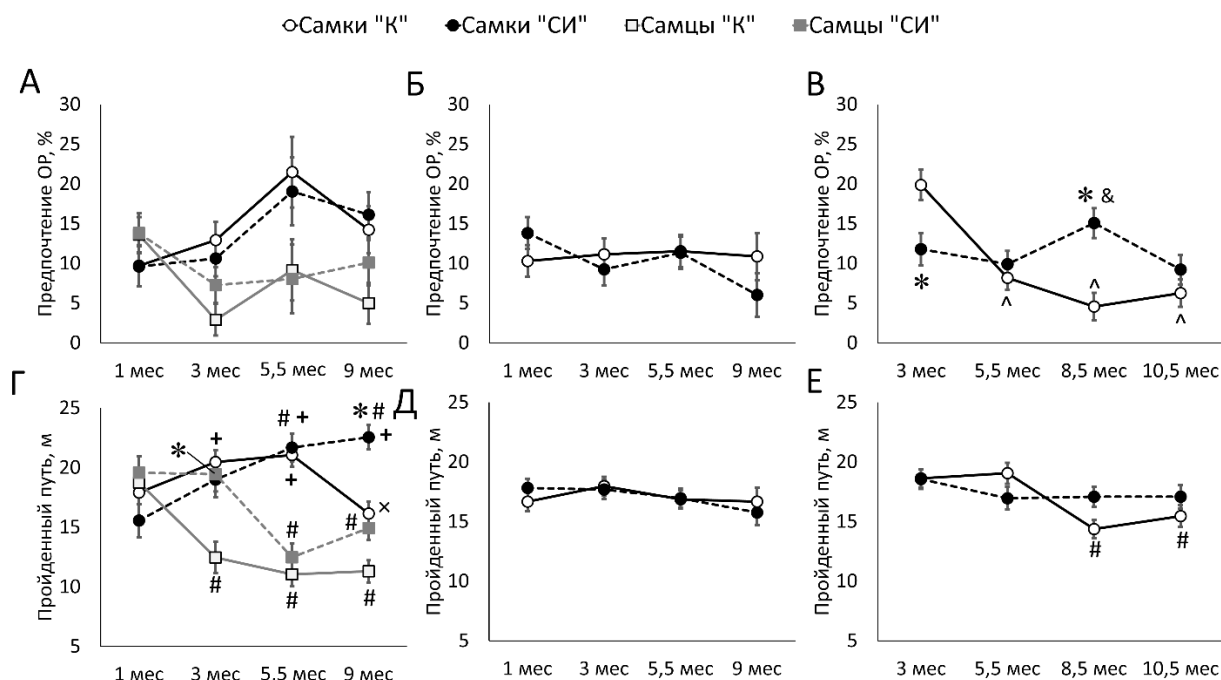


Рис. 9. Поведение крыс в тесте «Приподнятый Крестообразный Лабиринт». А, Г – серия 1; Б, Д – серия 2; В, Е – серия 3. По горизонтальной оси указан возраст крыс. ОР – открытые рукава лабиринта, &p<0,05 по сравнению с крысами той же группы в возрасте 5,5 и 10,5 мес., #p<0,05 по сравнению с крысами той же группы в возрасте 1 мес., x p<0,05 по сравнению с крысами той же группы в возрасте 5,5 мес., ^p<0,05 по сравнению с самками группы контроль в возрасте 3 мес., *p<0,05 по сравнению с крысами группы «Контроль» того же пола на том же сроке обследования, +p<0,05 по сравнению с самцами соответствующей группы (Repeated measures ANOVA, постдисперсионный анализ по тесту Ньюмана-Кеулса).

В серии 1 анализ выявил влияние фактора «Пол» ($F_{(1,63)}=8,658$, $p=0,005$), фактора «Возраст» ($F_{(3,189)}=3,154$, $p=0,026$) и взаимодействие этих факторов ($F_{(3,189)}=5,892$, $p<0,001$). У самцов в возрасте 3 мес. предпочтение ОР было ниже, чем в возрасте крыс 1 мес. А у самок величина этого показателя в возрасте 5,5 мес. было выше, чем в 1 и 3 мес. Кроме того, на данном сроке предпочтение ОР у самок было статистически значимо выше, чем у самцов ($p=0,007$). В серии 2 различий между группами не было ни на одном из сроков обследования, влияние фактора «Возраст» не было статистически значимым. В серии 3 было выявлено влияние фактора «Возраст» ($F_{(3,150)}=12,999$, $p<0,001$) и взаимодействие факторов «Возраст» и «Содержание» ($F_{(3,189)}=14,687$, $p<0,001$): у самок крыс группы «Контроль» предпочтение ОР было наиболее высоким в возрасте 3 мес., а у самок крыс группы «Социальная изоляция» – в возрасте 8,5 мес., на этих двух сроках различия между контрольной и опытной группами по данному показателю были статистически значимыми.

В тесте ПКЛ также анализировали двигательную активность по пройденному пути за 5 мин наблюдений (Рис. 9, Г, Д, Е). В серии 1 анализ выявил влияние факторов «Пол» ($F_{(1, 63)}=26,775$, $p<0,001$), «Возраст» ($F_{(3, 189)}=2,697$, $p=0,047$) и «Содержание» ($F_{(1, 63)}=5,857$, $p=0,018$). Также статистически значимым оказалось взаимодействие всех трех факторов «Пол» $\times$ «Возраст» $\times$ «Содержание» ($F_{(3, 189)}=4,897$, $p=0,003$). У самок группы «Контроль» в возрасте 9мес. длина пройденного пути была статистически значимо меньше, чем в возрасте 5,5 мес. ($p=0,025$). У самок группы «Социальная изоляция» длина пройденного пути с возрастом увеличилась, и на двух последних сроках обследования была больше, чем в возрасте крыс 1 мес. ($p=0,002$ и $p<0,001$, соответственно). У самцов длина пройденного пути с возрастом снижалась; в группе «Контроль» на всех последующих сроках обследования длина пройденного пути была меньше, чем в возрасте крыс 1 мес. ($p<0,001$ во всех случаях), а в группе «Социальная изоляция» снижение двигательной активности произошло позже, только на последних двух сроках

обследования двигательная активность отличалась от исходных значений этого показателя ($p < 0,001$ и $p = 0,042$). Выявлено увеличение длины пройденного пути вследствие социальной изоляции: у самцов в возрасте 3 мес., а у самок – в возрасте 9 мес. пройденный путь был длиннее, чем у крыс соответствующей контрольной группы ($p = 0,002$ и $p = 0,010$, соответственно). Половые различия в группе «Контроль» были статистически значимыми в возрасте крыс 3 и 5,5 мес., а в группе «Социальная изоляция» – в 5,5 и 9 мес.: длина пройденного пути была увеличена у самок ($p < 0,001$ для всех приведенных сравнений).

В серии 2 изменений двигательной активности в тесте ПКЛ не было выявлено. В серии 3 анализ показал статистически значимое влияние фактора «Возраст» ($F_{(3,150)} = 6,840$, $p < 0,001$) и взаимодействие факторов «Возраст» и «Содержание» ($F_{(3,150)} = 4,032$, $p = 0,009$): длина пройденного пути снижалась с возрастом, но это снижение было статистически значимым только в группе «Контроль»: в возрасте крыс 8,5 и 10,5 мес. длина пройденного пути в этой группе была меньше, чем в возрасте 3 и 5,5 мес. ($p < 0,001$ для сравнений с величиной показателя крыс в возрасте 8,5 мес., $p = 0,029$ и $p = 0,011$ для сравнения 3 и 5,5 мес. с 10,5 мес. соответственно).

3.5.2. Комплексная оценка тревожно-фобических состояний

Общий балл, характеризующий уровень тревожности крыс, анализировали с помощью Repeated measures ANOVA в серии 1. В серии 2 по критерию Колмогорова-Смирнова гипотезу о нормальном распределении данных отвергли и для анализа данных применили критерий Манна-Уитни.

Как в серии 1, так и в серии 2 фактор «Содержание» оказывал влияние на общий балл уровня тревожности крыс (в серии 1 – $F_{(1,63)} = 9,177$, $p = 0,004$; в серии 2 – $F = 7,290$, $p = 0,008$): уровень тревожности у крыс, подвергнутых социальной изоляции был ниже, чем у контрольных животных. В серии 1 также выявлено влияние фактора «Возраст» ($F_{(3,189)} = 4,061$, $p = 0,008$) и

взаимодействие факторов «Пол» × «Возраст» × «Содержание» ($F_{(3,189)}=3,294$, $p=0,022$). С возрастом происходит снижение уровня тревожности, при этом апостериорный анализ выявил статистически значимые изменения уровня тревожности только у самок группы «Социальная изоляция» (**Рис. 10, А**). В серии 2 снижение уровня тревожности у самок группы «Социальная изоляция» по сравнению с контрольными самками было выявлено в возрасте крыс 9 мес. ($U=63,5$, $p=0,043$) (**Рис. 10, Б**).

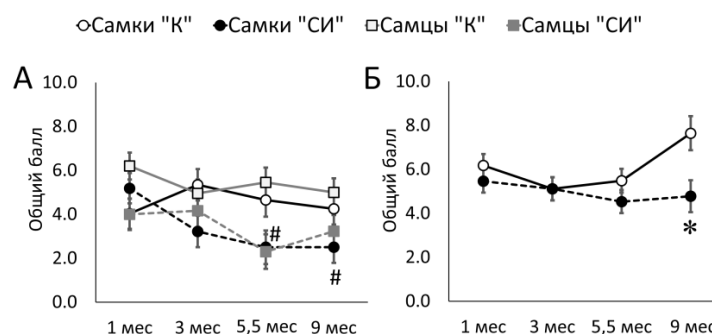


Рис. 10. Уровень тревожности крыс, оцененный методом комплексной оценки тревожно-фобических состояний. А – серия 1, Б – серия 2. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p<0,05$ по сравнению с крысами той же группы в возрасте 1 мес. (Н-К тест); * $p<0,05$ по сравнению с самками группы «Контроль» на том же сроке обследования (U-критерий Манна-Уитни).

3.5.3. Оценка тревожности в тесте «классическое Открытое Поле»

В серии 3 комплексную оценку тревожно-фобических состояний не проводили. Для дополнительной оценки уровня тревожности в этой серии анализировали время, проведенное в центре и в краевой зоне кОП, и латентный период захода в краевую зону. Эти показатели анализировали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и непараметрического дисперсионного анализа Kruskal-Wallis ANOVA с последующим множественным сравнением средних рангов (Таблица 3).

При внутригрупповом сравнении было выявлено, что в возрасте крыс 3 мес. как у самок группы «Контроль», так и у самок группы «Социальной изоляции» увеличивается время, проведенное в центре [$H(4, N=149)=24,750$

$p < 0,001$ и $H(4, N=141)=13,701$, $p=0,008$, соответственно], и снижается время, проведенное в краевой зоне [$H(4, N=149)=37,215$, $p < 0,001$ и $H(4, N=141)=42,389$, $p < 0,001$, соответственно]. В группе «Контроль» у самок в возрасте 5,5 и 8,5 мес. величины этих показателей сохранились на том же уровне и отличались от исходных значений, после чего возвращались к величинам в возрасте 1 мес. В группе «Социальная изоляция» время, проведенное в краевой зоне, в возрасте 5,5 мес. было таким же высоким, как в возрасте 1 мес., а на последующих двух сроках снова снизилось, и отличие от исходных значений были статистически значимыми. Изменений латентного периода захода в краевую зону в группе «Контроль» выявлено не было. В группе «Социальная изоляция» латентность захода в краевую зону в возрасте крыс 3 и 8,5 мес. была больше, чем в возрасте 1 мес. [$H(4, N=141)=27,814$, $p < 0,001$].

Таблица 3. – Показатели тревожности крыс в тесте «классическое Открытое

		Время, проведенное в центре ОП, с	Время, проведенное в краевой зоне ОП, с	Латентный период захода в краевую зону, с
Самки «К»	1 мес	0 (0,0)	291 (287,294)	6 (4,8)
	3 мес	0 (0,11) #	266 (247,275) #	10 (6,12)
	5,5 мес	0 (0,9) #	280 (261,289) #	8 (5,14)
	8,5 мес	0 (0,10) #	277 (244,287) #	9 (5,17)
	10,5 мес	0 (0,2)	285 (279,292)	6 (4,8)
Самки «СИ»	1 мес	0 (0,0)	292 (290,296)	4 (3,6)
	3 мес	0 (0,7) #	276 (259,286) #	10 (6,15) #
	5,5 мес	0 (0,4)	288 (279,295) *	5 (4,8) *
	8,5 мес	0 (0,7)	278 (263,285) #	9 (4,13) #
	10,5 мес	0 (0,5)	288 (264,292) #	5 (4,8)

Примечание – Данные представлены в виде Медианы с первым и третьим квартилями, * $p < 0,05$ по сравнению с самками группы «Контроль» на том же сроке обследования, # $p < 0,05$ по сравнению с самками той же группы в возрасте 1 мес.

Межгрупповые различия были выявлены только в возрасте крыс 5,5 мес. Самки группы «Социальная изоляция» быстрее заходили в краевую зону ($U=255$, $p=0,016$), и проводили в ней больше времени ($U=265$, $p=0,025$).

3.6. Депрессивно-подобное поведение

3.6.1. Тест «Принудительное Плавание»

Время активного и пассивного плавания в тесте ПП анализировали с помощью Repeated measures ANOVA в серии 1 и Two-Way ANOVA – в серии 2. Для последующего сравнения средних значений в группах применили тест Ньюмана-Кеулса. Время иммобильности и индекс депрессивности анализировали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

Фактор «Возраст» оказывал влияние на время активного и пассивного плавания в обеих сериях (серия 1: время активного плавания – $F_{(3,180)}=18,267$, $p<0,001$; время пассивного плавания – $F_{(3,180)}=13,018$, $p<0,001$; серия 2: $F_{(3,202)}=38,926$, $p<0,001$; $F_{(3,202)}=27,129$, $p<0,001$). С возрастом время активного плавания снижалось, а пассивного – увеличивалось (Таблица 4). В серии 1 отличия величин этих показателей от измеренных в возрасте крыс 1 мес. были статистически значимыми, начиная с возраста 5,5 мес., а в серии 2 – с возраста 3 мес. ($p<0,050$ для всех случаев).

В серии 1 анализ времени активного плавания выявил взаимодействие факторов «Возраст» × «Содержание» ($F_{(3,180)}=3,298$, $p=0,022$): у крыс группы «Контроль» время активного плавания в возрасте 5,5 и 9 мес. было меньше, чем в 1 мес., а у крыс группы «Социальная изоляция» снижение активного плавания было выявлено только в 9 мес. ($p<0,006$ для приведенных сравнений). Анализ времени пассивного плавания выявил взаимодействие факторов «Возраст» × «Содержание» ($F_{(3,180)}=6,616$, $p<0,001$) и «Пол» × «Возраст» ($F_{(3,180)}=3,436$, $p=0,018$). Увеличение времени пассивного плавания у крыс группы «Социальная изоляция» произошло позже (только в возрасте 9 мес., $p=0,018$), чем у крыс контрольной группы (отличие от величины, измеренной у животных в возрасте 1 мес. выявлено в возрасте 5,5 мес. и 9 мес., $p=0,031$ и $p=0,006$, соответственно). Кроме того, в возрасте крыс 5,5 мес. время пассивного плавания было статистически значимо меньше у крыс

группы «Социальная изоляция» по сравнению с животными контрольной группы ($p < 0,001$). У самок по сравнению с самцами увеличение времени пассивного плавания тоже происходило позже: отличие от возраста 1 мес. выявлено только на последнем сроке обследования ($p < 0,001$), в то время как у самцов увеличение пассивного плавания выявлено в 5,5 и 9 мес. ($p = 0,024$ и $p = 0,001$, соответственно). В возрасте крыс 5,5 мес. различия между самцами и самками были статистически значимыми ($p = 0,046$): время пассивного плавания было больше у самок. В серии 2 влияние фактора «Содержание» и взаимодействия факторов «Возраст» $\times$ «Содержание» не выявлено.

Таблица 4. – Показатели поведения в тесте «Принудительное плавание».

		Серия 1				Серия 2	
		Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»
Время акт. Плав.	1 мес.	142 $\pm$ 13	126 $\pm$ 11	148 $\pm$ 10	129 $\pm$ 12	153 $\pm$ 10	177 $\pm$ 10
	3 мес.	111 $\pm$ 21	121 $\pm$ 19	126 $\pm$ 17	169 $\pm$ 20	120 $\pm$ 10	117 $\pm$ 10
	5,5 мес.	98 $\pm$ 18	102 $\pm$ 16	74 $\pm$ 14	135 $\pm$ 16	83 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10
	9 мес.	75 $\pm$ 15	67 $\pm$ 14	70 $\pm$ 12	110 $\pm$ 14	53 $\pm$ 14	70 $\pm$ 13
Время пасс. Плав.	1 мес.	437 $\pm$ 12	470 $\pm$ 11	464 $\pm$ 11	446 $\pm$ 10	430 $\pm$ 13	406 $\pm$ 13
	3 мес.	485 $\pm$ 21	474 $\pm$ 19	424 $\pm$ 19	468 $\pm$ 17	450 $\pm$ 13	473 $\pm$ 13
	5,5 мес.	499 $\pm$ 25	423 $\pm$ 22	524 $\pm$ 20	463 $\pm$ 23	509 $\pm$ 13	517 $\pm$ 13
	9 мес.	520 $\pm$ 16	525 $\pm$ 14	489 $\pm$ 15	529 $\pm$ 13	539 $\pm$ 19	530 $\pm$ 17
Время иммоб.	1 мес.	6 (0; 22)	0 (0; 5)	3 (0; 12)	2 (0; 11)	3 (0; 9)	4 (0; 11)
	3 мес.	0 (0; 3)	0 (0; 3)	0 (0; 10)	4 (0; 13)	9 (3; 19)	0 (0; 6) *
	5,5 мес.	0 (0; 3)	0 (0; 7)	0 (0; 5)	0 (0; 1)	0 (0; 0)	0 (0; 2)
	9 мес.	0 (0; 3)	0 (0; 14)	0 (0; 3)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Индекс депресс.	1 мес.	0,4 (0,0; 0,8)	0,0 (0,0; 0,5)	0,2 (0,0; 0,6)	0,2 (0,0; 0,5)	0,2 (0,0; 0,7)	0,2 (0,0; 0,6)
	3 мес.	0,0 (0,0; 0,3)	0,0 (0,0; 0,4)	0,0 (0,0; 0,6)	0,2 (0,0; 1,0)	0,3 (0,1; 0,7)	0,0 (0,0; 0,4)
	5,5 мес.	0,0 (0,0; 0,1)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,2)	0,0 (0,0; 0,1)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,3)
	9 мес.	0,0 (0,0; 0,3)	0,0 (0,0; 0,8)	0,0 (0,0; 0,5)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)

Примечание – Данные представлены в виде $M \pm SEM$ для времени активного и пассивного плавания, для времени иммобильности и индекса депрессивности приведены медианы с первым и третьим квартилями. * $p < p_{кр}$ по сравнению с соответствующей контрольной группой крыс (U-критерий Манна-Уитни). Жирным шрифтом выделена пара значений, между которыми выявлено различие.

Анализ не выявил межгрупповых различий по индексу депрессивности, рассчитанному по результатам оценки поведения крыс данным тесте ни в серии 1, ни в серии 2 ($p > p_{кр}$ для всех сравнений). Однако, в серии 2 у самок группы «Социальная изоляция» в возрасте 3 мес. время иммобильности было меньше, чем у самок группы «Контроль» (Таблица 4).

3.6.2. Тест «Потребление/Предпочтение Сахарозы»

Показатели относительного потребления 10%С (на г массы тела животного) и предпочтения 10%-сах. анализировали с помощью Repeated measures ANOVA в сериях 1 и 2 (в серии 2 – для 30 крыс, у которых брали биологический материал в возрасте 10,5 мес.).

В серии 1 анализ выявил влияние фактора «Пол» на относительное потребление 10%С, усредненное для трех дней измерения ($F_{(1,55)}=49,101$, $p < 0,001$): величина этого показателя была больше у самок (**Рис. 11, А**).

В серии 2 анализ относительного потребления 10%С за 1 ч после питьевой и пищевой депривации в течение 24 ч выявил взаимодействие факторов «Возраст» $\times$ «Содержание» ($F_{(3,72)}=2,850$, $p=0,043$), но апостериорный анализ не выявил статистически значимых различий между группами ни на одном из сроков (Н-К тест: $p > 0,1$, тест LSD: $p > 0,06$ для всех сравнений). Относительное потребление 10%С за 3 ч и 24 ч после питьевой и пищевой депривации изменялось с возрастом (фактор «Возраст» – $F_{(3,72)}=3,526$, $p=0,019$ и $F_{(3,72)}=5,340$, $p=0,002$, соответственно). Величина этого показателя была наиболее высокой в возрасте крыс 1 мес., и статистически значимо отличалась от измеренной на последующих сроках (**Рис. 11, Б**). В двух сериях на предпочтение 10%С оказывал влияние только фактор «Возраст» (в серии 1 – $F_{(3,165)}=116,620$, $p < 0,001$; в серии за 1 ч – $F_{(3,72)}=22,230$, $p < 0,001$, за 3 ч – $F_{(3,72)}=14,893$, $p < 0,001$, за 24 ч – $F_{(3,72)}=15,630$, $p=0,001$) (**Рис. 11, В, Г**). Предпочтение 10%С было наименьшим в возрасте крыс 1 мес., и статистически значимо отличалось от измеренного на последующих сроках.

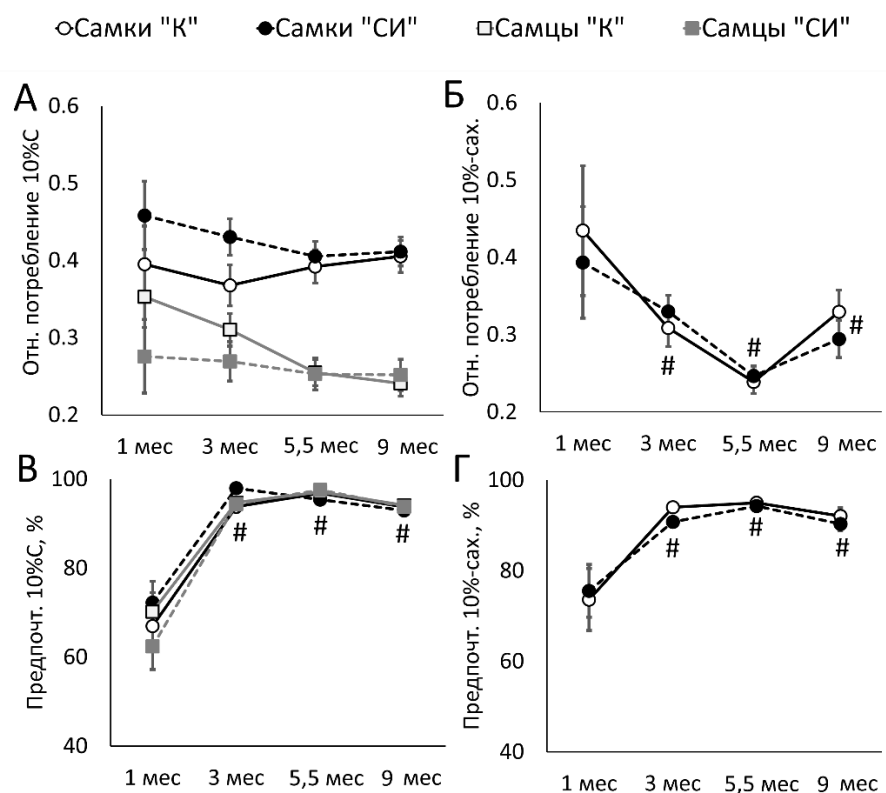


Рис. 11. Показатели поведения крыс в тесте «Потребление/Предпочтение сахарозы». А – серия 1, относительное потребление 10%С, усредненное за 3 дня; Б – серия 2, относительное потребление 10%С за 24 ч после пищевой и питьевой депривации; В – серия 1, предпочтение 10%С, усредненное за 3 дня; Г – серия 2, предпочтение 10%С за 24 ч после пищевой и питьевой депривации. По горизонтальной оси указан возраст крыс. # $p < 0,05$ по сравнению с крысами в возрасте 1 мес. (Н-К тест).

Результаты, приведенные в разделе 3.6., характеризующие тревожно-депрессивный профиль крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции, опубликованы в тезисах Ширеновой и соавт. (2020) и статье Ширеновой и соавт. (2022).

3.7. Социальное взаимодействие

3.7.1. Тест «Социальное взаимодействие»

Число и время агрессивных и неагрессивных социальных контактов в тесте «Социальное Взаимодействие» анализировали с помощью U-критерия

Манна-Уитни с последующей поправкой на множественность сравнений (FDR).

В возрасте крыс 1 мес. не было различий между группами в зависимости от условий содержания ни в серии 1, ни в серии 2 по показателям социального взаимодействия (Таблица 5).

Таблица 5. – Показатели поведения крыс в тесте «Социальное Взаимодействие».

		Серия 1				Серия 2	
		Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»
Число неагр. Контактов	1 мес.	32 (28; 37)	31 (28; 41)	30 (18; 40)	24 (16; 33)	25 (19; 32)	25 (16; 30)
	3 мес.	37 (31; 47)	54 * (51; 62)	41 (39; 47)	53 * (50; 55)	28 (21; 35)	56 * (38; 64)
	5,5 мес.	35 (32; 39)	47 * (45; 56)	34 (31; 40)	48 (37; 53)	27 (19; 32)	46 * (36; 49)
	9 мес.	34 (24; 41)	45 (42; 54)	24 (20; 30)	41 (24; 53)	24 (18; 29)	41 (26; 43)
Время неагр. Контактов	1 мес.	237 (211; 283)	232 (192; 328)	209 (134; 245)	154 (88; 252)	113 (74; 155)	126 (98; 160)
	3 мес.	191 (116; 243)	279 * (251; 389)	202 (170; 247)	332 * (302; 353)	104 (55; 185)	264 * (166; 324)
	5,5 мес.	181 (149; 193)	262 (191; 434)	172 (147; 192)	205 (176; 411)	84 (62; 131)	263 * (184; 278)
	9 мес.	130 (113; 168)	254 (181; 303)	120 (60; 136)	173 (93; 307)	140 (47; 167)	165 (123; 190)
Число агр. Контактов	1 мес.	23 (15; 29)	21 (0; 41)	3 (0; 4)	18 (0; 37)	2 (0; 5)	0 (0; 2)
	3 мес.	1 (0; 1)	15 * (7; 27)	7 (5; 13)	15 (7; 16)	0 (0; 0)	7 * (0; 26)
	5,5 мес.	0 (0; 0)	4 (0; 7)	0 (0; 0)	2 (0; 6)	0 (0; 0)	1 * (0; 3)
	9 мес.	3 (1; 5)	5 (4; 6)	0 (0; 1)	2 (0; 4)	0 (0; 0)	0 (0; 6)
Время агр. Контактов	1 мес.	92 (44; 112)	96 (0; 210)	5 (0; 21)	60 (0; 145)	5 (0; 27)	0 (0; 5)
	3 мес.	1 (0; 3)	41 * (18; 85)	26 (8; 37)	31 (16; 41)	0 (0; 0)	21 * (0; 12)
	5,5 мес.	0 (0; 0)	17 (0; 26)	0 (0; 0)	3 (0; 11)	0 (0; 0)	3 * (0; 13)
	9 мес.	10 (2; 32)	34 (8; 75)	0 (0; 1)	6 (0; 13)	0 (0; 0)	0 (0; 11)

Примечание – Данные представлены в виде Медианы с первым и третьим квартилями.
* $p < p_{кр}$ по сравнению с соответствующей по возрасту контрольной группой крыс того же пола (U-критерий Манна-Уитни). Жирным шрифтом выделены пары значений, между которыми выявлено различие.

Изолированное содержание в течение 2 мес. привело к увеличению числа и времени неагрессивных контактов как у самцов (серия 1 – $U=6,0$ и $U=5,0$, соответственно), так и у самок (серия 1 – $U=0,0$ и $U=4,0$, серия 2 – $U=6,5$ и $U=7,5$, соответственно). У самок группы «Социальная изоляция» число неагрессивных контактов было выше, чем у самок группы «Контроль» и на следующем сроке обследования, возрасте крыс 5,5 мес. в двух сериях (серия 1 – $U=3,5$, серия 2 – $U=17,0$). В серии 2 на этом сроке также было выявлено увеличение времени неагрессивных контактов ($U=5,5$). Увеличение числа и времени агрессивных контактов было выявлено только у самок в возрасте 3 мес. (серия 1 – $U=4,0$ и $U=4,0$; серия 2 – $U=22,5$ и $U=22,5$, соответственно). В серии 2 число и время агрессивных контактов оставалось повышенным у самок группы «Социальная изоляция» и на следующем сроке обследования ($U=55,5$ и $U=53,5$, соответственно). На последнем сроке обследования различий между группами не было выявлено ни в одной из серий. Половых различий в серии 1 не выявлено.

3.7.2. Трехкамерный Социальный Тест

Предпочтение социального объекта и предпочтение социальной новизны анализировали с помощью критерия Манна-Уитни в серии 2 и в серии 3.

В серии 2, в группе «Социальная изоляция» у крыс возрасте 9 мес. анализ выявил статистически значимое снижение предпочтения камеры с новым социальным объектом (незнакомой крысой) и снижение предпочтения нового социального объекта, измеренное на втором этапе эксперимента ($U=17$, $p=0,016$ и $U=22$, $p=0,047$, соответственно) (Таблица 6).

В серии 3, в возрасте крыс 3 мес. предпочтение социального объекта (крысы) по сравнению с несоциальным объектом (пустым цилиндром), измеренное на первом этапе эксперимента, было повышено у самок группы «Социальная изоляция» ($U=205$, $p=0,006$). Предпочтение камеры с

социальным объектом не достигло уровня статистической значимости ($U=258$, $p=0,066$). На втором этапе в этой серии, как и в серии 2, наблюдали снижение предпочтения нового социального объекта, но оно не было статистически значимым ($U=171$, $p=0,081$).

Таблица 6. – Социальное предпочтение и предпочтение социальной новизны в Трехкамерном Социальном тесте.

	Серия 2, возраст крыс 9 мес.		Серия 3, возраст крыс 3 мес.	
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»
Этап 1	56,3	38,0	23,0	45,9
Предпочтение камеры с социальным объектом (крыса), %	(-0,3; 70,2) (n = 11)	(-6,1; 62,5) (n = 12)	(-7,0; 38,9) (n = 28)	(17,7; 62,8) (n = 26)
Этап 1	59,2	38,3	45,3	73,1 *
Предпочтение социального объекта (крыса), %	(31,3; 68,8) (n = 11)	(0,9; 60,2) (n = 12)	(12,5; 67,1) (n = 28)	(55,1; 80,0) (n = 26)
Этап 2	24,5	31,0 *	28,7	12,0
Предпочтение камеры с новым социальным объектом (незнакомая крыса), %	(-14,2; 74,1) (n = 8)	(-59,0; -18,4) (n = 12)	(-15,0; 56,0) (n = 24)	(-23,7; 61,3) (n = 26)
Этап 2	54,9	-18,1 *	51,5	25,5
Предпочтение нового социального объекта (незнакомая крыса), %	(-11,7; 80,9) (n = 8)	(-37,9; 38,3) (n = 12)	(-16,7; 82,6) (n = 24)	(-17,5; 66,7) (n = 26)
Примечание – Данные представлены в виде Медианы с первым и третьим квартилями * $p<0,05$ по сравнению с соответствующей по возрасту контрольной группой (U-критерий Манна-Уитни)				

Результаты, представленные в разделе 3.7., опубликованы в статье Ширеновой и соавт. (2022).

3.8. Обучение и память

3.8.1. Тест «Водный Лабиринт Морриса»

Показатели обучения (дни 1-4) и памяти (тест 1 – через 24 ч после обучения, тест 2 – через 4 мес. после обучения, напоминание – через 24 ч после теста 2, и тест 3 – через 24 ч после напоминания) в тесте ВЛМ анализировали с помощью Two-Way ANOVA по факторам «Пол» и «Содержание» в серии 1, и One-Way ANOVA по фактору «Содержание» в серии 2. Апостериорный анализ проводили по тесту Ньюмана-Кеулса и LSD-

тесту Фишера. Для оценки выработки навыка попадания в целевой квадрант использовали одновыборочный t-тест Стьюдента (сравнение со случайным попаданием 25%).

Пройденный путь. В серии 1 анализ выявил влияние фактора «Пол» на длину пройденного пути в 1 и 3 день этапа обучения ($F_{(1,65)}=8,399$, $p=0,005$ и $F_{(1,650)}=14,157$, $p<0,001$, соответственно) (**Рис. 12, А**). В 1 день обучения длина пройденного пути была меньше у самок, а в третий – у самцов. Фактор «Содержание» не влиял на длину пройденного пути. В серии 2 различие между группами по этому показателю было выявлено на 4 день обучения ($F=3,245$, $p=0,049$), длина пройденного пути в группе «Социальная изоляция» была меньше (**Рис. 12, Б**).

Средняя скорость. В серии 1 в первый день обучения было выявлено влияние фактора «Пол» ($F_{(1,65)}=11,469$, $p=0,001$), фактора «Содержание» ($F_{(1,65)}=15,900$, $p<0,001$), и взаимодействие этих факторов ($F_{(1,65)}=32,241$, $p<0,001$): средняя скорость самок группы «Социальная изоляция» была ниже, чем в других группах крыс (**Рис. 12, В**). Кроме того, анализ выявил влияние фактора «Содержание» на этапе напоминания ($F_{(1,65)}=6,326$, $p=0,014$): средняя скорость крыс группы «Социальная изоляция» была снижена на этом этапе. В серии 2 в первый день обучения влияние фактора «Содержание» было близко к принятому уровню значимости ($F=4,126$, $p=0,052$), как и в серии 1, средняя скорость самок группы «Социальная изоляция» была ниже. Статистически значимых изменений этого показателя в серии 2 не выявлено (**Рис. 12, Г**).

Латентный период достижения приплатформенной зоны. В первый день обучения в серии 1 влияние фактора «Содержание» было статистически значимым ($F_{(1,65)}=10,925$, $p=0,002$): крысы группы «Социальная изоляция» позже достигали этой зоны. На этапе напоминания влияние фактора «Пол» достигло уровня статистической значимости ($F_{(1,65)}=6,881$, $p=0,011$): зоны платформы позже достигали самки.

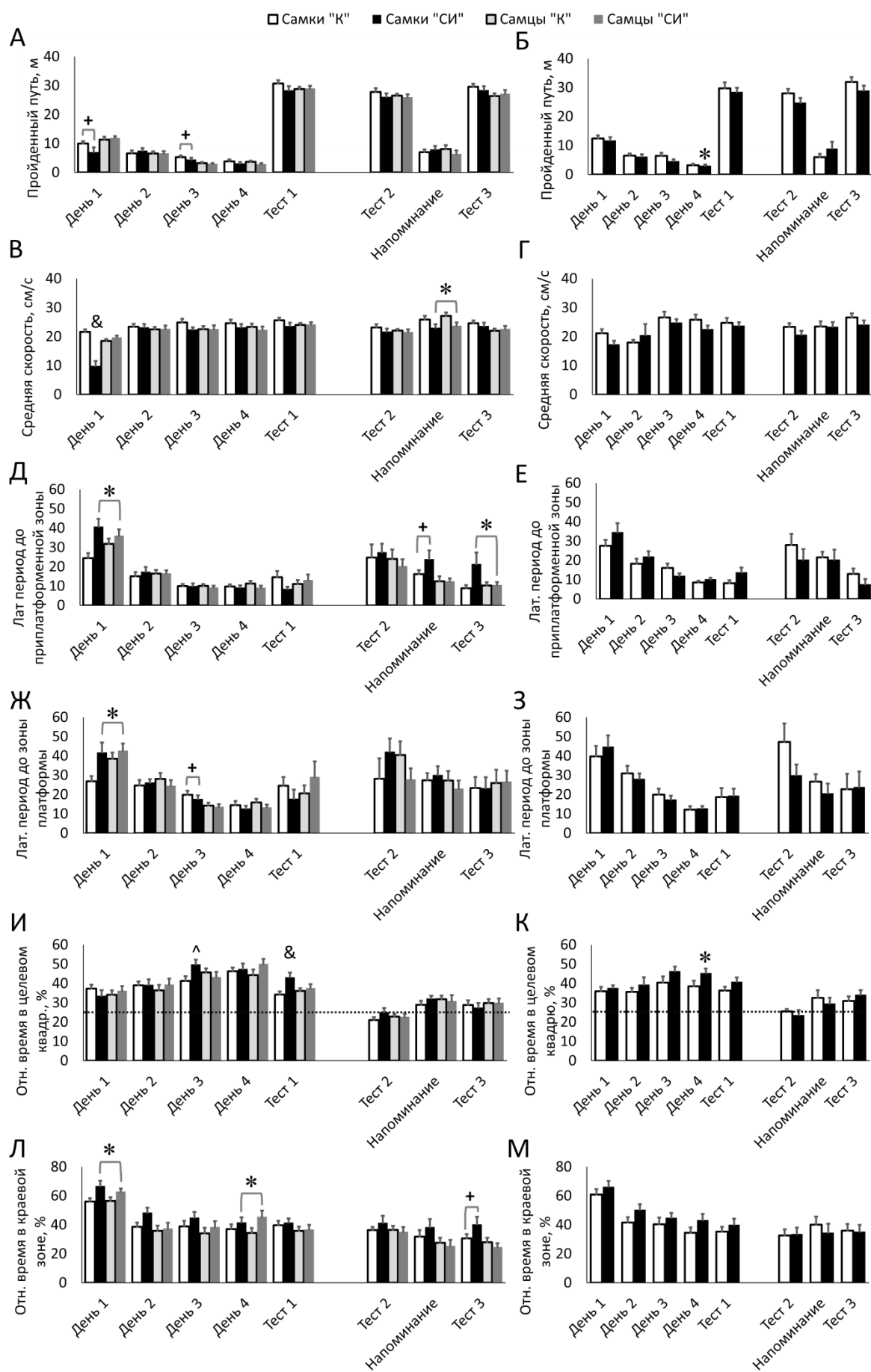


Рис. 12. Поведение крыс в тесте «Водный Лабиринт Морриса». А,В,Д,Ж,И,Л – серия 1; Б,Г,Е,З,К,М – серия 2. А,Б – длина пройденного пути, В,Г – средняя скорость, Д,Е – латентный период достижения приплатформенной зоны, Ж,З – латентный период достижения зоны платформы, И,К – относительное время, проведенное в целевом квадранте, пунктирная линия обозначает уровень случайного попадания в целевой квадрант – 25%, Л,М – 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), & $p < 0,05$ по сравнению со всеми другими группами, ^ $p = 0,015$ по сравнению с самками группы «Контроль» (LSD-тест).

В тесте 3 анализ выявил влияние фактора «Содержание» ($F_{(1,65)} = 4,335$, $p = 0,041$), и хотя взаимодействие факторов «Пол» × «Содержание» не достигло уровня статистической значимости ($F_{(1,65)} = 3,969$, $p = 0,051$), на рисунке видно, что увеличение латентного периода достижения этой зоны крысами группы «Социальная изоляция» в большей степени происходит из-за увеличения этого показателя именно у социально изолированных самок (Рис. 12, Д). В серии 2 на 4 день обучения влияние фактора «Содержание» были близко к принятому уровню статистической значимости ($F_{(1,65)} = 3,189$, $p = 0,052$). Величина этого показателя у самок группы «Социальная изоляция» была выше. Статистически значимых изменений в этой серии не выявлено (Рис. 12, Е).

Латентный период достижения зоны платформы. В 1 день обучения в серии 1 влияние фактора «Содержание» было статистически значимым ($F_{(1,65)} = 6,508$, $p = 0,013$). Крысы группы «Социальная изоляция» достигали платформы позже (Рис. 12, Ж). В 3 день обучения анализ выявил влияние фактора «Пол» ($F_{(1,65)} = 7,781$, $p = 0,007$): самки достигали платформы позже, чем самцы. В серии 2 различий между группами по этому показателю не выявлено (Рис. 12, З).

Относительное время, проведенное в целевом квадранте. На 3 день обучения в серии 1 анализ выявил взаимодействие факторов «Пол» × «Содержание» ($F_{(1,65)} = 5,210$, $p = 0,026$), самки группы «Социальная изоляция» проводили в целевом квадранте больше времени, чем самки группы

«Контроль» (Рис. 12, И). В тесте 1 анализ выявил влияние фактора «Содержание» и взаимодействие факторов «Пол» × «Содержание» ($F_{(1,65)}=4,148$, $p=0,006$ и $F_{(1,65)}=5,210$, $p=0,046$, соответственно). Самки группы «Социальная изоляция» проводили больше времени в целевом квадранте, чем крысы других групп. В серии 2 влияние фактора «Содержание» было статистически значимым на 4 день обучения ($F=6,023$, $p=0,005$): самки группы «Социальная изоляция» проводили в целевом квадранте больше времени.

В двух сериях проверка случайности нахождения крыс в каждом из квадрантов по показателю относительного времени, проведенного в квадранте в день тестирования (тест 1), в сравнении с 25% значением, характеризующим случайное нахождение в зоне, подтвердил выработку навыка нахождения целевого квадранта, в котором располагалась платформа, у крыс всех групп (серия 1 – самки группы «Контроль»: 34,3%, $t(17)=5,817$, $p<0,001$; самки группы «Социальная изоляция»: 43,3%, $t(16)=7,686$, $p<0,001$; самцы группы «Контроль»: 36,1%, $t(20)=7,701$, $p<0,001$; самцы группы «Социальная изоляция»: 37,6%, $t(16)=6,303$, $p<0,001$; серия 2 – самки группы «Контроль»: 36,4%, $t(14)=5,702$, $p<0,001$; самки группы «Социальная изоляция»: 41,0%, $t(16)=7,517$, $p<0,001$). Таким образом, крысы всех групп попадали в целевой квадрант не случайно. Через 4 мес. после обучения отличия этого показателя от величины, характеризующей случайное нахождение в целевом квадранте, не были статистически значимыми ни в серии 1, ни в серии 2. Однако при тестировании через 24 ч после напоминания (тест 3) в серии 1 относительное время, проведенное в целевом квадранте, превышало случайное значение у самцов независимо от условий содержания (самцы группы «Контроль»: 29,8%, $t(20)=2,223$, $p=0,038$; самцы группы «Социальная изоляция»: 30,1%, $t(16)=2,421$, $p=0,029$; самки группы «Контроль»: 28,9%, $t(17)=1,620$, $p=0,125$; самки группы «Социальная изоляция»: 27,5%, $t(16)=1,075$, $p=0,299$). В серии 2 относительное время, проведенное в целевом квадранте, в тесте 3 было больше случайного

значения у самок независимо от условий содержания (самки группы «Контроль»: 31,0% $t(14)=2,528$, $p=0,025$; самки группы «Социальная изоляция»: 34,2% $t(16)=3,924$, $p=0.002$).

Относительное время, проведенное в краевой зоне. Анализ выявил влияние фактора «Содержание» в 1 и 4 день обучения ($F_{(1,65)}=10,573$, $p=0,001$ и $F_{(1,65)}=4,807$, $p=0,032$) в серии 1 (**Рис. 12, К**). Крысы группы «Социальная изоляция» проводили больше относительного времени в краевой зоне. В тесте 3 статистической значимости достигло влияние фактора «Пол» ($F_{(1,65)}=6,569$, $p=0,013$), величина этого показателя была больше у самок, чем у самцов. В серии 2 не было выявлено изменений этого показателя.

Данные, приведенные в разделе 3.8.1. по серии 1, опубликованы в статье Krupina et al. (2020).

3.8.2. Условный рефлекс пассивного избегания

Выработку условного рефлекса пассивного избегания проводили в сериях 1 и 2. Для анализа результатов в серии 1 применили Repeated measures ANOVA: фактор «Пол», фактор «Содержание» и фактор повторных измерений «Этап эксперимента» [градации (4): Привыкание ($n=59$), Обучение ($n=59$), Тест 1 ($n=59$), Тест 2 ($n=59$)], в серии 2 – Two-Way ANOVA (фактор «Содержание» и фактор «Этап эксперимента» [градации (6): Привыкание ($n=59$), Обучение ($n=59$), Тест 1 ($n=59$), Тест 2 ($n=30$), Тест 3 ($n=30$), Тест 4 ($n=30$)]. В серии 2 на последнем сроке обследования число крыс было меньше, поскольку часть животных декапитировали в возрасте 5,5 мес. для взятия биологического материала. Для последующего сравнения средних значений в группах применили тест Ньюмана-Кеулса. Различия в доле крыс, не совершивших переход в темный отсек при тестировании, оценивали с помощью ТМФ, использовали двусторонний критерий. Показатели поведения при выработке и проверке сохранности УРПИ «число заглядываний» и «число неполных переходов» анализировали с помощью U-

критерия Манна-Уитни (в серии 1 – с поправкой на множественность сравнений по методу FDR-контроля).

В обеих сериях анализ выявил влияние фактора «Содержание» ($F_{(1,55)}=29,360$, $p<0,001$ – в серии 1; $F_{(1,255)}=7,154$, $p=0,007$ – в серии 2), влияние фактора «Этап эксперимента» ($F_{(3,55)}=16,963$, $p<0,001$ – в серии 1; $F_{(5,255)}=45,437$, $p<0,001$) и взаимодействие этих факторов ($F_{(3,55)}=12,527$, $p<0,001$ – в серии 1; $F_{(5,255)}=4,250$, $p<0,001$ – в серии 2). При тестировании через 24 ч после обучения (тест 1) крысы группы «Контроль» позже переходили в темный отсек камеры, чем на этапе обучения (**Рис. 13**, А, Б). В обеих сериях латентный период перехода в тесте 1 в группе «Социальная изоляция» после обучения не изменился. Различия между группами «Контроль» и «Социальная изоляция» на этом этапе были статистически значимыми в двух сериях. В серии 1 при тестировании через 7 дней после обучения у крыс группы «Контроль» УРПИ оставался выраженным, апостериорный анализ выявил статистически значимые различия при сравнении латентного периода перехода в тесте 2 с этапом обучения и с величиной этого показателя у крыс группы «Социальная изоляция» на том же этапе эксперимента. Различий между самцами и самками в этой серии выявлено не было.

В серии 2 сохранения высоких значений латентного периода перехода у самок группы «Контроль» через 7 дней после обучения не произошло. На этом этапе латентный период перехода в группе «Контроль» снизился до значений, зарегистрированных на этапе обучения. В тесте 4, после напоминания, у крыс группы «Контроль» латентный период перехода был выше, чем при обучении. Кроме того, только на этом этапе впервые было выявлено увеличение латентного периода перехода в группе «Социальная изоляция» по сравнению с величиной этого показателя у крыс на этапе обучения. Однако, различия между группами «Контроль» и «Социальная изоляция» оставались статистически значимыми, латентный период перехода у самок контрольной группы был еще больше.

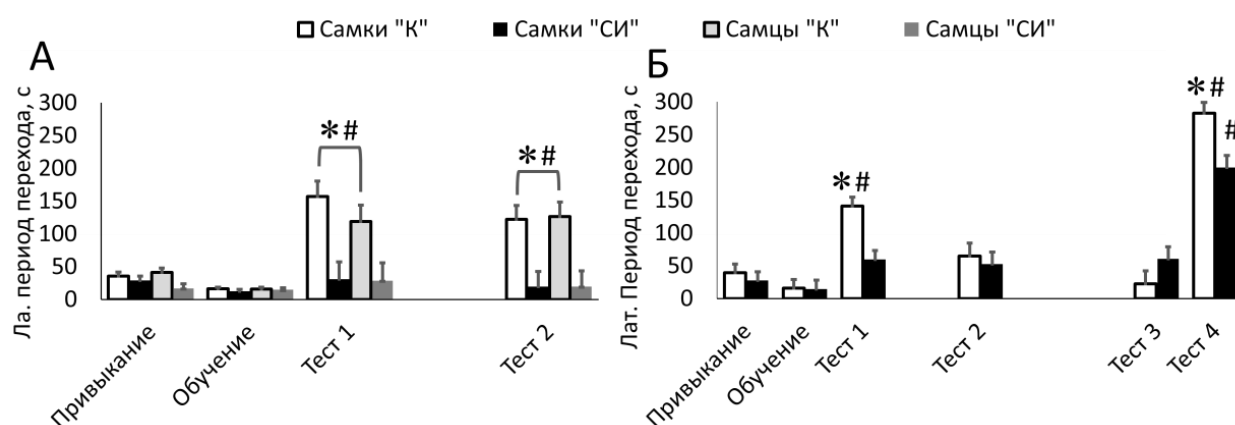


Рис. 13. Латентный период перехода в темный отсек камеры в тесте «Условный Рефлекс Пассивного Избегания». К – Контроль, СИ – Социальная изоляция, А – серия 1, Б – серия 2, Тест 1 – проверка выработки условного рефлекса через 24 ч после обучения, Тест 2 – проверка выработки условного рефлекса через 7 дней после обучения, Тест 3 – проверка выработки условного рефлекса через 3 мес. после обучения, Тест 4 – проверка выработки условного рефлекса через 24 ч после напоминания; * $p < 0,05$ 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 1 ТМФ показал, что доля крыс группы «Контроль», не совершивших переход в темный отсек камеры в тесте 1 была больше, чем у крыс группы «Социальная изоляция» (35,3% против 0%, $p = 0,021$ – для самок, и 33,3% против 0,0%, $p = 0,044$ – для самцов). В тесте 2 в этой серии различия по частоте встречаемости перехода в темный отсек камеры между группами не сохранились. В серии 2 доля самок, не совершивших переход, также была больше в группе «Контроль» по сравнению с группой «Социальная изоляция» только в тесте 1 (16,9% против 3,4%, $p = 0,021$).

В серии 1 при тестировании через 24 ч (тест 1) самки группы «Социальная изоляция» совершали меньше заглядываний в темный отсек, чем самки группы «Контроль» [0 (0; 0) против 2 (0; 5); $U = 56,5$, $p = 0,003$]. Баллы качества выработки УРПИ в группах не различались. В тесте 2 самки группы «Социальная изоляция» совершали меньше неполных переходов, чем самки группы «Контроль» [0 (0; 0) против 1 (0; 3); $U = 53,5$, $p = 0,008$]. В этом тесте качественные оценки выработки УРПИ были ниже у крыс в группах

«Социальная изоляция» по сравнению с контрольными животными, как у самок [соответственно, 1 (1; 2) против 2 (1; 3); $U=55,5$, $p=0,010$]; так и у самцов [1 (1; 1) против 1.5 (1; 5); $U=52,0$, $p=0,022$]. В серии 2 анализ не выявил различий по числу заглядываний и неполных переходов ни в одном тесте. Различия в качестве выработки УРПИ были статистически значимыми только при тестировании через 24 ч после обучения (тест 1) ($U=283$, $p=0.021$). У самок группы «Социальная изоляция» баллы качества выработки УРПИ были ниже [1 (1; 2) против 2 (1; 3)]. В тесте 4 различия между группами не достигли принятого уровня статистической значимости, но были близки к нему [3 (1; 3) против 4 (3; 5), $U=68$, $p=0,064$].

Результаты опубликованы в статье Krupina et al. (2020) и в тезисах Ширеновой (2021).

3.8.3. Условный рефлекс активного избегания

Для анализа числа реакций избавления, реакций избегания и числа попыток, которое совершила крыса до достижения критерия научения (6 реакций избегания подряд), применили One-Way ANOVA. Частоту встречаемости достижения критерия научения в группе оценивали с помощью точного метода Фишера (применили односторонний критерий).

На этапе обучения влияние фактора «Содержание» на число реакций избавления и реакций избегания было статистически значимым ($F=6,346$, $p=0,015$ и $F=7,356$, $p=0,009$, соответственно): самки группы «Социальная изоляция» совершали больше реакций избавления и меньше реакций избегания (**Рис. 14**). Однако ни при тестировании через 24 ч, ни при тестировании через 2 мес., различий между группами выявлено не было. Различия в частоте встречаемости достижения критерия научения в группах были близки к принятому уровню значимости ($p=0,059$). В группе «Контроль» критерия научения достигли 73,3% крыс, а в группе «Социальная изоляция» – только 46,4%. При этом, у крыс, которые достигли

критерия научения, число попыток, совершенных до достижения критерия, не зависело от условий содержания животных (среднее число попыток до достижения критерия в группе «Контроль» – $50,4 \pm 4,67$, в группе «Социальная изоляция» – $63,0 \pm 5,9$).

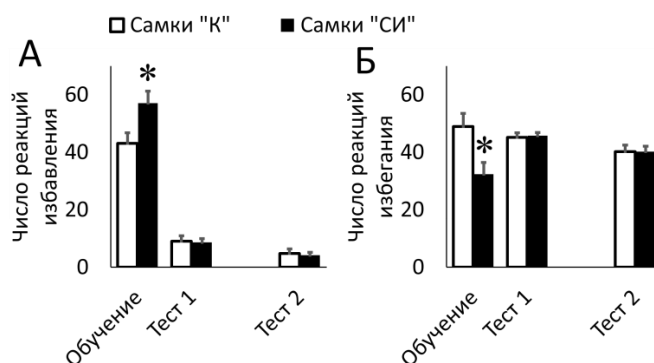


Рис. 14. Поведение крыс в тесте «Условный Рефлекс Активного Избегания». А – число реакций избегания, Б – число реакций избегания, * $p < 0,05$ по сравнению с самками группы «Контроль».

3.9. Вес органов-маркеров стресса и уровень кортикостерона в крови

Относительный вес органов-маркеров стресса анализировали с помощью Two-Way ANOVA в сериях 1 и 2. В серии 1 – фактор «Пол» и фактор «Содержание», в серии 2 – фактор «Содержание» и фактор «Стрессирование» на двух сроках измерения. В серии 3 анализ проводили с помощью One-Way ANOVA. Апостериорный анализ проводили по тесту Ньюмана-Кеулса.

Различий в относительном весе тимуса не было обнаружено ни в одной из серий. 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 «Социальная изоляция» по сравнению с крысами группы «Контроль» (Таблица 7).

Таблица 7. – Вес органов-маркеров стресса (мг / г веса) и уровень кортикостерона в крови.

Серия 1: возраст крыс 10 мес				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»
Тимус	0,92±0,05	0,77±0,05	0,75±0,05	0,75±0,05
Селезенка	3,51±0,19 +	2,90±0,19 *	2,84±0,17	2,37±0,20
Надпочечники	0,20±0,01 +	0,24±0,01*+	0,11±0,01	0,10±0,01
Кортикостерон	34,48±3,56+	40,58±5,13 +	17,92±2,89	17,71±2,31

Серия 2: возраст крыс 6 мес				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К» + стресс	Самки «СИ» + стресс
Тимус	0,79±0,09	0,99±0,10	1,00±0,09	0,97±0,10
Селезенка	2,83±0,14	3,09±0,15	3,02±0,14	2,67±0,15*
Надпочечники	0,18±0,01	0,15±0,01		
Кортикостерон	28,99±5,77	40,77±6,17	72,09±5,77#	81,45±6,17#

Серия 2: возраст крыс 10 мес				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К» + стресс	Самки «СИ» + стресс
Тимус	1,00±0,08	0,85±0,07	0,91±0,08	0,91±0,07
Селезенка	2,77±0,19	3,16±0,18	2,80±0,19	2,62±0,18
Надпочечники	0,12±0,01	0,15±0,01*	0,14±0,01	0,14±0,01

Серия 3: возраст крыс 11 мес		
	Самки «К»	Самки «СИ»
Тимус	0,64±0,03	0,72±0,22
Селезенка	2,19±0,10	2,18±0,07
Надпочечники	0,11±0,03	0,13±0,02*

Примечание – Данные приведены в виде M±SEM. В серии 2 данные о весе надпочечников у крыс, которых подвергли дополнительному иммобилизационному стрессу, были утрачены по техническим причинам. *p<0,05 по сравнению с контрольной группой крыс того же пола, +p<0,05 по сравнению с самцами той же группы, #p<0,05 по сравнению с самками той же группы, которых не подвергали дополнительному иммобилизационному стрессу (Н-К тест).

В серии 2 анализ выявил взаимодействие факторов «Содержание» и «Стрессирование» ($F_{(1,26)}=4,336$, $p=0,047$) в возрасте крыс 6 мес. У самок группы «Социальная изоляция» дополнительное стрессирование приводило к снижению относительного веса селезенки. В серии 3 различий между группами по относительному весу этого органа не выявлено.

Изменения относительного веса надпочечников были выявлены во всех сериях. В серии 1 оба фактора влияли на величину этого показателя (фактор

«Пол» – $F_{(1,64)}=294,042$, $p<0,001$; фактор «Содержание» – $F_{(1,64)}=7,105$, $p=0,009$) и взаимодействовали ($F_{(1,64)}=9,370$, $p=0,003$): величина этого показателя была выше у самок по сравнению с самцами, и у самок группы «Социальная изоляция» – больше, чем у самок группы «Контроль». В серии 2 было выявлено взаимодействие факторов «Содержание» и «Стрессирование» ($F_{(1,64)}=10,208$, $p=0,002$) в возрасте крыс 10 мес. Относительный вес надпочечников у самок группы «Социальная изоляция», не подвергавшихся дополнительному иммобилизационному стрессу, был повышен по сравнению с соответствующей контрольной группой. В серии 3 относительный вес надпочечников у самок группы «Социальная изоляция» также был повышен ($F=6,770$, $p=0,012$).

В серии 1 на уровень кортикостерона в крови оказывал влияние только фактор «Пол» ($F_{(1,36)}=25,565$, $p<0,001$): величина этого показателя была выше у самок по сравнению с самцами. В серии 2 на этот показатель влиял только фактор «Стрессирование» ($F_{(1,26)}=49,154$, $p<0,001$): дополнительный иммобилизационный стресс привел к повышению уровня кортикостерона у самок вне зависимости от условий содержания.

Данные серии 1, представленные в разделе 3.9., опубликованы в статье Krupina et al. (2020).

3.10. Экспрессия белков в структурах мозга крыс

Для анализа результатов иммуноблоттинга применили непараметрический критерий Манна-Уитни.

Бета-актин. Статистически значимых различий в уровне экспрессии β -акт в исследованных структурах головного мозга крыс не было выявлено ни в серии 1, ни в серии 2.

Интерлейкин-1 β . В серии 1 уровень экспрессии IL-1 β был снижен у самок группы «Социальная изоляция», по сравнению с самками группы «Контроль» в гиппокампе ($U=1$, $p=0,016$) (Таблица 8). В серии 2 в возрасте

крыс 6 мес. различия были выявлены только во фронтальной коре: экспрессия IL-1 β была ниже у самок группы «Социальная изоляция» ($U=7$, $p=0,026$). В возрасте крыс 10 мес. у самок группы «Социальная изоляция» экспрессия IL-1 β была повышена в гиппокампе ($U=5$, $p=0,011$) и понижена в стриатуме ($U=5$, $p=0,022$).

Интерлейкин-6. В серии 1 различия между группами были выявлены только в гиппокампе: у самок группы «Социальная изоляция» экспрессия IL-6 была ниже ($U=0$, $p=0,008$). В серии 2 у самок опытной группы в возрасте 6 мес. экспрессия этого белка в гиппокампе тоже была снижена ($U=6$, $p=0,017$). В стриатуме снижение экспрессии IL-6 было выявлено у самок группы «Социальная изоляция» как в возрасте 6 мес. ($U=4$, $p=0,011$), так и в возрасте 10 мес. ($U=4$, $p=0,014$).

Глюкокортикоидные рецепторы. В серии 1 анализ выявил статистически значимые различия в изменении экспрессии GR только между группами самцов: во фронтальной коре у самцов группы «Социальная изоляция» экспрессия рецепторов была повышена ($U=1,5$, $p=0,016$), а в гиппокампе – понижена ($U=2$, $p=0,032$). В серии 2 экспрессия GR во фронтальной коре самок группы «Социальная изоляция» была выше, чем у контрольных животных как в возрасте 6 мес. ($U=7$, $p=0,026$), так и в возрасте 10 мес. ($U=3$, $p=0,008$).

Дипептидилпептидаза IV. В серии 1 анализ выявил повышение экспрессии DPP4 в гиппокампе самок, подвергнутых социальной изоляции, по сравнению с самками группы «Контроль» ($U=2$, $p=0,032$). В серии 2 повышенное содержание DPP4 было выявлено у самок группы «Социальная изоляция» в гиппокампе ($U=4$, $p=0,007$) и пониженное – в стриатуме ($U=6$, $p=0,017$) в возрасте крыс 6 мес., во фронтальной коре в возрасте крыс 10 мес. экспрессия DPP4 была повышена ($U=3$, $p=0,008$).

Таблица 8. – Экспрессия белков во фронтальной коре, гиппокампе и стриатуме крыс. Данные представлены в относительных денситометрических единицах.

	Серия 1: Фронтальная кора				Серия 2: Фронтальная кора			
	Самки «К» 10 мес (n=5)	Самки «СИ» 10 мес (n=5)	Самцы «К» 10 мес (n=5)	Самцы «СИ» 10 мес (n=5)	Самки «К» 6 мес (n=7)	Самки «СИ» 6 мес (n=7)	Самки «К» 10 мес (n=6)	Самки «СИ» 10 мес (n=7)
β -act	685 (501, 744)	622 (592, 683)	577 (574, 595)	533 (530, 571)	298 (237, 427)	210 (187, 346)	314 (265, 399)	239 (234, 321)
IL-1 β	996 (995, 1433)	956 (837, 999)	896 (845, 981)	737 (673, 1672)	813 (743, 1507)	408 * (323, 771)	1995 (1866, 2630)	2685 (1789, 3966)
IL-6	195 (185, 293)	171 (168, 178)	245 (220, 245)	200 (185, 348)	1938 (1567, 2198)	2139 (1518, 2607)	1442 (1125, 1719)	1220 (890, 1926)
GR	109 (109, 120)	106 (101, 158)	120 (112, 123)	136 * (136, 138)	299 (274, 350)	426 * (360, 516)	468 (409, 569)	694 * (652, 744)
DPP4	711 (469, 722)	628 (615, 757)	740 (668, 771)	757 (646, 811)	387 (335, 471)	470 (397, 510)	480 (460, 493)	568 * (509, 592)
PREP	3549 (3206, 3723)	3208 (3023, 3419)	2273 (2189, 2406)	2367 (2360, 2449)	5068 (2000, 7282)	2449 (1529, 3314)	5868 (2535, 9384)	3269 (1544, 6783)
proBDNF	3135 (3021, 3149)	2514 * 2409, 2748)	2281 (2167, 2476)	1879 (1862, 2923)	516 (441, 668)	546 (470, 721)	1214 (1046, 1644)	1496 (1088, 5528)
SYP	8704 (8609, 8762)	8655 (7903, 8639)	7920 (7698, 7968)	7410 (6729, 7565)	2986 (2626, 4065)	5228 (4640, 6153)	5337 (3498, 9173)	3774 (2970, 8594)

Серия 1: Гиппокамп					Серия 2: Гиппокамп			
	Самки «К» 10 мес (n=5)	Самки «СИ» 10 мес (n=5)	Самцы «К» 10 мес (n=5)	Самцы «СИ» 10 мес (n=5)	Самки «К» 6 мес (n=7)	Самки «СИ» 6 мес (n=7)	Самки «К» 10 мес (n=7)	Самки «СИ» 10 мес (n=7)
β-act	271 (267, 301)	356 (285, 410)	529 (496, 547)	393 (347, 427)	570 (515, 835)	780 (552, 2009)	2352 (1960, 3831)	6943 (2839, 11334)
IL-1β	2356 (2311, 2437)	1564 * (1343, 1674)	1198 (1157, 1437)	1149 (994, 1595)	3878 (3790, 5100)	5297 (4156, 5907)	4631 (4256, 5630)	6503 * (5747, 12642)
IL-6	2996 (2403, 3774)	1481 * (973, 1493)	981 (973, 1493)	954 (942, 2635)	630 (288, 520)	259 * (250, 301)	429 (344, 1103)	575 (309, 1715)
GR	726 (680, 915)	585 (573, 586)	783 (732, 818)	535 * (512, 576)	616 (412, 1107)	1106 (568, 1540)	883 (650, 1423)	834 (626, 1418)
DPP4	1192 (1138, 1317)	1702 * (1596, 1710)	1545 (1344, 1662)	1441 (1421, 1458)	299 (293, 344)	357 * (346, 372)	232 (212, 318)	284 (229, 309)
PREP	1932 (1870, 2036)	1838 (1605, 2085)	1356 (1323, 1509)	1498 (1385, 1508)	351 (306, 456)	484 * (424, 671)	278 (259, 309)	609 * (496, 1156)
proBDNF	264 (262, 280)	251 (249, 260)	235 (230, 253)	239 (231, 242)	445 (356, 673)	283 * (261, 388)	1721 (1150, 3558)	1101 (815, 3336)
SYP	7731 (7519, 10983)	7171 (6867, 7335)	9120 (8851, 9303)	9849 (9457, 10172)	7716 (6251, 9992)	9743 (7265, 10269)	6191 (3225, 7045)	10635 * (9127, 12506)

Серия 1: Стриатум					Серия 2: Стриатум			
	Самки «К» 10 мес (n=4)	Самки «СИ» 10 мес (n=4)	Самцы «К» 10 мес (n=4)	Самцы «СИ» 10 мес (n=4)	Самки «К» 6 мес (n=7)	Самки «СИ» 6 мес (n=7)	Самки «К» 10 мес (n=6)	Самки «СИ» 10 мес (n=7)
β -act	14841 (13496, 16202)	11998 (11496, 13315)	16631 (15192, 17417)	13517 (13186, 14269)	719 (630, 941)	965 (717, 1437)	767 (700, 864)	860 (721, 940)
IL-1 β	356 (290, 484)	305 (268, 336)	544 (350, 634)	604 (227, 1244)	3349 (1478, 4737)	1615 (1356, 2521)	5800 (5691, 7326)	4545 * (3144, 4867)
IL-6	602 (531, 829)	891 (868, 1927)	1119 (848, 1207)	1211 (528, 2222)	1373 (1017, 4561)	478 * (418, 511)	7869 (7197, 11784)	3741 * (1546, 5359)
GR	215 (199, 232)	197 (188, 204)	204 (191, 211)	183 (160, 202)	594 (504, 707)	600 (517, 617)	710 (604, 741)	756 (643, 1068)
DPP4	2536 (2245, 2594)	2073 (1907, 2276)	3241 (2803, 3529)	3194 (2554, 3356)	762 (682, 881)	460 * (275, 666)	716 (663, 756)	655 (635, 667)
PREP	862 (740,1058)	669 (568,728)	724 (689, 764)	499 * (468, 541)	8498 (7485, 9754)	4933 * (4174, 5600)	4452 (3803, 4823)	5733 * (5126, 7380)
proBDNF	185 (180, 228)	193 (168, 234)	233 (212, 262)	210 (184, 307)	3595 (1699, 4479)	1758 (1647, 2145)	6847 (5893, 8308)	4747 * (4201, 6388)
SYP	3634 (3451, 3887)	3706 (3593, 3800)	4218 (3936, 4443)	4060 (3921, 4124)	729 (634, 761)	647 (632, 789)	374 (306, 620)	659 (433, 729)

Примечание – Данные представлены в виде Медианы с первым и третьим квартилями *p<0,05 по сравнению с соответствующей по возрасту контрольной группой (U-критерий Манна-Уитни). Жирным шрифтом выделены пары значений, между которыми выявлено различие.

Пролилэндопептидаза. В серии 1 статистически значимые различия в экспрессии PREP были выявлены между группами самцов: в стриатуме самцов группы «Социальная изоляция» содержание этого фермента было снижено ($U=0$, $p=0,029$). В серии 2 у самок группы «Социальная изоляция» было выявлено повышение экспрессии PREP в гиппокампе в возрасте крыс 6 мес. ($U=6$, $p=0,017$) и 10 мес. ($U=1$, $p=0,001$) по сравнению с самками контрольной группы. В стриатуме направление изменений экспрессии PREP зависело от возраста животных: в возрасте крыс 6 мес. у самок группы «Социальная изоляция» величина этого показателя была статистически значимо ниже, чем у самок контрольной группы ($U=4$, $p=0,007$), а в возрасте крыс 10 мес. – выше ($U=4$, $p=0,014$).

Предшественник нейротрофического фактора мозга. В серии 1 было выявлено снижение содержания proBDNF во фронтальной коре самок группы «Социальная изоляция» по сравнению с самками контрольной группы ($U=2$, $p=0,032$). В серии 2 в возрасте крыс 6 мес. снижение экспрессии этого белка у самок группы «Социальная изоляция» было выявлено в гиппокампе ($U=5$, $p=0,011$), а в возрасте крыс 10 мес. – в стриатуме ($U=6$, $p=0,035$).

Синаптофизин. Различий в уровне экспрессии SYP между группами в серии 1 выявлено не было. В серии 2 в возрасте крыс 10 мес. анализ выявил повышенное содержание этого белка в гиппокампе самок группы «Социальная изоляция» по сравнению с самками контрольной группы соответствующего возраста ($U=4$, $p=0,007$).

Данные об изменении экспрессии SYP, proBDNF и PREP у самцов и самок крыс (серия 1), представленные в разделе 3.10., опубликованы в статье Ширеновой и соавт. (2021) и в тезисах Shirenova et al. (2021), Ширенова и соавт. (2022).

3.11. Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга

Для анализа содержания моноаминов применили Two-Way ANOVA (факторы «Пол» и «Содержание»).

Норадреналин. Во фронтальной коре и в гипоталамусе анализ выявил только влияние фактора «Пол»: у самцов уровень НА был выше, чем у самок в обеих структурах (Таблица 9). В гиппокампе влияние факторов «Пол» и «Содержание» достигло уровня статистической значимости. Взаимодействие этих факторов было близко к принятому уровню значимости. Уровень НА в гиппокампе был ниже у самок, чем у самцов, и у крыс группы «Социальная изоляция» - ниже, чем у крыс группы «Контроль». Апостериорный анализ показал, что различия между группами «Социальная изоляция» и «Контроль» были статистически значимыми только у самок (Н-К тест). В стриатуме на уровень НА оказывал влияние только фактор «Содержание»: у крыс группы «Социальная изоляция» величина этого показателя была выше, чем у контрольных животных.

Дофамин. Различия в уровне DA были выявлены только во фронтальной коре и в гипоталамусе. В этих структурах влияние фактора «Содержание» было статистически значимым: уровень DA был выше у крыс группы «Социальная изоляция». *Диоксифенилуксусная кислота.* Изменение содержания DOPAC было выявлено только в гиппокампе. В этой структуре влияние фактора «Содержание» было статистически значимым: у крыс группы «Социальная изоляция» содержание этого метаболита было снижено.

Гомованилиновая кислота. Только в гиппокампе анализ выявил влияние фактора «Содержание»: содержание ГВК в гиппокампе было ниже у крыс группы «Социальная изоляция». Влияния фактора «Пол» не выявлено.

3-метокситирамин. Во фронтальной коре анализ выявил влияние фактора «Содержание» на уровень 3-МТ: величина этого показателя была выше у крыс группы «Социальная изоляция». В гипоталамусе взаимодействие факторов «Пол» × «Содержание» достигло уровня

статистической значимости: в группе «Социальная изоляция» были выявлены половые различия, содержание 3-МТ было выше у самок этой группы. В стриатуме уровня статистической значимости достигло влияние фактора «Пол»: у самцов содержание 3-МТ в этой структуре было выше.

Таблица 9. – Уровень моноаминов и их метаболитов во фронтальной коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе крыс, которых содержали в условиях длительной социальной изоляции (СИ), в сравнении с контрольными крысами, которых содержали в группах (К).

Фронтальная кора				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»
NA	2,18±0,10	2,35±0,10	2,54±0,10	2,39±0,10
	Ф. «Пол»: $F_{(1,36)}=4,458$, $p=0,042$			
DA	0,26±0,13	0,71±0,13	0,28±0,13	0,42±0,13
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=5,185$, $p=0,029$			
DOPAC	0,16±0,05	0,29±0,05	0,22±0,05	0,20±0,05
HVA	0,09±0,05	0,13±0,05	0,10±0,05	0,18±0,05
3-МТ	0,03±0,05	0,26±0,05	0,05±0,05	0,12±0,05
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=10,464$, $p=0,003$			
DOPAC/DA	0,71±0,14	0,64±0,14	0,82±0,14	0,64±0,14
3МТ/DA	0,15±0,21	0,83±0,21	0,17±0,21	0,34±0,21
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=4,230$, $p=0,047$			
HVA/DA	0,37±0,09	0,38±0,09	0,38±0,09	0,38±0,09
5-НТ	3,64±0,39	5,77±0,39	3,68±0,39	5,22±0,39
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=22,466$, $p<0,001$			
5-HIAA	1,93±0,26	1,87±0,26	3,16±0,26	2,65±0,26
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=14,686$, $p<0,001$			
5-HIAA/5-НТ	0,54±0,03	0,554±0,03	0,51±0,03	0,52±0,03
Гиппокамп				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»
NA	3,02±0,19	2,20±0,19 *	3,08±0,19	3,05±0,20
	Ф, «Пол»: $F_{(1,36)}=4,678$, $p=0,037$; Ф, «Содержание»: $F_{(1,36)}=5,264$, $p=0,028$; Взаим, «Пол» × «Содержание»: $F_{(1,36)}=4,005$, $p=0,053$			
DA	2,19±0,34	1,55±0,34	2,69±0,34	2,29±0,36
DOPAC	0,12±0,03	0,05±0,03	0,15±0,03	0,04±0,03
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=9,137$, $p=0,005$			
HVA	0,05±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=8,086$, $p=0,007$			
3-МТ	0,06±0,04	0,04±0,04	0,06±0,04	0,15±0,04
DOPAC/DA	0,06±0,09	0,28±0,09	0,13±0,09	0,15±0,10
3МТ/DA	0,03±0,03	0,14±0,03	0,04±0,03	0,09±0,03
	Ф. «Содержание»: $F_{(1,36)}=6,705$, $p=0,014$			
HVA/DA	0,02±0,06	0,021±0,06	0,07±0,06	0,07±0,06
5-НТ	1,95±0,12	1,81±0,12	1,85±0,12	1,71±0,13
5-HIAA	1,20±0,11	2,10±0,11	2,25±0,11	2,28±0,12
5-HIAA/5-НТ	1,17±0,06	1,18±0,06	1,23±0,06	1,34±0,07

Стриатум				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»
NA	0,55±0,11	0,78±0,11	0,68±0,11	0,90±0,11
	Ф. «Содержание»: F _(1,36) =4,254, p=0,047			
DA	48,46±4,24	53,20±4,02	56,29±4,02	57,05±4,02
DOPAC	4,24±0,39	4,48±0,37	4,51±0,37	5,01±0,37
HVA	2,82±0,32	3,01±0,31	2,93±0,31	3,09±0,31
3-MT	1,42±0,16	1,27±0,15	1,56±0,15	1,99±0,15
	Ф. «Пол»: F _(1,36) =8,032, p=0,008			
DOPAC/DA	0,09±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,09±0,00
3MT/DA	0,03±0,05	0,02±0,05	0,03±0,05	0,13±0,05
HVA/DA	0,06±0,00	0,06±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00
5-HT	2,13±0,27	2,99±0,26	2,77±0,26	3,47±0,26
	Ф. «Содержание»: F _(1,36) =8,914, p=0,005			
	Ф. «Пол»: F _(1,36) =4,561, p=0,040			
5-HIAA	5,01±0,58	5,92±0,55	6,21±0,55	6,58±0,55
5-HIAA/5-HT	2,60±0,16	2,00±0,15	2,27±0,15	1,92±0,15
	Ф, «Содержание»: F _(1,36) =9,298, p=0,004			
Гипоталамус				
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самцы «К»	Самцы «СИ»
NA	16,82±0,69	17,97±0,66	19,22±0,66	18,90±0,66
	Ф «Пол»: F _(1,36) =6,197, p=0,018			
DA	4,75±0,50	6,57±0,48	5,50±0,48	6,44±0,48
	Ф, «Содержание»: F _(1,36) =8.123, p=0,007			
DOPAC	1,08±0,13	1,05±0,12	0,97±0,12	1,11±0,12
HVA	0,35±0,10	0,44±0,09	0,52±0,09	0,46±0,09
3-MT	0,27±0,07	0,45±0,07 +	0,35±0,07	0,24±0,07
	Взаим, «Пол» × «Содержание»: F _(1,36) =4,429, p=0,043			
DOPAC/DA	0,22±0,03	0,18±0,02	0,19±0,02	0,17±0,02
3MT/DA	0,06±0,01	0,07±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01
HVA/DA	0,08±0,02	0,07±0,02	0,09±0,02	0,07±0,02
5-HT	10,19±0,51	11,78±0,48	10,99±0,48	11,31±0,48
	Ф, «Содержание»: F _(1,36) =3,851, p=0,058			
5-HIAA	7,02±0,36	8,06±0,34	7,62±0,34	7,63±0,34
5-HIAA/5-HT	0,69±0,03	0,69±0,03	0,70±0,03	0,68±0,03

Примечание – Данные приведены в виде $M \pm SEM$. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой крыс того же пола, # $p < 0,05$ по сравнению с самцами той же группы (Н-К тест). + $p = 0,039$ по сравнению с самками контрольной группы (LSD-тест). Жирным шрифтом выделены пары значений, между которыми выявлено различие.

Соотношение дофамина и его метаболитов. Изменения были выявлены только в отношении 3-MT/DA во фронтальной коре и гиппокампе. В обеих структурах на величину этого соотношения оказывал влияние фактор «Содержание»: отношение 3-MT/DA было больше у крыс группы «Социальная изоляция».

Серотонин. Во фронтальной коре было выявлено влияние фактора «Содержание»: у крыс группы «Социальная изоляция» содержание 5-НТ в этой структуре было выше. В стриатуме выявлено влияние факторов «Содержание» и «Пол»: содержание 5-НТ было выше у крыс группы «Социальная изоляция» и у самцов по сравнению с самками. В гипоталамусе влияние фактора «Содержание» было близко к принятому уровню значимости. Средние значения уровня 5-НТ в этой структуре были выше у крыс группы «Социальная изоляция». В гиппокампе и стриатуме изменений экспрессии этого нейромедиатора не выявлено.

5-оксииндолуксусная кислота. Изменения содержания 5-НІАА были выявлены только во фронтальной коре: на величину этого показателя оказывал влияние фактор «Содержание». У крыс группы «Социальная изоляция» содержание 5-НІАА было повышено по сравнению с контрольными животными.

Соотношение серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты. Только в стриатуме анализ выявил влияние фактора «Содержание» на величину отношения 5-НІАА/5-НТ: величина этого показателя у крыс группы «Социальная изоляция» была снижена.

ГЛАВА 4. Обсуждение результатов

4.1. Вес крыс

В настоящем исследовании только в одной из трех серий было отмечено изменение веса крыс, подвергнутых социальной изоляции: в серии 2 самки группы «Социальная изоляция» весили меньше, чем самки контрольной группы после 2, 4,5 и 8 мес. социальной изоляции (см. раздел 3.1.). В научной литературе представлены данные как о снижении веса крыс (Hatch et al., 1965, Ness et al., 1995; Cruz et al., 2015), выросших в условиях социальной изоляции, так и об отсутствии изменений этого показателя (Sakharian et al., 1982; Sanchez et al., 1998; Hellemans et al., 2004; Fone, Porkess, 2008, Trabace et al., 2012, Nakagawa et al., 2019). В работе Weiss et al. (2000) даже сообщается о тенденции к повышению веса у самцов крыс разных линий после 12 недель социальной изоляции. На основании этих данных можно заключить, что изменение веса крыс не является стабильно регистрируемым эффектом социальной изоляции.

4.2. Эстральный цикл

Исследований влияния социальной изоляции на эстральный цикл крайне мало. На самках линии Sprague-Dawley было показано, что многомесячная социальная изоляция приводит к нарушениям цикла в виде увеличения продолжительности стадии эструса, частоты состояния постоянного эструса и увеличения выраженности лордозного рефлекса (LeFevre, McClintock, 1991). В работе не сообщается о том, содержали ли самок в отдельной комнате или в комнате, в которой также содержали самцов. Hermes et al. (2006) обнаружили более короткий эстральный цикл у самок Sprague-Dawley после 2 мес. ранней социальной изоляции. При этом самок и самцов содержали в разных помещениях.

В настоящем диссертационном исследовании стадию цикла регистрировали только в дни проведения экспериментов (см. раздел 2.2.9.), а не ежедневно, чтобы снизить эффект хендлинга, который может опосредовать действие социальной изоляции (Rosa et al., 2005a, 2005b). На основании таких данных невозможно говорить о характере цикла у социально изолированных самок, можно оценить только представленность той или иной стадии эстрального цикла в группе.

В сериях 2 и 3 показано, что доля крыс, находящихся на стадии диэструса, проэструса или эструса у самок крыс, живущих в условиях социальной изоляции, не изменяется по сравнению с крысами, живущими в однополых группах (см. раздел 3.2.). Это согласуется с результатами работы, опубликованной Ramos-Ortolaza et al. (2017), где самок Sprague-Dawley содержали поодиночке или в парах в течение 8 недель. Вне зависимости от условий содержания у 85% крыс смена стадий эстрального цикла протекала нормально, средняя продолжительность одного цикла составила 4,8 дня. Известно, что двигательная активность повышается у самок в состоянии эструса (см. обзор Smith, 1994). В настоящей работе были выявлены признаки гиперактивности у самок крыс на разных сроках социальной изоляции (см. разделы 3.3.1., 3.3.2., 3.5.1., 3.6.1.). Однако отсутствие различий в доле самок, находившихся на разных стадиях эстрального цикла в разные сроки социальной изоляции, позволяет не связывать наблюдавшийся эффект гиперактивности при социальной изоляции у самок крыс с изменением гормонального фона в связи с нарушением эстрального цикла. Ramos-Ortolaza et al. (2017) не выявили взаимодействия факторов условий содержания и стадии эстрального цикла. Однако вопрос о потенциальном взаимодействии этих факторов при более длительной социальной изоляции и у самок крыс других линий остается открытым и требует отдельного детального изучения.

4.3. Ориентировочно-исследовательская деятельность

4.3.1. Двигательная активность

В данной работе двигательную и исследовательскую активность самцов и самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции, оценили в двух ситуациях с разным уровнем стресса – в автоматизированном и классическом «Открытом Поле». Ни в одной из серий не выявлено повышения двигательной активности в аОП, в ситуации с относительно низким уровнем стрессирования. Однако в серии 1 были выявлены половые различия: у самок двигательная активность была выше, чем у самцов (см. раздел 3.3.1.). Этот эффект имеет подтверждение и в работах других авторов (например, Archer, 1975; Hyde, Jerussi, 1983; Weiss et al., 2004). В тесте ПКЛ длина пройденного пути у самок тоже была больше, чем у самцов (см. раздел 3.5.1.)

Только в кОП, где уровень стрессирования был значительно выше за счет яркого освещения арены, в серии 1 удалось зарегистрировать повышение двигательной активности вследствие социальной изоляции. Этот эффект не зависел от пола животных (см. раздел 3.3.2.). В сериях 2 и 3 различия между самками групп «Контроль» и «Социальная изоляция» не были статистически значимыми ни на одном из сроков обследования, но в серии 3 снижение двигательной активности с возрастом в данном тесте наблюдалось только у самок группы «Контроль», что может быть косвенным свидетельством влияния условий содержания на повышение двигательной активности. Несмотря на то, что двигательная гиперактивность считается одним из ключевых показателей воздействия социальной изоляции, в научной литературе известны работы, в которых исследователям не удалось выявить повышения двигательной активности у социально изолированных крыс на небольшой, слабо освещенной арене (Varty et al., 2000; Karim, Arslan, 2000; Weiss et al., 2004). В работе Morinan et al. (1992) влияние социальной

изоляции на двигательную активность тоже удалось зарегистрировать только в условиях яркой освещенности, однако результат был противоположным. Эксперимент проводили в темно-светлой камере. При существенном увеличении яркости света в светлом отсеке камеры самцы опытной группы совершали меньше переходов между отсеками и проходили меньшую дистанцию.

В тесте ПКЛ в сериях 1 и 3 выявлено изменение длины пройденного пути у крыс в зависимости от условий содержания (см. раздел 3.5.1.). У самцов, подвергнутых социальной изоляции, снижение двигательной активности хоть и происходило, но на более позднем сроке, чем у самцов контрольной группы. У самок контрольной группы в сериях 1 и 3 двигательная активность с возрастом тоже снижалась. У самок группы «Социальная изоляция» в серии 1 было выявлено повышение двигательной активности с возрастом, а в серии 3 изменений этого показателя с возрастом не произошло.

В тесте ПП также было выявлено более позднее снижение двигательной активности по показателю времени активного и пассивного плавания (см. раздел 3.6.1.): у крыс контрольной группы оно начиналось уже в возрасте 5,5 мес., а у крыс группы «Социальная изоляция» - только в возрасте 9 мес.

Таким образом, 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.

4.3.2. Исследовательская активность

Изменения исследовательской активности вследствие социальной изоляции, выявленные в данной работе, не имели выраженной направленности. В серии 1 изолированное содержание привело к стиранию

половых различий, которые были выявлены между группами контрольных животных по числу стоек в аОП (см. раздел 3.3.1.). А в серии 3 у самок группы «Социальная изоляция» произошло более резкое снижение числа стоек с возрастом, чем в контрольной группе. В стрессогенной ситуации кОП не было выявлено различий между группами по числу стоек. При этом в одной из серий (в серии 3) самки группы «Социальная изоляция» чаще заглядывали в отверстия, что свидетельствует о повышении исследовательской активности (см. раздел 3.3.2.). В двух других сериях также наблюдалось повышение числа стоек вследствие социальной изоляции, но различия не достигли принятого уровня статистической значимости ($p=0,070$ и $p=0,058$, соответственно).

Как было отмечено в разделе 2.1., клетки, использованные для изолированного содержания крыс, имели меньшую высоту, что могло оказывать влияние на снижение числа стоек. Однако, поскольку такой эффект был выявлен только в одной из трех экспериментальных серий, более вероятным представляется влияние гетерогенности популяции крыс Wistar на исследовательскую активность, а не высоты клетки.

В работе Vary et al. (2000) сообщается о снижении числа заглядываний в отверстия у самцов крыс после 8 недель социальной изоляции по сравнению с контрольными животными и с крысами, жившими в обогащенной среде. Тестирование проводили при слабом красном свете. В другой работе после 6 недель изолированного содержания самцы не отличались от контрольной группы по числу стоек в «открытом поле» при слабом красном свете (Brenes et al., 2009).

В настоящей работе в ситуации с высоким уровнем стрессирования при ярком белом освещении в кОП, напротив, наблюдалось повышение числа заглядываний в отверстия. При этом при слабом уровне освещения, в тесте аОП, у социально изолированных крыс выявлены некоторые признаки снижения исследовательской активности. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что исследовательское поведение крыс,

подвергнутых социальной изоляции, может, подобно двигательной активности, сильно зависеть от уровня стрессогенности условий, в которых оценивается это поведение.

4.4. Болевая чувствительность

В двух сериях были получены данные о повышении порогов болевых реакций у крыс вследствие социальной изоляции, но эффект выявлен только в тесте «Hot Plate» (см. раздел 3.4.). Данные научной литературы также свидетельствуют о снижении болевой чувствительности у грызунов, которых содержали в социальной изоляции (Coudereau et al., 1997; Tuboly et al., 2009; Meng et al., 2010). В приведенных работах повышение ПБР было показано как в тесте «Hot Plate», так и в тесте «Tail Flick», однако последний проводили по другой методике, опуская хвост крысы в горячую воду. В данной работе использовали в качестве болевого раздражителя инфракрасный луч, таким образом, болевое раздражение затрагивало лишь небольшой участок хвоста. В работе Hellemans et al. (2004), в которой этот тест проводили по такой же методике, как в настоящем исследовании, – с использованием инфракрасного луча, ПБР социально изолированных самцов не отличались от ПБР самцов, живших в группах.

Показано, что цитокины опосредуют изменения ноцицептивной чувствительности у крыс (Bø et al., 2009; Gdek-Michalska et al., 2010; Абрамова и соавт., 2017). Возможно, что выявленное в настоящем исследовании снижение экспрессии провоспалительных цитокинов в головном мозге самок (IL-1 β во фронтальной коре, IL-6 и IL-1 β в гиппокампе и стриатуме, см. раздел 3.10.) отражает изменение иммунного ответа на стресс, что опосредует более низкую болевую чувствительность самок по сравнению с самцами после 4,5 мес. социальной изоляции.

Интересным результатом было изменение стратегии избавления с возрастом, которое было выявлено в тесте «Hot Plate» во всех сериях. В

возрасте крыс 1 мес. выпрыгивание было редко встречающейся реакцией, в 3 мес. эта реакция присутствовала вместе с облизыванием лапок, а на более поздних сроках обследования выпрыгивание становилось единственной реакцией избавления, которую демонстрировали крысы. Выпрыгивание является наиболее эффективной реакцией избавления. На текущий момент нет однозначного ответа на вопрос о том, с чем связано такое изменение стратегии – с взрослением и созреванием мозга, с научением или с увеличением размера тела, что позволяет быстрее обнаружить возможность выпрыгнуть. При этом в одной из серий (серия 2) было выявлено изменение частоты встречаемости болевых реакций у самок группы «Социальная изоляция» по сравнению с самками контрольной группы. Снижение частоты выпрыгивания после 2 мес. социальной изоляции может свидетельствовать в пользу гипотезы о связи выпрыгивания с размерами тела, поскольку именно в этой серии крысы, подвергнутые социальной изоляции, медленнее набирали вес. Если принять гипотезу о смене стратегии избавления вследствие научения, то другим объяснением может быть когнитивная недостаточность, которая, как показано в других тестах, развивается у крыс после социальной изоляции. В этой же серии было выявлено увеличение частоты реакции облизывания передней лапки у самок после 4,5 мес. социальной изоляции. Это может быть связано с тем, что на данном сроке обследования (возраст 5,5 мес.) самки группы «Социальная изоляция» позже выпрыгивали из цилиндра, и, соответственно, дольше подвергались болевому воздействию.

4.5. Эмоционально-мотивационное поведение

В данной работе не было выявлено развития стойких признаков тревоги и депрессивно-подобного поведения у крыс, подвергнутых социальной изоляции.

По показателю предпочтения ОР влияние условий содержания было выявлено только в серии 3: после 2 мес. предпочтение ОР у социально изолированных самок было ниже, а после 8 мес. – наоборот, выше, чем у самок контрольной группы (см. раздел 3.5.1.), то есть, на позднем сроке изоляции уровень тревожности снижался. При этом в возрасте 5,5 мес. в этой серии признаки повышенной тревожности у животных еще были заметны в тесте кОП: самки группы «Социальная изоляция» проводили больше времени в краевой зоне и быстрее заходили в нее (см. раздел 3.5.3.).

В двух других сериях, в которых проводили комплексную оценку тревожно-фобических состояний, данные можно интерпретировать только в пользу снижения тревожности вследствие длительной социальной изоляции. Помимо самостоятельного влияния условий содержания на общий балл тревожности, только у самок, но не у самцов было выявлено снижение величины этого показателя с возрастом (или с увеличением продолжительности социальной изоляции) (см. раздел 3.5.2.). Поскольку существенное число параметров, оцененных в данном тесте, связано с латентным периодом совершения некоторого действия в стрессогенной среде, стоит отметить, что различия между социально изолированными и контрольными животными могут объясняться повышенной двигательной активностью опытных животных в стрессогенной среде.

Учитывая большое количество работ (Dalrymple-Alford, Benton, 1981; Weiss et al., 2004), в которых приводятся свидетельства развития признаков тревожности у крыс после 6-8 недель социальной изоляции, можно предполагать, что продление социальной изоляции до 8 мес. привело к адаптации с гиперкомпенсацией признаков тревожности в этой серии вплоть до ее снижения. Данные литературы о развитии депрессивности после социальной изоляции противоречивы: есть свидетельства об отсутствии изменений по показателю иммобильности в тесте «Принудительное Плавание» (Hall et al., 1998; Karim, Arslan, 2000) и, напротив, о развитии «поведенческого отчаяния» в этом тесте (Brenes, Fornaguera, 2009; Yildirim et

al., 2012). Данные, представленные в настоящей работе, добавляют свидетельства в пользу отсутствия признаков депрессивности у крыс даже после многомесячной социальной изоляции.

4.6. Социальное взаимодействие

В сериях 1 и 2 социальная изоляция продолжительностью 2 и более мес. увеличивала число и время активных неагрессивных контактов. Число агрессивных контактов было увеличено у самок опытной группы в серии 1 после 2 мес. социальной изоляции, в серии 2 – у самок после 2 и 4,5 мес. изоляции (см. раздел 3.7.1.). Социальная изоляция в меньшей степени влияла на время агрессивных контактов. На последнем сроке обследования в возрасте крыс 9 мес. после 8 мес. социальной изоляции различий в частоте и продолжительности социальных контактов выявлено не было.

В серии 3 после 2 мес. социальной изоляции самки демонстрировали повышенное предпочтение социального объекта в трехкамерном социальном тесте (см. раздел 3.7.2.). В более позднем возрасте, как было показано в серии 2, различий в предпочтении социального объекта между крысами контрольной и опытной групп не было. Но только на позднем сроке социальной изоляции было выявлено снижение предпочтения «социальной новизны».

Стремление крыс, подвергнутых социальной изоляции, к повышению социальных контактов, в том числе агрессивных, можно рассматривать как демонстрацию неадекватного социального взаимодействия. Но можно взглянуть на проблему иначе. Само социальное взаимодействие играет важную роль в более эффективном преодолении действия стресса социальной изоляции, перенесенного в подростковом возрасте; развивается тип поведения, полезный в ситуациях, которые требуют социальной принадлежности для выживания социальных видов животных (Rivera-Irizarry et al., 2020). Усиление социального взаимодействия, вызванного

неблагоприятными социальными условиями, включая стресс социальной изоляции, способствует смягчению действия этого стресса, преодолению его эффектов и развитию стрессоустойчивости, то есть способствует так называемой «социальной буферизации» (Beery, Kaufer, 2015). «Социальная буферизация», в свою очередь, может приводить к снижению уровня стресс-индуцированной тревоги (Smith, Wang, 2014). С этих позиций можно предположить, что увеличение общительности самок крыс после двух мес. социальной изоляции представляет собой стратегию преодоления на данном сроке этого стрессирующего воздействия.

Интересным результатом было снижение предпочтения социальной новизны, выявленное в серии 2 у самок после 8 мес. социальной изоляции. Оценку предпочтения «социальной новизны» можно отнести к когнитивным функциям, характеризующим социальное узнавание (social recognition), поэтому на основании нарушения предпочтения «социальной новизны» можно предполагать развитие нарушений процессов обработки социальной информации и социальной памяти (Seillier, Giuffrida, 2016). Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о возможном прогрессивном ухудшении социальной памяти у крыс, если срок социальной изоляции увеличивается.

Результаты настоящего исследования не противоречат интересной гипотезе, рассмотренной в работе (Matisz et al., 2021), суть которой заключается в том, что хронический стресс переключает поведение крыс с исследования окружающей среды на эксплуатацию известных ресурсов для удовлетворения текущих и неизвестных будущих потребностей, избегая множества возможных угроз. На взрослых самцах крыс Long-Evans авторы показали, что после хронического пятинедельного мягкого непредсказуемого стресса, включавшего в число стрессирующих воздействий социальную изоляцию (дважды в неделю – на всю ночь, один раз в неделю – на сутки), у животных повышалась чувствительность к угрожающему контексту (в присутствии запаха хищника они пробегали большую дистанцию, чем

контрольные крысы в тесте ОП), снижалось исследовательское и «потребительское»/пищедобывательное поведение (consummatory behavior) (они меньше исследовали и меньше лизали кормушки в задаче конкурентного выбора). Сдвиг в поведении от исследования к эксплуатации известных ресурсов, по мнению авторов, дает стрессированным животным преимущество в приспособлении к окружающей среде, и его можно считать адаптивным, так как исследование требует времени и энергии и связано с повышенным риском по сравнению с использованием знакомого варианта. В настоящей работе на модели хронического стресса социальной изоляции не оценивали «потребительское» поведение самок крыс, однако оценивали исследовательское поведение, поведение избегания рисков и моторную активность. В рамках гипотезы о смещении поведения под влиянием хронического стресса от исследования к эксплуатации известных ресурсов снижение предпочтения нового социального объекта, вплоть до полного отсутствия такого предпочтения, можно рассмотреть, как снижение мотивации к исследованию нового. Таким образом, снижение предпочтения «социальной новизны» может отражать не только нарушения социальной памяти, но и изменение характера мотивационной деятельности.

Выявленное в настоящем исследовании изменение показателей социальности и ухудшение предпочтения «социальной новизны» у крыс после социальной изоляции длительностью 8 мес. по сравнению с социальной изоляцией длительностью 2 мес., по-видимому, сопровождается сменой стратегий преодоления. В соответствии с моделью аллостатических состояний, предложенной Куприяновым и Ждановым (2014), можно предположить, что происходит переход аллостатической нагрузки на иной, более высокий уровень.

4.7. Когнитивная деятельность

4.7.1. Реакция на новизну

Реакция на новизну у крыс подразумевает повышение исследовательского поведения в незнакомой среде в ответ на появление нового объекта или стимула, которое связано с детекцией изменений в окружении и стресс-индуцированной активацией (Redolat et al., 2009). В сериях 1 и 2 нам удалось зарегистрировать снижение реакции на новизну у крыс группы «Социальная изоляция» (см. раздел 3.3.2.). В работе Rosa et al. (2005) на самцах крыс также было показано, что социальная изоляция приводит к снижению реакции на новизну: после 3 недель изолированного содержания у самцов опытной группы было зарегистрировано меньше ультразвуковых вокализаций в новой обстановке, чем у самцов контрольной группы. В исследовании Gentsch et al. (1982) сообщается о снижении реакции на изменения в знакомом «открытом поле» (размещении в нем трех новых объектов) у самцов крыс после 3 мес. социальной изоляции. В настоящей работе получены данные о снижении реакции на новизну не только у самцов, но и у самок. Приведенные результаты свидетельствуют о стойком эффекте, который сохраняется и на более поздних сроках социальной изоляции (8 и более мес.). В работе Atmore et al. (2020) также показано снижение реакции на новизну у самцов и самок Sprague-Dawley после 3 мес. ранней социальной изоляции в тесте «Распознавание Нового Объекта» (Novel Object Recognition test).

4.7.2. Пространственная память

В настоящей работе предложена модификация метода оценки пространственной памяти в тесте ВЛМ. К стандартной процедуре, которая включает проверку выработки навыка через 24 ч после последней обучающей сессии, добавили отсроченную проверку памяти через 4 мес.,

напоминание, состоящее из двух попыток найти платформу, аналогичных попыткам в обучающей сессии, и проверку памяти через 24 ч после напоминания. Такой подход позволил собрать больше данных о формировании и сохранении пространственной памяти у крыс, живущих в условиях социальной изоляции.

Научение

В двух сериях при обучении было выявлено увеличение латентности достижения приплатформенной зоны крысами группы «Социальная изоляция»: в серии 1 – в первый день обучения, в серии 2 – в последний день обучения (см. раздел 3.8.1.). В серии 1 в этот день анализ также выявил увеличение латентного периода достижения зоны платформы и относительного времени, проведенного в краевой зоне вследствие социальной изоляции, а в серии 2 в последний день обучения этот фактор увеличил длину пройденного пути. Относительное время, проведенное крысами группы «Социальная изоляция» в краевой зоне лабиринта, в серии 1 было увеличено и в последний день обучения. Все эти изменения свидетельствуют в пользу гипотезы об ухудшении процесса обучения у крыс, подвергнутых социальной изоляции. По результатам серии 1 было выдвинуто предположение о том, что увеличение латентного периода достижения платформы может происходить из-за повышенной сенсibilизации крыс, подвергнутых социальной изоляции, к стрессовой ситуации, что приводило к увеличению тигмотаксиса (Garthe et al., 2009; Krupina et al., 2020) и мешало обнаружению платформы (Krupina et al., 2020). У самок в серии 2 не было выявлено повышения тигмотаксиса при обучении. Это может объясняться вариативностью данного показателя в разных когортах крыс. Ранее в лаборатории общей патологии нервной системы ФГБНУ «НИИОПП» было показано увеличение тигмотаксиса в ВЛМ у самцов популяции Wistar после 2 мес. социальной изоляции (Khlebnikova et al., 2018). С учетом результатов серии 2 (увеличение пройденного пути и

латентности достижения приплатформенной зоны крысами группы «Социальная изоляция» в последний день обучения) можно говорить о том, что, по крайней мере, у самок нарушен сам процесс научения, независимо от стратегии поведения в ситуации с высоким уровнем стрессирования.

В двух сериях у самок группы «Социальная изоляция» в первый день обучения было выявлено снижение средней скорости перемещения, что отличало их от крыс других групп (в серии 2 это отличие почти достигло уровня статистической значимости: $p=0,052$). Ранее Lapiz et al. (2001) предположили, что снижение скорости в ВМЛ у крыс, подвергнутых социальной изоляции, может быть связано со снижением мотивации. Исследование было проведено на самцах крыс линии Lister Hooded, но согласно нашим данным, эту гипотезу можно высказать и в отношении самок популяции Wistar. Также, согласно результатам настоящей работы, исключительно у самок при обучении социальная изоляция привела к увеличению относительного времени, проведенного в целевом квадранте, в серии 1 – в 3 день, в серии 2 – в последний день обучения. Как правило, этот показатель используют как основной для определения эффективности научения (Vorhees, Williams, 2014). Однако такая его интерпретация в настоящей работе не согласуется с результатами анализа других показателей. Более вероятным кажется объяснение, что самки группы «Социальная изоляция», хоть и правильно определяли общее направление до платформы, но, оказавшись в целевом квадранте, дольше искали ее конкретное местоположение, в пользу чего свидетельствует увеличение латентного периода достижения приплатформенной зоны в тот же день обучения в серии 2.

Выявлены некоторые половые различия в обучении крыс в ВЛМ, не связанные с влиянием условий содержания. В первый день обучения скорость самок была ниже, чем у самцов, а в 3 день – выше. Однако в 3 день самки позже достигали приплатформенной зоны, чем самцы. Согласно данным научной литературы, самцы быстрее обучаются в тесте ВЛМ

(Jonasson, 2005; Vorhees et al., 2008; Williams et al., 2004). Полученные в настоящей работе данные не противоречат результатам других авторов, что позволяет объяснять более выраженное влияние социальной изоляции на обучение самок в тесте ВЛМ по сравнению с самцами за счет изначальных половых различий, показанных для этого теста.

Тестирование памяти

В серии 1 при тестировании через 24 ч после последней обучающей сессии у самок группы «Социальная изоляция» было выявлено увеличение относительного времени, проведенного в целевом квадранте, по сравнению с крысами других групп. В той же серии на этапе напоминания, через 24 ч после тестирования сохранности пространственной памяти в течение 4 мес., средняя скорость была снижена у крыс, подвергнутых социальной изоляции, а у самок был увеличен латентный период достижения приплатформенной зоны по сравнению с самцами. При тестировании через 24 ч после напоминания величина этого показателя была больше у крыс группы «Социальная изоляция». При этом средние значения латентного периода достижения приплатформенной зоны на этих двух этапах были наибольшими именно в группе самок, подвергнутых социальной изоляции. Данные свидетельствуют в пользу высказанного выше предположения о большей уязвимости пространственной памяти самок к стрессу длительной социальной изоляции. В серии 2 статистически значимых различий при тестировании памяти выявлено не было. Стоит отметить, что и изменения научения в ВЛМ в этой серии были менее выраженными, чем в серии 1. Не ясно, связано ли это с генетической гетерогенностью популяции крыс Wistar, некоторыми изменениями в последовательности тестов, более поздним началом социальной изоляции в этой серии (ПНД 35-36 против ПНД 33).

Для оценки сохранности памяти спустя 4 мес. после обучения был проведен сравнительный анализ (Repeated measures ANOVA) 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 столь продолжительное время после обучения. Эффект не зависел ни от пола животных (серия 1), ни от условий содержания (серии 1 и 2).

В настоящем исследовании не было выявлено выраженных различий в успешности обучения и сохранения пространственной памяти в контрольных группах у самцов по сравнению с самками, показанного на крысах других линий – Sprague-Dawley, Long-Evans и Fisher (Williams et al., 2004; Jonasson, 2005; Vorhees et al., 2008). Однако в серии 1 в тесте 3 предпочтение целевого квадранта (по показателю не случайного пребывания в нем) было выявлено у самцов, но не у самок независимо от условий содержания. В серии 2 предпочтение целевого квадранта в этом тесте было выявлено и у самок. Тем не менее, половые различия, выявленные по этому показателю в серии 1, скорее свидетельствуют в пользу предположения о более успешном запоминании пространственной информации у самцов популяции Wistar, по сравнению с самками.

4.7.3. Условный рефлекс пассивного избегания

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. социальной изоляции (серия 2).

В серии 1 у крыс группы «Контроль» был сформирован устойчивый УРПИ, который сохранялся через 7 дней после обучения (см. раздел 3.8.2.). У крыс обоего пола, подвергнутых социальной изоляции, латентность перехода

в темный отсек камеры не изменилась после обучения. В серии 2 результаты были схожими: через 24 ч после обучения, только крысы контрольной группы демонстрировали УРПИ. Однако в этой серии при тестировании через 7 дней латентный период перехода не был увеличен ни у самок группы «Социальная изоляция», ни у самок группы «Контроль». Это может быть связано с тем, что в серии 2 УРПИ вырабатывали в более раннем возрасте крыс (5,5 мес. против 9 мес.). Показано, что выработка УРПИ зависит от возраста крыс, однако зависимость не является линейной. У самцов крыс Long-Evans латентный период перехода в темный отсек камеры был значительно ниже в возрасте крыс 32 мес. по сравнению с крысами в возрасте 3-5 мес. при тестировании через 48 ч после обучения (Chopin, Briley, 1990). На самцах крыс Sprague-Dawley показано, что УРПИ у животных в возрасте 3 мес. и 12 мес. был более выражен, чем у крыс в возрасте 1 мес. и 18 мес. при тестировании через 2 мин и через 30 дней после обучения (McNamara et al., 1977).

Оценка качества выработки УРПИ позволила получить дополнительные данные. Так в серии 1 были выявлены половые различия. В тесте 1 самки группы «Социальная изоляция» совершали больше заглядываний в темный отсек, а в тесте 2 – больше неполных переходов, чем самки контрольной группы. Различий между группами самцов по этим показателям выявлено не было. Однако в тесте 2 баллы качества выработки УРПИ были снижены у крыс группы «Социальная изоляция» независимо от пола. Это свидетельствует о менее выраженном условном рефлексе страха и более низком уровне эмоционального стресса у крыс, живших в условиях социальной изоляции, по сравнению с крысами, жившими в группах, в ситуации принятия решения о переходе в темный отсек камеры. При этом среди животных опытной группы самцы демонстрировали более выраженный условный рефлекс страха, чем самки. Как было показано в серии 2, качественное снижение УРПИ у самок, подвергнутых социальной

изоляции, проявляется даже при менее продолжительном воздействии этого стрессирующего фактора.

В работах других авторов показано, что даже менее продолжительная социальная изоляция приводит к нарушениям выработки УРПИ. В работе Acro et al. (2003) сообщается о снижении латентного периода перехода через 24 ч после выработки УРПИ у самцов Sprague-Dawley после 8 недель изолированного содержания по сравнению с самцами контрольной группы, однако, даже у крыс опытной группы латентный период перехода был в 9 раз выше при тестировании, чем при обучении. В исследовании Crine (1984) на самцах Wistar показано, что уже после 44 дней социальной изоляции латентный период перехода при тестировании существенно ниже, чем у самцов, которых содержали в группах. В другом исследовании (Levshina et al., 2006) авторы показали, что самцы Wistar, подвергнутые 70-дневной изоляции после отсаживания от матери, во взрослом возрасте (3 мес.) чаще совершали переход в темный отсек камеры после обучения, чем самцы контрольной группы.

В настоящем исследовании на тех сроках обследования, на которых проводили выработку УРПИ, влияние фактора «Содержание» на ПБР крыс в тесте «Hot Plate» было статистически значимым как в серии 1, так и в серии 2 (см. раздел 3.4.1.). Причем в серии 1 ПБР крыс группы «Социальная изоляция» были повышены независимо от пола животных. Не исключено, что ухудшение выработки УРПИ может быть связано со снижением болевой чувствительности. Однако некоторые данные свидетельствуют против этого предположения. Стресс принудительного плавания в течение 3 дней приводил к снижению болевой чувствительности (гипоалгезии) у крыс в тесте «Hot Plate», что сопровождалось нарушением выработки УРПИ (уменьшением латентного периода перехода в темный отсек камеры) (Shabani et al., 2016). Взаимосвязь болевой чувствительности и выработки УРПИ требует дальнейшего исследования.

В серии 2 через 4 мес. после первого обучения напоминание привело к повышению латентного периода перехода у самок группы «Социальная изоляция», хотя и менее выраженному, чем в контрольной группе крыс. Учитывая, что латентный период перехода в тесте 4 превышал величину этого показателя в тесте 1 практически в два раза, как в группе «Контроль», так и в группе «Социальная изоляция» (см. **Рис. 13**), можно предполагать сохранение некоторой памяти о первом обучении даже спустя 4 мес. после него.

4.7.4. Условный рефлекс активного избегания

В работе приведены исследования нарушения выработки УРАИ у самок, подвергнутых длительной социальной изоляции. Интересно отметить, что различия между группами были выявлены только на этапе обучения, но не при тестировании (см. раздел 3.8.3.). В работе Levshina et al. (2006) показано ухудшение обучения в тесте УРАИ у самцов Wistar в возрасте 3 мес. после 70-дневной социальной изоляции, 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. Чтобы избежать действия болевого стимула в тесте УРАИ, животное должно перейти в отсек камеры, который также ассоциирован с недавним действием болевого стимула. Принятие такого решения связано с выраженным эмоциональным конфликтом как для крыс, подвергнутых социальной изоляции, так и для контрольных животных, однако высокий уровень стрессогенности самой обстановки теста УРАИ осложняет принятие верного решения в большей степени для крыс, выросших в условиях социальной изоляции. Результаты настоящего диссертационного исследования не противоречат гипотезе, высказанной Levshina et al. (2006). Более того, это предположение может объяснить

отсутствие различий между группами на этапе тестирования, поскольку на этом этапе обстановка тестирования уже знакома животным, что несколько снижает уровень стрессогенности данного теста. Другим возможным объяснением этого эффекта может быть нарушение рабочей памяти, но не процесса консолидации при социальной изоляции.

4.8. Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая ось

Активность ГГА-оси тесно связана с действием половых гормонов: у самок грызунов выше базовый уровень содержания кортикостерона в крови, чем у самцов и более выраженное увеличение содержания кортикостерона в крови в ответ на стресс (Pisu et al., 2016; Hamden et al., 2019). В настоящем исследовании также было обнаружено повышенное содержание базового уровня кортикостерона у самок по сравнению с самцами. Однако, различий между крысами, находившимися в условиях изолированного или группового содержания, не было выявлено. В научной литературе накоплены противоречивые данные о влиянии социальной изоляции на содержание этого гормона. На самцах Wistar было показано, что ранняя социальная изоляция длительностью 6 и 8 недель приводила к снижению базового уровня кортикостерона в крови (Sanchez et al., 1998; Maslova et al., 2010). Краткосрочная социальная изоляция (13 дней) у самцов и самок линии Sprague-Dawley также приводила к снижению содержания кортикостерона в крови (Pisu et al., 2016). В другом исследовании сообщается о повышении содержания кортикостерона в крови у самцов Sprague-Dawley после 6-дневной социальной изоляции (Gamallo et al., 1986). Есть экспериментальные свидетельства отсутствия изменений содержания этого глюкокортикоида в крови у самцов крыс Wistar после 2-недельной социальной изоляции (Heidbreder et al., 2000). Weiss et al. (2004) показали, что у самок Sprague-Dawley после 18-дневной социальной изоляции не был изменен ни базовый

уровень кортикостерона в крови, ни его содержание после обследования в стрессогенном тесте акустического стартл-ответа.

В настоящей работе не было выявлено изменения базового уровня кортикостерона после 4,5 мес. социальной изоляции (у самок) и 9 мес. социальной изоляции у самцов и самок крыс Wistar (см. раздел 3.9.). В возрасте крыс 6 мес. индуцированное иммобилизационным стрессом повышение уровня кортикостерона в крови самок опытной и контрольной групп не различалось. Анализ только уровня кортикостерона не позволяет получить однозначного ответа на вопрос о том, происходит ли на больших сроках социальной изоляции адаптация к действию этого стресса.

Дополнительную информацию может дать оценка состояния ГГА-оси, ответ которой может быть изменен за счет изменения экспрессии и/или аффинности GR. Эффекты глюкокортикоидов опосредованы связыванием с GR – ядерным рецептором, фосфопротеином, содержащим многочисленные потенциальные сайты фосфорилирования, который функционирует как лиганд-зависимый транскрипционный фактор (Vittelius et al., 2018). Функциональные изменения GR происходят в результате гормон-зависимого и независимого фосфорилирования (цит. по обзору Galliher-Beckly, Cidlowski, 2009).

В настоящей работе во фронтальной коре было выявлено увеличение экспрессии GR у самцов после 9 мес. социальной изоляции (серия 1) и у самок после 5 и 9 мес. социальной изоляции (серия 2). Только у самцов было выявлено снижение экспрессии GR в гиппокампе вследствие длительной социальной изоляции. В целом, эти результаты свидетельствуют об изменениях функционирования ГГА-оси при социальной изоляции, несмотря на отсутствие изменений содержания кортикостерона в крови, и подтверждают формирование у животных ответа на стресс под влиянием социальной изоляции. У крыс обоего пола уже после 2 мес. социальной изоляции было выявлено повышение социального взаимодействия, а у самок было отмечено повышение агрессивности в поведении, однако на данном

сроке обследования не оценивали экспрессию GR в структурах мозга. Повышение экспрессии было обнаружено на более поздних сроках социальной изоляции. Альтерации ГГА-оси, развивающиеся вследствие социального стресса, связаны как с повышением социального интереса, так и с агрессивностью причинно-следственными связями (цит. по обзору Sandi, Haller, 2015). Нельзя исключить, что повышение экспрессии GR в мозге происходит на ранних сроках социальной изоляции одновременно с нарушением социального поведения и сохраняется при пролонгировании этого стрессирующего воздействия.

Показано, что социальная изоляция приводит к увеличению относительного веса надпочечников у самок (длительность социальной изоляции 13 и 14 недель) (Hatch et al., 1965; Syme, 1973), но не у самцов (длительность социальной изоляции 5-8 недель) (Gamallo et al., 1986; Maslova et al., 2010; Ness et al., 1995; Sanchez et al., 1998). В настоящей работе получены схожие данные, хотя срок социальной изоляции был существенно больше: во всех трех сериях после 9 и 9,5 мес. социальной изоляции относительный вес надпочечников был увеличен у самок, но не у самцов. В серии 1 различий между самцами контрольной и опытной групп выявлено не было. Интересно отметить, что после 5 мес. социальной изоляции в серии 2 не было выявлено увеличения веса надпочечников у самок. В совокупности с приведенными выше результатами Hatch et al. (1965) и Syme (1973) можно предположить, что изменение веса надпочечников у самок зависит от продолжительности социальной изоляции: после приблизительно 3 мес. воздействия этого стрессора вес надпочечников увеличивается, затем на фоне адаптации к социальной изоляции достигает значений, характерных для контрольной группы соответствующего возраста, но на более поздних сроках (больше 9 мес.) снова возрастает, что может свидетельствовать об истощении адаптационных механизмов. Это предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

Только в одной из серий (серия 1) было выявлено снижение относительного веса селезенки у самок, подвергнутых социальной изоляции. Социальная изоляция не влияла на вес тимуса ни у самцов, ни у самок. Hatch et al. (1965) выявили снижение веса селезенки и тимуса у самцов и самок крыс после 13 недель изолированного содержания. В работах последующих лет были собраны противоречивые данные по влиянию социальной изоляции на вес тимуса. Например, в работе Sanchez et al. (1998) 2-месячная социальная изоляция, напротив, приводила к увеличению веса тимуса у самцов Wistar. Но изолированное содержание на протяжении 6 недель не изменило вес тимуса у самцов Wistar (Maslova et al., 2010). При этом после 5 недель социальной изоляции относительный вес тимуса у самцов Sprague-Dawley был увеличен (Ness et al., 1995). С учетом этих данных, а также принимая во внимание расхождение между результатами, полученными в разных сериях в настоящей работе, можно сказать, что изменение относительного веса селезенки и тимуса вследствие социальной изоляции, по-видимому, не является надежной характеристикой действия стресса социальной изоляции.

4.9. Молекулярные изменения в структурах мозга

4.9.1. Цитокины с провоспалительным действием

Участие провоспалительных цитокинов в ответе на стресс подтверждено научными исследованиями (Pugh et al., 1999; Hueston et al., 2017). В исследовании Перцова и соавт. (2021) показано, что содержание IL-1 β и IL-6 в крови зависит от частоты предъявления стрессогенного фактора. Однократная иммобилизация в течение 4 ч не изменяла уровень этих цитокинов в крови, но повторяющийся иммобилизационный стресс в течение 8 дней приводил к постепенному повышению их содержания в крови.

Когда психологический или физиологический стресс индуцирует нейровоспаление, глюкокортикоиды оказывают противовоспалительное

действие путем повышения уровня противовоспалительных цитокинов и снижения уровня провоспалительных цитокинов (цит. по обзору Kim et al., 2016). Таким образом, при хроническом стресс-индуцированном воспалении, сопровождающемся неконтролируемой секрецией провоспалительных цитокинов, ответная активация ГГА-оси будет способствовать торможению нейровоспалительной реакции.

В настоящем исследовании пролонгированная социальная изоляция сопровождалась преимущественно снижением уровня провоспалительных цитокинов в структурах мозга самок крыс: в серии 2 после 5 мес. социальной изоляции снижение выявлено во фронтальной коре, гиппокампе и стриатуме, в серии 1, но не в серии 2 после 9 мес. социальной изоляции было отмечено снижение в гиппокампе и стриатуме крыс. Принимая во внимание тот факт, что при длительной социальной изоляции основным выявленным изменением GR в структурах мозга оказалось повышение их уровня во фронтальной коре (не только у самок, но и у самцов), можно предположить, что именно активация ГГА-оси способствовала снижению уровня провоспалительных цитокинов в структурах мозга. Однако в настоящем исследовании не оценивали уровень цитокинов с преимущественно противовоспалительным действием, что не позволяет судить о том, был ли увеличен их уровень в мозге. Тем не менее, наблюдение о разнонаправленности изменения экспрессии GR и провоспалительных цитокинов косвенно свидетельствует о вероятном развитии признаков нейровоспаления у крыс, подвергнутых хроническому неизбежному стрессу социальной изоляции, и включении механизмов преодоления воспалительного ответа. Снижение экспрессии GR в гиппокампе самцов крыс после 9 мес. социальной изоляции требует отдельного анализа, так как ставит вопрос о возможном начале развития у них глюкокортикоидной резистентности (Меркулов и соавт., 2017).

Как показано в работах других авторов (Pugh, 1999; Barrientos et al. 2003; Hueston et al., 2017), у грызунов-самцов повышение содержания IL-1 β в

гиппокампе вследствие социальной изоляции сопровождалось нарушением памяти. В настоящем исследовании когнитивные нарушения у самок крыс были выявлены как при повышении, так и при снижении IL-1 β в этой структуре после 9 мес. социальной изоляции.

Известно, что IL-1 β участвует в регуляции ноцицепции (Obreja et al., 2002; Абрамова и соавт., 2017). Увеличение уровня мРНК и белка IL-1 β наблюдали в ипсилатеральной части дорсального отдела спинного мозга после пережатия седалищного нерва у крыс, что сопровождалось развитием симптомов нейропатической боли, а однократное введение антагониста IL-1-рецептора снижало выраженность этих симптомов (Pilat et al., 2015). Результаты настоящего диссертационного исследования согласуются с этими данными: снижение экспрессии IL-1 β в структурах мозга самок сопровождалось снижением болевой чувствительности.

В настоящем исследовании выявлено снижение экспрессии IL-6 в гиппокампе и стриатуме самок крыс после 5 и 9 мес. социальной изоляции (см. раздел 3.9.). Corsi-Zuelli et al. (2019) тоже выявили снижение экспрессии этого цитокина, но после 10 недель социальной изоляции у самцов Wistar, и в другой структуре – в префронтальной коре. В настоящей работе не было обнаружено изменения уровня IL-6 у самцов после 9 мес. социальной изоляции, а на более ранних сроках экспрессию данного цитокина у них не оценивали. Учитывая эти данные, можно предполагать, что ответ цитокинов с провоспалительным действием может зависеть от пола животных на разных сроках социальной изоляции.

4.9.2. Маркеры нейропластичности

В настоящем исследовании снижение экспрессии proBDNF вследствие социальной изоляции выявлено только у самок: в серии 2 после 5 мес. изоляции – в гиппокампе, а после 9 мес. – в стриатуме (см. раздел 3.10.). В серии 1 после 9 мес. социальной изоляции выявлено снижение уровня

proBDNF во фронтальной коре. Как в серии 1, так и в серии 2 выявлены нарушения пространственной памяти. Причем в серии 1 эти нарушения были более выражены у самок, чем у самцов. Важно отметить, что в данной работе оценивали экспрессию не зрелого BDNF (mBDNF), а его предшественника, регулирующего синаптическую пластичность и формирование нервных связей в подростковом возрасте (Hempstead, 2015). В работе Teng et al. (2005) была высказана гипотеза о том, что разнообразие функций нейротрофинов может частично модулироваться регулируемым высвобождением зрелых и про-изоформ в нервной системе. Результаты настоящего исследования поддерживают эту гипотезу. Возможно, снижение экспрессии proBDNF у самок отражает нейропластические изменения, возникшие в раннем периоде развития, на фоне начала действия стресса социальной изоляции. Если такие изменения сопровождались дисбалансом proBDNF/mBDNF, то это могло быть одним из механизмов, лежащих в основе большей уязвимости самок к воздействию социальной изоляции. Есть свидетельства того, что функционирование сигнального каскада proBDNF-p75NTR в нейронах взрослых мышей тормозило активность V-слоя пирамидных клеток энторинальной коры, возбуждение которых является ключевым компонентом рабочей и пространственной памяти (Gibon et al., 2015). Блокировка proBDNF антителами усиливала активность пирамидных клеток.

В ряде работ обнаружено, что когнитивные нарушения у крыс, индуцированные социальной изоляцией, сопровождались усилением экспрессии белков-маркеров апоптоза (Park et al., 2020a, 2020b; Kim et al., 2020). В экспериментах на культуре клеток симпатических нейронов выявлено, что proBDNF может оказывать проапоптотическое действие в случае образования комплекса с рецептором p75NTR (рецептор нейротрофинов) и NTRS3/сортилина (несопряженный с G-белками рецептор нейротензина-3) (Teng et al., 2005). Возможно, выявленное в настоящем исследовании снижение экспрессии proBDNF в структурах мозга у самок

крыс, развившееся под действием социальной изоляции, является адаптивным действием на проапоптотическое действие этого белка.

В данном исследовании не было выявлено изменений экспрессии SYP во фронтальной коре и стриатуме ни в одной из серий. Только в серии 2 экспрессия этого белка была увеличена в гиппокампе у самок после 9 мес. социальной изоляции. Надо отметить, что изменение уровня экспрессии одного из маркеров нейропластичности (BDNF или proBDNF, SYP) в одной и той же структуре мозга может происходить без изменения уровня другого (Yau et al., 2014). Отсутствие изменений экспрессии SYP в гиппокампе самцов после длительной социальной изоляции было неожиданным результатом данной работы, тогда как при действии других видов стресса и менее продолжительной социальной изоляции такие изменения были неоднократно описаны. В работе Xu et al. (2004) 4-часовой иммобилизационный стресс в течение 3 последовательных дней приводил к снижению содержания SYP в гиппокампе самцов Sprague-Dawley на 50%. Трехчасовое отлучение от матери в течение первых 3 недель постнатального развития приводило к снижению экспрессии SYP в гиппокампе у самцов и самок крыс Wistar в возрасте 3,5 мес. (Dandi et al., 2018). В другой работе (Andersen, Teicher, 2004) показано, что 2-часовое отлучение от матери в ПНД 2-20 также приводило к снижению SYP в гиппокампе. Причем этот эффект удавалось зарегистрировать у крыс в возрасте 2 мес. и старше, в ПНД 25 и 40 различий между группами было не выявлено. Влияние пола в этих двух работах не обсуждались. Социальная изоляция взрослых самцов Sprague-Dawley в течение 2 недель приводила к снижению экспрессии SYP в гиппокампе (Das et al., 2016). Varty et al. (1999) на самцах Lister Hooded показали, что ранняя социальная изоляция, продолжавшаяся в течение 8 недель, приводила к снижению иммунореактивности SYP в зубчатой извилине гиппокампа. Можно полагать, что одной из основных причин отсутствия снижения содержания SYP в гиппокампе самцов в данном диссертационном исследовании является большой срок социальной

изоляции, за время которого могла произойти адаптация, в результате которой некоторые нейропластические изменения, возникшие в подростковом возрасте, были скомпенсированы.

Работы, в которых отдельно обсуждаются эффекты социальной изоляции на экспрессию SYP у самок, немногочисленны. В частности, в работе Ramos-Ortolaza et al. (2017) сообщается об отсутствии изменений экспрессии SYP у самок линии Sprague-Dawley, которых подвергли 8-недельной социальной изоляции во взрослом возрасте. В другом исследовании (Leussis, Andersen, 2008) после 5 дней ранней социальной изоляции сообщается о снижении экспрессии SYP в префронтальной коре, но не в гиппокампе у крыс Sprague-Dawley обоего пола. В настоящем исследовании впервые показано, что социальная изоляция продолжительностью более 8 мес. может приводить к повышению экспрессии SYP в гиппокампе самок. Эти результаты не противоречат гипотезе о возможной адаптации нейропластических механизмов мозга к столь продолжительному действию социальной изоляции.

4.9.3. Пролинспецифические пептидазы

В настоящей работе выявлены изменения экспрессии PREP в структурах мозга крыс (см. раздел 3.10.). В гиппокампе самок выявлено повышение экспрессии этой пептидазы на двух сроках обследования – после 5 и 9 мес. изолированного содержания (серия 2). В стриатуме у самцов выявлено снижение экспрессии PREP после 9 мес. социальной изоляции (серия 1), а у самок – после 5 мес. (серия 2). После 9 мес. социальной изоляции в стриатуме самок в серии 2 выявлено повышение экспрессии PREP, а в серии 1 изменения не выявлены.

В научной литературе представлены данные, свидетельствующие о связи когнитивного дефицита с повышением активности PREP в структурах мозга, а некоторые ингибиторы PREP проявляют антиамнестические

свойства (Назарова и соавт., 2007; Babkova et al., 2017). С этих позиций нарушение пространственной и ассоциативной памяти, выявленное у самок, подвергнутых изолированному содержанию (см. раздел 3.8.), может быть связано с повышением экспрессии PREP в гиппокампе.

Авторы работ, в которых было показано нейропротективное действие ингибиторов PREP, считают, что это действие может быть опосредовано нейропептидами – субстратами фермента, которые участвуют в реализации антиапоптотических механизмов. В контексте сказанного привлекает внимание нейропептид с промнестическим действием, нейротензин, который экспрессируется в стриатуме (Zahm, 1987; Liu et al., 2017) и расщепляется PREP (Jalkanen et al., 2006; Peltonen et al., 2012). Нейротензин оказывает антиапоптотическое действие в ЦНС через взаимодействие со своими рецепторами, в частности, с NTSR3/сортилином (Devader et al., 2013). NTSR3/сортилин способен формировать гетеродимеры (белковые комплексы) с рецепторами нейротрофинов, в том числе с p75NTR, что, как сказано выше, является триггером proBDNF-индуцированной гибели нейронов, а нейротензин способен противодействовать пронеуротрофин-индуцированному апоптозу путём конкуренции за сайт связывания NTSR3/сортилина, действуя как конкурентный ингибитор (Teng et al., 2005; Nykjaer, Willnow, 2012).

Учитывая эти данные, можно интерпретировать снижение экспрессии PREP в стриатуме как защитный механизм, приводящий к увеличению уровня антиапоптотического субстрата нейротензина. Такое объяснение согласуется с менее выраженными когнитивными нарушениями, выявленными у самцов крыс после 9 мес. социальной изоляции по сравнению с самками (см. разделы 3.8.1., 3.8.2.). Возможно, снижение экспрессии PREP у самок после 5 мес. социальной изоляции выполняет ту же функцию, но на более поздних сроках действие этого механизма оказывается недостаточным для преодоления патогенного влияния социальной изоляции, и может происходить даже увеличение экспрессии этой пептидазы.

В настоящем исследовании также выявлены изменения экспрессии DPP4 в структурах мозга самок (см. раздел 3.10.): выявлено повышение экспрессии DPP4 во фронтальной коре после 9 мес. социальной изоляции (серия 2), в гиппокампе после 5 мес. социальной изоляции (серия 2) и после 9 мес. (серия 1). В стриатуме самок выявлено снижение экспрессии DPP4 после 5 мес. социальной изоляции (серия 2).

В научной литературе имеются данные об участии DPP4 в ряде физиологических и патофизиологических процессов. В частности, в моделях на грызунах показано участие DPP4 в регуляции болевой чувствительности и реакции на стресс (Karl et al., 2003a, 2003b), развитии тревожно-депрессивного поведения (Крупина и соавт., 2009; Кушнарева и соавт., 2011; Krupina, Khlebnikova, 2016). В исследовании Karl et al. (2003b) на нокаутных крысах линии F344/DuCrj(DPP4^{-/-}) с дефицитом DPP4 показано, что отсутствие DPP4-подобной активности приводит к снижению болевой чувствительности и реакции на стресс. В недавней работе (Sharma et al., 2015) на взрослых самцах Wistar показано анксиолитическое действие ингибитора DPP4, ситаглиптина, в тесте ПКЛ. В настоящем исследовании у самок после 5 мес. социальной изоляции изменения экспрессии DPP4 в структурах мозга сопровождались снижением болевой чувствительности, но одновременно повышением, а не понижением реакции на стресс, в частности по показателю относительного пребывания в краевой зоне КОП и ВЛМ (см. разделы 3.5.3. и 3.8.1.), без явных признаков повышения тревожности. Эти результаты согласуются с результатами Karl et al. (2003) в отношении взаимосвязи DPP4-недостаточности (в настоящем исследовании – в стриатуме) со снижением болевой чувствительности у самок в возрасте 5 мес. Однако обнаруженное повышение уровня белка DPP4 во фронтальной коре мозга и гиппокампе не сопровождалось повышением тревожности или ростом депрессивности у самок, которых содержали в социальной изоляции в течение 5 и 9 мес. Более того, на более позднем сроке социальной изоляции (9 мес.) на фоне повышенной экспрессии DPP4 во фронтальной коре и

гиппокампе у этих крыс было выявлено даже снижение тревожности. Эти факты напрямую не согласуются с ранее высказанным предположением о связи развития аффективных расстройств с увеличением активности фермента в названных структурах мозга (Кушнарева и соавт., 2011), но позволяют предполагать участие DPP4 в развитии повышенной чувствительности к стрессу.

Имеются данные также о нейропротекторном действии ингибиторов DPP4 за счет снижения расщепления этой пептидазой глюкагоноподобного пептида 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1), который проходит гематоэнцефалический барьер и оказывает нейропротекторное действие (Shannon, 2013). Siddiqui et al. (2021) изучили воздействие ингибитора DPP4, линаглиптина на поведение самцов Wistar на модели болезни Альцгеймера. Введение $\alpha\beta$ (1-42) пептидов в гиппокамп приводило к нарушениям моторной активности в «открытом поле» и нарушениям пространственной памяти в тесте ВЛМ. Пероральное введение линаглиптина в течение 8 недель приводило к восстановлению этих нарушений до уровня, сопоставимого с уровнем у животных контрольной группы, то есть восстанавливало нарушение когнитивных функций. Возможно, повышение экспрессии DPP4 в гиппокампе и фронтальной коре, выявленное в настоящем исследовании, послужило одним из механизмов нарушения обучения и памяти у самок крыс в результате снижения содержания специфических субстратов фермента в этих структурах.

4.9.4. Моноамины и их метаболиты

В настоящем исследовании у крыс групп «Социальная изоляция» независимо от пола выявлено повышение содержания НА в стриатуме и снижение содержания НА в гиппокампе. В гиппокампе снижение содержания НА также выявлено у самок по сравнению с самцами. В этой структуре различия между крысами контрольной и опытной групп одного пола были

статистически значимыми только у самок, что свидетельствует в пользу большей выраженности последствий социальной изоляции.

В работе Atmore et al. (2020) *in vitro* был изучен выброс NA в ответ на GABA- и глутамат-стимуляцию у крыс Sprague-Dawley, демонстрировавших после 3 мес. социальной изоляции снижение реакции на новизну в тесте «Распознавание Нового Объекта», различавшееся у самцов и самок на разных этапах теста. Эффекты ранней социальной изоляции были выявлены на срезах префронтальной коры, но не гиппокампа. Авторы сообщают о более выраженных нарушениях ответа NA у самцов, чем у самок. В настоящем исследовании срок социальной изоляции был в три раза больше, и содержание NA оценивали *ex vivo* во фронтальной коре целиком, а не только в префронтальной ее части. В этой структуре было выявлено только большее содержание NA у самцов по сравнению с самками (см. раздел 3.11.). Однако на данном сроке снижение реакции на новизну в тесте КОП демонстрировали животные обоего пола, что может быть связано со снижением у них содержания NA в гиппокампе. Более выраженное снижение содержания NA в этой структуре у самок также может объяснять более выраженное ухудшение обучения на данном сроке социальной изоляции. В исследовании Fulford, Marsden (1997) по анализу стимулируемого выброса NA в структурах мозга *in vitro* показано, что у самцов Lister Hooded в гиппокампе после 1-2 недель ранней социальной изоляции могут иметь место специфичные для региона изменения чувствительности α_2 -адренорецепторов. В совокупности, эти результаты и результаты настоящего исследования поддерживают гипотезу о важной роли норадренергической системы в развитии нарушений поведенческого ответа на новизну, выявленного у крыс обоего пола вследствие социальной изоляции. Однако центральные механизмы снижения реакции на новизну могут различаться у крыс разных линий и изменяться в зависимости от продолжительности социальной изоляции.

В настоящем исследовании выявлен ряд изменений в функционировании DA-ергической системы у крыс после 9 мес. социальной

изоляции. Во фронтальной коре мозга – терминальном поле мезокортикальной DA-ергической системы – выявлено повышение содержания DA, 3-МТ и отношения 3-МТ/DA. Это свидетельствует о повышении функциональной активности данной DA-ергической системы, которое проявлялось усилением оборота DA по отношению 3-МТ/DA. В гиппокампе, структуре лимбической системы мозга, не было обнаружено изменения содержания самого DA, но выявлен сниженный уровень DOPAC и HVA, при повышенном обороте DA по отношению 3-МТ/DA. Можно предположить, что следствием пролонгированной социальной изоляции в гиппокампе стало увеличение метаболизма DA до 3-МТ за счет снижения метаболизма DA по пути $DA \rightarrow DOPAC \rightarrow HVA$. В настоящей работе также выявлено увеличение содержания 3-МТ в гипоталамусе самок после 8 мес. социальной изоляции. Этот результат поддерживает предположение об активации метаболизма DA по пути $DA \rightarrow 3-МТ$ в мозге вследствие длительной социальной изоляции, а также является еще одним индикатором большей подверженности самок действию этого типа стресса.

Показана роль как DA-, так и NA-ергической систем в социальном поведении крыс, в частности – в социальной игре в подростковом возрасте (Achterberg et al., 2015). Авторы оценивали мотивацию к социальной игре и выраженность игрового поведения. Самцов Wistar подвергали 24-часовой социальной изоляции 5 дней в неделю и обучали нажимать на педаль, чтобы получить возможность непродолжительного социального взаимодействия (2 мин) с конспецификом. Введение ингибитора обратного захвата DA (GBR-12909) приводило к повышению числа нажатий на педаль, но не изменяло само социальное взаимодействие, а введение ингибитора обратного захвата NA (атомоксетина) снижало число нажатий на педаль, частоту пиннинга и время, проведенное в активном социальном взаимодействии. Исходя из этих данных, можно предположить, что DA повышает, а NA – напротив, снижает мотивацию к социальному взаимодействию. В настоящем исследовании в серии 1 выявлено повышение социального взаимодействия, как у самцов, так

и у самок популяции Wistar в группах «Социальная изоляция» в подростковом возрасте (см. раздел 3.7.), однако в этом возрасте оценку уровня моноаминов в структурах мозга не проводили. Повышение содержания DA во фронтальной коре и снижение содержания NA в гиппокампе крыс обнаружено на поздних сроках социальной изоляции, когда нарушений поведения в тесте СВ уже не было. В серии 2 у самок после 9 мес. социальной изоляции выявлено снижение предпочтения социальной новизны (см. раздел 3.7.2.), то есть нарушение социального поведения, что предположительно может быть связано со снижением содержания NA в гиппокампе, но это требует экспериментальной проверки.

На самцах мышей показано, что снижение предпочтения социальной новизны, выявленное после 4 недель социальной изоляции, сопровождалось снижением числа D2-рецепторов в прилежащем ядре и медиальной префронтальной коре (Zhang et al., 2021). В другом исследовании (Karkhanis et al., 2019) на самцах Long-Evans авторы выявили снижение экспрессии D3-рецепторов в гиппокампе, но не в прилежащем ядре после 8 недель социальной изоляции. Авторы предложили рассматривать отсутствие изменений в прилежащем ядре как признак адаптации к продолжительной социальной изоляции. Снижение числа D2-рецепторов выявлено в префронтальной коре самцов Sprague-Dawley после 8 недель социальной изоляции (Fitzgelad et al., 2013).

В совокупности эти результаты подтверждают неоднозначную роль DA-ергической системы в развитии нарушений, вызванных социальной изоляцией. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о наличии нарушений оборота DA в мозге крыс даже после многомесячной социальной изоляции. Повышение содержания DA во фронтальной коре может быть механизмом адаптации к снижению экспрессии рецепторов DA. Усиление метаболизма DA по пути $DA \rightarrow 3\text{-MT}$ может выполнять схожую функцию, поскольку известно, что метаболиты DA обладают собственной нейротрансмиттерной активностью, но действие 3-MT как

нейротрансмиттера более выражено по сравнению с DOPAC и HVA (Nakazato et al., 2002; Sotnikova et al., 2010).

В целом, остается нерешенным вопрос, как изменения DA и NA во фронтальной коре и гиппокампе связаны с изменением поведения животных, подвергнутых длительной социальной изоляции. Учитывая, что основными изменениями на поздних сроках социальной изоляции были нарушения когнитивных функций, можно предположить взаимосвязь выявленных изменений катехоламинергических систем с нарушением познавательной деятельности.

В настоящем исследовании выявлено повышение содержания 5-НТ и 5-НIAA во фронтальной коре крыс, подвергнутых социальной изоляции, что свидетельствует об увеличении оборота 5-НТ в этой структуре. Увеличение содержания 5-НТ также выявлено в гипоталамусе крыс группы «Социальная изоляция», но различия не достигли принятого уровня статистической значимости ($p=0,058$). В стриатуме обнаружено повышение содержания 5-НТ и снижение отношения 5-НIAA/5-НТ у крыс группы «Социальная изоляция», что можно рассматривать как признак снижения оборота 5-НТ в этой структуре.

Воздействие социальной изоляции на 5-НТ-ергическую систему показано в работах ряда авторов. Согласно обзору Veenema et al. (2009), альтерации 5-НТ-системы, выявляемые в моделях ранней социальной депривации на грызунах, очень сложные, различаются в разных структурах мозга, отмечены на нескольких уровнях функционирования данной нейромедиаторной системы и не всегда воспроизводятся.

Muchimapura et al. (2002) методом микродиализа исследовали высвобождение внеклеточного 5-НТ у самцов Lister Hooded после 6 недель социальной изоляции. Различий в базовом уровне внеклеточного 5-НТ в гиппокампе выявлено не было, но социальная изоляция приводила к снижению выраженности выброса 5-НТ в ответ на острый стресс (электрошок в течение 10 мин). Двухмесячная социальная изоляция,

начинавшаяся после отсаживания от матери, сопровождалась снижением уровня серотонина и повышением его оборота по отношению 5-НІАА/5-НТ в гиппокампе самцов крыс Wistar, а после 3 мес. изоляции изменений в гиппокампе отмечено не было (Крупина и соавт., 2019). В настоящем исследовании изменения базового содержания 5-НТ в гиппокампе после значительно более длительной социальной изоляции у самцов и самок крыс тоже не выявлены.

Показано, что ранняя социальная изоляция приводит к снижению экспрессии 5-НТ в дорзальном ядре шва (6 недель изоляции) (Park et al., 2020) и к снижению выброса 5-НТ в префронтальной коре, определяемого методом микродиализа *in vivo*, в условиях решения задачи на внимание (Dalley et al., 2002). У самок Lister Hooded после 12 недель социальной изоляции не было выявлено изменения содержания 5-НТ в префронтальной коре, прилежащем и хвостатом ядрах, но соотношение 5-НТ/5-НІАА в прилежащем ядре было снижено на 18% (Jones et al., 1992). Вероятно, повышение содержания 5-НТ и 5-НІАА, выявленное во фронтальной коре в настоящем исследовании у крыс с когнитивными нарушениями, связано с существенным увеличением длительности социальной изоляции. Воздействие социальной изоляции разной продолжительности на 5-НТ-ергическую систему самок подлежит детальному изучению в дальнейших исследованиях.

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 (Prut, 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 нейропатофизиологических 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 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-HT-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 7,5 – 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, во фронтальной коре была также повышена экспрессия дипептидилпептидазы-4, а в стриатуме – экспрессия пролилэндопептидазы; 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова А.Ю., Перцов С.С., Козлов А.Ю., Никенина Е.В. Цитокины как один из ведущих факторов изменения ноцицептивных порогов у крыс // Российский журнал боли. – 2017. – № 1 (52). – С. 3-4.
2. Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро // https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/hfa_391-2410-prevalence-of-mental-disorders/visualizations/#id=19973&tab=table
3. Гуляева Н.В. Молекулярные механизмы нейропластичности: расширяющаяся вселенная // Биохимия – 2017. – Т. 82. – С. 365-371.
4. Дегтярев В.П., Раевская О.С. Боль и обезболивание. Нейрофизиологические и нейрохимические механизмы: учебное пособие // М.: МГМСУ. – 2011. – С. 96.
5. Зубков Е.А., Зоркина Я.А., Оршанская Е.В., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Чехонин В.П. Ранняя социальная изоляция нарушает экспрессию генов в структурах мозга крыс // Бюл. эксперим. биол. мед. – 2018. – Т. 166, № 9. – С. 366-341.
6. Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. Маркер синаптических контактов — синаптофизин // Морфология. – 2015. – Т. 147. – С. 79-83.
7. Коржевский Д.Э., Петрова Е.С., Кирик О.В., Безнин Г.В., Сухорукова Е.Г. Нейральные маркеры, используемые при изучении стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 57-63.
8. Корнева Е.А., Шанин С.Н., Новикова Н.С., Пугач В.А. Клеточно-молекулярные основы изменения нейроиммунного взаимодействия при стрессе // Росс. Физиол. Журн. Им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 3. – С. 217-229.
9. Крот К.В., Мешалкина С.Ю., Слободенюк Е.В. Социально-экономическая значимость психических расстройств: региональные аспекты // Дальневосточный мед. журн. (ежеквартальное научно-практическое издание) – 2016. – № 1. – С. 91-96.

- 10.Крупина Н.А., Богданова Н.Г., Хлебникова Н.Н., Золотов Н.Н., Крыжановский Г.Н. Влияние ингибитора пролилэндопептидазы бензилоксикарбонил/метионил/2(s)-цианопирролидина на депрессивно-подобное поведение крыс в тесте принудительного плавания и активность пролинспецифических пептидаз в структурах мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 11. – С. 559-563.
- 11.Крупина Н.А., Кушнарера Е.Ю., Хлебникова Н.Н., Золотов Н.Н., Крыжановский Г.Н. Экспериментальная модель тревожно-депрессивного состояния у крыс, вызванная введением ингибитора дипептидилпептидазы IV метионил-2(S)–цианопирролидина в раннем постнатальном периоде // Журн. Высш. Нервн. Деят. им. И.П. Павлова. – 2009. – Т. 59, № 3. – С. 360-372.
- 12.Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Пептидергические механизмы регуляции эмоционально-мотивационного поведения // Успехи физиологических наук. – 2010. – Т. 41, № 2. – С. 3-26.
- 13.Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Наркевич В.Б., Наплёкова П.Л., Кудрин В.С. Уровень моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс, находившихся в социальной изоляции в течение двух и трех месяцев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 11. – С. 540-545.
- 14.Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н. Ранняя социальная изоляция увеличивает агрессивность и нарушает кратковременное привыкание у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – Т. 59, № 4. – С. 4-15.
- 15.Куприянов Р.В., Жданов Р.И. Стресс и аллостаз: проблемы, перспективы и взаимосвязь // Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова. – 2014. – Т. 64, № 1. – С. 21-31.
- 16.Кушнарера Е.Ю., Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Золотов Н.Н., Крыжановский Г.Н. Активность пролинспецифических пептидаз в

- структурах мозга крыс с экспериментальным тревожно-депрессивным состоянием, вызванным введением ингибитора дипептидилпептидазы IV в раннем постнатальном периоде // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, № 6. – С. 619-623.
- 17.МКБ-10: Международная классификация болезней 10 пересмотра. – Версия 2019. <https://mkb-10.com/index.php?pid=4001>
- 18.Меркулов В.М., Меркулова Т.И., Бондарь Н.П. Механизмы формирования глюкокортикоидной резистентности в структурах головного мозга при стресс-индуцированных психопатологиях // Биохимия – 2017. – Т. 82, № 3. – С. 494-510.
- 19.Назарова Г.А., Золотов Н.Н., Крупина Н.А., Крайнева В.А., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А. Изменение активности пролинспецифических пептидаз при экспериментальном моделировании ретроградной амнезии // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2007. Т. 70, № 6. С. 6-8.
- 20.Перцов С.С., Абрамова А.Ю., Чехлов В.В. Влияние многократных стрессорных воздействий на цитокиновый профиль крови у крыс с разными показателями поведения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 10. – С. 400-405.
- 21.Психическое здоровье: гендерный аспект // Современная терапия психических расстройств. – Сайт врачей-психиатров. <https://psypharma.ru/ru/novosti/mezhdunarodnye-novosti-psihiatrii-ot-eleny-mozhaevoy/psihicheskoe-zdorove-gendernyy-aspekt>
- 22.Родина В.И., Крупина Н.А., Крыжановский Г.Н., Окнина Н.Б. Многопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс // Журн. высш. нервн. деят. – 1993. – Т. 43, № 5. – С. 1006-1017.
- 23.Хлебникова Н.Н., Медведева Ю.С., Крупина Н.А. Ранняя социальная изоляция, вызывающая эмоционально-мотивационные нарушения у крыс, сопровождается дефицитом кратковременного привыкания, но не

- влияет на пространственную память // Журн. высшей нервной деятельности. – 2018. – Т. 68, № 5. – С. 646-662.
24. Ширенова С.Д. Влияние социальной изоляции на выработку условного рефлекса пассивного избегания у самок крыс. *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. – С. 329. Екатеринбург, 11-12 декабря, 2020.
25. Ширенова С.Д., Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Динамика болевой чувствительности у самцов и самок крыс в условиях длительной социальной изоляции // *Российский журнал боли*. – 2019. – Т. 17, № 4. – С. 27-34. doi: 10.26731/RASP.2019.04.38
26. 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 // *Российский журнал боли*. – 2020. – Т. 18, спецвыпуск. – С. 13-14. Тезисы XXVI Российской научно-практической конференции с международным участием «Медицина боли: от понимания к действию». 17–19 сентября 2020 г. ОНЛАЙН. <https://doi.org/10.17116/pain2020180325>
27. 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

28. Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Тревожно-депрессивный профиль самцов и самок крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции // Тезисы XVII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2021. – С. 438-439. Судак, 4-10 июня, 2021.
- Shirenova Sophie D., Khlebnikova Nadezhda N., Krupina Nataliya A. Anxiety- and depressive-like profiles in male and female rats subjected to prolonged social isolation. XVII International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology». – 2021. – P. 438-439. doi: 10.29003/m2417.sudak.ns2021-17/438-439
29. 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
30. 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.
31. Щетинин Е.В., Батурин В.А., Арушанян Э.Б., Ованесов К.Б., Попов А.В. Биоритмологический подход к оценке принудительного плавания

- как экспериментальной модели "депрессивного" состояния // Журн. высш. нервн. деят. - 1989. – Т. 39, № 5. – С. 958-964.
32. Ястребов В.С., Митихина И.А., Митихин В.Г., Шевченко Л.С., Солохина Т.А. Психическое здоровье населения мира: социально-экономический аспект (по данным зарубежных исследований 2000—2010 гг.) // Журн. неврологии и психиатрии. – 2012. – Т. 112, № 2. – С. 4-12.
33. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Боль: практическое руководство для врачей // М.: Издательство РАМН. – 2011. – 512 с.
34. Achterberg E.J.M., van Kerkhof L.W.M., Servadio M., van Swieten M.M.H., Houwing D.J., Aalderink M., et al. Contrasting roles of dopamine and noradrenaline in the motivational properties of social play behavior in rats // Neuropsychopharmacology. – 2015. – Vol. 41, № 3. – P. 858-868. doi: 10.1038/npp.2015.212
35. Adams T., Rosenkranz J.A. Social Isolation During Postweaning Development Causes Hypoactivity of Neurons in the Medial Nucleus of the Male Rat Amygdala // Neuropsychopharmacology. – 2015. – Vol. 41, № 7. – P. 1929-1940. doi:10.1038/npp.2015.364
36. Adler M.W., Maunon C., Samanin R., Valzelli L. Morphine analgesia in grouped and isolated rats // Psychopharmacologia. – 1975. – Vol. 41, № 1. – P. 11-14. doi:10.1007/bf00421298
37. Ahmad S., Wang L., Ward P.E. Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo // Journ. Pharmacol. Exp. Ther. – 1992. – Vol. 260. – P. 1257-1261.
38. Ago Y., Takuma K., Matsuda T. The Potential role of serotonin1A receptors in post-weaning social isolation-induced abnormal behaviors in rodents // Journal of Pharmacological Sciences. – 2014. – Vol. 125, № 3. – P. 237-241. doi:10.1254/jphs.14r05cp
39. Akbarabadi A., Niknamfar S., Vouseoghi N., Sadat-Shirazi M.-S., Toolee H., Zarrindast M.-R. Effect of rat parental morphine exposure on passive

- avoidance memory and morphine conditioned place preference in male offspring // *Physiology & Behavior*. – 2018. – Vol. 184. – P. 143-149. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.11.024
40. Alquicer G., Morales-Medina J.C., Quirion R., Flores G. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2008. – Vol. 35, № 2. – P. 179-187. doi: 10.1016/j.jchemneu.2007.10.001
41. Andrejew R., Paim M., Moritz C.E.J., Carreño F., Rates S.M.K., Elisabetsky, E. et al. Post-weaning social isolation impairs purinergic signaling in rat brain // *Neurochemistry International*. – 2021. – Vol. 148, P. 105-111. doi:10.1016/j.neuint.2021.105111
42. Andersen S.L., Teicher M.H. Delayed Effects of Early Stress on Hippocampal Development // *Neuropsychopharmacology*. – 2004. – Vol. 29, № 11. – P. 1988-1993. doi: 10.1038/sj.npp.1300528
43. Archer J. Contrasting effects of group housing and isolation on subsequent open field exploration in laboratory rats // *Psychonomic Science*. – 1969. – Vol. 14, № 5. – P. 234-235. doi:10.3758/bf03332812
44. Arco A., Zhu S., Terasmaa A. et al. Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum // *Psychopharmacology*. – 2004. – Vol. 171, P. 148-155. doi: 10.1007/s00213-003-1578-8
45. Ari C., D'Agostino D.P., Diamond D.M., Kindy M., Park C., Kovács Z. Elevated Plus Maze test combined with Video Tracking software to investigate the anxiolytic effect of exogenous ketogenic supplements // *Journal of visualized experiments: JoVE*. – 2019. – Vol. 143 – P. 1-10. doi: 10.3791/58396
46. Atmore K.H., Stein D.J., Harvey B.H., Russell V.A., Howells F.M. Differential effects of social isolation rearing on glutamate- and GABA-stimulated noradrenaline release in the rat prefrontal cortex and

- hippocampus // *European Neuropsychopharmacology*. – 2020. – Vol. 0. – P. 1-10. doi:10.1016/j.euroneuro.2020.05.007
47. Babkova K., Korabecny J., Soukup O., Nepovimova E., Jun D., Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors // *Future Med. Chem.* – 2017. – Vol. 9. – P. 1015-1038. doi: 10.4155/fmc-2017-0030
48. Bakshi V.P., Swerdlow N.R., Braff D.L., Geyer M.A. Reversal of Isolation Rearing-Induced Deficits in Prepulse Inhibition by Seroquel and Olanzapine // *Biological Psychiatry*. – 1998. – Vol. 43, № 6. – P. 436-445. doi: 10.1016/s0006-3223(97)00246-1
49. Bangasser D.A., Eck S.R., Telenson A.M., Salvatore M. Sex differences in stress regulation of arousal and cognition // *Physiol. Behav.* – 2018. – Vol. 187. P. 42-50. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.09.025
50. Barefoot J.C., Gronbaek M., Jensen G., Schnohr P., Prescott E. Social Network Diversity and Risks of Ischemic Heart Disease and Total Mortality: Findings from the Copenhagen City Heart Study // *American Journal of Epidemiology*. – 2005. – Vol. 161, № 10. – P. 960-967. doi:10.1093/aje/kwi128
51. Barrientos R., Sprunger D., Campeau S., Higgins E., Watkins L., Rudy J., Maier S. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist // *Neuroscience*. – 2003. – Vol. 121, № 4. – P. 847-853. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00564-5
52. Bartolomucci A., Palanza P., Sacerdote P., Ceresini G., Chirieleison A., Panerai A., Parmigiani S. Individual housing induces altered immune-endocrine responses to psychological stress in male mice // *Psychoneuroendocrinology*. – 2003. – Vol. 28, № 4. – P. 540-558. doi: 10.1016/s0306-4530(02)00039-2
53. Bauer P.M., Hanson J.L., Pierson R.K., Davidson R.J., Pollak S.D. Cerebellar volume and cognitive functioning in children who experienced

- early deprivation // *Biological psychiatry*. – 2009. – Vol. 66, № 12. – P. 1100-1106. doi:10.1016/j.biopsych.2009.06.014
- 54.Bean G., Lee T. Social isolation and cohabitation with haloperidol- treated partners: Effect on density of striatal dopamine D2 receptors in the developing rat brain // *Psychiatry Research*. – 1991. – Vol. 36, № 3. – P. 307-317. doi:10.1016/0165-1781(91)90029-o
- 55.Beery A.K., Kaufer D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents // *Neurobiol. Stress*. – 2015. – Vol. 1. – P. 116–127.
- 56.Beery A.K., Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research // *Neurosci. Biobehav. Rev*. – 2011. – Vol. 35. – P. 565e572.
- 57.Belzung C., Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression // *Biology of mood & anxiety disorders*. – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. 9-23. doi: 10.1186/2045-5380-1-9.
- 58.Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing // *Journ. R. Stat. Soc. Ser. B*. – 1995. – Vol. 57. P. 289-300. doi: 10.1111/j.2517&6161.1995.tb02031.x.
- 59.Berkman L., Syme L.S. Social networks, host resistance, and mortality: a nine-year follow-up study of Alameda county residents // *American Journal of Epidemiology*. – 1979. – Vol. 109, № 2. – P. 186-204. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a112674
- 60.Bick J., Nelson C.A. Early Adverse Experiences and the Developing Brain. // *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. – 2015. – Vol. 41, № 1. – P. 177-196. doi:10.1038/npp.2015.252
- 61.Bick J., Zeanah C.H., Fox N.A., Nelson C.A. Memory and Executive Functioning in 12-Year-Old Children With a History of Institutional Rearing. // *Child Dev*. – 2018. – Vol. 89. – P.495-508. doi:10.1111/cdev.12952

62. Bø S.H., Davidsen E.M., Gulbrandsen P., Dietrichs E., Bovim G., Stovner L.R., White L. Cerebrospinal fluid cytokine levels in migraine, tension-type headache and cervicogenic headache // *Cephalalgia*. – 2009. – Vol. 29, Iss. 3. P. 365–372.
63. Bondar N.P., Merkulova T.I. Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay // *Journ. Biosci.* – 2016. – Vol. 41. – P. 751-758, doi: 10.1007/s12038-016-9648-3
64. Bos K.J., Fox N., Zeanah C.H., Nelson C.A. Effects of early psychosocial deprivation on the development of memory and executive function // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2009. – Vol. 3. – P. 1-7. doi:10.3389/neuro.08.016.2009
65. Boshtam M., Asgary S., Kouhpayeh S., Shariati L., Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review // *Inflammation*. – 2016. – Vol. 40, № 1. – P. 340-349. doi:10.1007/s10753-016-0477-1
66. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999
67. Brenes J.C., Fornaguera J. Effects of environmental enrichment and social isolation on sucrose consumption and preference: Associations with depressive-like behavior and ventral striatum dopamine // *Neuroscience Letters*. – 2008. – Vol. 436, № 2. – P. 278–282. doi:10.1016/j.neulet.2008.03.045
68. Brenes J.C., Padilla M., Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats // *Behavioural Brain Res.* – 2009. – Vol. 197, № 1. – P. 125-137. doi:10.1016/j.bbr.2008.08.014
69. Brinkhues S., Dukers-Muijers N.H.T.M., Hoebe C.J.P.A., van der Kallen C.J.H., Dagnelie P.C., Koster A., Henry R.M.A., Sep S.J.S., Schaper N.C.,

- Stehouwer C.D.A., et al.: Socially isolated individuals are more prone to have newly diagnosed and prevalent type 2 diabetes mellitus - the Maastricht study // BMC Publ. Health. – 2017. – Vol. 17. – P. 955-955. doi: 10.1186/s12889-017-4948-6
- 70.Cacioppo J.T., Cacioppo S., Capitanio J.P., Cole S.W. The Neuroendocrinology of Social Isolation // Annual Review of Psychology. – 2015. – Vol. 66, № 1. – P. 733-767. doi: 10.1146/annurev-psych-010814-015240
- 71.Calati R., Ferrari C., Marie B., Oasi O., Emilie O., Courteta C.P., André F. Suicidal Thoughts and Behaviors and Social Isolation: A Narrative Review of the Literature // Journ. Affect. Disord. – 2019. – Vol. 15. – P. 653-667, doi: 10.1016/j.jad.2018.11.022
- 72.Campos A.C., Fogaca M.V., Aguiar D.C., Guimaraes F.S. Animal models of anxiety disorders and stress // Revista Brasileira de Psiquiatria. – 2013. – Vol. 35, suppl. 2. – P. S101–S111. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139
- 73.Card J.P. Early Experience Modifies the postnatal assembly of autonomic emotional motor circuits in rats // Journ. Neurosci. – 2005. – Vol. 25, № 40. – P. 9102-9111. doi:10.1523/JNEUROSCI.2345-05.2005
- 74.Cattane N., Vernon A.C., Borsini A., Scassellati C., Endres D., Capuron L., Tamouza R., Benros M.E., Leza J.C., Pariante C.M., Riva M.A., Cattaneo A. European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) ImmunoNeuroPsychiatry Thematic Working Group. Preclinical animal models of mental illnesses to translate findings from the bench to the bedside: Molecular brain mechanisms and peripheral biomarkers associated to early life stress or immune challenges // Eur. Neuropsychopharmacol. – 2022. – Vol. 58. – P. 55-79. doi: 10.1016/j.euroneuro.2022.02.002
- 75.Chang Q., Chan C.H., Yip P.S. A meta-analytic review on social relationships and suicidal ideation among older adults // Soc. Sci. Med. – 2017. – Vol. 191. – P. 65-76. doi:10.1016/j.socscimed.2017.09.003

- 76.Cilia J., Hatcher P.D., Reavill C., Jones D.N.C. Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats: an update // Psychopharmacology. – 2005. – Vol. 180, № 1. – P. 57-62. doi: 10.1007/s00213-004-2139-5
- 77.Cilia J., Reavill C., Hagan J., Jones D. Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats // Psychopharmacology. – 2001. – Vol. 156, № 2-3. – P. 327-337. doi: 10.1007/s002130100786
- 78.Cinini S.M., Barnabe G.F., Galvão-Coelho N., de Medeiros M.A., Perez-Mendes P., Sousa M.B.C., Covolan L., Mello L.E. Social isolation disrupts hippocampal neurogenesis in young non-human primates // Frontiers in Neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – P. 1-9. doi: 10.3389/fnins.2014.00045
- 79.Clark M.S. Social Relationships in Adulthood // International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences. – 2015. – Vol. 22. – P. 563-569. doi:10.1016/b978-0-08-097086-8.34026-0
- 80.Cohen, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences // Edn. 2, Hillsdale, Erlbaum. – 1988.
- 81.Cohen, S., Doyle W.J., Skoner D.P., Rabin B.S., Gwaltney J.M. Social Ties and Susceptibility to the Common Cold // JAMA. – 1997. – Vol. 277, № 24. – P. 1940–1944. doi:10.1001/jama.1997.03540480040036
- 82.Chopin P., Briley M. The effects of raubasine and dihydroergocristine on an age-related deficit in passive avoidance learning in rats // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 1990. – Vol. 42, № 5. – P. 375-376. doi: 10.1111/j.2042-7158.1990.tb05435.x
- 83.Cora M.C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears // Toxicologic Pathology. – 2015. – Vol. 43, № 6. – P. 776-793. doi:10.1177/0192623315570339
- 84.Corsi-Zuelli F., Fachim H.A., Loureiro C.M., Shuhama R., Bertozi G., Joca S.R.L., Menezes P.R., Louzada-Junior P., Del-Ben C.M. Prolonged periods of social isolation from weaning reduce the anti-inflammatory cytokine IL-

- 10 in blood and brain // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Vol. 12. doi: 10.3389/fnins.2018.01011
85. Coudereau J.-P., Monier C., Bourre J.-M., Frances H. Effect of isolation on pain threshold and on different effects of morphine // *Prog. Neuro-Psychopharm. & Biol. Psychiat.* – 1997. – Vol. 21, № 6. – P. 997-1018. doi:10.1016/s0278-5846(97)00094-8
86. Couzin-Frankel J. National Institutes of Health. Needed: more females in animal and cell studies // *Science*. – 2014. – Vol. 344, № 6185. – P. 679. doi: 10.1126/science.344.6185.679
87. Coyle C.E., Dugan E. Social Isolation, Loneliness and Health Among Older Adults // *Journal of Aging and Health*. – 2012. – Vol. 24, № 8. – P. 1346-1363. doi:10.1177/0898264312460275
88. Crespi F., Wright I., Mobius C. Isolation rearing of rats alters release of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the frontal cortex: an in vivo electrochemical study // *Experimental Brain Research*. – 1992. – Vol. 88, № 3. – P. 495-501. doi:10.1007/bf00228179
89. Crine A.F. Dose-related influence of arginine-vasopressin on a passive avoidance behavior: Effect of rearing conditions // *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* – 1984. – Vol. 8, № 3. – P. 379-384. doi:10.1016/S0278-5846(84)80025-1
90. Cruz F.C., Duarte J.O., Leão R.M., Hummel L.F.V., Planeta C.S., Crestani C.C. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence // *Developmental Neurobiology*. – 2015. – Vol. 76, № 1. – P. 34-46. doi:10.1002/dneu.22297
91. D'Agostino G., Kim J.D., Liu Z.W., Jeong J.K., Suyama S., Calignano A., Gao X.B., Schwartz M., Diano S. Prolyl endopeptidase-deficient mice have reduced synaptic spine density in the CA1 // *Cereb Cortex*. – 2013. – Vol. 23, № 8. – P. 2007-2014. doi: 10.1093/cercor/bhs199

92. Dalley J.W., Theobald D.E., Pereira E.A., Li P.M., Robbins T.W. Specific abnormalities in serotonin release in the prefrontal cortex of isolation-reared rats measured during behavioural performance of a task assessing visuospatial attention and impulsivity // *Psychopharmacology*. – 2002. – Vol. 164, № 3. – P. 329-340. doi: 10.1007/s00213-002-1215-y
93. Dalrymple-Alford J.C., Benton D. The effect of social isolation of the rat on open field activity and emergence // *Behavioural Processes*. – 1981. – Vol. 6, № 3. – P. 283-290. doi:10.1016/0376-6357(81)90007-3
94. Dandi E., Kalamari A., Touloumi O., Lagoudaki R., Nousiopoulou E., Simeonidou C., et al. Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress // *International Journ. of Devel. Neurosci.* – 2018. – Vol. 67. – P. 19-32. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003
95. Das S.K., Baitharu I., Barhwal K., Hota S. K., Singh S.B. Early mood behavioral changes following exposure to monotonous environment during isolation stress is associated with altered hippocampal synaptic plasticity in male rats // *Neurosci. Lett.* – 2016. – Vol. 612. – P. 231–237. doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.038
96. Data and resources: prevalence of mental health. In: *Health topics* [website]. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2018 (<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/data-and-statistics>, accessed 7 July 2017)
97. Davis D.A, Luecken L.J, Zautra A.J. Are Reports of Childhood Abuse Related to the Experience of Chronic Pain in Adulthood? // *The Clinical Journal of Pain*. – 2005. – Vol. 21, № 5. – P. 398-405. doi:10.1097/01.ajp.0000149795.08746.31
98. Day-Wilson K.M., Jones D.N.C., Southam E., Cilia J., Totterdell S. Medial prefrontal cortex volume loss in rats with isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition of acoustic startle // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 141, № 3. – P. 1113-1121. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.04.048

99. de Jong Gierveld J., van Tilburg T., Dykstra, P.A. Loneliness and social isolation. // The Cambridge handbook of personal relationships. Cambridge University Press. – 2005. – P. 485-500.
100. Devader C., Béraud-Dufour S., Coppola T., Mazella J. The antiapoptotic role of neurotensin // Cells. – 2013. – Vol. 2. – P. 124-135, doi: 10.3390/cells2010124
101. Domeney A., Feldon J. The Disruption of Prepulse Inhibition by Social Isolation in the Wistar Rat: How Robust Is the Effect? // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 1998. – Vol. 59, № 4. – P. 883–890. doi:10.1016/s0091-3057(97)00534-0
102. Duffy J.A., Hendricks S.E. Influences of social isolation during development on sexual behavior of the rat // Animal Learning & Behavior. – 1973. – Vol. 1, № 3. – P. 223-227. doi:10.3758/bf03199079
103. Einon D.F., Morgan M.J. Habituation of object contact in socially-reared and isolated rats // Animal Behaviour. – 1976. – Vol. 24. – P. 415-420.
104. Einon D.F., Morgan M.J., Sahakian B.J. The development of intersession habituation and emergence in socially-reared and isolated rats // Developmental Psychobiology. – 1975. – Vol. 8. – P. 553-559.
105. Eisenberger N.I. Does Rejection Hurt? An fMRI study of social exclusion // Science. – 2003. – Vol. 302, № 5643. – P. 290-292. doi:10.1126/science.1089134
106. El Yacoubi M., Vaugeois J.M., Marguet D., Sauze N., Guieu R., Costentin J., Fenouillet E. Behavioral characterization of CD26 deficient mice in animal tests of anxiety and antidepressant-like activity // Behav. Brain Res. – 2006. – Vol. 171, № 2. – P. 279-285.
107. Elsner V.R., Cechinel L.R., de Meireles L.C.F., Bertoldi K., Siqueira I.R. Epigenetic marks are modulated by gender and time of the day in the hippocampi of adolescent rats: a preliminary study // Neural. Regen. Res. – 2018. – Vol. 13, № 12. – P. 2160-2163. doi:10.4103/1673-5374.241467

108. Enz N., Vliegen G., De Meester I., Jungraithmayr W. CD26/DPP4 – a potential biomarker and target for cancer therapy // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2019. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.02.015
109. Evans M., Fisher E.B. Social isolation and mental health: the role of nondirective and directive social support // *Community Mental Health Journal*. – 2021. doi:10.1007/s10597-021-00787-9
110. Fiala B., Snow F.M., Greenough W.T. “Impoverished” rats weigh more than “Enriched” rats because they eat more // *Developmental Psychobiology*. – 1977. – Vol. 10, № 6. – P. 537-541. doi: 10.1002/dev.420100607
111. Fitzgerald M.L., Mackie K., Pickel V.M. The impact of adolescent social isolation on dopamine D2 and cannabinoid CB1 receptors in the adult rat prefrontal cortex // *Neuroscience*. – 2013. – Vol. 235. – P. 40-50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.021
112. Fone K.C.F., Porkess M.V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents // *Relevance to developmental neuropsychiatric disorders*. – 2008. – Vol. 32, № 6. – P. 1087-1102. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.003
113. Fone K.C.F., Shalders K., Fox Z.D., Arthur R., Marsden C.A. Increased 5-HT_{2C} receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation // *Psychopharmacology*. – 1996. – Vol. 123, № 4. – P. 346-352. doi:10.1007/bf02246645
114. Frenois F., Moreau M., O'Connor J., Lawson M., Micon Ch., Lestage J., Kelley K.W., Dantzer R., Castanon N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior // *Psychoneuroendocrinology*. – 2007. – Vol. 32, № 5. – P. 516-531. doi:10.1016/j.psyneuen.2007.03.005
115. Fulford A.J., Marsden C.A. Effect of isolation-rearing on noradrenaline release in rat hypothalamus and hippocampus in vitro // *Brain*

- Research. – 1997. – Vol. 748, № 1-2. – P. 93-99. doi: 10.1016/s0006-8993(96)01279-6
116. Gądek-Michalska A., Tadeusz J., Rachwalska P., Bugajski J. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems // Pharmacological Reports. – 2013. – Vol. 65, № 6. – P. 1655-1662. doi:10.1016/s1734-1140(13)71527-5
117. Gallegos, M. E. H., Zannatha, M. M. I., Osornio, E. G., Sánchez, A. S., & del Rio, F. A. P. The Activities of six exo- and endopeptidases in the substantia nigra, neostriatum, and cortex of the rat brain // Neurochemical Research. – 1999. – Vol. 24, № 12. – P. 1557–1561. Doi:10.1023/a:1021156216661
118. Galliher-Beckley A.J., Cidlowski J.A. Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease // IUBMB Life. – 2009. – Vol. 61, № 10. – P. 979-986. doi: 10.1002/iub.245
119. Gamallo A., Villanua A., Trancho G., Fraile A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats // Physiol. Behav. – 1986. – Vol. 36. – P. 217-221. doi: 10.1016/0031-9384(86)90006-5
120. Gapp K., Ziegler L., Tweedie-Cullen R.Y., Mansuy I.M. Early life epigenetic programming and transmission of stress-induced traits in mammals // BioEssays. – 2014. – Vol. 36, № 5. – P. 491-502. doi:10.1002/bies.201300116
121. Garthe A., Behr J., Kempermann G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies // PloS one. – 2009. – Vol. 4, № 5. – P. e5464. doi: 10.1371/journal.pone.0005464
122. Garzón, J., Del Río J. Hyperactivity induced in rats by long-term isolation: Further studies on a new animal model for the detection of antidepressants // European Journal of Pharmacology. – 1981. – Vol. 74, № 4. – P. 287-294. doi:10.1016/0014-2999(81)90047-9

123. Garzón J., Fuentes J., Del Rio J. Antidepressants selectively antagonize the hyperactivity induced in rats by long-term isolation // *European Journal of Pharmacology*. – 1979. – Vol. 59, № 3-4. – P. 293-296. doi:10.1016/0014-2999(79)90293-0
124. Gdek-Michalska A., Bugajski J. Interleukin-1 in stress-induced activation of limbic-hypothalamic-pituitary adrenal axis // *Pharmacological reports*. – 2010. – P. 969–982.
125. Gentsch C., Lichtsteiner M., Kraeuchi K., Feer H. Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments // *Behavioural Brain Research*. – 1982. – Vol. 4, № 1. – P. 45-54. doi: 10.1016/0166-4328(82)90163-2
126. Geyer M.A., Wilkinson L.S., Humby T., Robbins T.W. Isolation Rearing of Rats Produces a Deficit in Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Similar to that in Schizophrenia // *Biological Psychiatry*. – 1993. – Vol. 34, № 6. – P. 361-372. doi: 10.1016/0006-3223(93)90180-L
127. Giacobbo L B., Doorduyn J., Klein H.C., Dierckx R.A.J.O., Bromberg E., de Vries E.F.J. // *Mol. Neurobiol.* – 2019. – Vol. 56. – P. 3295-3312. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
128. Gibon J., Buckley S.M., Unsain N., Kaartinen V., Séguéla P., Barker P.A. proBDNF and p75NTR Control Excitability and Persistent Firing of Cortical Pyramidal Neurons // *Journ. Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2015 – Vol. 35, № 26. – P. 9741-9753. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4655-14.2015
129. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *The Lancet*. – 2018. – Vol. 392(10159). – P. 1789-1858.
130. Glowinski J., Iversen L.L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. II. Rate of turnover of catecholamines in various brain regions // *Neurochem.* – 1966. – Vol. 13, № 8. – P. 671-682.

131. Goel N., Workman J.L., Lee T T., Innala L., Viau V. Sex differences in the HPA axis // *Comprehensive Physiology*. – 2014. – Vol. 4, № 3. – P. 1121-1155. doi:10.1002/cphy.c130054
132. Gorenko J.A., Moran C., Flynn M., Dobson K., Konnert C. Social Isolation and Psychological Distress Among Older Adults Related to COVID-19: A Narrative Review of Remotely-Delivered Interventions and Recommendations // *Journ. Applied Gerontol.* – 2020. – Vol. 40, № 1. – P. 3-13.
133. Gorzalka B.B., Raible L.H. Facilitation of lordosis behavior in rats by social isolation: Adrenal mediation // *Physiology & Behavior*. – 1981. – Vol. 27, № 4. – P. 603-607. doi:10.1016/0031-9384(81)90229-8
134. Gray J.A., Lalljee B. Sex differences in emotional behaviour in the rat: Correlation between open-field defecation and active avoidance // *Animal Behaviour*. – 1974. – Vol. 22. – P. 856-861. doi:10.1016/0003-3472(74)90008-6
135. Green M.R., McCormick C.M. Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models // *Hormones and Behavior*. – 2013. – Vol. 64, № 2. – P. 364-379. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.09.012
136. Grippo A.J., Wu K.D., Hassan I., Carter C.S. Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety // *Depression and Anxiety*. – 2008. – Vol. 25, № 6. – P. E17-E26. doi:10.1002/da.20375
137. Guo L., Luo F., Gao N., Yu B. Social isolation and cognitive decline among older adults with depressive symptoms: prospective findings from the China Health and Retirement Longitudinal Study // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. – 2021. – Vol. 95. doi:10.1016/j.archger.2021.104390

138. Hall C.S., Ballachey E.L. A study of the rat's behavior in a field: A contribution to method in comparative psychology // University of California Publications in Psychology. – 1932. – Vol. 6. – P.1-12.
139. Hall F.S., Huang S., Fong G.F., Pert A. The effects of social isolation on the forced swim test in Fawn hooded and Wistar rats // Journ. of Neurosci. Method. – 1998. – Vol. 79, № 1. – P. 47-51. doi:10.1016/s0165-0270(97)00155-6
140. Hall-Lande J.A., Eisenberg M.E., Christenson S.L., Neumark-Sztainer D. Social isolation, psychological health, and protective factors in adolescence // Adolescence. – 2007. – Vol. 42, № 166. – P. 265–286.
141. Hamden J.E., Salehzadeh M., Jalabert C., O'Leary T.P., Snyder J.S., Gomez-Sanchez C.E., Soma K.K. Measurement of 11-dehydrocorticosterone in mice, rats and songbirds: Effects of age, sex and stress // General and comparative endocrinology/ - 2019/ - Vol. 281. – P. 173-182. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.05.018
142. Hancock M. Prevention, detection, intervention: the big wins for mental health // The Lancet. – 2018. – doi:10.1016/s0140-6736(18)32269-4
143. Hatch A., Wiberg G.S., Balazs T., Grice H.C. Long-Term Isolation Stress in Rats // Science. – 1963. – Vol. 142, № 3591. – P. 507-507. doi:10.1126/science.142.3591.507
144. Hatch A.M., Wiberg G.S., Zawidzka Z., Cann M., Airth J. M., Grice H.C. Isolation syndrome in the rat // Toxicology and Applied Pharmacology. – 1965. – Vol. 7, № 5. – P. 737-745. doi:10.1016/0041-008x(65)90132-8
145. Hauger R.L., Millan M.A., Lorang M., Harwood J.P., Aguilera G. Corticotropin-Releasing Factor Receptors and Pituitary Adrenal Responses during Immobilization Stress // Endocrinology. – 1988. – Vol. 123, № 1. – P. 396-405. doi:10.1210/endo-123-1-396
146. Hawkley L.C., Thisted R.A., Masi C.M., Cacioppo J.T. Loneliness predicts increased blood pressure: 5-year cross-lagged analyses in middle-

- aged and older adults // *Psychology and Aging*. – 2010. – Vol. 25, № 1. – P. 132-141. doi: 10.1037/a0017805
147. Heck A.L., Handa R.J. Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones // *Neuropsychopharmacology*. – 2019. – Vol. 44, № 1. – P. 45-58. doi: 10.1038/s41386-018-0167-9
148. Heidbreder C.A., Weiss I.C., Domeney A.M., Pryce C., Homberg J., Hedou G., Feldon J., Moran M.C., Nelson P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome // *Neuroscience*. – 2000. – Vol. 100, № 4. – P. 749-768. doi:10.1016/s0306-4522(00)00336-5
149. Hempstead B.L. Brain-derived neurotrophic factor: Three ligands, many actions // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2015. – Vol. 126. – P. 9-19.
150. Helleman K.G.C., Benge L.C., Olmstead M.C. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome // *Developmental Brain Research*. – 2004. – Vol. 150. – P. 103-115. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.03.003
151. Hermes G., Li N., Duman C., Duman R. Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats // *Physiol. Behav.* – 2011. – Vol. 104, № 2. – P. 354–359. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.019
152. Hermes G.L., Rosenthal L., Montag A., McClintock M.K. Social isolation and the inflammatory response: sex differences in the enduring effects of a prior stressor // *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2006. – Vol. 290, № 2. – P. R273–R282. doi:10.1152/ajpregu.00368.2005
153. Hill R.A., Klug M., Kiss Von Soly S., Binder M.D., Hannan A J., van den Buuse M. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a

- “two hit” rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling // *Hippocampus*. – 2014. – Vol. 24, № 10. – P. 1197-1211. doi:10.1002/hipo.22302
154. Hirnstein M., Hausmann, M. Sex/gender differences in the brain are not trivial—A commentary on Eliot et al. 2021 // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2021. – Vol. 130. – P. 408-409. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.09.012
 155. Holt-Lunstad J., Smith T.B., Baker M., Harris T., Stephenson D. Loneliness and Social Isolation as Risk Factors for Mortality: A Meta-Analytic Review // *Perspectives on Psychological Science*. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 227-237. doi:10.1177/1745691614568352
 156. Holt-Lunstat J., Steptoe A. Social isolation: An underappreciated determinant of physical health // *Current Opinion in Psychology*. – 2022. – Vol. 43. – P. 232-237. doi: 10.1016/j.copsyc.2021.07.012
 157. Hostinar C.E., Johnson A.E., Gunnar M.R. Early social deprivation and the social buffering of cortisol stress responses in late childhood: An experimental study // *Developmental Psychology*. – 2015. – Vol. 51, №. 11. – P. 1597-1608. doi:10.1037/dev0000029
 158. Hu C., Luo Y., Wang H., Kuang S., Liang G., Yang Y., Mai S., Yang J., Hashimoto K. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12, № 9. – e0185129. doi:10.1371/journal.pone.0185129
 159. Hueston C.M., Cryan J.F., Nolan Y.M. Adolescent social isolation stress unmasks the combined effects of adolescent exercise and adult inflammation on hippocampal neurogenesis and behavior // *Neuroscience*. – 2017. – Vol. 365. – P. 226-236. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.09.020
 160. Hyde J.F., Jerussi T.P. Sexual dimorphism in rats with respect to locomotor activity and circling behavior // *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. – 1983. – Vol. 18, № 5. – P. 725-729. doi:10.1016/0091-3057(83)90014-x

161. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics - International Classification of Diseases 11th Revision. The global standard for diagnostic health information. – Version 02/2022. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fclid%2fentity%2f334423054>
162. Ingram J., Hand C.J., Maciejewski G. Social isolation during COVID-19 lockdown impairs cognitive function // *Applied cognitive psychology*. – 2021. – Advance online publication. P. 1-13. doi: 10.1002/acp.3821
163. Itou M., Kawaguchi T., Taniguchi E., Sata M. Dipeptidyl peptidase-4: a key player in chronic liver disease // *World Journ. Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 19, № 15. – P. 2298-2306. doi: 10.3748/wjg.v19.i15.2298
164. Jaffe E.H., De Frias V., Ibarra C. Changes in basal and stimulated release of endogenous serotonin from different nuclei of rats subjected to two models of depression // *Neurosci. Letters*. – 1993. – Vol. 162, № 1-2. – P. 157-160. doi:10.1016/0304-3940(93)90584-8
165. Jalkanen A.J., Puttonen K.A., Venäläinen J.I., Sinervä V., Mannila A. et al. Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old scopolamine-treated rats // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – Vol. 100. – P. 132-138. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.00021.x
166. Jang Y., Choi E.Y., Park N.S., Chiriboga D.A., Duan L., Kim M.T. Cognitive health risks posed by social isolation and loneliness in older Korean Americans // *BMC geriatrics*. – 2021. – Vol. 21, № 1 (123). – P. 1-8. doi: 10.1186/s12877-021-02066-4
167. Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2005. – Vol. 28, № 8. – P. 811-825. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.10.006
168. Jones G.H., Hernandez T.D., Kendall D.A., Marsden C.A., Robbins T.W. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: Study of behavioural responses and postmortem and in vivo

- neurochemistry // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 1992. – Vol. 43, № 1. – P. 17-35. doi: 10.1016/0091-3057(92)90635-s
169. Joyce J., Ryan J., Owen A., Hu J., McHugh Power J., Shah R., Woods R., Storey E., Britt C., Freak-Poli R., ASPREE Investigator Group. Social isolation, social support, and loneliness and their relationship with cognitive health and dementia // International Journ. of geriatric psychiatry. – 2021. – Vol. 37, № 1. – P. 1-12. doi: 10.1002/gps.564
 170. Juraska J.M., Henderson C., Müller J. Differential rearing experience, gender, and radial maze performance // Developmental Psychobiology. – 1984. – Vol. 17, № 3. – P. 209-215. doi:10.1002/dev.420170302
 171. Karim A., Arslan M. Isolation modifies the behavioural response in rats // Bangladesh Medical Research Council bulletin. – 2000. – Vol. 26, № 1. – P. 27-32.
 172. Karkhanis A.N., Leach A.C., Yorgason J.T., Uneri A., Barth S., Niere F., et al. Chronic social isolation stress during peri-adolescence alters presynaptic dopamine terminal dynamics via augmentation in accumbal dopamine availability // ACS Chemical Neuroscience. – 2018. doi:10.1021/acscchemneuro.8b00360
 173. Karl T., Chwalisz W.T., Wedekind D., Hedrich H.J., Hoffmann T., Jacobs R., Pabst R., Von Horsten S. Localization, transmission, spontaneous mutations, and variation of function of the Dpp4 (Dipeptidyl-peptidase IV; CD26) gene in rats // Regul. Pept. – 2003a. – Vol. 115. – P. 81-90.
 174. Karl T., Hoffmann T., Pabst R., von Hörsten S. Extreme reduction of dipeptidyl peptidase IV activity in F344 rat substrains is associated with various behavioral differences // Physiol. Behav. – 2003b. – Vol. 80, № 1. – P. 123-134.
 175. Karpenko O., Syunyakov T.S., Kulygina M.A., Pavlichenko A.V., Chetkina A.S., Andrushchenko A.V. Impact of COVID-19 pandemic on anxiety, depression and distress - online survey results amid the pandemic in Russia // Consortium Psychiatricum. – 2020. – Vol. 1, № 1. – P. 8-20.

176. Keller-Wood M.E., Dallman M.F. Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion // *Endocrine Reviews*. – 1984. – Vol. 5, № 1. – P. 1-24. doi:10.1210/edrv-5-1-1
177. Kim Y.-K., Na K.-S., Myint A.-M., Leonard B.E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 2016. – Vol. 64. – P. 277-284. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.008
178. Kim T.W., Park S.S., Shin M.S., Park H.S., Baek S.S. Treadmill exercise ameliorates social isolation-induced memory impairment by enhancing silent information regulator-1 expression in rats // *Journ. Exerc. Rehabil.* – 2020. – Vol. 16. – P. 227-233. doi: 10.12965/jer.2040400.200
179. Knox S.S., Uvnäs-Moberg K. Social isolation and cardiovascular disease: an atherosclerotic pathway? *Psychoneuroendocrinology*. – 1998. – Vol. 23, № 8. – P. 877-890. doi:10.1016/s0306-4530(98)00061-4
180. Kokras N., Sotiropoulos I., Besinis D., Tzouveka E.L., Almeida O.F.X., Sousa N., Dalla C. Neuroplasticity-related correlates of environmental enrichment combined with physical activity differ between the sexes // *European Neuropsychopharmacology*. – 2018. doi:10.1016/j.euroneuro.2018.11.1107
181. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Tsorin I.B., Vititnova M.B., Kryzhanovskii S.A. Influence of social isolation stress on age-related changes in functional activity and expression of receptors of endogenous vasoconstrictors in rat aorta // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2021. – Vol. 170, № 4. – P. 405-409. doi: 10.1007/s10517-021-05076-9
182. Krebs-Thomson K., Giracello D., Solis A., Geyer M.A. Post-weaning handling attenuates isolation-rearing induced disruptions of prepulse inhibition in rats // *Behavioural Brain Research*. – 2001. – Vol. 120, № 2. – P. 221-224. doi: 10.1016/s0166-4328(00)00374-0

183. Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Neonatal Exposure to the Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors Diprotin A and Sitagliptin Induces Depression-Like Behavior, Anxiety, and Latent Aggression in Adolescent and Adult Rats // *Journal of Behavioral and Brain Science*. – 2016. – Vol. 6, № 4. – P. 167-183. doi: 10.4236/jbbs.2016.64018
184. 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. – P. 799. doi: 10.3390/brainsci10110799
185. Kumar R., Parameswaran S., Bavi R., Baek A., Son M., Rampogu S., Park C., Lee G., Zeb A., Parate S., Rana R.M., Lee K.W., Investigation of novel chemical scaffolds targeting prolyl oligopeptidase for neurological therapeutics // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2019. – Vol. 88. – P. 92-103. doi: 10.1016/j.jmgm.2018.12.006.
186. Kumsta R., Marzi S.J., Viana J., Dempster E.L., Crawford B., Rutter M., Mill J., Sonuga-Barke E.J.S. Severe psychosocial deprivation in early childhood is associated with increased DNA methylation across a region spanning the transcription start site of CYP2E1 // *Translational Psychiatry*. – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. e830. doi:10.1038/tp.2016.95
187. Labos E., Zabala K., Renato A., Trojanowski S., Del Rio M., Fustinoni O., Vázquez N. Restricción cognitiva durante la cuarentena por COVID-19 [Cognitive impairment during the COVID-19- social isolation period] // *Medicina*. – 2021. – Vol. 81, № 5. – P. 722–734.
188. Lapiz M.S.D., Mateo Y., Durkin S., Parker T., Marsden C.A. Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze // *Psychopharmacology*. – 2001. – Vol. 155, № 3. – P. 251-259. doi:10.1007/s002130100702
189. Laugesen K., Baggesen L.M., Schmidt S.A.J., Glymour M.M., Lasgaard M., Milstein A., Sørensen H.T., Adler N.E., Ehrenstein V. Social isolation and all-cause mortality: a population-based cohort study in

- Denmark // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 4731. doi:10.1038/s41598-018-22963-w
190. Lavenda-Grosberg D., Lalzar M., Leser N., Yaseen A., Malik A., Maroun M., Barki-Harrington L., Wagner S. Acute social isolation and regrouping cause short- and long-term molecular changes in the rat medial amygdala // Molecular psychiatry. – 2021. – P. 1-10. doi: 10.1038/s41380-021-01342-4
191. LeFevre J., McClintock M.K. Isolation accelerates reproductive senescence and alters its predictors in female rats // Hormones and Behavior. – 1991. – Vol. 25, № 2. – P. 258-272. doi:10.1016/0018-506x(91)90055-m
192. Leussis M.P., Andersen S.L. Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model // Synapse. – 2007. – Vol. 62, № 1. – P. 22-30. doi: 10.1002/syn.20462
193. Levshina I.P., Pasikova N.V., Shuikin N.N. Acquisition of a conditioned avoidance reflex and morphometric characteristics of the sensorimotor cortex in rats subjected to social deprivation in early ontogenesis // Neurosci. Behav. Physiol. – 2006. – Vol. 36. – P. 693-701. doi: 10.1007/s11055-006-0075-z
194. Li M., Du W., Shao F., Wang W. Cognitive dysfunction and epigenetic alterations of the BDNF gene are induced by social isolation during early adolescence // Behavioural Brain Research. – 2016. – Vol. 313. – P. 177-183. doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.025
195. Liu Q., Hazan A., Grinman E., Angulo J.A. Pharmacological activation of the neurotensin receptor 1abrogates the methamphetamine-induced striatal apoptosis in the mouse brain // Brain Res. – 2017. – Vol. 1659. – P. 148-155. doi: 10.1016/j.brainres.2017.01.029
196. Loades M.E., Chatburn E., Higson-Sweeney N., Reynolds S., Shafran R., Brigden A., Linney C., McManus M.N., Borwick C., Crawley E. Rapid Systematic Review: The Impact of Social Isolation and Loneliness on the

- Mental Health of Children and Adolescents in the Context of COVID-19 // Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry. – 2020. – Vol. 59, № 11. – P. 1218-1239.e3. doi:10.1016/j.jaac.2020.05.009
197. Lu L., Bao G., Chen H., Xia P., Fan X., Zhang J., Pei G., Ma L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments // Experimental Neurology. – 2003. – Vol. 18. – P. 600-609. doi:10.1016/S0014-4886(03)00248-6
 198. Lukkes J.L., Watt M.J., Lowry C.A., Forster G.L. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. // Frontiers in behavioral neuroscience. – 2009. – Vol. 3, № 18. – P. 1-12. doi:10.3389/neuro.08.018.2009
 199. Lupien S.J., McEwen B.S., Gunnar M.R., Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition // Nature Reviews Neuroscience. – 2009. – Vol. 10, № 6. – P. 434-445. doi:10.1038/nrn2639
 200. Ma Y.-K., Zeng P.-Y., Chu Y.-H., Lee C.-L., Cheng C.-C., Chen C.-H., Su Y.-S., Lin K.-T., Kuo T.-H. Lack of social touch alters anxiety-like and social behaviors in male mice // Stress. – 2022. – Vol. 25, № 1. – P. 134-144. doi: 10.1080/10253890.2022.2047174
 201. Mackes N.K., Golm D., Sarkar S., Kumsta R., Rutter M., Fairchild G., Mehta M.A., Sonuga-Barke E., ERA Young Adult Follow-up team. Early childhood deprivation is associated with alterations in adult brain structure despite subsequent environmental enrichment // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2020. – Vol. 117, № 1. – P. 641-649. doi:10.1073/pnas.1911264116
 202. Maes M., Goossens F., Scharpe S., Calabrese J., Desnyder R., et al. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs // Psychiatry Res. – 1995. – Vol. 58. – P. 217-225.

203. Malcolm M., Frost H., Cowie J. Loneliness and social isolation causal association with health-related lifestyle risk in older adults: a systematic review and meta-analysis protocol // *Syst Rev.* – 2019. – Vol. 8, № 48. – P. 1-8. doi:10.1186/s13643-019-0968-x
204. Mann L.M., Walker B.R. The role of equanimity in mediating the relationship between psychological distress and social isolation during COVID-19 // *Journ. Affect. Disord.* – 2022. – Vol. 296. – P. 370-379. doi: 10.1016/j.jad.2021.09.087. Epub 2021 Oct 2.
205. Maslova L.N., Bulygina V.V., Amstislavskaya T.G. Prolonged social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-term physiological and behavioral effects // *Neurosci. Behav. Physi.* – 2010. – Vol. 40. – P. 955-963. doi:10.1007/s11055-010-9352-y
206. Matisz C.E., Badenhorst C.A., Gruber A.J. Chronic unpredictable stress shifts rat behavior from exploration to exploitation // *Stress.* – 2021. – Vol. 24, № 5. – P. 635-644. doi: 10.1080/10253890.2021.1947235
207. Matsuda S., Tohyama S., Mizutani A. Sex differences in the effects of adult short-term isolation rearing on contextual fear memory and extinction // *Neuroscience letters.* – 2018. – Vol. 687. – P. 119-123. doi:10.1016/j.neulet.2018.09.030
208. Matteucci E., Giampietro O. Dipeptidyl Peptidase-4 (CD26): Knowing the Function before Inhibiting the Enzyme // *Current Medicinal Chemistry.* – 2009. – Vol. 16, № 23. – P. 2943-2951. doi: 10.2174/092986709788803114
209. Matthews T., Danese A., Wertz J., Odgers C.L., Ambler A., Moffitt T.E., Arseneault L. Social isolation, loneliness and depression in young adulthood: a behavioural genetic analysis // *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology.* – 2016. – Vol. 51, № 3. – P. 339-348. doi:10.1007/s00127-016-1178-7
210. McCormick C.M., Mathews I.Z. Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning

- and memory // Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. – 2010. – Vol. 34, № 5. – P. 756-765. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.09.019
211. McEwen B.S, Bowles N.P., Gray J.D., Hill M.N., Hunter R.G., Karatsoreos I.N., Nasca C. Mechanisms of stress in the brain // Nature Neuroscience. – 2015. – Vol. 18, № 10. – P. 1353-1363. doi:10.1038/nn.4086
212. McKibben C.E., Reynolds G.P., Jenkins T.A. Analysis of sociability and preference for social novelty in the acute and subchronic phencyclidine rat // Journ. Psychopharmacol. – 2014. – Vol. 28, № 10. – P. 955-963. doi:10.1177/0269881114544778
213. McLaughlin K.A., Sheridan M.A., Nelson C.A. Neglect as a Violation of Species-Expectant Experience: Neurodevelopmental Consequences // Biological psychiatry. – 2017. – Vol. 82, № 7. – P. 462-471. doi:10.1016/j.biopsych.2017.02.1096
214. McNamara M.C., Bepjignus G., Benignus V.A., Miller A.T. Active and passive avoidance in rats as a function of age // Experimental Aging Research. – 1977. – Vol. 3, № 1. – P. 3-16. doi:10.1080/03610737708257084
215. Meisinger C., Kandler U., Ladwig K.H. Living alone is associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus in men but not women from the general population: the MONICA/KORA Augsburg Cohort Study // Psychosom. Med. – 2009. – Vol. 71. – P. 784-788. doi: 10.1097/psy.0b013e3181ae5770
216. Melzack R. From the gate to the neuromatrix // Pain. – 1999. – Vol. 82, № S. – P. 121-126. doi:10.1016/S0304-3959(99)00145-1
217. Meng Q., Li N., Han X., Shao F., Wang W. Peri-adolescence isolation rearing alters social behavior and nociception in rats // Neuroscience Letters. – 2010. – Vol. 480, № 1. – P. 25-29. doi:10.1016/j.neulet.2010.05.067

218. Mentlein R., Dahms P., Grandt D., Krüger R. Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV // Regul Pept. – 1993. – Vol. 49, № 2. – P.133-144.
219. Mentzel S., Dijkman H.B., Van Son J.P., Koene R.A., Assmann K.J. Organ distribution of aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV in normal mice // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 1996. – Vol. 44, № 5. – P. 445-461. doi: 10.1177/44.5.8627002
220. Möller M., Du Preez J.L., Viljoen F.P., Berk M., Emsley R., Harvey B.H. et al. Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine // Brain Behav. Immun. – 2013. – Vol. 30. – P. 156-167. doi: 10.1016/j.bbi.2012.12.011
221. Morinan A., Leonard B.E. Some anatomical and physiological correlates of social isolation in the young rat // Physiology & Behavior. – 1980. – Vol. 24, № 3. – P. 63-640. doi:10.1016/0031-9384(80)90265-6
222. Morinan A., Parker V., Rich D.A., Cariuk P., Horton R.W. Social isolation does not alter brain regional benzodiazepine binding site numbers, affinity and coupling in the rat // Psychopharmacology. – 1992. – Vol. 106, № 4. – P. 565-569. doi:10.1007/bf02244831
223. Muchimapura S., Fulford A., Mason R., Marsden C. Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress // Neuroscience. – 2002. – Vol. 112, № 3. – P. 697-705. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00107-0
224. Mumtaz F., Khan M.I., Zubair M., Dehpour A.R. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 105. – P. 1205-1222. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.086
225. Myöhänen T.T., García-Horsman J.A., Tenorio-Laranga J., Männistö P.T. Issues about the physiological functions of prolyl oligopeptidase based on its discordant spatial association with substrates and inconsistencies

- among mRNA, protein levels, and enzymatic activity // *Journ. Histochem. Cytochem.* – 2009. – Vol. 57, № 9. – P. 831-848.
226. Myöhänen T.T., Venäläinen J.I., Tupala E., Garcia-Horsman J.A., Miettinen R., Männistö P.T. Distribution of immunoreactive prolyl oligopeptidase in human and rat brain // *Neurochem Res.* – 2007. – Vol. 32, № 8. – P. 1365-1374.
 227. Nakagawa Y., To M., Saruta J., Yamamoto Y., Yamamoto T., Shimizu T., Kamata Y., Matsuo M., Tsukinoki K. Effect of social isolation stress on saliva BDNF in rat // *Journal of Oral Science.* – 2019. – Vol. 61, № 4. – P. 516-520. doi:10.2334/josnugd.18-0409
 228. Nakazato T., Akiyama A. Behavioral activity and stereotypy in rats induced by l -DOPA metabolites: a possible role in the adverse effects of chronic l -DOPA treatment of Parkinson's disease // *Brain Research.* – 2002. – Vol. 930, № 1-2. – P. 134-142. doi:10.1016/s0006-8993(02)02238-2
 229. Naumova O.Y., Rychkov S.Y., Kornilov S.A., Odintsova V.V., Anikina V.O., Solodunova M.Y., et al. Effects of early social deprivation on epigenetic statuses and adaptive behavior of young children: A study based on a cohort of institutionalized infants and toddlers // *PLoS ONE.* – 2019. – Vol. 14, № 3. – P. e0214285. doi:10.1371/journal.pone.0214285
 230. Nazarova G.A., Zolotov N.N., Krupina N.A., Kraineva V.A., Garibova T.L., Voronina T.A. Changes in proline-specific peptidase activity in experimental model of retrograde amnesia // *Eksperim. klinich. farmakol.* – 2007. – Vol. 70. – P. 6-8. doi: 10.30906/0869-2092-2007-70-6-6-8
 231. Ness J.W., Marshall T.R., Aravich P.F. Effects of rearing condition on activity-induced weight loss // *Developmental Psychobiology.* – 1995. – Vol. 28, № 3. – P. 165-173. doi:10.1002/dev.420280304
 232. Niesink R.J.M., Van Ree J.M. Short-term isolation increases social interactions of male rats: A parametric analysis // *Physiology & Behavior.* – 1982a. – Vol. 29, № 5. – P. 819-825. doi:10.1016/0031-9384(82)90331-6

233. Niesink R.J.M., Van Ree J.M. Antidepressant drugs normalize the increased social behaviour of pairs of male rats induced by short term isolation // *Neuropharmacology*. – 1982b. – Vol. 21, № 12. – P. 1343-1348. doi:10.1016/0028-3908(82)90144-7
234. Nishikawa T., Kajiwara Y., Köno Y., Sano T., Nagasaki N., Tanaka M. Different Effect of social isolation on the levels of brain monoamines in post-weaning and young-adult rat // *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. – 1976. – Vol. 30, № 1. – P. 57-63. doi:10.1111/j.1440-1819.1976.tb00111.x
235. Niu L., Shi Luo S., Xu Y., Wang Z., Luo D., Yang H. et al. The critical role of the hippocampal NLRP3 inflammasome in social isolation-induced cognitive impairment in male mice // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2020. – e107301. doi: 10.1016/j.nlm.2020.107301
236. Nugent N.R., Tyrka A.R., Carpenter L.L. et al. Gene–environment interactions: early life stress and risk for depressive and anxiety disorders // *Psychopharmacology*. – 2011. – Vol. 214. – P. 175-196. doi: 10.1007/s00213-010-2151-x
237. Nykjaer A., Willnow T.E. Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function // *Trends Neurosci*. – 2012. – Vol. 35. – P. 261-270, doi: 10.1016/j.tins.2012.01.003
238. Obreja O., Rathee P.K., Lips K.S., Distler C., Kress M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. – 2002. – Vol. 16, № 12. – P. 1497-1503. doi: 10.1096/fj.02-0101com
239. Panksepp J. Brief social isolation, pain responsivity, and morphine analgesia in young rats // *Psychopharmacology*. – 1980. – Vol. 72, № 1. – P. 111-112. doi:10.1007/bf00433816
240. Pantell M., Rehkopf D., Jutte D., Syme S.L., Balmes J., Adler N. Social Isolation: A Predictor of Mortality Comparable to Traditional Clinical

- Risk Factors // American Journal of Public Health. – 2013. – Vol. 103, № 11. – P. 2056-2062. doi:10.2105/ajph.2013.301261
241. Park H.S., Kim T.W., Park S.S., Lee S.J. Swimming exercise ameliorates mood disorder and memory impairment by enhancing neurogenesis, serotonin expression, and inhibiting apoptosis in social isolation rats during adolescence // Journ. Exerc. Rehabil. – 2020. – Vol. 16. – P. 132-140. doi: 10.12965/jer.2040216.108
242. Park S.S., Park H.S., Kim T.W., Lee S.J. Effects of swimming exercise on social isolation-induced memory impairment and apoptosis in old rats // Journ. Exerc. Rehabil. – 2020. – Vol. 16. – P. 234-241, doi: 10.12965/jer.2040366.183
243. Pechtel P., Pizzagalli D.A. Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature // Psychopharmacology. – 2011. – Vol. 214, № 1. – P. 55-70. doi:10.1007/s00213-010-2009-2
244. Pellow Sh., Chopin Ph., File S.E., Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // Neuroscience. Meth. – 1985. – Vol. 14. – P. 149-167. doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7
245. Peltonen I., Myöhänen T.T., Männistö P.T. Different interactions of prolyl oligopeptidase and neurotensin in dopaminergic function of the rat nigrostriatal and mesolimbic pathways // Neurochem. Res. – 2012. – Vol. 37. – P. 2033-2041. doi: 10.1007/s11064-012-0825-y
246. Penttinen A., Tenorio-Laranga J., Siikanen A., Morawski M., Robner S., Garcia-Horsman A.J. Prolyl Oligopeptidase: A rising star on the stage of neuroinflammation research // CNS & Neurological Disorders – Drug Targets. – 2011. – Vol. 10, № 3. – P. 340-348. doi: 10.2174/187152711794653742

247. Perissinotto C.M., Stijacic C.I., Covinsky K.E. Loneliness in older persons // Archives of Internal Medicine. – 2012. – Vol. 172, № 14. – P. 1078-1084. doi:10.1001/archinternmed.2012.1993
248. Perlman D., Peplau L. Toward a social psychology of loneliness // Personal relationships in disorder. – 1981. – Vol. 3. – P. 31-43.
249. Perrot-Sinal T.S., Kostenuik M.A., Ossenkopp K.-P., Kavaliers M. Sex differences in performance in the morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training // Behavioral Neuroscience. – 1966. – Vol. 110, № 6. – P. 1309-1320.
250. Pilat D., Rojewska E., Jurga A. M., Piotrowska A., Makuch W., Przewlocka B., Mika J. IL-1 receptor antagonist improves morphine and buprenorphine efficacy in a rat neuropathic pain model // European Journal of Pharmacology. – 2015. – Vol. 764. – P. 240-248. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.058
251. Pisu M.G., Garau A., Boero G., Biggio F., Pibiri V., Dore R., Locci V., Paci E., Porcu P., Serra M. Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats // Neuroscience. – 2016. – Vol. 320. – P. 172-182. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.009
252. Pressman S.D., Cohen S., Miller G.E., Barkin A., Rabin B.S., Treanor J.J. Loneliness, social network size, and immune response to influenza vaccination in college freshmen // Health Psychol. – 2005. – Vol. 24. – P. 297-306. doi: 10.1037/0278-6133.24.3.297
253. Preston A.J., Rew L. Connectedness, Self-Esteem, and Prosocial Behaviors Protect Adolescent Mental Health Following Social Isolation: A Systematic Review // Issues in Mental Health Nursing. – 2021. – P. 1–10. doi:10.1080/01612840.2021.1948642
254. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // Pharmacol. - 1978. – Vol. 47, № 2. – P. 379-391. doi:10.1016/0014-2999(78)90118-8

255. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 463, № (1-3). – P. 3-33.
256. Pugh C. Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation // *Behavioural Brain Research.* – 1999. – Vol. 106, № 1-2. – P. 109-118. doi: 10.1016/s0166-4328(99)00098-4
257. Quan M.N., Tian Y.T., Xu K.H., Zhang T., Yang Z. Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats // *Neuroscience.* – 2010. – Vol. 169. – P. 214-222. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.04.048
258. Ramos-Ortolaza D.L., Doreste-Mendez R.J., Alvarado-Torres J.K., Torres-Reveron A. Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress // *Behavioural Brain Research* – 2017. – Vol. 328. – P. 115 122. doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.016
259. Redolat R., Pérez-Martínez A., Carrasco M.C., Mesa P. Individual differences in novelty-seeking and behavioral responses to nicotine: a review of animal studies // *Current drug abuse reviews.* – 2009. – Vol. 2, № 3. – P. 230-242. doi: 10.2174/1874473710902030230
260. Riva P., Wesselmann E.D., Wirth J.H., Carter-Sowell A.R., Williams K.D. When pain does not heal: The common antecedents and consequences of chronic social and physical pain // *Basic and Applied Social Psychology* – 2014. – Vol. 36, № 4. – P. 329-346. doi:10.1080/01973533.2014.917975
261. Rivera-Irizarry J.K., Skelly M.J., Pleil K.E. Social isolation stress in adolescence, but not adulthood, produces hypersocial behavior in adult male and female C57BL/6J mice // *Front. Behav. Neurosci.* – 2020. – Vol. 14. – P. 129. doi:10.3389/fnbeh.2020.00129

262. Rivier C., Vale W. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: A pituitary-mediated mechanism // *Endocrinology*. – 1987. – Vol. 121, № 4. – P. 1320–1328. doi:10.1210/endo-121-4-1320
263. Rosa M.L.N.M., Nobre M.J., Oliveira A.R., Brandão M.L. Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats // *Neuropsychobiology*. – 2005b. – Vol. 51, № 4. – P. 248-255. doi: 10.1159/000085820
264. Rosa M.L.N.M., Silva R.C.B., Moura-de-Carvalho F.T., Brandão M.L., Guimarães F.S., Del Bel E. Routine post-weaning handling of rats prevents isolation rearing-induced deficit in prepulse inhibition // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2005a. – Vol. 38, № 11. – P. 1691-1696. doi: 10.1590/s0100-879x2005001100018
265. Ross A.P., Norvelle A., Choi D.C., Walton J.C., Albers H.E., Huhman K.L. Social housing and social isolation: Impact on stress indices and energy balance in male and female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) // *Physiology & Behavior*. – 2017. – Vol. 177. – P. 264-269. doi:10.1016/j.physbeh.2017.05.015
266. Rudy J.W., Kuwagama K., Pugh C.R. Isolation reduces contextual but not auditory-cue fear conditioning: A role for endogenous opioids // *Behavioral Neuroscience*. – 1999. – Vol. 113, № 2. – P. 316-323. doi: 10.1037/0735-7044.113.2.316
267. Sahakian B.J., Burdess C., Luckhurst H., Trayhurn P. Hyperactivity and obesity: The interaction of social isolation and cafeteria feeding // *Physiology & Behavior*. – 1982. – Vol. 28, № 1. – P. 117-124. doi:10.1016/0031-9384(82)90112-3
268. Sakurada S., Hayashi T., Katsuyama S., Tan-No K., Sakurada T. Degradation of endomorphin-2 at the supraspinal level in mice is initiated by dipeptidyl peptidase IV: an in vitro and in vivo study // *Biochem.Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66. – P. 653-661.

269. Sánchez M.M., Aguado F., Sanchez-Toscano F., Saphier D. Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation // *Endocrinology*. – 1998. – Vol. 139. – P. 579-587. doi: 10.1210/endo.139.2.5720
270. Sandi C., Haller J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2015. – Vol. 16, № 5. – P. 290-304. doi:10.1038/nrn3918
271. Schneider T., Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism // *Neuropsychopharmacol.* – 2004. – Vol. 30, № 1. – P. 80-89. doi: 10.1038/sj.npp.1300518
272. Schrijver N.C.A., Bahr N.I., Weiss I.C., Wurbel H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. – 2002. – Vol. 73. – P. 209-224. doi:10.1016/S0091-3057(02)00790-6
273. Schrijver N.C.A., Pallier P.N., Brown V.J., Würbel H. Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats // *Behavioural Brain Research*. – 2004. – Vol. 152. – P. 307-331. doi: 10.1016/j.bbr.2003.10.016
274. Schubert M.I., Porkess M.V., Dashdorj N., Fone K.C.F., Auer D.P. Effects of social isolation rearing on the limbic brain: A combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. // *Neuroscience*. – 2009. – Vol. 159, № 1. – P. 21-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.019
275. Seillier A., Giuffrida A. Disruption of social cognition in the sub-chronic PCP rat model of schizophrenia: Possible involvement of the endocannabinoid system // *Europ. Neuropsychopharmacol.* – 2016. – Vol. 26, № 2. – P. 298-309. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.12.009

276. Selye H. Stress. The Physiology and Pathology of Exposure to Stress // Montreal. – 1950. – P. 1-1025.
277. Serra M., Pisu M.G., Floris I., Biggio G. Social isolation-induced changes in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat // Stress. – 2005. – Vol. 8, № 4. – P. 259-264. doi:10.1080/10253890500495244
278. Serra M., Pisu M.G., Floris I., Cara V., Purdy R.H., Biggio G. Social isolation-induced increase in the sensitivity of rats to the steroidogenic effect of ethanol // Journ. of Neurochemistry. – 2003. – Vol. 85, № 1. – P. 257-263. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01680.x
279. Serra M., Pisu M.G., Littera M., Papi G., Sanna E., Tuveri F., Usala L., Purdi R.H., Biggio G. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABAA receptor function in rat brain // Journal of Neurochemistry. – 2000. – Vol. 75, № 2. – P. 732-740. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750732.x
280. Shabani M., Nazeri M., Parsania S., Golchin L., Razavinasab M., Abareghi F., Kermani M. Simultaneous impairment of passive avoidance learning and nociception in rats following chronic swim stress // Adv. Biomed. Res. – 2016. – Vol. 5. – P. 93.
281. Shankar A., McMunn A., Banks J., Steptoe A. Loneliness, social isolation, and behavioral and biological health indicators in older adults // Health Psychology. – 2011. – Vol. 30, № 4. – P. 377-385. doi: 10.1037/a0022826
282. Shannon R.P. DPP-4 inhibition and neuroprotection: do mechanisms matter? // Diabetes. – 2013. – Vol. 62. – P. 1029-1031. doi: 10.2337/db12-1794
283. Shao Y., Yan G., Xuan Y., Peng H., Huang Q.-J., Wu R., Xu H. Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus // Behavioural Brain Research. – 2015. – Vol. 282. – P. 201-208. doi:10.1016/j.bbr.2015.01.005

284. Sharma A.N., Pise A., Sharma J.N., Shukla P. Dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) inhibitor delays tolerance to anxiolytic effect of ethanol and withdrawal-induced anxiety in rats // *Metabolic Brain Disease*. – 2014. Vol. 30, № 3. – P. 659-667. doi: 10.1007/s11011-014-9603-7
285. 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 // *Bòl.* – Vol. 20, № 5. – P. 40. Krakov, June 22-27, 2019
286. 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)*. – 2021. – P. 22. London, March 8-9, 2021.
287. Shirenova S.D., Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Glucocorticoid receptor expression in brain structures of socially isolated rats // «2nd Clinical neurology and neurosurgery congress». – 2021. – P. 10. Berlin, July 15-16, 2021
288. Siddiqui N., Ali J., Parvez S., Zameer S., Najmi A.K., Akhtar M. Linagliptin, a DPP-4 inhibitor, ameliorates A β (1–42) peptides induced neurodegeneration and brain insulin resistance (BIR) via insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat model of Alzheimer's disease // *Neuropharmacology*. – 2021. – Vol. 195, № 108662. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108662
289. Sim A.Y., Barua S., Kim J.Y., Lee Y.-H., Lee J.E. Role of DPP-4 and SGLT2 Inhibitors Connected to Alzheimer Disease in Type 2 Diabetes Mellitus // *Front. Neurosci.* – 2021. – Vol. 15. – P. 708547. doi: 10.3389/fnins.2021.708547
290. Smith A.S., Wang Z. Hypothalamic oxytocin mediates social buffering of the stress response // *Biol. Psychiatry*. – 2014. – Vol. 76, № 4. – P. 281-288.

291. Smith S.S. Female sex steroid hormones: From receptors to networks to performance - actions on the sensorimotor system // *Prog. Neurobiol.* – 1994. – Vol. 44. – P. 55-86.
292. Social isolation and loneliness among older people: advocacy brief. Geneva: World Health Organization; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. – 2021.
293. Sotnikova T.D., Beaulieu J.-M., Espinoza S., Masri B., Zhang X., Salahpour A., et al. The Dopamine Metabolite 3-Methoxytyramine Is a Neuromodulator // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, № 10. – P. e13452. doi: 10.1371/journal.pone.0013452
294. Spevak A.M., Quadagno D.M., Knoepfel D., Poggio J.P. The effects of isolation on sexual and social behavior in the rat // *Behavioral Biology*. – 1973. – Vol. 8, № 1. – P. 63-73. doi:10.1016/s0091-6773(73)80007-0
295. Stern J.A., Winokur G., Eisenstein A., Taylor R., Sly M. The effect of group vs. individual housing on behaviour and physiological responses to stress in the albino rat // *Journ. of Psychosomatic Research*. – 1960. – Vol. 4, № 3. – P. 185-190. doi:10.1016/0022-3999(60)90010-6
296. Sturgeon J.A, Zautra A.J. Social pain and physical pain: shared paths to resilience // *Pain Management*. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 63-74. doi:10.2217/pmt.15.56
297. Sun L., Min L., Li M., Shao F., Wang W. Transcriptomic analysis reveals oxidative phosphorylation activation in an adolescent social isolation rat model // *Brain Research Bulletin*. – 2018. – Vol. 142. – P. 304-312. doi:10.1016/j.brainresbull.2018.08.013
298. Swerdlow N.R., Light G.A., Thomas M.L. et al. Deficient prepulse inhibition in schizophrenia in a multi-site cohort: Internal replication and extension // *Schizophrenia Research*. – 2018. – Vol. 198. – P. 6-15. doi:10.1016/j.schres.2017.05.013

299. Syme L.A. Social isolation at weaning: Some effects on two measures of activity // *Animal Learning & Behavior*. – 1973. – Vol. 1. – P. 161-163. doi: 10.3758/BF03199065
300. Szeltner Z., Polgar L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase // *Current protein & peptide science*. – 2008. – Vol. 9, № 1. – P. 96-107.
301. Tada H., Miyazaki T., Takemoto K., Jitsuki S., Nakajima W., Koide M., Yamamoto N., Taguchi A., Kawai H., Komiya K., Suyama K., Abe H., Sano A., Takahashi T. Social isolation suppresses actin dynamics and synaptic plasticity through ADF/cofilin inactivation in the developing rat barrel cortex // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 8471. doi:10.1038/s41598-017-08849-3
302. Tapias-Espinosa C., Río-Álamos C., Sánchez-González A., Oliveras I., Sampedro-Viana D., del Mar Castillo-Ruiz M., Canete T., Tobena A., Fernández-Teruel, A. Schizophrenia-like reduced sensorimotor gating in intact inbred and outbred rats is associated with decreased medial prefrontal cortex activity and volume // *Neuropsychopharmacology*. – 2019. – Vol. 0. – P. 1-10, doi:10.1038/s41386-019-0392-x
303. Teng H.K., Teng K.K., Lee R., Wright S., Tevar S., et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin // *Journ. Neurosci*. – 2005. – Vol. 25. – P. 5455-5463. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005.
304. Tomazini F.M., Reimer A., Albrechet-Souza L., Brandão M.L. Opposite effects of short- and long-duration isolation on ultrasonic vocalization, startle and prepulse inhibition in rats // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2006. – Vol. 153, № 1. – P. 114-120. doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.10.007
305. Trabace L., Zotti M., Colaianna M., Morgese M.G., Schiavone S., Tucci P., Harvey B.H., Wegener G., Cuomo V. Neurochemical differences in two rat strains exposed to social isolation rearing // *Acta*

- neuropsychiatrica. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 286-295. doi: 10.1111/j.1601-5215.2011.00627.x
306. Tragantzopoulou P., Giannouli, V. Social isolation and loneliness in old age: Exploring their role in mental and physical health // *Psychiatriki*. – 2021. – Vol. 32, № 1. – P. 59–66. doi: 10.22365/jpsych.2021.009
307. Tuboly G., Benedek G., Horvath G. Selective disturbance of pain sensitivity after social isolation // *Physiol. & Behav.* – 2009. – Vol. 96, № 1. – P. 0-22. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.030
308. Ullah M.F., Ahmad A., Bhat S.H., Abu-Duhier F.M., Barreto G.E., Ashraf G.M. Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders // *Neuroscience and biobehavioral reviews*. – 2019. – Vol. 102. – P. 95-105. doi:10.1016/j.neubiorev.2019.04.003
309. Valiensi S.M., Folgueira A.L., Garay A. Early impact on sleep and mental health during the mandatory social isolation of COVID-19 outbreak: an observational cross-sectional study carried out in Argentina // *Sleep Sci.* – 2022. – Vol. Spec1. – P. 41-48. doi: 10.5935/1984-0063.20200121
310. Valtorta N.K., Kanaan M., Gilbody S., Ronzi S., Hanratty B. Loneliness and social isolation as risk factors for coronary heart disease and stroke: systematic review and meta-analysis of longitudinal observational studies // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2016. – Vol. 102, № 13. – P. 1009-1016. doi:10.1136/heartjnl-2015-308790
311. van Ijzendoorn M.H., Luijk M.P.C.M, Juffer F. IQ of Children Growing Up in Children's Homes: A Meta-Analysis on IQ Delays in Orphanages // *Merrill-Palmer Quarterly*. – 2008. – Vol. 54, № 3. – P. 341-366. doi:10.1353/mpq.0.0002
312. Varty G.B., Braff D.L., Geyer M.A. Is there a critical developmental 'window' for isolation rearing-induced changes in prepulse inhibition of the acoustic startle response? // *Behavioural Brain Research*. – 1999a. – Vol. 100, № 1-2. – P. 177-183. doi: 10.1016/s0166-4328(98)00129-6

313. Varty G.B., Geyer M.A. Effects of isolation rearing on startle reactivity, habituation, and prepulse inhibition in male Lewis, Sprague-Dawley, and Fischer F344 rats // *Behavioral Neuroscience*. – 1998. – Vol. 112, № 6. – P. 1450-1457. doi: 10.1037/0735-7044.112.6.1450
314. Varty G.B., Marsden C.A., Higgins G.A. Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats // *Brain Res.* – 1999b. – Vol. 824. – P. 197-203, doi: 10.1016/s0006&8993(99)01173&7
315. Varty G.B., Paulus M.P., Braff D.L., Geyer M.A. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity // *Biological psychiatry*. – 2000. – Vol. 47, № 10. – P. 864-873. doi: 10.1016/s0006-3223(99)00269-3
316. Veenema A.H. Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: What can we learn from animal models? // *Frontiers in Neuroendocrinology*. – 2009. – Vol. 30, № 4. – P. 497-518. doi:10.1016/j.yfrne.2009.03.003
317. Victor C., Scambler S., Bowling A., Bong J. The prevalence of, and risk factors for, loneliness in later life: A survey of older people in Great Britain // *Ageing and Society*. – 2005. – Vol. 25, № 6. – P. 357-375. doi:10.1017/S0144686X04003332
318. Vitellius G., Trabado S., Bouligand J., Delemer B., Lombès M. Pathophysiology of glucocorticoid signaling // *Annales d'Endocrinologie*. – 2018. – Vol. 79, № 3. – P. 98-106. doi:10.1016/j.ando.2018.03.001
319. Viveros M.P., Hernandez R., Gallego A. Effects of social isolation and crowding upon active-avoidance performance in the rat // *Animal Learning & Behavior*. – 1990. – Vol. 18, № 1. – P. 90-96. doi:10.3758/bf03205243
320. Vorhees C.V., Herring N.R., Schaefer T.L., Grace C.E., Skelton M.R., Johnson H.L., Williams M.T. Effects of neonatal (+)-methamphetamine on

- path integration and spatial learning in rats: effects of dose and rearing conditions. *International journal of developmental neuroscience* // The official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. – 2008. – Vol. 26, № 6. – P. 599-610. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.04.002
321. Vorhees C.V., Williams M.T. Assessing spatial learning and memory in rodents // *ILAR Journ.* – 2014. – Vol. 55, № 2. – P. 310-332. doi:10.1093/ilar/ilu013
322. Vrankova S., Galandakova Z., Benko J., Cebova M., Riecansky I., Pechanova O. Duration of social isolation affects production of nitric oxide in the rat brain // *International journal of molecular sciences.* – 2021. – Vol. 22, № 19. – P. 10340. <https://doi.org/10.3390/ijms221910340>
323. Walker E., Ploubidis G., Fancourt D. Social engagement and loneliness are differentially associated with neuro-immune markers in older age: time-varying associations from the English Longitudinal Study of Ageing // *Brain Behav. Immun.* – 2019. – Vol. 82. – P. 224–229. doi: 10.1016/j.bbi.2019.08.189
324. Wang M., Xie Y., Qin D. Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases // *Brain Res. Bull.* 2021. – Vol. 166. – P. 172-184. doi:10.1016/j.brainresbull.2020.11.005
325. Weiss I.C., Di Iorio L., Feldon J., Domeney A.M. Strain differences in the isolation-induced effects on prepulse inhibition of the acoustic startle response and on locomotor activity // *Behavioral Neuroscience.* – 2000. – Vol. 114, № 2. – P. 364-373. doi: 10.1037/0735-7044.114.2.364
326. Weiss I.C., Feldon J., Domeney A.M. Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition // *Behavioural Pharmacology.* – 1999. – Vol. 10, № 2. – P. 139-149. doi: 10.1097/00008877-199903000-00003
327. Weiss I.C., Pryce C.R., Jongen-Rêlo A.L., Nanz-Bahr N.I., Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine

- state in the rat // Behavioural Brain Research. – 2004. – Vol. 152, № 2. – P. 279-295. doi:10.1016/j.bbr.2003.10.015
328. Wilbarger J., Gunnar M., Schneider M., Pollak S. Sensory processing in internationally adopted, post-institutionalized children // Journ. Child Psychol. Psychiatry. – 2010. – Vol. 51, № 10. – P. 1105–1114. doi:10.1111/j.1469-7610.2010.02255.x
329. Wilkinson L.S., Killcross S.S., Humby T., Hall F.S., Geyer M.A., Robbins T.W. Social Isolation in the rat produces developmentally specific deficits in prepulse inhibition of the acoustic startle response without disrupting latent inhibition // Neuropsychopharmacology. – 1994. – Vol. 10, № 1. – P. 61-72. doi: 10.1038/npp.1994.8
330. Williams M.T., Moran M.S., Vorhees C.V. Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats. International journal of developmental neuroscience // The official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. – 2004. – Vol. 22, № 5-6. – P. 273-283. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.04.003
331. Willner, P., Muscat, R., Papp, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression // Neuroscience and biobehavioral reviews. – 1992. – Vol. 16, № 4. – P. 525-534. doi:10.1016/s0149-7634(05)80194-0
332. Wongwitdecha N., Kasemsook C., Plasen S. Social isolation alters the effect of desipramine in the rat forced swimming test // Behavioural Brain Research. – 2006. – Vol. 167, № 2. – P. 232-236. doi:10.1016/j.bbr.2005.09.010
333. Wongwitdecha N., Marsden C. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test // Behav. Brain Res. – 1996. – Vol. 75. – P. 27-32.
334. Xu H., He J., Richardson J.S., Li X.-M. The response of synaptophysin and microtubule-associated protein 1 to restraint stress in rat

- hippocampus and its modulation by venlafaxine // *Journ. of Neurochem.* – 2004. – Vol. 91, № 6. – P. 1380-1388. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02827.x
335. Yaron A., Naider F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 28. – P. 31-81.
336. Yau S.-Y., Li A., Zhang E.-D., Christie B.R., Xu A., Lee T.M.C., So K.-F. Sustained running in rats administered corticosterone prevents the development of depressive behaviors and enhances hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity without increasing neurotrophic factor levels // *Cell Transplantation.* – 2014. – Vol. 23, № 4-5. – P. 481-492. doi: 10.3727/096368914x678490
337. Yildirim E., Erol K., Ulupinar E. Effects of sertraline on behavioral alterations caused by environmental enrichment and social isolation // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* – 2012. – Vol. 101, № 2. – P. 278-287. doi:10.1016/j.pbb.2011.12.017
338. Yu B., Steptoe A., Chen Y., Jia, X. Social isolation, rather than loneliness, is associated with cognitive decline in older adults: the China health and retirement longitudinal study // *Psychological Medicine.* – 2021. – P. 1-8. doi:10.1017/s0033291720001026
339. Zahm D.S. Neurotensin-immunoreactive neurons in the ventral striatum of the adult rat: ventromedial caudate putamen, nucleus accumbens and olfactory tubercle // *Neurosci. Lett.* – 1987. – Vol. 81. – P. 41-47. doi: 10.1016/0304-3940(87)90337-5
340. Zhang D., Lin Z., Chen F., Li S. What could interfere with a good night's sleep? The risks of social isolation, poor physical and psychological health among older adults in china // *Research on Aging.* – 2022. – 1640275211065103. doi: 10.1177/01640275211065103
341. Zhang X., Xun Y., Wang L., Zhang J., Hou W., Ma H., et al. Involvement of the dopamine system in the effect of chronic social

- isolation during adolescence on social behaviors in male C57 mice // *Brain Research*. – 2021. – Vol. 1765, № 147497. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147497
342. Zhao X., Sun L., Jia H., Meng Q., Wu S., Li N., He S. Isolation rearing induces social and emotional function abnormalities and alters glutamate and neurodevelopment-related gene expression in rats // *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. – 2009. – Vol. 33, № 7. – P. 1173-1177. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.06.016
343. Zhong J., Rajagopalan S. Dipeptidyl peptidase-4 regulation of SDF-1/CXCR4 axis: Implications for cardiovascular disease // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6. doi: 10.3389/fimmu.2015.00477
344. Zhu L., Tamvakopoulos C., Xie D., Dragovic J., Shen X., Fenyk-Melody J.E., Schmidt K., Bagchi A., Griffin P.R., Thornberry N.A., Sinha R.R. The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide [1-38] // *J Biol.Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 22418-22423.
345. Zlatković J., Filipović D. Chronic social isolation induces NF-κB activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex // *Neurochemistry International*. – 2013. – Vol. 63, № 3. – P. 172-179. doi:10.1016/j.neuint.2013.06.002
346. Zubkov E.A., Zorkina Y.A., Orshanskaya E.V., Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Chekhonin V.P. Post-Weaning Social Isolation Disturbs Gene Expression in Rat Brain Structures // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 166, № 3. – P. 364-368. doi:10.1007/s10517-019-04351-0