

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:  
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ,  
ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 616-092.9

**ДЛИТЕЛЬНАЯ СОЦИАЛЬНАЯ ИЗОЛЯЦИЯ УХУДШАЕТ ОБУЧЕНИЕ  
В ЗАДАЧЕ ДВУСТОРОННЕГО АКТИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ  
У САМОК КРЫС**

© 2024 г. Н. А. Крупина\*, Н. Н. Хлебникова

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение*

*«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия*

*\*e-mail: krupina-na@yandex.ru*

Поступила в редакцию 10.07.2024 г.

После доработки 20.08.2024 г.

Принята к публикации 09.09.2024 г.

Дефицит социальных контактов у социально живущих видов, включая людей, провоцирует развитие хронического стресса, приводящего к расстройствам в психоэмоциональной сфере, развитию нарушений когнитивных функций и др. Ранее мы показали, что нарушения пространственной памяти и пассивного избегания у крыс, подвергнутых многомесячной социальной изоляции (СИ) с раннего возраста, более выражены у самок по сравнению с самцами. Исследований на самках недостаточно. Целью настоящей работы были оценка обучения в тесте условного рефлекса активного избегания (УРАИ) в парадигме двустороннего избегания и проверка сохранности навыка у самок, подвергнутых СИ, начинавшейся после отсаживания крысят от матери и продолжавшейся до 10 мес. Обучение крыс в тесте УРАИ начинали после 6.5 мес СИ, когда уровень тревожности и выраженность груминга у них были ниже, чем у крыс, которых содержали в группах. Крысы, подвергнутые СИ, совершали меньше реакций избегания, но больше реакций избавления, а также реже достигали критерия научения. Через 24 ч после обучения латентный период реакций избавления у изолированных крыс был повышен, а максимальное число реакций избегания подряд – снижено. Через 2 мес после обучения не выявлено различий в сохранности УРАИ между крысами, проживавшими в разных условиях содержания. После 10 мес СИ уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс был ниже, чем у крыс контрольной группы. Полученные результаты свидетельствуют о худшем обучении и сохранении навыка через сутки после обучения в тесте УРАИ у крыс под влиянием длительной СИ.

*Ключевые слова:* длительная социальная изоляция, самки крыс, двусторонний условный рефлекс активного избегания, тревожность, груминг, двигательная и исследовательская активность, болевая чувствительность в тесте «Hot Plate», кортикостерон

**DOI:** 10.31857/S0044467724060076

Дефицит социальных контактов у социально живущих видов, включая людей, провоцирует развитие хронического стресса, приводящего к неблагоприятным последствиям для ЦНС – расстройствам в психоэмоциональной сфере (da Silva et al., 2024; Lapiz et al., 2003; Mumtaz et al., 2018; Santini et al., 2020), нарушениям коммуникабельности, смене и появлению неадаптивных стратегий преодоления (Ширенова и др., 2022a; Guo et al., 2024; Tanaka et al., 2019), усилению восприимчивости к действию других стрессоров (Sailer et al., 2022). СИ провоцирует развитие нарушений когнитивных функций (Крупина, Ширенова, 2023), что проявляется нарушением способности к переключению внимания (McLean et al., 2008), дефектами ассоциативного обучения (Левшина и др., 2005;

Del Arco et al., 2004; Krupina et al., 2020) и привыкания (неассоциативного обучения) по показателям локомоторной активности и акустического стартл-ответа (Хлебникова и др. 2018; Weiss et al., 2004), пространственной памяти (Крупина et al., 2020), распознавания социального и нового объекта (Bianchi et al., 2006; Mumtaz et al., 2018). Однако нарушения привыкания (по локомоторной активности), пространственной памяти, а также распознавания нового объекта под влиянием СИ выявляются не всегда (Хлебникова и др. 2018; Broadfoot et al., 2023; Nikolaienko et al., 2023). Более того, СИ может приводить к улучшению показателей памяти при обучении в водном лабиринте Морриса и распознавании новых объектов (см. табл. 1 в обзоре (Крупина, Ширенова, 2023)).

Различные формы защитного поведения подвержены влиянию хронического стресса СИ (Zelikowsky et al., 2018) — это снижение контекстуальной обусловленности страхом, повышенная реактивность на электрошок, усиление фризинга в ответ на угрожающий ультразвуковой стимул и др. Ухудшение выработки условного рефлекса активного избегания (УРАИ) было показано у самцов крыс Wistar и у крыс Sprague-Dawley обоего пола после 1.5–2 мес СИ, которую начинали сразу после отсаживания от матери (Левшина и др., 2005; Viveros et al., 1990); отмечено (Viveros et al., 1990), что самки справлялись с решением задачи в тесте УРАИ лучше, чем самцы. В работах последних лет многие авторы отмечают недостаточность доклинических исследований на самках (Mauvais-Jarvis et al., 2017), и этот пробел требует восполнения.

Подростковый возраст — это период развития, связанный со значительными изменениями в ЦНС, приводящими под влиянием внешних и внутренних факторов к формированию того или иного типа реагирования на воздействия у взрослых особей, в основе чего лежат изменения чувствительности к стрессорирующим стимулам и вознаграждению, во многом обусловленные нейропластическими изменениями (Dayananda et al., 2023; Walker et al., 2019). В последнее время влияние неблагоприятных воздействий в раннем возрасте связывают с включением трансгенерационных механизмов наследования (выделяют роль эпигенетики, митохондрий, некодирующих РНК) (Holuka et al., 2024), что определяет стойкость возникающих нарушений. К неблагоприятным стрессорирующим факторам раннего возраста относятся в том числе уязвимость перед социальными невзгодами, например СИ в сенситивный период развития (подростковый период у крыс) (Lapiz et al., 2003; Lukkes et al., 2009; Miskolczi et al., 2019).

В подавляющем большинстве исследований оценку когнитивных функций у грызунов проводили после СИ с ранним началом и длительностью не более 4 мес. В наших исследованиях на модели СИ, которая начиналась после отсаживания крысят от матери и продолжалась до 9 мес, нарушения пространственной памяти и пассивного избегания оказались более выражены у самок по сравнению с самцами (Krupina et al., 2020). По результатам оценки поведения и состояния ГГА-оси мы предположили развитие у самок крыс адаптивных изменений в течение длительной СИ (Ширенова и др., 2021; Ширенова и др., 2022а, 2022б). Однако до сих пор не известно, оказывает ли СИ, пролонгированная до многих месяцев, влияние на выработку навыка и сохранение УРАИ. Целью настоящей работы была оценка эффективности обучения и проверка сохранности навыка в тесте УРАИ в парадигме двустороннего избегания у самок крыс, подвергнутых длительной СИ. Принимая во внимание то, что

тревога имеет решающее значение на этапе выработки двустороннего избегания (Fernández-Teruel, Tobeña, 2020; Vicens-Costa et al., 2011), а также то, что различия в болевой чувствительности и уровне кортикостерона в крови (Bernardi et al., 1986) могут оказывать влияние на обучение с болевым подкреплением, мы дополнительно оценивали у крыс уровень тревожности, болевую чувствительность, уровень кортикостерона в крови и вес надпочечников как одного из органов — маркеров стресса.

## МЕТОДИКА

Работа выполнена на 58 самках крыс Wistar. Все процедуры на животных проводили под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП». День рождения крысят считали нулевым постнатальным днем (ПНД). В ПНД1 определяли пол новорожденных крысят и для дальнейшей работы оставляли только детенышей женского пола. Крысят распределяли самкам для вскармливания таким образом, чтобы у каждой самки было по 5–6 крысят из разных пометов. В ПНД27, что соответствовало подростковому возрасту крысят (Lukkes et al., 2009; McCormick, Mathews, 2010; Green, McCormick, 2013), после первичной оценки двигательной активности их отсаживали от матерей, сохраняя состав групп. Болевую чувствительность оценивали в ПНД28. В ПНД31 животных распределили на контрольных («К») ( $n = 30$ ) (групповое содержание по 5 особей в клетке размером 37.0 x 57.0 x 19.0 см) и социально изолированным («СИ») ( $n = 28$ ) (одиночное содержание в клетке размером 36.5 x 20.5 x 14.0 см) таким образом, чтобы по исходным показателям поведения и болевой чувствительности, а также по весу группы «СИ» и «К» не различались.

В возрасте 3, 5.5, 8.5 и 10.5 мес у крыс оценивали болевую чувствительность, двигательную активность и уровень тревожности. Тесты следовали в указанном порядке, интервалы между ними составляли 1–3 дня.

*Оценка болевой чувствительности.* Определяли величину порогов болевых реакций (ПБР) крыс в тесте «Hot Plate» ( $t = 55.0 \pm 0.3$  °C) («TSE Systems», Германия) по латентным периодам отдергивания передней, задней лапок и прыжка, независимо от того, завершался ли он выпрыгиванием. Если крыса не выпрыгивала из камеры в течение 30 с, тестирование прекращали.

*Оценка двигательной (горизонтальной) активности.* Тестирование в автоматизированном «Открытом поле» проводили в камерах из прозрачного материала размером 48 x 48 x 21 см (Opto-Varimex, «Columbus Instruments», США) при освещенности 17 люкс в течение 10 мин. Оценивали длину

пройденного пути (см) и привыкание (по снижению двигательной активности в динамике тестирования).

**Оценка уровня тревожности.** Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) проводили с использованием оборудования и программного обеспечения видеосистемы «VideoMot2» («TSE Systems», Германия). ПКЛ из черного пластика состоит из двух открытых (ОР, 43 x 14 см) и двух закрытых (ЗР, 43 x 14 x 22 см) рукавов, расположенных взаимно перпендикулярно друг к другу, с центральной площадкой 14 x 14 см (освещенность в центре 24 люкс). ПКЛ находился на высоте 70 см от пола. Рассчитывали предпочтение ОР как отношение длительности пребывания крысы в ОР к суммарной длительности пребывания в ОР и ЗР (Ari et al., 2019). Чем выше предпочтение ОР, тем менее тревожны крысы. Дополнительно оценивали суммарное время, проведенное в дистальных отделах обоих ОР лабиринта (Luedke et al., 2013). По числу и длительности вертикальных стоек и эпизодов груминга в ПКЛ судили соответственно об исследовательской активности (Ari et al., 2019) и стресс-индуцированном эмоциональном напряжении животных (Mu et al., 2020). Длительность тестирования составляла 5 мин.

**Выработка и проверка сохранности условного рефлекса активного избегания (УРАИ).** Выработку УРАИ с проверкой сохранения навыка спустя сутки проводили у крыс обеих групп начиная с возраста 7.5 мес (после 6.5 мес СИ в опытной группе), процесс обучения всех крыс в обеих группах занимал 4 недели. Обучение крыс в рабочие дни начинали в 10–11 часов утра и заканчивали не позже 15 часов дня. В каждый день обучения брали крыс из обеих групп. В один день и обучали крыс, и проверяли сохранность навыка у обученных в предыдущий день животных. По окончании выработки УРАИ и первой проверки его сохранности (через сутки) у всех крыс в возрасте 8.5 мес тестировали поведение. Дополнительно проводили проверку сохранности навыка у животных через 2 мес после обучения; этот временной интервал выдерживали для каждого животного. Тестирование поведения проводили по окончании этой проверки у всех крыс в возрасте 10.5 мес.

Навык вырабатывали с использованием парадигмы двустороннего избегания аверсивного воздействия в челночной камере с решетчатым металлическим полом, которая была разделена на два отсека перегородкой с отверстием (Multi Conditioning System, TSE, Германия). Тестирование сохранности памяти проводили через 24 ч и через 2 мес после обучения. Все этапы эксперимента проводили на фоне белого шума 60 дБ при освещенности 127 люкс; камера находилась в звукоизолирующем коробе. После 5 мин адаптации, в течение которых крыса могла свободно исследовать камеру, подавали условный сигнал, представлявший собой сочетание светового (белый свет,

480 люкс) и звукового (2000 Гц, 67 дБ) сигналов. Условный сигнал без аверсивного подкрепления подавали в течение 10 с. Если в течение этого времени крыса не переходила в другой отсек, на пол камеры без задержки подавали переменный ток (0.5 мА, 1 Гц) (безусловный аверсивный сигнал) в течение 8 с. При переходе крысы в другой отсек камеры до истечения 8 с ток отключали. Действие условного сигнала прекращали вместе с отключением тока. Максимальная продолжительность одной попытки составляла 18 с. Попытки следовали с 20-секундными интервалами. Сессия обучения для всех крыс состояла из 100 попыток, длительность сессии обучения составляла около часа. Активным избеганием считали переход крысы в другой отсек камеры после подачи условного сигнала, но до начала действия электрического тока. Переход во время действия безусловного сигнала считали реакцией избегания. Критерием научения считали 6 реакций избегания подряд. Сохранность памяти оценивали по той же схеме, но число попыток сокращали до 50. Длительность сессии при проверке сохранности навыка составляла около получаса. Оценивали число реакций и латентный период реакций избегания и избавления при переходе в безопасный отсек камеры, число реакций без ответа, число переходов в период адаптации и в межсигнальные периоды, а также максимальное число реакций избегания, следующих подряд, и число раз достижения критерия научения на этапах обучения и проверки сохранности навыка.

**Определение уровня кортикостерона (КОРТ) в сыворотке крови и веса надпочечников.** Анализ данных показателей проводили только у части крыс в каждой группе. Из обеих групп крысы были выбраны для анализа случайным образом, без учета их поведенческих характеристик. Таким образом были сформированы малые выборки (группа «К», n = 9; группа «СИ», n = 8). Для того чтобы определить, насколько поведение животных в этих малых выборках отражало выявленные изменения в поведении животных в больших группах, проводили дополнительное межгрупповое сравнение крыс из малых выборок в возрасте 10.5 мес по тем же показателям: весу, двигательной активности, уровню тревожности, выраженности груминга, уровню исследовательской активности, болевой чувствительности, а также сохранности УРАИ через 2 мес после обучения. В возрасте 11 мес животных выводили из эксперимента путем декапитации с использованием гильотины; у крыс из малых выборок немедленно собирали образцы крови из туловища в вакуумные пробирки с активатором свертывания (SiO<sub>2</sub>) и разделительным гелем (Sanamedical, Россия). Сыворотку получали путем центрифугирования (2000 g, 15 мин, Eppendorf Centrifuge 5702R), помещали аликвоты каждой пробы в отдельные пробирки и хранили при температуре –80 °С.

Твердофазный иммуноферментный анализ проводили с помощью набора ELISA (DRG Instruments GmbH, Германия) по инструкции производителя. Данные считывали с помощью микропланшетного ридера для иммуноферментных анализов Immunochem-2100 (High Technology, Inc., USA) и строили 4-параметровую логистическую кривую с использованием ресурса Myassays.com для экстраполяции данных. Уровни КОПТ выражали в нг/мл.

Сразу после декапитации животного выделяли и взвешивали надпочечники, рассчитывали их относительный вес в мг/кг веса крысы.

Статистическую обработку данных проводили по алгоритмам программы «STATISTICA 13.0.5.17». В случае, если гипотезу о нормальном характере распределения данных не отвергали, использовали параметрический дисперсионный анализ Two Way ANOVA с или без повторных измерений с последующим апостериорным анализом по тесту LSD Fisher (в таких случаях данные представлены в виде  $M \pm m$ ). Оценивали влияние факторов: «Содержание» (градации: «К»; «СИ»), «Возраст» (градации: 1; 3; 5.5; 8.5 и 10.5 мес), «Минуты» (градации: 1–10 минута, оценка привыкания). Если гипотезу о нормальном характере распределения данных отвергали, применяли непараметрический непарный критерий Манна – Уитни либо непараметрический Kruskal – Wallis ANOVA с последующим множественным сравнением средних рангов; в таких случаях данные представлены в виде медианы с первым и третьим квартилями –  $Me (Q1; Q3)$ . Частоту встречаемости признака оценивали с помощью двустороннего точного метода Фишера (ТМФ). Принятый уровень значимости составлял 5%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

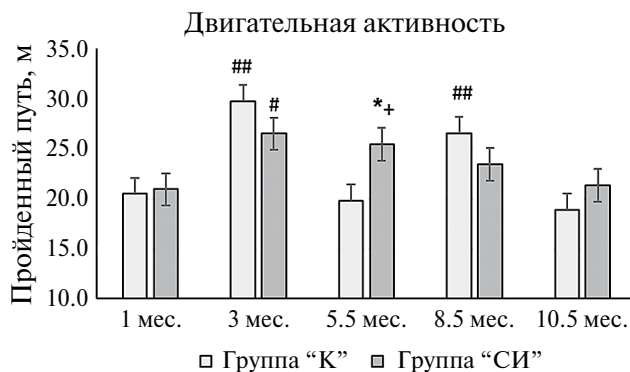
Выявлено влияние фактора «Возраст» на вес крыс:  $F(4, 270) = 811.9, p < 0.001$ . Вес крыс в обеих группах исходно не различался и нарастал до возраста 8.5 мес (вес в группах «СИ» и «К» соответственно, в возрасте 1 мес:  $67.9 \pm 1.7$  г и  $64.8 \pm 1.7$  г; в возрасте 3 мес:  $245.1 \pm 4.2$  г и  $248.8 \pm 4.5$  г; в возрасте 5.5 мес:  $288.0 \pm 7.5$  г и  $288.1 \pm 6.6$  г; в возрасте 8.5 мес.:  $317.9 \pm 6.6$  г и  $318.9 \pm 6.1$  г; в возрасте 10.5 мес:  $325.8 \pm 7.0$  г и  $322.0 \pm 7.1$  г). Динамика нарастания в группах «СИ» и «К» не различалась. Взаимодействия факторов «Возраст» х «Содержание», а также влияния фактора «Содержание» не обнаружено.

### Двигательная (горизонтальная) активность

Выявлено взаимодействие факторов «Содержание» х «Возраст»:  $F(4, 277) = 2.820, p = 0.025$ . В возрасте 5.5 мес двигательная активность крыс «СИ» была выше, чем у крыс «К» (рис. 1), что

свидетельствовало о развитии гиперактивного фенотипа после 4.5 мес СИ. У самок группы «К» повышение двигательной активности относительно ее величины в возрасте 1 мес было статистически значимым на двух сроках обследования – в возрасте крыс 3 и 8.5 мес, а у самок группы «СИ» увеличение двигательной активности относительно исходного уровня отмечалось в возрасте крыс 3 мес и 5.5 мес (в последнем сравнении выявлен тренд:  $p = 0.052$ ).

Обнаружено влияние фактора «Возраст» на двигательную активность ( $F(4, 277) = 8.693, p < 0.001$ ): ее величина была максимальной у крыс в возрасте 3 мес (по сравнению с возрастом крыс 1, 5.5 и 10.5 мес –  $p < 0.001$ ; по сравнению с возрастом 8.5 мес –  $p = 0.051$ ). Фактор «Минуты» также оказывал влияние на двигательную активность ( $F(9, 2493) = 284.833, p < 0.001$ ): отмечали постепенное статистически значимое снижение двигательной активности по мере тестирования. Выявлено взаимодействие факторов «Минуты» х «Возраст»: в возрасте 3 мес поминутная двигательная активность крыс в большинстве случаев превышала таковую на других сроках обследования. Взаимодействие факторов «Минуты» х «Содержание», а также «Минуты» х «Содержание» х «Возраст» не выявлено,



**Рис. 1.** Двигательная активность крыс в динамике обследования. По горизонтальной оси указан возраст животных. По вертикальной оси – пройденный путь (м) в сумме за 10 мин тестирования в автоматизированном тесте «открытого поля». Светлые столбики – группа «К», темные столбики – группа «СИ». \* –  $p < 0.020$  по сравнению с крысами группы «К» в том же возрасте; ## –  $p < 0.001$ ; # –  $p < 0.020$ ; + –  $p = 0.052$  по сравнению со значением в возрасте 1 мес в той же группе (TWO WAY ANOVA, *post hoc* LSD-критерий).

**Fig. 1.** Rat locomotor activity during the examination's dynamics. The horizontal axis shows rats' age. The vertical axis shows distance covered (m) in 10 min of observation in the automated Open Field test. Light columns – group «K», dark columns – group «СИ». \*  $p < 0.020$  compared with rats of group «K» of the same age; ##  $p < 0.001$ ; #  $p < 0.020$ ; +  $p = 0.052$  compared with the same group at age one month (TWO WAY ANOVA, *post hoc* LSD test).

что свидетельствует об отсутствии различий в при-  
выкании по данному показателю между крысами  
«СИ» и «К» на всех сроках обследования.

**Уровень тревожности**

В тесте ПКЛ у крыс группы «СИ» по сравне-  
нию с крысами группы «К» в возрасте 3 мес вы-  
явлено меньшее предпочтение ОР и меньшее вре-  
мя выхода в дистальные отделы ОР, а в возрасте  
8.5 мес, напротив, отмечено более высокое пред-  
почтение ОР и большее время выхода в дистальные  
отделы ОР (табл. 1). Также после 7.5 мес СИ вы-  
явлено увеличение доли крыс, вышедших в дис-  
тальные отделы ОР, по сравнению с группой «К»:  
соответственно 85.7% и 44.8% ( $p = 0.002$ , ТМФ).  
Данные свидетельствуют о повышенном уровне  
тревожности у крыс после 2 мес СИ и сниженном  
уровне тревожности после 7.5 мес СИ по сравне-  
нию с уровнем тревожности у крыс контрольной  
группы.

Вертикальная активность крыс группы «СИ»  
на протяжении всего обследования в ПКЛ стати-  
стически значимо не отличалась от активности  
крыс в группе «К» (см. табл. 1). Выраженность  
груминга как по числу эпизодов, так и по его об-  
щей длительности у крыс группы «СИ» в возрасте  
8.5 мес была снижена в сравнении с крысами груп-  
пы «К» (см. табл. 1).

Внутригрупповое сравнение у крыс группы «К»  
выявило снижение предпочтения ОР [Kruskal –  
Wallis test:  $H(3, N = 113) = 29.343, p < 0.001$ ] и вре-  
мени выхода в дистальные отделы ОР [Kruskal-  
Wallis test:  $H(3, N = 113) = 27.676, p < 0.001$ ], на-  
чиная с возраста 5.5 мес, тогда как у крыс группы  
«СИ» статистически значимых изменений вели-  
чины данных показателей в динамике обследова-  
ния не было выявлено [соответственно Kruskal-  
Wallis test:  $H(3, N = 108) = 6.265, p = 0.100$  и  $H(3, N = 108) = 6.396, p = 0.094$ ] (см. табл. 1). Ре-  
зультаты свидетельствуют о повышении уровня  
тревожности с возрастом у крыс группы «К», но не  
у крыс группы «СИ».

Возрастная динамика снижения вертикальной  
активности была схожа в группах «К» и «СИ». С воз-  
раста 8.5 мес у крыс обеих групп отмечали снижение  
числа стоек [Kruskal – Wallis test, группы «К» и «СИ»  
соответственно:  $H(3, N = 113) = 24.413, p < 0.001$ ;  
 $H(3, N = 108) = 38.315, p < 0.001$ ], а в возрасте  
10.5 мес – снижение длительности вертикальной  
активности [Kruskal – Wallis test, группы «К» и «СИ»  
соответственно:  $H(3, N = 113) = 18.613, p < 0.001$ ;  
 $H(3, N = 108) = 25.017; p < 0.001$ ].

Изменения выраженности груминга  
у крыс в группе «К» были отмечены в возрас-  
те 10.5 мес [Kruskal – Wallis test, число эпизо-  
дов:  $H(3, N = 113) = 9.221, p = 0.027$ ; длитель-  
ность груминга:  $H(3, N = 113) = 13.147, p = 0.004$ ];

**Таблица 1.** Показатели поведения в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, которых содержали в условиях длительной изоляции («СИ»), и крыс контрольной группы («К») **Table 1.** Indicators of the behavior in the Elevated Plus Maze Test in rats kept in prolonged social isolation (SI) compared with rats kept in groups (K)

Возраст крыс	Предпочтение ОР (% времени)		Время в дистальных отделах ОР (с)		Число стоек		Длительность стоек (с)		Число эпизодов груминга		Длительность груминга (с)	
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»
3 мес.	26.45 (13.3; 37.9) (n = 30)	17.4 (6.2; 22.4)** (n = 29)	25.1 (8.7; 31.3) (n = 30)	11.4 (3.3; 21.5)* (n = 29)	11.0 (8.0; 14.0) (n = 30)	11.0 (8.0; 13.0) (n = 29)	29.4 (16.0; 36.4) (n = 30)	24.5 (19.2; 41.1) (n = 29)	3.0 (1.0; 4.0) (n = 30)	2.0 (1.0; 6.0) (n = 29)	11.3 (1.2; 20.4) (n = 30)	7.2 (1.6; 26.0) (n = 29)
5.5 мес.	9.0 (0.3; 21.5)** (n = 25)	12.7 (4.8; 22.2) (n = 25)	4.5 (0; 13.2)** (n = 25)	9.0 (0; 20.5) (n = 25)	10.0 (8.0; 14.0) (n = 25)	8.0 (6.0; 11.0) (n = 25)	34.0 (20.5; 45.4) (n = 25)	28.0 (22.1; 36.8) (n = 25)	2.0 (2.0; 4.0) (n = 25)	1.0 (0; 4.0) (n = 25)	16.8 (2.6; 7.0) (n = 25)	5.7 (0; 28.0) (n = 25)
8.5 мес.	4.1 (0; 10.9)** (n = 29)	19.4 (7.6; 35.7)** (n = 28)	0 (0; 5.3)** (n = 29)	13.1 (6.0; 37.5)** (n = 28)	7.0 (5.0; 10.0)* (n = 29)	8.0 (5; 9)* (n = 28)	22.7 (13.8; 33.5) (n = 29)	23.9 (14.6; 32.2) (n = 28)	2.0 (2.0; 3.0) (n = 29)	1.0 (0; 3.0)* (n = 28)	23.0 (14.2; 37.6) (n = 29)	3.0 (0; 14.8)** (n = 28)
10.5 мес.	3.8 (0; 14.8)** (n = 29)	7.15 (0.5; 21.5) (n = 26)	0 (0; 12.1)** (n = 29)	3.2 (0; 13.7) (n = 26)	6.0 (3.0; 7.0)** (n = 29)	4.5 (2.0; 6.0)** (n = 26)	15.1 (8.4; 22.9)* (n = 29)	11.1 (8.2; 16.8)** (n = 26)	1.0 (1.0; 2.0) (n = 29)	1.5 (0; 3.0) (n = 26)	5.0 (0.8; 17.5) (n = 29)	5.1 (0; 13.0) (n = 26)

*Примечание.* Данные приведены в виде медианы с первым и третьим квартилями; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; +  $p < 0.07$  по сравнению с величиной показателя в группе «К» в соответствующем возрасте (тест Манна – Уитни); ##  $p < 0.001$ ; #  $p < 0.05$  по сравнению со значением в возрасте 3 мес. в той же группе (Kruskal – Wallis test со множественным сравнением средних рангов); n – число крыс в группе.  
*Note:* The data are presented as Median with the first and third quartiles; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ; +  $p < 0.07$  compared with the rats in group “K” at the corresponding age (Mann – Whitney test); ##  $p < 0.001$ ; #  $p < 0.05$  compared with rats of the same group at the age of 3 months (Kruska – Wallis test with multiple comparisons of mean ranks); n is the number of rats in the group.

## УРАИ

число эпизодов груминга было меньше, чем в возрасте 5.5 мес, а длительность груминга – меньше, чем в возрасте 8.5 мес (эти различия в табл. 1 не показаны). У крыс группы «СИ» статистически значимые изменения в выраженности груминга в динамике обследования не были выявлены [Kruska – Wallis test, число эпизодов груминга и длительность груминга соответственно:  $H(3, N = 108) = 7.064, p = 0.070$  и  $H(3, N = 108) = 5.042, p = 0.169$ ].

**Болевая чувствительность**

Влияния фактора «Содержание» ни на один из использованных показателей болевой чувствительности не выявлено (табл. 2). Фактор «Возраст» оказывал влияние только на ПБР прыжка: ( $F(4.224) = 8.698, p < 0.001$ ). С возрастом ПБР прыжка снижались. Взаимодействия факторов «Возраст» x «Содержание» ни по одному из показателей болевой чувствительности не выявлено. Однако внутрigrупповая динамика ПБР прыжка была различна: у крыс группы «К» величина ПБР прыжка снижалась относительно исходного уровня (в возрасте 1 мес), начиная с возраста 5.5 мес, тогда как у крыс группы «СИ» такое снижение было обнаружено только в возрасте 10.5 мес. Таким образом, снижение величины ПБР, связанное с повышением болевой чувствительности с возрастом, у самок крыс группы «СИ» происходило медленнее, чем у крыс, находившихся на групповом содержании.

На этапе обучения самки группы «СИ» совершали меньше реакций избегания и больше реакций избавления по сравнению с группой «Контроль» (рис. 2 а, 2 б). Латентный период реакций избегания и избавления в группах не различался (рис. 2 в, 2 г). При проверке памяти через 24 ч после обучения число реакций избегания и избавления, а также латентный период реакций избегания в группах «СИ» и «К» не различались, однако латентный период реакций избавления у крыс группы «СИ» был статистически значимо больше, чем в группе «К». Через 2 мес после обучения различий между группами ни по числу избеганий/избавлений, ни по латентному периоду этих реакций выявлено не было.

На этапе обучения доля крыс, не достигших критерия научения, в группе «СИ» составила 53.6% (15 из 28 крыс), а в группе «К» – 26.7% (8 из 30 крыс) ( $p = 0.059$ ; ТМФ). Из крыс, достигших критерия научения, крысы группы «СИ» достигали критерия меньшее число раз и демонстрировали тенденцию к снижению максимального числа избеганий подряд в сравнении с крысами группы «К» (табл. 3). Различия в числе попыток до достижения критерия также не было статистически значимым, хотя просматривалось увеличение показателя у крыс группы «СИ».

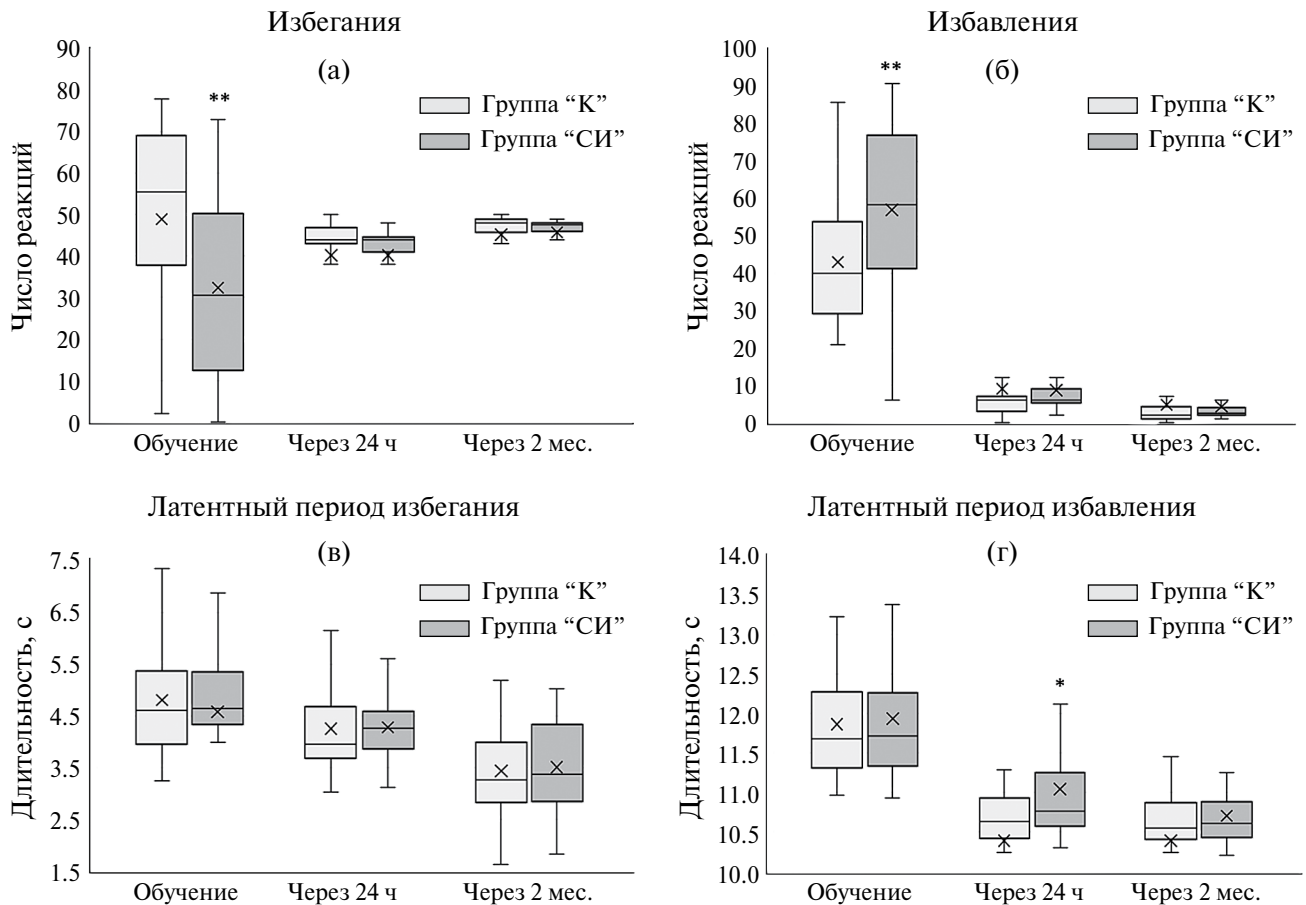
При проверке сохранности памяти через 24 ч после обучения крысы, достигшие критерия научения, которых содержали в условиях СИ, демонстрировали снижение максимального числа избеганий подряд в сравнении с крысами группы

**Таблица 2.** Пороги болевых реакций (ПБР) в тесте «Hot Plate» у крыс, которых содержали в условиях длительной социальной изоляции («СИ»), в сравнении с крысами, которых содержали в группах («К») **Table 2.** Pain thresholds (ПБР) in the Hot Plate test in rats kept in prolonged social isolation (СИ) compared with rats kept in groups (K)

Возраст крыс	Показатели, ПБР (с)					
	Облизывание передней лапки		Облизывание задней лапки		Прыжок	
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»
1 мес	11.2±1.4 (n = 21)	12.8±1.3 (n = 24)	14.2±1.3 (n = 13)	13.3±1.3 (n = 13)	18.3±1.9 (n = 16)	15.6±2.0 (n = 12)
3 мес	11.1±1.0 (n = 19)	12.6±1.2 (n = 22)	12.2±1.2 (n = 21)	13.7±1.2 (n = 24)	15.0±1.4 (n = 26)	15.7±1.4 (n = 25)
5.5 мес	12.0±1.4 (n = 9)	14.4±1.8 (n = 10)	10.5±0.8 (n = 14)	10.6±1.1 (n = 11)	8.6±1.2 ## (n = 24)	11.5±1.6 (n = 23)
8.5 мес	13.7±2.9 (n = 7)	14.1±1.5 (n = 10)	11.4±0.9 (n = 8)	13.5±1.5 (n = 13)	13.0±1.2 # (n = 29)	14.8±1.4 (n = 25)
10.5 мес	12.5±1.3 (n = 6)	10.4±1.3 (n = 6)	11.6±1.4 (n = 10)	10.9±0.8 (n = 10)	9.8±1.8 ## (n = 28)	8.6±1.2 ## (n = 26)

*Примечание.* Данные приведены в виде  $M \pm SEM$ ; ##  $p < 0.001$ ; #  $p < 0.030$  по сравнению с величиной ПБР прыжка у крыс в возрасте 1 мес. в соответствующей группе (LSD Fisher тест после Two Way ANOVA); n – число крыс в группе.

*Note.* Data are presented as  $M \pm SEM$ ; ##  $p < 0.001$ ; #  $p < 0.030$  compared with the rat pain threshold' values of jumping at the age of 1 month in the corresponding group (Two Way ANOVA followed by LSD Fisher test); n is the number of rats in the group.



**Рис. 2.** Показатели поведения крыс при выработке и проверке навыка в тесте УРАИ. (а) – число реакций избегания; (б) – число реакций избавления; (в) – латентный период реакций избегания, с; (г) – латентный период реакций избавления, с; «К» – контроль, крысы, которых содержали в группах; «СИ» – крысы, которых содержали в социальной изоляции. Светлые столбики – группа «К», темные столбики – группа «СИ». По горизонтальной оси – этапы в задаче двустороннего условного активного избегания: обучение, проверка памяти через 24 ч и через 2 мес. На этапе выработки навыка (обучение) крысам были предъявлены 100 попыток, на этапах проверки памяти (тестирование) – по 50 попыток. \*\* –  $p < 0.01$ ; \* –  $p < 0.05$  по сравнению с крысами группы «К» (критерий Манна – Уитни). На диаграмме размаха: высота блока – интерквартильный размах (25%–75%), низ блока – Q1 (первый квартиль), верх блока – Q3 (третий квартиль), медиана обозначена поперечной чертой, × – среднее арифметическое по выборке, вертикальные линии («усы») – минимальное и максимальное значения выборки. Выбросы на рисунке не показаны.

**Fig. 2.** Indicators of the behavior of rats during the acquisition and retention in the Active Avoidance test. (a) – number of avoidance responses, (б) – number of escape responses, (в) – latency to avoid, (г) – latency to escape; «К» – control, rats kept in groups; «СИ» – rats kept in social isolation. Light columns – group «К», dark columns – group «СИ». The horizontal axis shows the stages in the two-way active avoidance conditioning task: acquisition, retention after 24 hours and after 2 months. At the acquisition stage (training), rats were presented with 100 trials, and at the retention stages (testing) – 50 trials. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$  compared with rats of group «К» (Mann-Whitney test). In the box and whiskers plot: box height, interquartile range (25%–75%); bottom of the box, Q1 (first quartile); top of the box, Q3 (third quartile), median is marked with the transverse line, Q2 (second quartile); × – arithmetic mean for the sample, vertical lines (“whiskers”) – minimum and maximum sample values. The outliers are not shown in the plot.

«К» (см. табл. 3). Через 2 мес после обучения межгрупповых различий ни по одному из вышеуказанных показателей не наблюдали.

Таким образом, крысы, проживавшие в условиях СИ, демонстрировали выраженное ухудшение обучения и некоторые признаки нарушения сохранения памяти через сутки, но не через 2 мес после обучения.

Ни в период обучения, ни при проверке сохранности навыка не было выявлено межгрупповых различий в числе переходов из одного отсека камеры в другой в период адаптации и в межсигнальные интервалы, а также в числе попыток, не завершившихся переходом в другой отсек камеры (во всех случаях  $p > 0.05$ ; тест Манна – Уитни).

**Таблица 3.** Характеристики выработки и сохранения навыка в тесте УРАИ у крыс, которых содержали в условиях длительной социальной изоляции («СИ»), в сравнении с крысами, которых содержали в группах («К»)

**Table 3.** Characteristics of acquisition and retention in the Active Avoidance test in rats kept in prolonged social isolation (СИ) compared with rats kept in groups (K)

Возраст крыс	Показатели, ПБР (с)					
	Сколько раз достигнут критерий научения		Число попыток до достижения критерия научения		Максимальное число избеганий подряд	
	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»	Самки «К»	Самки «СИ»
Обучение	4.0 (2.0; 5.0) (n = 22)	2.0 (1.0; 3.0) * (n = 13)	40.5 (33.0; 47.0) (n = 22)	53.0 (42.0; 73.0) + (n = 13)	16.0 (11.0; 21.0) (n = 22)	10.0 (8.0; 16.0) + (n = 13)
Через 24 ч после обучения	2.0 (2.0; 3.0) (n = 26)	2.0 (1.0; 3.0) (n = 25)	5.5 (2.0; 8.0) (n = 26)	8.0 (2.0; 10.0) (n = 25)	27.0 (19.0; 32.0) (n = 26)	19.0 (14.0; 24.0) * (n = 25)
Через 2 мес после обучения	2.0 (1.0; 2.0) (n = 29)	2.0 (1.0; 3.0) (n = 28)	2.0 (1.0; 6.0) (n = 29)	1.5 (0; 3.5) (n = 28)	36.0 (27.0; 44.0) (n = 29)	32.0 (24.5; 38.5) (n = 28)

*Примечание.* Данные приведены в виде Me (Q1; Q3); \*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.020$ ; + $p = 0.079$  по сравнению с величиной показателя в группе «К» (тест Манна – Уитни); n – число крыс, достигших критерия научения. На этапе обучения крысам было предъявлено 100 попыток, на этапах проверки памяти – по 50 попыток.

*Note.* The data are presented as Me (Q1; Q3); \*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.020$ ; + $p = 0.079$  compared with the rats in group “K” (Mann – Whitney test); n is the number of rats that reached the learning criterion. At the acquisition stage (training), rats were presented with 100 trials, and at the retention stages (testing) – 50 trials.

#### **Показатели поведения, уровень кортикостерона в сыворотке крови и вес надпочечников у крыс в малых выборках**

Крысы в малых выборках из групп «СИ» и «К» в возрасте 10.5 мес не различались по весу, двигательной активности, уровню тревожности (по предпочтению ОР и времени в дистальных отделах ОР в ПКЛ), выраженности груминга (по числу эпизодов и их суммарной длительности), уровню исследовательской активности (по числу и длительности стоек в ПКЛ). Однако, так же как в полных группах (для сравнения см. табл. 1), отмечена тенденция к снижению числу стоек у крыс «СИ» ( $p = 0.074$ , критерий Манна – Уитни). Не обнаружено межгрупповых различий в болевой чувствительности ни по одному из использованных показателей.

На этапах обучения и проверки сохранности навыка при сравнении малых выборок не выявлено статистически значимых межгрупповых различий. Однако у самок группы «СИ» при выработке навыка УРАИ число реакций избегания было меньше, чем у крыс группы «К» [соответственно 36 (15.5; 45.5) и 52 (31; 59)] ( $p = 0.139$ , здесь и далее критерий Манна – Уитни), а число реакций избавления – больше [55 (43; 70) и 40 (34; 58)] ( $p = 0.481$ ) (для сравнения с полными группами см. рис. 2). Крысы, которых содержали в изоляции, реже достигали

критерия научения, чем крысы контрольной группы [2 (1; 2) и 3 (2; 5)] ( $p = 0.117$ ) (для сравнения см. табл. 3). Через 24 ч после обучения выявлена тенденция к увеличению латентного периода реакций избавления у крыс группы «СИ» по сравнению с крысами контрольной группы [10.8 (10.7; 11.4) с в сравнении с 10.6 (10.5; 10.7) с] ( $p = 0.074$ ), максимальное число избеганий подряд у крыс группы «СИ» также было меньше [17 (14; 27) в сравнении с 26 (19; 31)] ( $p = 0.142$ ). Очевидно, отсутствие статистически значимых межгрупповых различий обусловлено малыми объемами выборок, но при сравнении малых выборок «СИ» и «К» направленность изменений у крыс группы «СИ» была такой же, как при сравнении полных групп, что дает возможность говорить о репрезентативности малых выборок.

В выборках малого объема у крыс группы «СИ» после 10 мес изоляции уровень КОРТ в сыворотке крови был ниже, чем у крыс группы «К»: соответственно 723.71 (590.74; 875.31) и 1168.17 (911.45; 1365.26) нг/мл (критерий Манна – Уитни,  $p = 0.036$ ). Вес надпочечников у крыс группы «СИ» статистически значимо не отличался от значений в контрольной группе (группы «СИ» и «К» соответственно: 0.13 (0.12; 0.14) и 0.12 (0.11; 0.13) мг / г веса тела, критерий Манна – Уитни,  $p = 0.114$ ).



## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании основным установленным фактом является нарушение УРАИ у самок крыс, подвергнутых длительной СИ, которое было выявлено на этапе обучения: при выработке навыка крысы группы «СИ» совершали меньше реакций избегания, но больше реакций избавления по сравнению с крысами группы «К», а также реже достигали критерия научения (см. рис. 2, табл. 3). Это нарушение обучения обнаружено в контексте сопровождающих его оценок поведения.

По итогам тестирования поведения по окончании выработки и первичной проверки навыка у всех крыс в возрасте 8.5 мес мы установили, что в этом возрасте крысы группы «СИ» не отличались от крыс группы «К» ни по весу, ни по двигательной активности (см. рис. 1), ни по числу вертикальных стоек в ПКЛ (см. табл. 1), ни по болевой чувствительности (см. табл. 2), то есть эти параметры не могли повлиять на различие в эффективности обучения крыс в группах «СИ» и «К». Однако отличия по уровню тревожности были выявлены: у крыс группы «СИ» в период выработки УРАИ отмечено большее предпочтение ОР и времени, проведенного в дистальных отделах ОР, по сравнению с крысами группы «К». Данные свидетельствуют о том, что в возрасте 8.5 мес крысы группы «СИ» были менее тревожны, чем контрольные животные. Кроме того, в этом возрасте у крыс группы «СИ» была снижена выраженность реакций груминга (см. табл. 1). Несмотря на то что груминг считается чувствительным показателем переживания тревожности, а его увеличение часто связывают с попыткой снижения возбуждения от переживания стрессорных анксиогенных воздействий (Moyaho et al., 2002; Zhang et al., 2019; Mu et al., 2020), груминг все же не является надежным маркером тревожности, как показано при 5-минутном тестировании в ПКЛ (Estanislau et al., 2011). Тем не менее в нашем исследовании сниженный уровень тревожности у самок крыс в сравнении с контрольными значениями после 7.5 мес СИ, с одновременным уменьшением у них выраженности груминга, можно с осторожностью рассматривать как свидетельство меньшего эмоционального напряжения при помещении животных в стрессогенную ситуацию в тесте ПКЛ. Отметим, что на раннем сроке обследования самки крыс после двух мес СИ по показателям поведения в ОР лабиринта были более тревожны, чем контрольные животные (см. табл. 1). Повышение уровня тревожности после нескольких недель СИ согласуется с данными Hellemans et al. (2004) (самцы крыс Long Evans), Dimonte et al., (2023) (самцы крыс Wistar) и наших предыдущих исследований (Хлебникова и др., 2018) (самцы крыс Wistar), что в совокупности с данными настоящего исследования позволяет

говорить о сходном характере изменения уровня тревожности в ответ на стресс СИ у крыс обоего пола. Подробное обсуждение изменений уровня тревожности у крыс в первые месяцы СИ проведено в нашей недавней работе (Ширенова и др., 2022). В настоящем исследовании при длительности СИ 4.5 и 9.5 мес мы не увидели различий в уровне тревожности у крыс групп «СИ» и «К». Однако, проводя межгрупповые сравнения уровня тревожности, надо учитывать и характер внутригрупповых изменений. У крыс, находившихся на групповом содержании, уровень тревожности, если судить по снижению предпочтения ОР и времени в дистальных отделах ОР в тесте ПКЛ, начиная с возраста 5.5 мес повышался, тогда как у крыс, которых содержали поодиночке, такого повышения тревожности не наблюдали (см. табл. 1). Это, по-видимому, нашло отражение в межгрупповых различиях по данному показателю на разных этапах обследования. Однако вопрос о том, связаны ли отличия возрастной динамики уровня тревожности у крыс группы «СИ» с процессами их адаптации/деадаптации к условиям проживания, и если да, то какова эта связь, остается открытым.

По полученным данным в нашей работе, выработка навыка и проверка его сохранности через сутки после обучения у крыс группы «СИ» ассоциированы со сниженным по сравнению с контрольными значениями уровнем тревожности и, вероятно, меньшим эмоциональным напряжением. Известно, что крысы Римской линии, выведенные по признаку низкого уровня избегания при решении задачи двустороннего избегания, были более тревожны, чем крысы той же линии, выведенные по признаку высокого уровня избегания (Escorihuela et al., 1999). Они также проявляли большую эмоциональность, демонстрируя более частый груминг (Ferré et al., 1995). С учетом этих данных можно было бы ожидать, что крысы «СИ», менее тревожные и менее эмоциональные по сравнению с крысами контрольной группы, должны обучаться лучше, чем контрольные крысы. Однако мы, напротив, выявили ухудшение обучения у самок группы «СИ». Интересно, что Римские крысы с высоким уровнем избегания реагировали на 24-недельный стресс СИ развитием целого ряда нарушений в психофизиологическом состоянии: по результатам тестирования после 14 недель СИ эти крысы с высоким уровнем избегания (и исходно более низким уровнем тревожности и меньшей эмоциональностью) развивали локomotorную гиперактивность, демонстрировали повышенную тревожность, нарушения в обучении и сохранности памяти, дефицит предстимульного торможения, что свидетельствовало о развитии у них типичного изоляционного синдрома, который обычно наблюдается у крыс после 8–12 недель СИ (Sánchez-González et al., 2020). Авторы

предположили, что при длительном содержании в условиях СИ у животных включаются какие-то компенсаторные механизмы, пока не известные.

В настоящем исследовании в динамике наблюдения повышение уровня тревожности у крыс относительно контрольных значений было выявлено после 8 недель СИ (в возрасте 3 мес), признаки гиперактивного фенотипа отмечены у тех же крыс после 18 недель СИ (в возрасте 5.5 мес), тогда как нарушения обучения в тесте УРАИ, которые мы оценивали у крыс только после 26–30 недель СИ (в возрасте 7.5–8.5 мес), не сопровождались изменениями двигательной активности и повышением уровня тревожности. Напротив, в этом возрасте крысы группы «СИ», как сказано выше, были менее тревожны, чем контрольные крысы. В настоящем исследовании мы оценивали выработку УРАИ только на позднем сроке социальной изоляции и не можем сопоставить по времени эффективность выработки навыка с повышенным уровнем тревожности или развитием гиперактивности. Однако нельзя не отметить то, что нарушения в психоэмоциональном поведении и обучении, характерные для изоляционного синдрома, не были синхронны по времени наблюдения. В совокупности эти результаты дают основание говорить о гетерохронном развитии симптомов изоляционного синдрома у самок крыс, подвергнутых многомесячной СИ. Нет сомнений в том, что значительные психоэмоциональные нарушения, в первую очередь изменения уровня тревожности, могут модулировать эффективность обучения в задаче двустороннего избегания, как показано, например, в работе de Oliveira с соавт. (de Oliveira et al., 2016): у крыс линий Wistar и Sprague-Dawley худшее обучение в тесте УРАИ было ассоциировано с более низким уровнем тревожности, что не противоречит результатам настоящей работы. Однако, на наш взгляд, психоэмоциональные нарушения как таковые не являются ведущими в определении результатов обучения при действии психосоциального стресса СИ, что подтверждается и данными других исследователей (Moragrega et al., 2005). Мы полагаем, что определяющим фактором может быть сформированный изоляционный синдром, что находит отражение в нарушениях целого ряда механизмов, прямо связанных с обучением. Например, в случае действия неконтролируемого стресса СИ на эффективность обучения могут оказывать влияние нарушения чувствительности к вознаграждению (Hofford, 2021), изменения регуляции и экспрессии BDNF в структурах мозга, опосредующего развитие пластических изменений в гиппокампе (Ширенова и др., 2021; Pisu et al., 2011; Saad et al., 2023), изменения активности нейронов в базолатеральной миндалине с нарушением функционирования окружающих ГАМКергических нейронов (Vazquez-Sanroman et al., 2021),

нарушения функционирования холинергических (Moragrega et al., 2005; Myslivecek, 2021), моноаминергических (Lapiz et al., 2003; Shirenova et al., 2023), пептидергических систем мозга (Nadad-Ophir et al., 2017) и др.

Оценки выработки УРАИ у грызунов, подвергнутых стрессу СИ, разнятся. В экспериментах после типичной по длительности СИ (около двух мес) выявлено ухудшение обучения (Левшина и др., 2005; Viveros et al., 1990), что согласуется с данными настоящего исследования, несмотря на значительное различие в длительности СИ. Однако есть и противоположные оценки. Например, у самцов мышей NMRI, которых содержали в условиях СИ в течение 30 дней, число избеганий было больше, чем у мышей, проживавших в группах (Moragrega et al., 2005). В последнем примере обучение в тесте УРАИ оценивали у грызунов другого вида – мышей линии, для которой характерен иммунодефицит (бестимусные животные), что может оказывать влияние на обучение, так как известно, что иммунная система подвержена влиянию стрессорирующих событий (Deaket et al., 2015). Предполагается, что худшее обучение крыс линии Wistar по сравнению с крысами Sprague-Dawley в тесте УРАИ может быть связано с более высокой активностью иммунной системы у крыс Wistar, которая определяет сильную реакцию на стрессорирующий стимул, в случае УРАИ – удар электрическим током (de Oliveira et al., 2016). Таким образом, в настоящем исследовании худшее обучение в тесте УРАИ у крыс Wistar группы «СИ» может косвенно свидетельствовать о более выраженной активации у них иммунного ответа по сравнению с крысами, проживавшими в группах.

Заслуживает внимания тот факт, что у крыс разных линий, прошедших обучение в тесте УРАИ, независимо от эффективности выработки навыка, исследователи обнаружили снижение уровня КОРТ в плазме крови по сравнению с крысами, не прошедшими обучение, что позволило им связать влияние самих тренировок с изменением уровня КОРТ, приводящим к гипокортицизму (de Oliveira et al., 2016). В работе Ohta и соавт. (Ohta et al., 1999) показано, что уровень АКТГ в плазме крови после выработки УРАИ выше у крыс с высоким уровнем избегания. В настоящем исследовании снижение уровня КОРТ в сыворотке было обнаружено у хуже обучавшихся крыс группы «СИ», что, в совокупности с данными об отсутствии разницы в весе надпочечников с крысами контрольной группы, позволяет предполагать большую чувствительность к стрессу болевой подкрепления во время выработки навыка у самок крыс под влиянием длительной СИ. Принимая во внимание то, что болевая чувствительность крыс групп «СИ» и «К» в сроки выработки и проверки сохранности навыка в тесте «Hot Plate» (тепловой раздражитель)

не различалась, можно думать о существовании межгрупповых различий к действию болевого раздражителя другой модальности, например к болевому подкреплению электрическим током (эти измерения в настоящем исследовании не проводили), или о более высокой чувствительности крыс группы «СИ» к стрессогенной ситуации при выработке УРАИ. Предположение о том, что высокий уровень стрессогенности самой обстановки теста УРАИ осложняет принятие верного решения в большей степени для крыс, выросших в условиях СИ, было высказано в работе Левшиной и др. (2005).

При проверке памяти через сутки после выработки навыка мы не выявили межгрупповых различий в числе реакций избегания и избавления, однако нам удалось обнаружить повышенные значения латентного периода реакций избавления и уменьшение максимального числа избеганий подряд у крыс группы «СИ». В совокупности эти данные позволили нам предполагать худшую сохранность выработанного навыка двустороннего избегания у крыс, проживавших в условиях СИ, при ее проверке в уже знакомой животным, менее стрессогенной обстановке.

К возможному объяснению нарушений памяти, наблюдавшихся через сутки после обучения у крыс группы «СИ», можно привлечь развивающуюся концепцию Павловской сенситизации, заключающуюся в том, что такая сенситизация — это прежде всего ассоциативный эффект (Domjan, Fanselow, 2024). Стимулы, которые не ассоциируются с условным раздражителем, не вызывают повышенной реактивности, которая активируется условным стимулом. Павловская сенситизация может отличаться от обычной сенситизации по диапазону ее реактивности, которую можно выявить в пробах с различными стимулами, включая безусловное подкрепление. Активация режима реагирования увеличивает вероятность определенных реакций. То есть способы реагирования на условный стимул включают не только ожидаемую ответную реакцию (в случае УРАИ — избегание/избавление), но и повышенную реактивность на определенные стимулы, связанные с условным сигналом, а кондиционирование позволяет условному сигналу изменять обработку сенсорных или афферентных входных сигналов. В контексте сказанного худшие характеристики условных реакций у крыс группы «СИ» через сутки после обучения можно связать в том числе с их пониженной реактивностью, например на связанные с условным сигналом обстановочные стимулы, что вызвано нарушениями обработки сенсорных/афферентных сигналов.

В заключение необходимо отметить, что настоящее исследование, несмотря на то что оно восполняет недостаток работ по изучению влияния

социальной изоляции на самках, имеет ограничения, так как нарушения в задаче двустороннего активного избегания по объективным причинам не были параллельно проанализированы у самцов. Кроме того, был оценен только один нейроэндокринный показатель стресса — уровень гормона КОРТ в сыворотке крови — и только у части животных. Мы полагаем, что необходимо продолжить исследования в этом направлении, чтобы выяснить, изменяется ли стресс-реактивность и стрессоустойчивость при длительной социальной изоляции, а также понять, какие механизмы опосредуют развитие адаптационных процессов в этих условиях.

## ВЫВОДЫ

1. Длительная социальная изоляция, начинавшаяся после отсаживания крысят от матери и продолжавшаяся до 10 мес, нарушала обучение в тесте условного рефлекса активного избегания (УРАИ) в парадигме двустороннего избегания у животных в возрасте 7.5–8.5 мес, что проявлялось увеличением у них числа реакций избавления, уменьшением числа реакций избегания, а также снижением частоты достижения критерия научения по сравнению с крысами, которых содержали в группах.

2. В возрасте 8.5 мес крысы, которых содержали в социальной изоляции, были менее тревожны и демонстрировали менее выраженный груминг в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» по сравнению с крысами, которых содержали в группах, но не отличались от них по двигательной и исследовательской активности.

3. Через 24 ч после обучения у крыс, которых содержали в условиях социальной изоляции, латентный период реакций избавления был повышен, а максимальное число реакций избегания подряд — снижено, что свидетельствовало о худшем сохранении у них навыка по сравнению с крысами, которые проживали в группах.

4. Через 2 мес после обучения не выявлено различий в сохранности УРАИ между крысами, проживавшими в разных условиях содержания; после 10 мес СИ уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс был ниже, чем у крыс контрольной группы.

5. У крыс, которых содержали в социальной изоляции, в возрасте 3 мес уровень тревожности был выше, чем у крыс, которых содержали в группах, а в возрасте 5.5 мес у крыс, проживавших в социальной изоляции, были выявлены признаки гиперактивного фенотипа. На протяжении всего обследования не было выявлено межгрупповых различий по показателям веса и болевой чувствительности в тесте «Hot Plate».

### ВКЛАД АВТОРОВ

Н.А. Крупина – концепция и руководство работой, проведение экспериментов; подготовка текста и редактирование текста статьи, интерпретация и обсуждение результатов исследования; Н.Н. Хлебникова – проведение экспериментов, подготовка текста и иллюстраций, обсуждение результатов исследования.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2022–2024 годы (№ НИОКТР: 122022200349-9).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.М. Комкову за техническую поддержку в проведении исследований.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ПРАВИЛ БИОЭТИКИ

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФГБНУ «НИИОПП» (протокол №1 от 02.02.2021 и №3 от 07.05.2024).

### ПЕРВИЧНЫЕ ДАННЫЕ

Доступны по запросу у авторов исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Крупина Н.А., Ширенова С.Д. Нарушения когнитивных функций при длительной социальной изоляции: результаты исследований на людях и экспериментов на животных. *Успехи физиол. наук.* 2023. 54 (4): 18–35.

Левшина И.П., Пасикова Н.В., Шуйкин Н.Н. Выработка условных реакций избегания и морфометрические

характеристики сенсомоторной коры крыс, социально депривированных в раннем онтогенезе. *Журн. высш. нерв. деят. им. И.П. Павлова.* 2005. 55 (4): 558–566.

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. высш. нервн. деят.* 2018. 68 (5): 647–662.

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. 86(6): 857 – 870.

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.* 2022а. 72 (4): 520–542.

Ширенова С.Д., Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Экспрессия рецепторов глюкокортикоидов и интерлейкинов IL-1 $\beta$  и IL-6 в структурах мозга крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции: половые различия. *Патогенез.* 2022б. 3: 147–148.

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. *J. Vis. Exp.* 2019. 143: e58396.

Bernardi M., Genedani S., Bertolini A. Behavioral activity and active avoidance learning and retention in rats neonatally exposed to painful stimuli. *Physiol Behav.* 1986. 36 (3): 553–555.

Bianchi M., Fone K.F.C., Azmi N., Heidbreder C.A., Hagan J.J., Marsden C.A. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 2006. 24(10): 2894–2902.

Broadfoot C.K., Lenell C., Kelm-Nelson C.A., Ciucci M.R. Effects of social isolation on 50-kHz ultrasonic vocalizations, affective state, cognition, and neurotransmitter concentrations in the ventral tegmental and locus coeruleus of adult rats. *Behav. Brain Res.* 2023. 437: 1141–1157.

da Silva R.P.B., Pinheiro I.L., da Silva R.K.B., Moretti E.C., de Oliveira Neto O.B., Ferraz-Pereira K., Galindo L.C.M. Social isolation and post-weaning environmental enrichment effects on rat emotional behavior and serotonergic system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2024. 84 (4): 265–280.

Dayananda K.K., Ahmed S., Wang D., Polis B., Islam R., Kaffman A. Early life stress impairs synaptic pruning in the developing hippocampus. *Brain Behav. Immun.* 2023. 107: 16–31.

de Oliveira C.C., Gouveia F.V., de Castro M.C., Kuroki M.A., Dos Santos L.C., Fonoff E.T., Teixeira M.J., Otoch J.P.,

- Martinez R.C.* A window on the study of aversive instrumental learning: Strains, performance, neuroendocrine, and immunologic systems. *Front. Behav. Neurosci.* 2016. 10: 162.
- Deak T., Quinn M., Cidlowski J.A., Victoria N.C., Murphy A.Z., Sheridan J.F.* Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress related disease. *Stress.* 2015. 18: 367–380.
- Del Arco A., Zhu S.W., Terasmaa A., Mohammed A.H., Fuxe K.* Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum // *Psychopharmacol.* 2004. 171: 148.
- Dimonte S., Sikora V., Bove M., Morgese M.G., Tucci P., Schiavone S., Trabace L.* Social isolation from early life induces anxiety-like behaviors in adult rats: Relation to neuroendocrine and neurochemical dysfunctions. *Biomed. Pharmacother.* 2023. 158: 114181.
- Domjan M., Fanselow M.S.* Pavlovian or associative sensitization and its biological significance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2024. 1: 105790.
- Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A., Gil L., Aguilar R., Tobeña A., Driscoll P.* Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol. Behav.* 1999. 167 (1): 19–26.
- Estanislau C., Ramos A.C., Ferraresi P.D., Costa N.F., de Carvalho H.M.C.P., Batistela S.* Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behav. Processes.* 2011. 86: 46–51.
- Fernández-Teruel A., Tobeña A.* Revisiting the role of anxiety in the initial acquisition of two-way active avoidance: pharmacological, behavioural and neuroanatomical convergence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020. 118: 739–758.
- Ferré P., Fernández-Teruel A., Escorihuela R.M., Driscoll P., Corda M.G., Giorgi O., Tobeña A.* Behavior of the Roman/Verh high- and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiol. Behav.* 1995. 58: 1209–1213.
- Green M.R., McCormick C.M.* Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models. *Horm. Behav.* 2013. 64 (2): 364–379.
- Guo B., Xi K., Mao H., Ren K., Xiao H., Hartley N.D., Zhang Y., Kang J., Liu Y., Xie Y., Zhou Y., Zhu Y., Zhang X., Fu Z., Chen J.F., Hu H., Wang W., Wu S.* CB1R dysfunction of inhibitory synapses in the ACC drives chronic social isolation stress-induced social impairments in male mice. *Neuron.* 2024. 112(3):441–457.
- Hadad-Ophir O., Ardi Z., Brande-Eilat N., Kehat O., Anunu R., Richter-Levin G.* Exposure to prolonged controllable or uncontrollable stress affects GABAergic function in sub-regions of the hippocampus and the amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2017. 138: 271–280.
- Hellemans K.G., Benge L.C., Olmstead M.C.* Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2004. 150 (2): 103–115.
- Hofford R.S.* Isolation drives reward-seeking in rats. *Lab. Animal.* 2021. 50(5), 125–126.
- Holuka C., Grova N., Charalambous E. G., Le Cleac'H.J., Turner J.D., Mposhi A.* Transgenerational impacts of early life adversity: from health determinants, implications to epigenetic consequences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2024. 164: 105785.
- 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. 10: 799.
- Lapiz M.D.S., Fulford A., Muchimapura S., Mason R., Parker T., Marsden C. A.* Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2003. 33: 13–29.
- Luedke A.C., Boucher P.O., Niel L., Holmes M.M.* Altered anxiety and defensive behaviors in Bax knockout mice. *Behav. Brain Res.* 2013. 239: 115–120.
- 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. *Front. Behav. Neurosci.* 2009. 3: 18.
- Mauvais-Jarvis F., Arnold A.P., Reue K.* A Guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. *Cell. Metab.* 2017. 25(6): 1216–1230.
- McCormick C.M., Mathews I.Z.* Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2010. 34(5): 756–765.
- McLean S., Grayson B., Harris M., Protheroe C., Woolley, M., Neill J.* Isolation rearing impairs novel object recognition and attentional set shifting performance in female rats. *J. Psychopharmacol.* 2008. 24 (1): 57.
- Miskolczi C., Halász J., Mikics É.* Changes in neuroplasticity following early-life social adversities: the possible role of brain-derived neurotrophic factor. *Pediatr. Res.* 2019. 85(2): 225–233.
- Moragrega I., Carmen Carrasco M., Redolat R.* Effects of housing and nicotine on shuttle-box avoidance in male NMRI mice. *Behav. Brain. Res.* 2005. 164 (2): 178–187.
- Moyaho A., Valencia J.* Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychology.* 2002. 116: 263–269.
- Mu M.D., Geng H.Y., Rong K.L., Peng R.C., Wang S.T., Geng L.T., Qian Z.M., Yung W.H., Ke Y.* A limbic circuitry involved in emotional stress-induced grooming. *Nat. Commun.* 2020.11(1): 2261.
- Mumtaz F., Khan M.I., Zubair M., Dehpour A.R.* Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model – A comprehensive review. *Biomed. Pharmacother.* 2018. 105: 1205.

- Myslivecek J.* Social Isolation: How can the effects on the cholinergic system be isolated? *Front. Pharmacol.* 2021. 12: 716460.
- Nikolaienko O., Klymenko M., Isaeva E.* Consequences of adolescent social isolation on behavior and synaptic plasticity in the dorsal and ventral hippocampus in male Wistar rats. *Neurol. Res.* 2023. 45(12): 1152–1160.
- Ohta R., Shirota M., Adachi T., Tohei A., Taya K.* Plasma ACTH levels during early, two-way avoidance acquisition in high- and low-avoidance rats (Hatano strains). *Behav. Genet.* 1999. 29 (2): 137–144.
- Pisu M.G., Dore R., Mostallino M.C., Mameli R., Cadeddu R., Secci P.P., Serra M.* Down-regulation of hippocampal BDNF and Arc associated with improvement in aversive spatial memory performance in socially isolated rats. *Behav. Brain. Res.* 2011. 222(1): 73–80.
- Saad N., Raviv D., Mizrahi Zer-Aviv T., Akirav I.* Cannabidiol modulates emotional function and brain-derived neurotrophic factor expression in middle-aged female rats exposed to social isolation. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. 24 (20): 15492.
- Sailer L.L., Patel P.P., Park A.H., Moon J., Hanadani-Levy A., Ophir A.G.* Synergistic consequences of early-life social isolation and chronic stress impact coping and neural mechanisms underlying male prairie vole susceptibility and resilience. *Front. Behav. Neurosci.* 2022. 16: 931549.
- Sánchez-González A., Oliveras I., Río-Álamos C., Piludu M.A., Gerbolés C., Tapias-Espinosa C., Tobeña A., Aznar S., Fernández-Teruel A.* Dissociation between schizophrenia-relevant behavioral profiles and volumetric brain measures after long-lasting social isolation in Roman rats. *Neurosci. Res.* 2020. 155: 43–55.
- Santini Z.I., Jose P.E., Cornwell E.Y., Koyanagi A., Nielsen L., Hinrichsen C., Meilstrup C., Madsen K.R.* Social disconnectedness, perceived isolation, and symptoms of depression and anxiety among older Americans (NSHAP): a longitudinal mediation analysis. *Lancet Public Health.* 2020. 5: 62–70.
- Shirenova S.D., Khlebnikova N.N., Narkevich V.B., Kudrin V.S., Krupina N.A.* Nine-month-long social isolation changes the levels of monoamines in the brain structures of rats: a comparative study of neurochemistry and behavior. *Neurochem. Res.* 2023. 48(6): 1755–1774.
- Tanaka K., Osako Y., Takahashi K., Hidaka C., Tomita K., Yuri K.* Effects of post-weaning social isolation on social behaviors and oxytocinergic activity in male and female rats. *Heliyon.* 2019. 5(5): e01646.
- Vazquez-Sanroman D.B., Arlington Wilson G., Bardo M.T.* Effects of social isolation on perineuronal nets in the amygdala following a reward omission task in female rats. *Mol. Neurobiol.* 2021. 58 (1):348–361.
- Viveros M.P., Hernandez R., Gallego A.* Effects of social isolation and crowding upon active-avoidance performance in the rat. *Animal Learn. Behav.* 1990. 18(1): 90.
- Walker D.M., Cunningham A.M., Gregory J.K., Nestler E.J.* Long-term behavioral effects of post-weaning social isolation in males and females. *Front. Behav. Neurosci.* 2019. 13: 66.
- 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. *Behav. Brain Res.* 2004. 152(2): 279–295.
- Zelikowsky M., Hui M., Karigo T., Choe A., Yang B., Blanco M.R., Beadle K., Gradinaru V., Deverman B.E., Anderson D.J.* The neuropeptide Tac2 controls a distributed brain state induced by chronic social isolation stress. *Cell.* 2018. 173(5): 1265–1279.e19.
- Zhang C., Kalueff A.V., Song C.* Minocycline ameliorates anxiety-related self-grooming behaviors and alters hippocampal neuroinflammation, GABA and serum cholesterol levels in female Sprague-Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Behav. Brain Res.* 2019. 363: 109–117.

## LONG-TERM SOCIAL ISOLATION IMPAIRS LEARNING IN A TWO-WAY ACTIVE AVOIDANCE TASK IN FEMALE RATS

N. A. Krupina<sup>#</sup>, N. N. Khlebnikova

*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: krupina-na@yandex.ru*

In socially living species, including humans, social contacts' deficit provokes chronic stress development, leading to disorders in the psychoemotional sphere, cognitive impairment, etc. Previously, we showed that spatial memory and passive avoidance impairments in rats exposed to months-long social isolation (SI) from an early age are more pronounced in females compared to males. There is lack research on females. This study aimed to evaluate learning in the two-way avoidance paradigm using the conditioned active avoidance reflex (CAAR) test and to assess skill retention in female rats exposed to SI, which started after the pups were taken from their dams and lasted for up to ten months. After 6.5 months of SI, rats were trained in the CAAR test when their anxiety level and grooming expression were lower than in rats housed in groups. Rats exposed to SI

performed fewer avoidance but more escape responses and were less likely to achieve the learning criterion. In isolated rats compared to control rats, the escape latency was heightened, and the maximum number of avoidance reactions in a row was less after 24 hours after training. After 2 months after training, no differences in CAAR retention were revealed between rats kept in different housing conditions. After 10 months of SI, rat blood serum corticosterone levels were lower than in rats in the control group. The findings show worse learning and skill retention one day following training in the CAAR test in rats under the influence of long-term SI.

*Keywords:* long-term social isolation, female rats, two-way conditioned active avoidance reflex, anxiety, grooming, locomotor and exploratory activity, pain sensitivity in the “Hot Plate” test, corticosterone