

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ  
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

---

---

УДК 612; 612,65; 612,66; 612,88

## ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К ОБУЧЕНИЮ В ЗРЕЛОМ ВОЗРАСТЕ КРЫС WAG/RIJ

© 2021 г. А. Ю. Шишелова<sup>1,2</sup>, В. В. Раевский<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

\*e-mail: vraevsky@mail.ru

Поступила в редакцию 02.12.2020 г.

После доработки 11.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

У крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии и характеризующихся депрессивным статусом, исследовали влияние полной 3-часовой ежедневной социальной изоляции в разные критические периоды раннего постнатального онтогенеза (2–8-й, 9–15-й, 16–22-й дни после рождения) на поведение во взрослом возрасте. Установлено, что изоляция со 2-го по 8-й и с 16-го по 22-й дни жизни обуславливает увеличение двигательной активности в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта и в тесте “открытого поля”. У животных, подвергавшихся изоляции с 9-го по 15-й день, не отмечено изменения двигательной активности по сравнению с животными контрольной группы, но выявлено повышение эмоциональной реактивности. Формирование условного рефлекса двустороннего избегания обнаружено у большего числа животных, перенесших изоляцию с 9-го дня жизни.

*Ключевые слова:* социальная изоляция, онтогенез, двигательная активность, обучение

DOI: 10.31857/S0044467721030072

### ВВЕДЕНИЕ

Социальная среда является важным фактором раннего онтогенеза, оказывающим существенное влияние как на формирование ранних поведенческих реакций, так и на способность адаптации к окружающей среде в зрелом возрасте (Curley et al., 2011; Cohen et al., 2015). Основными компонентами социальной среды для новорожденных являются мать и сиблинги. Особенное значение материнской заботы было идентифицировано в экспериментах с перекрестным выращиванием потомства крыс линий WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии, и Wistar без врожденной патологии ЦНС. В этих экспериментах было установлено, что у крысят линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии, воспитанных здоровыми самками линии Wistar, эпилептическая активность формируется позже и менее выражена (Sitnikova et al., 2015, 2016; Саркисова и др., 2017). Ограничение

сенсорного притока в течение первых 20 дней жизни за счет ежедневного выстригания вибрисс, напротив, инициирует у этих животных более раннее развитие патологии (Sitnikova, 2011).

В то же время ранний онтогенез представляет собой ряд периодов, в течение которых сенсорные факторы специфически влияют на развитие организма. Так, в экспериментах на крысах линии Wistar было показано, что ограничение видоспецифической афферентации за счет ежедневного выстригания вибрисс в разные сроки постнатального онтогенеза (со 2-го или 9-го по 20-й дни жизни) оказывает разное влияние на формирование ранних поведенческих реакций, а также на исследовательское поведение во взрослом возрасте (Шишелова, Раевский, 2009; Шишелова и др., 2015, 2016), что позволило выделить два критических периода в раннем онтогенезе крысят — со 2-го и с 9-го дня жизни. Однако есть основания считать, что после

## МЕТОДИКА

прозревания крысят (15–17-й день жизни) наступает третий период развития, для которого характерно включение в репертуар взаимодействия с окружающей средой нового сенсорного входа. Это позволяет предполагать, что на развитие генетически предопределенной патологии у крыс линии WAG/Rij особое влияние могут оказывать сенсорные факторы одного из указанных критических периодов раннего онтогенеза. Изменение социальной среды в определенный критический период в последующем может приводить к изменению эмоционального статуса животных, коррелирующего с вероятностью развития эпилептической активности. Так, известно, что для крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии, характерны депрессивные нарушения (Sarkisova et al., 2003; Sarkisova, van Luijcklaag, 2011). При этом показано, что у тех молодых животных, у которых наблюдается низкий уровень тревожности, в последующем развивается эпилептическая активность (Смирнов, Ситникова, 2020).

Основная цель нашего исследования заключалась в выявлении влияния социального опыта новорожденных в разные периоды раннего онтогенеза (со 2-го по 8-й, с 9-го по 15-й и с 16-го по 22-й дни жизни) на поведение и способность к обучению во взрослом возрасте у крыс линии WAG/Rij.

Одной из моделей исследования роли социального опыта в развитии служит изоляция от сородичей. Для грызунов в раннем постнатальном онтогенезе наиболее распространенным способом изоляции является ежедневное отлучение на несколько часов помета от матери (Litvin et al., 2010; Rana et al., 2015; Vetulani, 2013). В этих условиях новорожденный остается в окружении сиблингов, т.е. социальные контакты ограничены только частично. Реже в качестве модели социальной депривации применяется полная социальная изоляция, когда каждого детеныша удаляют из гнезда и содержат отдельно не только от матери, но и от сиблингов (Marmendal et al., 2006; Zhang et al., 2013). Этот способ социальной депривации, как более эффективный, был использован нами. Применение такой методики социальной изоляции отдельно для разных недель постнатального онтогенеза крыс использовано впервые.

Все эксперименты выполняли в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского Сообщества от 22 сентября 2010 – Directive 2010/63/EU).

Работа проведена на крысах линии WAG/Rij с генетической предрасположенностью к абсанс эпилепсии. Все животные были выращены в виварии лаборатории, с поддерживаемым режимом смены светлого и темного периодов суток (по 12 ч в соответствии с естественным ритмом, свет включали в 8.00). Беременных самок за два дня до предполагаемых родов отсаживали в отдельные клетки. День родов принимали за первый день жизни. На 2-й день проводили осмотр крысят и ограничивали число крысят в помете до 6–8, оставляя одинаковое количество самцов и самок в помете. Сформированы три экспериментальные группы, в которых детенышей подвергали ежедневной изоляции от матери и сиблингов в течение трех часов: в первой группе со 2-го по 8-й день жизни (5 пометов: 18 самцов и 13 самок), во второй – с 9-го по 15-й день (4 помета: 16 самцов, 16 самок), в третьей – с 16-го по 22-й день постнатального онтогенеза (5 пометов: 19 самцов, 19 самок). Изоляцию проводили в помещении виварии при температуре воздуха 20–21 градус по Цельсию. Всех крысят обоего пола из каждого помета изолировали одновременно. Во время изоляции каждого детеныша содержали в отдельном непрозрачном контейнере с опилками (для первой и второй групп – в круглом с диаметром 9.8 см и высотой 4.3 см, 13.0 см и 7.5 см соответственно, для третьей – в квадратном со стороной 15.3 см и высотой 7.5 см). Контейнеры с крысятами из одного помета размещали на столике рядом друг с другом. Столик с контейнерами находился на расстоянии 2 м от клеток с кормящими самками и другими пометами, что снижало влияние на них возможной ультразвуковой вокализации изолированных крысят (Gulia et al., 2014). В контрольной группе проводили только осмотр крысят в возрасте 2 и 9 дней (6 пометов: 22 самца и 22 самки). В возрасте 27 дней крысят отсаживали от матери и далее содержали группами по 3–4 животных одного пола в каждой клетке. Во взрослом возрасте тестировали поведение самцов: 1) в 2 мес – в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) в течение пяти минут, 2) в 2.5 мес – в “открытом поле” в течение десяти

минут, 3) в 6–6.5 мес – в челночной камере, где животных обучали условному рефлексу двустороннего избегания.

ПКЛ состоял из 4 рукавов равной длины (45 см): двух противоположных открытых и двух закрытых (огороженных стенками), с центральной открытой площадкой размером  $10 \times 10$  см, на высоте 80 см над полом. “Открытое поле” представляло собой квадратную, равномерно освещенную (26 люкс) арену черного цвета размером  $108 \times 108$  см, огороженную стенками высотой 40 см. Каждый эксперимент начинали с посадки животного в центр установки.

Регистрацию движения осуществляли с помощью компьютерной программы “Easy Track”, которая определяла координаты положения крысы каждые 40 мсек. Координаты использовали для построения траектории перемещения животного и для вычисления кинематических характеристик его движения. Анализировали длину пройденного пути, максимальную скорость движения животного ( $V_{\max}$ , наибольшее значение за период тестирования), время “сидения” – суммарную продолжительность отсутствия ходьбы и вертикальной активности (что соответствует регистрируемой скорости движения менее 2 см/с), время “бега” – суммарную продолжительность перемещения с высокой скоростью (более 30 см/с). Показатели движения в ПКЛ вычисляли отдельно для открытых и закрытых рукавов, а также анализировали время пребывания в этих зонах. В “открытом поле” вычисляли суммарные параметры движения для целого “открытого поля” и для его центральной зоны (квадрат в центре, площадью  $1/9$  от площади “открытого поля”). Путем визуального наблюдения регистрировали число стоек, актов груминга, дефекаций.

*Обучение условному рефлексу двустороннего избегания (УРДИ).* Для исследования УРДИ использовали челночную камеру, разделенную на два одинаковых по размеру отсека с отверстием в перегородке. К полу камеры (металлическая решетка) был подключен электростимулятор, что позволяло подавать ток отдельно на каждую половину камеры. Крысу помещали в камеру за 5 мин до начала обучения. В качестве условного раздражителя использовали 5-секундный звуковой сигнал (с уровнем звукового давления 80 дБ). Безусловным раздражителем служило электрокожное раздражение конечностей живот-

ного (силу тока (мА) подбирали достаточную для инициации реакции отдергивания лап). Во время обучения отсек, в котором находилось животное при предъявлении условного раздражителя, был опасным, подключенным в данный момент к электростимулятору. Безусловный раздражитель предъявляли через 4.5 сек после включения условного сигнала до перехода животного в соседний (безопасный) отсек. Если животное не переходило в безопасный отсек в течение 40 сек, электрическую стимуляцию прекращали. После перехода крысы в соседний отсек последний становился опасным, а покинутый отсек – безопасным. Интервал между сочетаниями составлял 20–40 сек. Переход крысы в безопасный отсек до включения электрокожного раздражения считали проявлением условной реакции избегания. Процедура обучения состояла из 5 последовательных серий, каждая из которых содержала 10 предъявлений сочетаний условного и безусловного раздражителей. Анализировали: (1) общее количество условных реакций избегания (в % от суммарного числа предъявлений условного раздражителя); (2) число условных реакций в каждой серии; (3) порядковый номер предъявления условного раздражителя, при котором животное демонстрировало первую условную реакцию избегания; (4) долю животных в группе, достигших критерия обученности животного (наличие 9 условных реакций избегания в ответ на 10 последовательных предъявлений условного раздражителя), когда условный рефлекс считали стойко сформированным.

Статистический анализ проводили в программе STATISTICA 10.0. При обработке данных использовали тест для проверки на нормальность распределений (критерий Шапиро–Уилка W), однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (для показателей поведения в ПКЛ, имевших нормальные распределения), непараметрические статистические критерии – Манна–Уитни (U) для показателей, имевших отличные от нормальных распределения, парный Вилкоксона (T), и сравнение двух долей (пропорций) (difference between two proportions, two-sided test). Для *post-hoc* анализа использовали тест Ньюмена–Коулса (Newman–Keuls).

**Таблица 1.** Показатели поведения в отсеках ПКЛ крыс контрольной и экспериментальных групп (среднее  $\pm$  С.К.О.)  
**Table 1.** The signs of plus-maze behavior in control and experimental rat groups (mean  $\pm$  Std.Dev.)

Показатели поведения	Контрольная группа $n = 19$	Изолированные со 2-го дня жизни $n = 17$	Изолированные с 9-го дня жизни $n = 15$	Изолированные с 16-го дня жизни $n = 19$
Показатели поведения в закрытых рукавах				
Длина пути, см	886.6 $\pm$ 182.0	936.2 $\pm$ 154.6	<b>1006.6 <math>\pm</math> 208.5</b>	<b>818.6 <math>\pm</math> 133.2 #</b>
$V_{\max}$ , см/с	<b>33.65 <math>\pm</math> 6.5</b>	<b>40.8 <math>\pm</math> 9.1 #</b>	37.05 $\pm$ 5.0	36.2 $\pm$ 5.9
Число актов груминга	0.9 $\pm$ 1.0	1.8 $\pm$ 1.6	1.7 $\pm$ 1.0 *	1.5 $\pm$ 1.3
Число дефекаций	0.7 $\pm$ 1.5	1.2 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 1.9 *	1.4 $\pm$ 2.2
Показатели поведения в открытых рукавах				
	$n = 13$	$n = 10$	$n = 10$	$n = 16$
Длина пути, см	114.9 $\pm$ 76.7	214.6 $\pm$ 126.1 *	175.2 $\pm$ 83.6	232.4 $\pm$ 130.8 **
Время пребывания, с	32.1 $\pm$ 21.9	57.0 $\pm$ 24.6 *	52.8 $\pm$ 30.0	60.2 $\pm$ 30.4 **
$V_{\max}$ , см/с	16.0 $\pm$ 5.4	23.4 $\pm$ 9.8	18.75 $\pm$ 4.2	22.4 $\pm$ 7.9 *
Число выходов в рукава	2.3 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 1.2	3.25 $\pm$ 1.6

**Примечание.** Жирным шрифтом в строке выделены показатели групп, имеющих статистически значимые различия между собой (ANOVA, *post-hoc* анализ, Newman–Keuls тест: # –  $p < 0.05$ ). \* – статистически значимые отличия от контрольной группы (тест Манна–Уитни, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ ).

**Note.** The bold values in line are the behavior signs of groups with statistically significant differences (ANOVA, *post-hoc* analysis, Newman–Keuls test: #  $p < 0.05$ ). \* – the values differ significantly from those of control group (Mann–Whitney test, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### *Поведение в приподнятом крестообразном лабиринте*

Основные показатели поведения в приподнятом крестообразном лабиринте проанализированы отдельно для закрытых и открытых рукавов. Сводные данные по показателям, имевшим статистически значимые различия в исследованных группах, представлены в табл. 1.

Обращает внимание, что у животных, перенесших изоляцию со 2-го по 8-й день жизни, скорость перемещения в закрытых рукавах лабиринта была значимо больше, чем у контрольных животных (ANOVA  $F(3,66) = 3.401$ ,  $p = 0.022$ ; *post-hoc* анализ, тест Newman–Keuls,  $p = 0.014$ ). В открытые рукава выходили 59% крыс из группы, изолированных со 2-го дня жизни, что сравнимо с контрольными животными (68%), но у этих животных зафиксированы статистически значимо большие продолжительность пребывания и длина пройденного пути в открытых рукавах по сравнению с контрольной группой (тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ), а также тенденция к более высокой скорости перемещения во время побегов (тест Манна–Уитни,  $p = 0.088$ ).

У крыс, изолированных от матери и сиблингов с 9-го по 15-й день жизни, по сравнению с контрольной группой во время нахождения в закрытых рукавах выявлено большее число дефекаций и груминга (тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ). В открытые рукава выходило столько же крыс, перенесших изоляцию с 9-го дня (67%), что и в контрольной группе.

У крыс, которых изолировали от матери и сиблингов с 16-го по 22-й день жизни, поведение в закрытых рукавах статистически значимо отличалось только от поведения животных, изолированных с 9-го дня, меньшей длиной пройденного пути (ANOVA  $F(3,66) = 3.685$ ,  $p = 0.016$ ; *post-hoc* анализ, тест Newman–Keuls,  $p = 0.010$ ).

В открытые рукава лабиринта выходило 67% крыс, изолированных с 16-го дня жизни. У этих крыс наблюдались наибольшие статистически значимые отличия показателей исследовательской активности в открытых рукавах по сравнению с контрольными животными: увеличение длины пути, времени пребывания (тест Манна–Уитни,  $p < 0.01$ ), максимальной скорости передвижения (тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ).

Таким образом, установлено влияние ранней полной социальной изоляции на эмоци-

**Таблица 2.** Показатели поведения в “открытом поле” крыс контрольной и экспериментальных групп, за первые и последующие 5 мин тестирования (среднее  $\pm$  С.К.О.)**Table 2.** The signs of the open field behavior in control and experimental rat groups in the first and next 5 minutes (mean  $\pm$  Std.Dev.)

Показатели поведения	Контрольная группа <i>n</i> = 19		Изолированные со 2-го дня жизни <i>n</i> = 17		Изолированные с 9-го дня жизни <i>n</i> = 16		Изолированные с 16-го дня жизни <i>n</i> = 17	
	1–5 мин	6–10 мин	1–5 мин	6–10 мин	1–5 мин	6–10 мин	1–5 мин	6–10 мин
Длина пути, см	1726.9 $\pm$ 603.5	1271.2 $\pm$ 583.35&&	2114.9 $\pm$ 669.1	1414.1 $\pm$ 598.5&&&	1910.9 $\pm$ 476.3	1205.5 $\pm$ 461.0&&&	2354.5 $\pm$ 358.8 **	1667.4 $\pm$ 372.5*&&&
Время “бега”	18.9 $\pm$ 13.0	13.8 $\pm$ 8.6	29.15 $\pm$ 16.1	15.6 $\pm$ 11.6&&	13.9 $\pm$ 12.2	8.0 $\pm$ 8.9 &&	29.5 $\pm$ 11.3 *	18.5 $\pm$ 7.9 &&&
Время “сидения”	134.65 $\pm$ 38.4	173.7 $\pm$ 55.1&	118.65 $\pm$ 37.4	164.8 $\pm$ 43.9&&&	125.2 $\pm$ 32.2	178.7 $\pm$ 39.8&&&	96.4 $\pm$ 16.65***	137.5 $\pm$ 23.1*&&&
<i>V</i> max, см/с	40.3 $\pm$ 7.9	37.7 $\pm$ 11.7	44.6 $\pm$ 6.4 *	42.1 $\pm$ 6.6	41.6 $\pm$ 5.05	39.8 $\pm$ 6.4&	44.9 $\pm$ 5.2*	44.7 $\pm$ 4.9*
Число стоек	4.6 $\pm$ 3.6	5.6 $\pm$ 2.85	5.65 $\pm$ 4.5	6.3 $\pm$ 4.3	5.4 $\pm$ 2.2	4.7 $\pm$ 4.3	7.8 $\pm$ 3.5 **	7.2 $\pm$ 2.5
Число актов груминга	1.2 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 1.1	2.35 $\pm$ 2.3	2.8 $\pm$ 2.3	3.1 $\pm$ 1.4***	2.5 $\pm$ 1.5*	2.2 $\pm$ 1.2 **	2.8 $\pm$ 2.6*
Доля крыс, вышедших в ЦЗ, %	73%	58%	88%	71%	94%	44%	94%	94%
Длина пути в ЦЗ, см	57.0 $\pm$ 46.7	47.2 $\pm$ 33.0	79.5 $\pm$ 68.4	94.9 $\pm$ 94.5	101.7 $\pm$ 81.0	102.6 $\pm$ 88.3	205.0 $\pm$ 101.1***	100.1 $\pm$ 57.1 *

**Примечание.** \* – статистически значимые отличия от контрольной группы в данный период тестирования (тест Манна–Уитни, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ ). & – статистически значимые различия между поведением в первые и последующие 5 мин тестирования (парный тест Вилкоксона, & –  $p < 0.05$ , && –  $p < 0.01$ , &&& –  $p < 0.001$ ). ЦЗ – центральная зона “открытого поля”.

**Note.** \* – the values differ significantly from those of control group in this test period (Mann–Whitney test, \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ ). & – statistically significant differences between behavior in the first and next 5 minutes (paired Wilcoxon test, & –  $p < 0.05$ , && –  $p < 0.01$ , &&& –  $p < 0.001$ ). CZ – the central zone of the “open field”.

ональную реактивность и исследовательское поведение в ПКЛ во взрослом возрасте. Эффект изоляции зависит от периода раннего онтогенеза, во время которого эта процедура осуществляется.

Изоляция в первую неделю жизни увеличивает во взрослом возрасте общее время пребывания в потенциально опасном пространстве открытых рукавов лабиринта, длину пройденного пути и скорость передвижения по сравнению с контрольными животными.

Изоляция во вторую неделю жизни приводит только к увеличению эмоциональной реактивности, что проявляется в повышенном количестве актов груминга и дефекации по сравнению с контрольной группой.

Изоляция в третью неделю жизни оказывает наиболее выраженное влияние на поведение в приподнятом крестообразном лабиринте и особенно в открытых рукавах. При этом не наблюдается изменений показателей эмоциональной реактивности.

### Поведение в “открытом поле”

Поведение в ОП анализировали отдельно для первых и последующих пяти минут тестирования, принимая в качестве рабочей гипотезы, что в течение первых 5 мин двигательная активность отражает комплексное ориентировочное поведение, имеющее как активно-оборонительную, так и исследовательскую компоненты, а во вторые 5 мин теста – в большей степени исследовательскую активность (Маркель и др., 1988). У контрольных животных при сравнении поведения в первом и втором 5-минутных периодах тестирования обнаружены статистически значимое снижение длины пути и увеличение продолжительности “сидения” во втором периоде (парный тест Вилкоксона,  $p < 0.01$  и  $p < 0.05$  соответственно) (табл. 2). Поведение в центральной зоне от первого периода ко второму не изменилось.

Во всех экспериментальных группах наблюдались сходные изменения во втором периоде тестирования: статистически значимое снижение длины пути (парный тест Вилкок-

сона,  $p < 0.001$ ), времени “бега” ( $p < 0.01$ ) и увеличение продолжительности “сидения” ( $p < 0.001$ ).

Поведение крыс, изолированных со 2-го по 8-й день жизни от матери и сиблингов, во взрослом возрасте не отличается от поведения контрольных животных ни по одному показателю (за исключением статистически значимо большей  $V_{\max}$  в первые 5 мин тестирования, тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ).

В группе животных, подвергнутых изоляции с 9-го дня, обнаружено только одно отличие от контроля – у экспериментальных крыс во взрослом возрасте выявлено значимо большее число актов груминга, что было характерно как для первых, так и для вторых пятиминутных периодов тестирования (тест Манна–Уитни,  $p < 0.001$  и  $p < 0.05$ ).

По сравнению с контрольной группой наибольшие отличия выявлены для крыс, изолированных с 16-го дня жизни: статистически значимо большие значения длины пройденного пути, скорости перемещения, числа актов груминга, сниженная продолжительность “сидения” в каждый из периодов теста, а также большие величины времени “бега” и числа стоек в первые 5 мин тестирования (тест Манна–Уитни, см. табл. 2).

По поведению в центральной зоне отличия от контрольной группы получены для животных, изолированных с 9-го и 16-го дней жизни. У первых статистически значимо уменьшалась доля крыс, выходящих в центральную зону во вторые 5 мин теста, по сравнению с предшествующим периодом (тест сравнения двух долей,  $p = 0.002$ ), что характеризует снижение исследовательской активности у этой группы животных. У крыс, подвергавшихся изоляции с 16-го дня жизни, доля животных, выходящих в центральную зону во втором периоде теста, была статистически значимо больше по сравнению с крысами контрольной группы и изолированными с 9-го дня жизни (тест сравнения двух долей,  $p = 0.015$  и  $p = 0.002$ ), что свидетельствует о повышенной исследовательской активности.

Таким образом, изоляция со 2-го и 9-го дня оказывала незначительное влияние на поведение в “открытом поле” у взрослых крыс, в то время как изоляция с 16-го дня жизни вызывала выраженное увеличение двигательной и исследовательской активности в этом тесте.

### *Обучение условному рефлексу двустороннего избегания*

В группе контрольных животных общее количество избеганий при предъявлении условного раздражения составило  $37.05 \pm 21.0\%$  от всех 50 предъявлений условного раздражителя во время обучения. УРДИ (по критерию 9 условных реакций в ответ на 10 последовательных предъявлений условного стимула) в этой группе удалось выработать у 48% крыс. Анализ динамики обучения выявил последовательное увеличение числа условных реакций от первой серии до третьей, после чего число избеганий не увеличивается (рис. 1). Таким образом, стабилизация проявления реакций избегания в этой группе возникала в течение первых тридцати предъявлений условного стимула.

У крыс, изолированных со 2-го по 8-й день жизни, общее количество реакций избегания ( $52.13 \pm 13.18\%$  от 50 предъявлений условного раздражителя) было статистически значимо больше, чем у животных контрольной группы (тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ). Условный рефлекс был выработан у 60% крыс, что статистически значимо не отличалось от доли обучившихся крыс в группе контрольных животных. Динамика обучения характеризовалась последовательным увеличением числа избеганий от 1-й до 4-й серии (рис. 1), что свидетельствует об увеличении времени, необходимого для выработки стабильного навыка в этой группе по сравнению с контрольной.

В группе, подвергшейся изоляции с 9-го по 15-й день жизни, общее количество реакций избегания ( $52.58 \pm 18.33\%$  от 50 предъявлений условного раздражителя) было статистически значимо большим, чем у контрольной группы (тест Манна–Уитни,  $p < 0.05$ ). УРДИ был выработан у 83% крыс (отличие от контрольной группы статистически значимо, тест сравнения двух долей,  $p = 0.046$ ). У животных, изолированных с 9-го дня жизни, динамика увеличения числа реакций избегания была такой же, как и у крыс контрольной группы – они достигали максимума в третьей серии.

У животных, изолированных от матери и сиблингов с 16-го по 22-й день жизни, общее количество реакций избегания ( $42.75 \pm 16.87\%$  от 50 предъявлений условного раздражителя) не отличалось статистически значимо от контрольной группы. Условный рефлекс удалось выработать у 56% крыс, что также статисти-

чески значимо не отличалось от доли обучившихся крыс в группе контрольных животных. Число реакций избегания у животных, подвергнутых изоляции с 16-го дня жизни, постепенно возрастало в течение всего периода обучения — от первой к пятой серии (рис. 1), что характеризует увеличение времени, необходимого для выработки стабильной реакции избегания, по сравнению с остальными группами.

Статистически значимых различий долей обучившихся УРДИ животных между группами, подвергавшимися изоляции, не было обнаружено.

Время появления первой реакции избегания (по критерию порядкового номера условного раздражителя, при котором животное демонстрировало первую условную реакцию) у животных контрольной группы и крыс, подвергнутых социальной изоляции, не различалось.

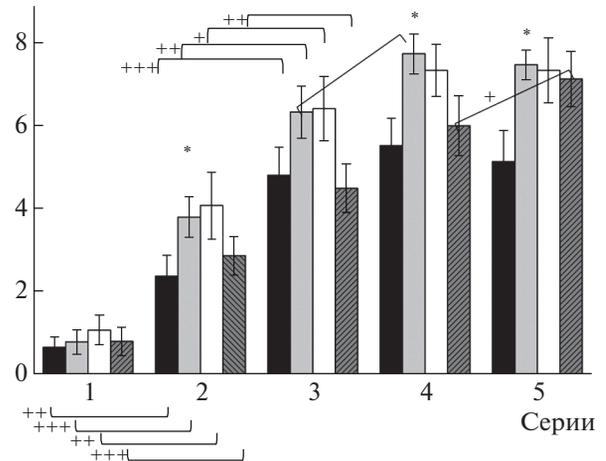
Таким образом, у крыс, социально изолированных с 9-го по 15-й дни постнатального онтогенеза, наблюдается повышение способности к обучению УРДИ. У других групп животных, подвергавшихся изоляции в более ранние или поздние сроки, доля обучившихся животных не изменялась по сравнению с контрольной группой, но наблюдалось увеличение времени, необходимого для достижения уровня стабильного проявления условного рефлекса.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было установлено, что сенсорные факторы раннего онтогенеза способны изменить темпы развития генетически предопределенной абсанс эпилепсии у крыс линии WAG/Rij (Sitnikova, 2011; Sitnikova et al., 2015, 2016; Саркисова и др., 2017).

Известно, что первый месяц жизни крыс можно разделить на несколько критических периодов, в течение которых видоспецифическая афферентация по-разному сказывается как на формировании ранних поведенческих реакций, так и на адаптивном поведении в зрелом возрасте.

В течение первых 8–9 дней у крысят происходит формирование специфической организации соматосенсорной коры, что обеспечивает адекватное восприятие сигналов от вибрисс — сенсорного входа, играющего большую роль в организации поведения нор-



**Рис. 1.** Динамика обучения УРДИ. По горизонтали — серии обучения, по вертикали — суммарное число условных реакций во время этих серий. Обозначения: черные столбики соответствуют контрольной группе, серые — группе крыс, изолированных со 2-го дня жизни, белые — группе крыс, изолированных с 9-го дня жизни, заштрихованные — группе крыс, изолированных с 16-го дня жизни. Вертикальные линии для каждой фигуры отражают ошибку средней. Статистически значимые различия между двумя последовательными периодами (парный критерий Вилкоксона): + —  $p < 0.05$ ; ++ —  $p < 0.01$ ; +++ —  $p < 0.001$ . \* — статистически значимые различия между группами контрольной и изолированной со 2-го дня жизни ( $p < 0.05$ , тест Манна–Уитни).

**Fig. 1.** Dynamics of active avoidance learning. Horizontal — series of trials, vertical — the total number of conditioned responses during these series. Legend: black bars correspond to the control group, gray bars — to the group of rats isolated from the 2nd day of life, white bars — to the group of rats isolated from the 9th day of life, shaded bars — to the group of rats isolated from the 16th day of life. The vertical lines for each bar represent the error of the mean. Statistically significant differences between two consecutive periods (paired Wilcoxon test): + —  $p < 0.05$ ; ++ —  $p < 0.01$ ; +++ —  $p < 0.001$ . \* — statistically significant differences between the control and isolated groups from the 2nd day of life ( $p < 0.05$ , Mann–Whitney test).

ных животных (Guido et al., 1998). Выстригание вибрисс с 2-дневного возраста приводит к реорганизации корреляционных связей между сроками созревания ранних поведенческих реакций, выражающейся в исчезновении некоторых корреляционных связей и появлении новых связей между временем созревания и формирования ранних поведенческих реакций (Шишелова, Раевский, 2009). Такую реорганизацию можно рассматривать как компенсаторную перестройку в сенсорных

системах, что свидетельствует о значительных пластических возможностях адаптации к сенсорной депривации в первую неделю жизни. Благоприятным обстоятельством для противодействия негативным внешним факторам в этот период жизни также можно считать наиболее низкий уровень функционирования гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы по критерию количества основного белка рецепторов к глюкокортикоидам в гиппокампе (Galeeva et al., 2010) и низкой реактивности в виде невысокой секреции кортикостерона в ответ на стрессовое воздействие (Levine, 2002).

Наши исследования показали, что выстригание вибрисс с 9-го дня постнатального онтогенеза (после структурного формирования соматосенсорной системы) приводит к исчезновению большинства корреляционных связей между сроками формирования ранних поведенческих реакций и прозреванием, что может препятствовать эффективной консолидации разрозненно созревающих реакций в целостные функциональные системы (Шишелова, Раевский, 2009). Вероятно, что последствия сенсорной депривации в данный период могут усиливаться в связи с повышением в это время у крысят чувствительности к стрессовому воздействию за счет увеличения количества белка рецепторов к глюкокортикоидам в гиппокампе, которое к 13-му дню жизни достигает максимума (Galeeva et al., 2010).

В совокупности эти факты позволили нам на первом этапе выделить два критических периода раннего онтогенеза (первые 8 дней и последующий период), в течение которых дефицит сенсорной информации по-разному влияет на формирование поведения в зрелом возрасте (Шишелова, Раевский, 2009). Однако вследствие особенностей развития поведения крысят в течение второй и третьей недели жизни возникла необходимость разделить второй критический период на два, выделив, таким образом, третий период, который начинается после прозревания (происходящего в возрасте 15–17 дней). Для него характерны основные признаки перехода к новому этапу развития: включение в репертуар взаимодействия с окружающей средой нового сенсорного входа, обусловленное прозреванием (Wills et al., 2014), становление способности к пространственному обучению с вовлечением гиппокампа (Wills et al., 2014), смена ведущей афферентации, обеспечивающей взаимодей-

ствие новорожденного с матерью и сиблингами, — у крысят постепенно прекращается ультразвуковая оборонительная вокализация при разлучении с матерью (Gulia, 2014). К 15-му дню жизни заканчивается период сниженной чувствительности гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы к стрессовым факторам (stress hypo-responsive period), и далее, к 25–30-му дню жизни, происходит постепенное возрастание уровня кортикостерона в крови — как базального, так и вызванного стрессовыми факторами (Galeeva et al., 2010; Holmes et al., 2005; Romeo, 2016; Wills et al., 2014). В этот период происходит полное созревание базовых поведенческих реакций: стоек, груминга, манипуляторной активности (Шишелова, Раевский, 2009). Таким образом, по степени зрелости сенсорных систем и эмоциональной реактивности после третьей недели жизни крысята в целом становятся подготовленными к покиданию гнезда.

Настоящее исследование показало, что специфика влияния полной социальной изоляции крысят линии WAG/Rij на поведение и способность к обучению в зрелом возрасте зависит от того, в какой критический период раннего онтогенеза эта изоляция осуществлялась.

Последствия изоляции крысят в возрастной период со 2-го по 8-й день жизни проявлялись в повышении двигательной активности по критериям увеличения длины пройденного пути и скорости перемещения, преимущественно в открытых рукавах ПКЛ, что указывает на сниженную тревожность.

У крыс, изолированных с 9-го по 15-й день жизни, по сравнению с контрольными животными изменений в двигательной активности практически не происходит, но при тестировании как в ПКЛ, так и в ОП у них выявлено повышение эмоциональной реактивности по критерию увеличения числа эпизодов груминга и дефекации (Estanislau et al., 2019; Fernández-Teruel et al., 2016).

Как было отмечено, этот период характеризуется высокой активностью гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы. Возможно, именно это обстоятельство является причиной наиболее существенного влияния полной изоляции в этот период на проявление эмоциональной реактивности в зрелом возрасте.

Наибольшие изменения двигательной активности в ПКЛ и в тесте ОП обнаружены у

животных, изолированных с 16-го по 22-й день жизни. Причина этого не очевидна. В качестве гипотезы можно предположить, что в основе данного феномена лежит ограничение визуального опыта в период наиболее интенсивного развития зрительной сенсорной системы. В этот период также происходит развитие функциональных связей гиппокампа — структуры, которая считается одним из центров, контролирующих поведение в конфликтной ситуации и усиливающих исследовательское поведение для получения большего количества информации с целью разрешения конфликта (например, при реакции на новую обстановку) (Sturman et al., 2018). По данным литературы, выявлены связи между плотностью нервных волокон в гиппокампе и количеством стоек без опоры в “открытом поле”, отражающих исследование окружающего пространства с помощью зрительной системы. Таким образом, ограничение зрительной афферентации после прозревания (Sturman et al., 2018) могло привести к формированию повышенной потребности в ее получении для разрешения конфликта при освоении новой обстановки.

Исследование влияния социальной изоляции в раннем онтогенезе на способность к обучению оборонительному поведению выявило, на первый взгляд, парадоксальный факт: общее число реакций избегания в процессе обучения УРДИ статистически значимо больше у крыс, подвергавшихся изоляции со 2-го по 8-й день, и у крыс, изолированных с 9-го по 15-й день, а число крыс, обучившихся условному рефлексу, больше только в последней группе. Основой для лучшего обучения животных, изолированных в течение второй недели жизни, может служить тот факт, что у них наблюдается повышенная эмоциональная реактивность по критерию числа эпизодов груминга и дефекаций при первом помещении в новую потенциально опасную обстановку, а также повышение чувствительности гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы (Galeeva et al., 2010). Можно предполагать, что наблюдаемая наибольшая эмоциональная реактивность обуславливает более выраженную оборонительную мотивацию, что, в свою очередь, приводит к лучшему обучению животных. Большое число реакций избегания у крыс, изолированных в течение первой недели жизни, следует отнести за счет повышенной двигательной активности, в результате чего животные часто пе-

ремещаются из одного отсека в другой, что может совпадать с включением условного стимула и создавать впечатление “правильной” реакции. Однако отсутствие повышения доли животных, достигших критерия обученности, не позволяет в этом случае говорить об улучшении консолидации адаптивного навыка.

Неожиданным и требующим дальнейшего анализа является тот факт, что полная изоляция крысят в возрасте с 16-го по 22-й день жизни вызывает самые существенные изменения поведения в ПКЛ и тесте “открытое поле” и в то же время не влияет на способность к обучению УРДИ в зрелом возрасте.

## ВЫВОДЫ

1. Полная ежедневная социальная изоляция крыс WAG/Rij со 2-го по 8-й и с 16-го по 22-й дни жизни обуславливает увеличение двигательной и исследовательской активности в зрелом возрасте, причем изоляция с 16-го по 22-й день жизни оказывает наибольший эффект.

2. Изоляция с 9-го по 15-й день жизни приводит к повышению эмоциональной реактивности взрослых крыс в новой обстановке.

3. Крысы, подвергавшиеся изоляции с 9-го по 15-й день жизни, демонстрируют большую способность к обучению условному рефлексу двустороннего избегания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-013-00597 “Социальные факторы, аггравирующие проявление абсанс эпилепсии”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маркель А.Л., Галактионов Ю.К., Ефимов В.М. Факторный анализ поведения крыс в тесте открытого поля. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1988. 38 (5): 855–863.
- Саркисова К.Ю., Габова А.В., Куликов М.А., Федосова Е.А., Шацкова А.Б., Морозов А.А. Воспитание приемной матерью Wistar с высоким уровнем проявления материнской заботы препятствует развитию наследственной абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии у крыс линии WAG/Rij. ДАН. 2017. Т. 473. № 2. 246–249.
- Смирнов К.С., Ситникова Е.Ю. Формирование эпилептического фенотипа у крыс WAG/Rij связано со сниженной тревожностью. “Эпилепсия: от фундаментальной науки к практике”. Материалы I онлайн-конференции и школы с международным участием. М., 2020.

- Шишелова А.Ю., Алиев Р.Р., Раевский В.В.* Ранний сенсорный опыт определяет разнообразие исследовательского поведения в зрелом возрасте. Экспериментальная психология. 2015. 8 (1): 73–84.
- Шишелова А.Ю., Алиев Р.Р., Раевский В.В.* Влияние раннего сенсорного опыта на исследовательскую активность взрослых животных. Доклады Академии наук. 2016. 468 (1): 1–3.
- Шишелова А.Ю., Раевский В.В.* Влияние вибрисс-эктомии в раннем постнатальном онтогенезе у крысят на развитие поведения. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2009. 59 (3): 326–334.
- Curley J.P., Jensen C.L., Mashoodh R., Champagne F.A.* Social influences on neurobiology and behavior: epigenetic effects during development. *Psychoneuroendocrinology*. 2011. 36 (3): 352–371. <https://doi.org/10.1016/j.psypneuen.2010.06.005>
- Cohen J.L., Glover M.E., Pugh P.C., Fant A.D., Simmons R.K., Akil H., Kerman I.A., Clinton S.M.* Maternal Style Selectively Shapes Amygdalar Development and Social Behavior in Rats Genetically Prone to High Anxiety. *Dev. Neurosci*. 2015. 37 (3): 203–214. <https://doi.org/10.1159/000374108>
- Estanislau C., Veloso A.W.N., Filgueiras G.B., Maio T.P., Dal-Cól M.L.C., Cunha D.C., Klein R., Carmona L.F., Fernández-Teruel A.* Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. *Physiol Behav*. 2019. 209:112585. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112585>
- Fernández-Teruel A., Estanislau C.* Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. 2016 *Nature Rev. Neurosci*. V. 17 (9), 591–591. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.102>
- Galeeva A., Pelto-Huikko M., Pivina S., Ordyan N.* Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. *Vitam Horm*. 2010. 82:367–389. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82019-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82019-9)
- Guido W., Gunhan-Agar E., Erzurumlu R.S.* Developmental changes in the electrophysiological properties of brain stem trigeminal neurons during pattern (barelette) formation. *J. Neurophysiol*. 1998. 79: 1295–1306.
- Gulia K.K., Patel N., Radhakrishnan A., Kumar V.M.* Reduction in Ultrasonic Vocalizations in Pups Born to Rapid Eye Movement Sleep Restricted Mothers in Rat Model. *PLoS One*. 2014. 9 (1): e84948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084948>
- Holmes A., le Guisquet A.M., Vogel E., Millstein R.A., Leman S., Belzung C.* Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005. 29 (8):1335–1346. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.012>
- Levine S.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox. Res*. 2002. 4 (5–6): 557–564. <https://doi.org/10.1080/10298420290030569>
- Litvin Y., Tovote P., Pentkowski N.S., Zeyda T., King L.B., Vasconcellos A.J., Dunlap C., Spiess J., Blanchard D.C., Blanchard R.J.* Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Horm Behav*. 2010. 58 (2): 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.03.010>
- Marmendal M., Eriksson C.J., Fahlke C.* Early deprivation increases exploration and locomotion in adult male Wistar offspring. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006. 85 (3):535–44. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.10.005>
- Rana S., Pugh Ph.C., Jackson N., Clinton S.M., Kerman I.A.* Inborn Stress Reactivity Shapes Adult Behavioral Consequences of Early-Life Maternal Separation Stress. *Neurosci Lett*. 2015. 584: 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.011>
- Romeo R.D., Patel R., Pham L., So V.M.* Adolescence and the Ontogeny of the Hormonal Stress Response in Male and Female Rats and Mice *Neurosci Biobehav Rev*. 2016. 70: 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.020>
- Sarkisova K.Yu., Midzyanovskaya I.S., Kulikov M.A.* Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Behav. Brain Res*. 2003. 144 (2–3): 211–226.
- Sarkisova K., van Luijtelaaar G.* The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011. 35 (4):854–76. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
- Sitnikova E.* Neonatal sensory deprivation promotes development of absence seizures in adult rats with genetic predisposition to epilepsy. *Brain Research*. 2011. 1377:109–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.067>
- Sitnikova E., Rutskova E.M., Raevsky V.V.* Reduction of epileptic spike-wave activity in WAG/Rij rats fostered by Wistar dams. *Brain Res*. 2015; 1594: 305–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.067>
- Sitnikova E., Rutskova E.M., Raevsky V.V.* Maternal care affects EEG properties of spike-wave seizures (including pre- and post ictal periods) in adult WAG/Rij rats with genetic predisposition to absence epilepsy. *Brain Res Bull*. 2016; 127: 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.019>
- Sturman O., Germain P.-L., Bohacek J.* Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. 2018. 21

- (5):443–452.  
<https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
- Vetulani J.* Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological Reports*. 2013. 65: 1451–1461.
- Wills T.J., Muessig L., Cacucci F.* The development of spatial behaviour and the hippocampal neural representation of space. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014. 369 (1635): 20130409.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0409>
- Zhang Y., Zhu X., Bai M., Zhang L., Xue L., Yi J.* Maternal deprivation enhances behavioral vulnerability to stress associated with miR-504 expression in nucleus accumbens of rats. *PLoS One*. 2013. 8 (7): e69934.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069934>

## THE INFLUENCE OF EARLY SOCIAL ISOLATION ON MOTOR ACTIVITY AND LEARNING ABILITY IN THE MATURE AGE OF WAG/RIJ RATS

A. Yu. Shishelova<sup>a,b</sup> and V. V. Raevsky<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia*

<sup>b</sup> *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: vraevsky@mail.ru*

In WAG/Rij rats, genetically predisposed to absence epilepsy and characterized by a depressive status, we studied the effect of a complete daily 3 h social isolation in different critical periods of early postnatal ontogenesis (2–8, 9–15, 16–22 postnatal days) on behavior in adulthood. It was found that the isolation from the 2nd to the 8th and from the 16th to the 22nd postnatal days produces an increase in the locomotor activity in the open arms of the elevated plus-maze and in the open field test. In animals isolated from the 9th to the 15th postnatal day, there was no change in the locomotion compared to the control group, but an increase in an emotional reactivity was revealed. The rats isolated from the 9th postnatal day showed the best acquisition of two-way active avoidance behavior in the shuttle box compared to the other groups.

*Keywords:* social isolation, ontogeny, locomotion, learning