

УДК 577.25;616-092.9

ДЛИТЕЛЬНАЯ СОЦИАЛЬНАЯ ИЗОЛЯЦИЯ ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ПРЕДШЕСТВЕННИКА BDNF И ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

© 2021 С.Д. Ширенова*, Н.Н. Хлебникова, Н.А. Крупина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315 Москва, Россия; электронная почта: Shirenova.jr@gmail.com

Поступила в редакцию 29.12.2020

После доработки 25.03.2021

Принята к публикации 15.04.2021

Стресс в раннем периоде развития человека и животных является фактором риска развития нарушений в поведении и когнитивных расстройств. К числу таких стрессирующих воздействий относится социальная изоляция в раннем постнатальном онтогенезе. Развитие нарушений поведения и когнитивных функций связывают с нейропластическими изменениями в структурах мозга. В наших исследованиях показано, что у крыс-самцов Wistar после 10 недель социальной изоляции развиваются нарушения в поведении и когнитивный дефицит, что сопровождается повышением относительного уровня экспрессии гена, кодирующего сериновую протеазу пролилэндопептидазу (PREP, EC 3.4.21.26), во фронтальной коре мозга. Цель настоящей работы заключалась в определении методом иммуноблоттинга уровня белков синаптофизина (SYP), предшественника нейротрофического фактора мозга (proBDNF) и PREP в структурах мозга (гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме) крыс, находившихся в длительной социальной изоляции, в сравнении с животными, находившимися на групповом содержании. Работа проведена на 20 крысах (10 самцов, 10 самок) популяции Wistar. Крыс опытной группы (5 самцов и 5 самок) содержали поодиночке в течение 9 мес., начиная с возраста 1 мес. В возрасте 10 мес. у социально изолированных крыс выявлены нарушения памяти в тестах «Условный рефлекс пассивного избегания» и «Водный лабиринт Морриса» и снижение реакции на новизну. Экспрессию белков SYP, proBDNF и PREP в структурах мозга крыс оценивали методом Вестерн-блот с использованием моноклональных антител. Социальная изоляция привела к снижению уровня proBDNF во фронтальной коре мозга у самок и снижению экспрессии PREP в стриатуме у самцов. Полученные данные предполагают участие системы нейротрофических факторов и PREP в механизмах развития поведенческих и когнитивных нарушений, наблюдаемых у крыс в условиях длительной социальной изоляции, начинающейся в раннем возрасте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: социальная изоляция, синаптофизин, предшественник BDNF, пролилэндопептидаза, структуры мозга, Вестерн-блот.

DOI: 10.31857/S0320972521060087

ВВЕДЕНИЕ

Стресс в раннем онтогенезе является фактором риска развития нарушений в поведении и когнитивных расстройств, ряда соматических заболеваний [1–4]. К числу таких стрессирующих воздействий относится социальная изоляция (депривация) в детском возрасте, сопровождающаяся ограничением сенсорной стимуляции и недостаточностью формирования со-

циальных, когнитивных и речевых навыков в критические периоды развития.

Социальная изоляция (СИ) является существенным стрессором как для человека, так и для социальных животных, к которым относятся и грызуны [5, 6]. Сообщается о развитии у социально изолированных крыс признаков повышенной агрессивности, нарушений мотивации, гиперактивного фенотипа, когнитивного дефицита [7]. Считается, что нейробиологической основой этих сдвигов в поведении являются нейропластические изменения в структурах мозга [8] и нарушения эпигенетического программирования активности генома в раннем возрасте [9–11].

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

Принятые сокращения: ВЛМ – тест «Водный лабиринт Морриса»; ГП – гиппокамп; ОП – тест «Открытое поле»; СИ – социальная изоляция; СТР – стриатум; УРПИ – тест «Условный рефлекс пассивного избегания»; ФК – фронтальная кора; BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга); PREP – пролилэндопептидаза; SYP – синаптофизин.

* Адресат для корреспонденции.

первую очередь от активности нейронов; эти процессы, в свою очередь, определяются регуляцией синаптических белков [12]. Основным интегральным белком мембран малых (не содержащих пептидов) синаптических везикул нейронов является трансмембранный гликопротеин синаптофизин (SYN), к функциям которого относят формирование синаптических пузырьков, выделение из них нейромедиаторов и синаптогенез [13, 14]. Данные о влиянии разных видов хронического стресса (иммобилизационный, непредсказуемый, стресс отлучения новорождённых крысят от матери) на экспрессию SYN противоречивы [15–21], что может быть обусловлено как особенностями самого стрессогенного воздействия, так и особенностями реагирования на стресс животных разных линий, пола и возраста. Данные по эффектам стресса СИ немного, и они также неоднозначны. Хронический 8-недельный стресс СИ взрослых самок Sprague-Dawley не изменял экспрессию SYN в гиппокампе (ГП) и гипоталамусе [22], а 8-недельный стресс СИ самцов крыс *Lister hooded*, начинавшийся сразу после отлучения крысят от матери, приводил к снижению экспрессии SYN в зубчатой извилине ГП [23]. Двухнедельная СИ взрослых самцов крыс Sprague-Dawley приводила к снижению экспрессии SYN и синаптической пластичности в ГП [24]. Нам не удалось найти в научной литературе данных об экспрессии SYN в структурах мозга крыс при пролонгированной СИ.

Ещё одним хорошо известным маркером и регулятором синаптической и нейрональной пластичности является BDNF – самый распространённый нейротрофин в мозге млекопитающих, который относят к наиболее важным медиаторам стресс-ответа [25, 26]. BDNF регулирует выживаемость нейронов и их дифференцировку, модулирует синаптическую функцию (способствует долговременной потенциации, структурному увеличению шипиков дендритов) [27]. BDNF первоначально синтезируется в форме *pre-proBDNF*-предшественника в эндоплазматическом ретикулуме, транспортируется в аппарат Гольджи, где образуется изоформа *proBDNF*, из которой после отщепления последовательности *pro*-домена образуется зрелый BDNF (*mBDNF*) [28, 29]. Регулирующее действие *proBDNF* и самого BDNF на синаптическую пластичность отличается, часто противоположно. Предполагается, что *proBDNF* может быть ключевым регулятором синаптической пластичности и формирования нервных цепей в подростковом возрасте, а эффекты сохраняются у взрослых животных [27]. Нарушение баланса *proBDNF* и *mBDNF*, предполагающее торможе-

ние конверсии предшественника до зрелого BDNF, обнаружено в ГП крыс на модели стресса «двойного удара» (хроническое неонатальное отлучение от матери и питьё раствора кортикостерона взрослыми животными) [30] и на модели пренатального стресса [31]. Ранняя СИ, начинавшаяся сразу после отлучения от матери и продолжавшаяся 2 недели (постнатальные дни 21–34), приводила к снижению предстимульного торможения в тесте на сенсомоторную реактивность и эпигенетическим модификациям BDNF: увеличению экспрессии BDNF в медиальной префронтальной коре и снижению его экспрессии в ГП у самцов крыс Sprague-Dawley [32]. Данные о том, изменяется ли уровень изоформ BDNF при стрессе длительной СИ, и, если да, то как, в настоящее время нет.

В наших исследованиях на модели СИ, начинавшейся сразу после отлучения крысят от матери и длившейся 2 мес., крысы-самцы Wistar демонстрировали повышенную агрессивность, снижение предстимульного торможения и когнитивный дефицит, проявлявшийся нарушением привыкания, о котором судили по снижению амплитуды акустического стартл-ответа; это сопровождалось повышением во фронтальной коре (ФК) мозга относительного уровня экспрессии гена *prep*, кодирующего сериновую протеазу пролилэндопептидазу (PREP, EC 3.4.21.26) [33]. PREP, протеаза с плейотропным действием [34], вовлечена во многие процессы, в том числе в процессы обучения и памяти, нейропластичности, по-видимому, вследствие взаимодействия с другими белками [35]. На модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием одного из ингибиторов дипептидилпептидазы IV (EC 3.4.14.5) в раннем постнатальном периоде, у крыс-самцов Wistar с возрастом показано повышение активности PREP в ФК, гипоталамусе, прилежащем ядре и стриатуме (СТР), у крыс-самок – в ГП и СТР [36]. У этих крыс обучение в тесте условного рефлекса активного избегания проходило хуже, чем у животных контрольной группы [37]. Тревно-депрессивное состояние, индуцированное неонатальным действием другого ингибитора дипептидилпептидазы IV, сопровождалось повышением экспрессии гена *prep* в СТР [38]. На моделях экспериментальной ретроградной амнезии, вызванной действием м-холиноблокатора скополамина или максимальным электрошоком, активность PREP в ФК и ГП самцов Wistar возрастала [39]. Недавно мы показали, что длительная СИ крыс Wistar, начинавшаяся после отлучения от матери и длившаяся 9 мес., ухуд-

шала когнитивные способности самцов и самок крыс в тестах условного рефлекса пассивного избегания и пространственной памяти, причём эффект был более выражен у самок [40].

Цель настоящей работы заключалась в определении методом иммуноблоттинга уровня белков SYR, proBDNF и PREP в структурах мозга (гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме) крыс, находившихся в длительной социальной изоляции, в сравнении с животными, которых содержали в группах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование социальной изоляции и оценка поведения крыс. Оценка экспрессии белков SYR, proBDNF и PREP проведена на 20 крысах (10 самцов, 10 самок) популяции Wistar, рождённых и выращенных в питомнике ФГБНУ «НИИОПП» (система «Меркурий», номер в реестре: RU 1487336). Эти животные были отобраны из больших по объёму групп самцов и самок крыс Wistar, содержащихся в социальной изоляции или в группах в течение 9 мес. и прошедших поведенческое тестирование. У отобранных крыс масса каждого из образцов ткани выделенных структур мозга была не менее 100 мг, что необходимо для проведения анализа методом иммуноблоттинга без потери его чувствительности. Результаты оценки поведения в исходных больших группах крыс в тестах «Открытое поле» (ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) и «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) опубликованы [40]. В настоящей работе мы также провели оценку поведения в данных тестах у крыс, отобранных в эксперимент по определению уровня экспрессии белков в мозге, для того чтобы определить, насколько поведение животных в этой выборке отражает выявленные ранее изменения в поведении животных в больших группах. Начиная с возраста 1 мес. и до выведения животных из эксперимента в возрасте 10 мес., часть крыс содержали в группах по 4–5 животных в клетках размером 57,0 × 37,0 × 19,0 см (группы «Контроль, самки», $n = 5$ и «Контроль, самцы», $n = 5$), часть – поодиночке в клетках размером 36,5 × 20,5 × 14,0 см (группы «Изоляция, самки», $n = 5$ и «Изоляция, самцы», $n = 5$). Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещённости и свободным доступом к пище (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воде.

Перед выведением крыс из эксперимента оценивали двигательную активность и память животных в тестах автоматизированного ОП,

классического ОП, УРПИ и ВЛМ. Подробное описание процедур тестирования приведено в работе Kgrupina et al. [40].

Тест автоматизированного «Открытого поля» (оценка двигательной активности). В автоматизированном ОП (аОП) с прозрачными стенками (арена размером 48 × 48 × 21 см) (Opto-Varimex, «Columbus Instruments», США) двигательную активность крыс оценивали в течение 10 мин при мягком комнатном освещении (17 люкс) в условных см (по числу прерываний инфракрасных лучей).

Тест классического «Открытого поля» (оценка двигательной активности и реакции на новизну). В классическом ОП (кОП) (круглая белая арена диаметром 120 см разделена на 20 квадратов, высота непрозрачных стенок 28 см) двигательную активность крыс оценивали в течение трёх минут по числу пересечённых квадратов при ярком освещении (500–510 люкс в центре, 400–410 люкс на периферии ОП). На четвертой минуте белый свет переключали на мягкий красный (лампочка 40 Вт над центром ОП). Реакцию на новизну определяли по увеличению двигательной активности животных в ответ на изменение окружающей среды [41]; фактором новизны в данном случае служила резкая смена освещённости. Рассчитывали отношение: (путь, пройденный за четвертую минуту при красном свете)/(путь, пройденный за первую минуту при белом свете).

Тест «Условный рефлекс пассивного избегания». Выработку УРПИ проводили в установке, разделённой опускающейся дверцей на «безопасный» освещённый и «опасный» (с электрифицированным полом) неосвещённый отсеки. Установку помещали в звукоизолированную камеру (Multi Conditioning System, «TSE Systems», Германия). В первый день крысы привыкали к установке, исследуя светлый (156 люкс) отсек в течение 60 с, и затем в течение 120 с получали возможность посетить тёмный отсек. Через 24 ч проводили выработку УРПИ (этап обучения): крысу помещали в освещённый отсек установки, через 5 с разделительную дверцу автоматически открывали, а через 1 с после перехода животного в неосвещённый отсек – закрывали; через 5 с крыса получала удар током (0,5 мА, 1 Hz, в течение 5 с); через 30 с после этого крысу возвращали в клетку. Сохранение УРПИ проверяли через 24 ч после выработки (Тестирование 1) и через неделю (Тестирование 2). На всех этапах фиксировали латентный период перехода из освещённого отсека установки в неосвещённый отсек (с). Процедура проверки была аналогичной процедуре выработки УРПИ за исключением того, что электрический ток при переходе в тёмный отсек

не подавали. Максимально возможное время для перехода в тёмный отсек составляло 300 с.

Тест «Водный лабиринт Морриса» (оценка пространственной памяти). Установка ВЛМ представляла собой бассейн круглой формы диаметром 160 см, заполненный водой до высоты 30 см; температура воды составляла 25 ± 1 °С; поведение крыс фиксировали с помощью программного обеспечения (Video tracking system VideoMot2, «TSE Systems»). Пространство бассейна было виртуально разделено на 4 квадранта. Во время обучения прозрачную платформу диаметром 14 см располагали в одном и том же квадранте (целевой квадрант) так, чтобы она находилась на 1,5 см ниже уровня воды. Визуальные ключи располагали вне бассейна. Крыс начинали обучать в возрасте 5,5 мес. В течение четырёх последовательных дней крысе предоставляли 4 попытки найти скрытую платформу, стартовые квадранты чередовали в псевдослучайном порядке. Максимальная длительность попытки составляла 2 мин. Выработку навыка проверяли в двухминутной пробе через 24 ч после последнего дня обучения; платформу из лабиринта убрали. Проверку сохранения навыка проводили в тех же условиях через 4 мес. после обучения – у крыс в возрасте 9,5 мес. На следующий день после проверки крысе предоставляли 2 попытки (максимальная длительность – 2 мин) с напоминанием места расположения платформы, которую вновь помещали в целевой квадрант. Через сутки проводили третью проверку сохранения навыка при отсутствии платформы в бассейне. В пробах анализировали латентность достижения зоны платформы и зоны, прилегающей к платформе (10 см от края платформы), относительное время, проведённое в краевой зоне (дистальные 20% от радиуса бассейна). В настоящей работе даны результаты сравнения всех групп крыс в последней проверке, перед выведением животных из эксперимента.

В возрасте 10 мес. всех крыс декапитировали с использованием гильотины.

Подготовка проб. После декапитации крыс мозг быстро извлекали и помещали в охлаждённый физиологический раствор. На ледяной подложке выделяли гиппокамп, фронтальную кору и стриатум; до окончания сбора всех проб образцы помещали в жидкий азот, в дальнейшем пробы хранили в морозильнике Sanio MDF-193 («Sanio», Япония) при -80 °С. Пробы растирали в жидком азоте. Для получения цитозольного экстракта использовали 2 лизис-буфера: гипотонический буфер-I [рН 7,5, 20 мМ Tris, «Bio-Rad», США), 1 мМ EDTA («Sigma-Aldrich», США), 1 мМ DTT («Bio-Rad»), протеазный ин-

гибиторный микс 10 мкл/мл («Sigma-Aldrich») и лизис-буфер-II [60 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2 мМ EGTA, 1% (w/v) Triton X-100, 10% (v/v) глицерин, 1 мМ DTT, протеазный ингибиторный микс 10 мкл/мл; («Sigma-Aldrich»)]. Пробы лизировали в гипотоническом буфере-I в течение 5 мин при 4 °С, затем супернатант отделяли при помощи центрифугирования [1000 об./мин, 5 мин, 4 °С («Eppendorf», Германия)]. Лизис буфером-II проводили в течение 25 мин при 4 °С, затем пробы повторно центрифугировали [13 000 об./мин, 25 мин, 4 °С; («Eppendorf»)]. В цитоплазматический экстракт, содержащий исследуемые белки, добавляли загрузочный буфер [0,5 М Tris-HCl, рН 6,8, 0,08 г/мл SDS, 5 мг/мл DTT, 0,2 мг/мл бромфеноловый синий, 40% (v/v) глицерин] в соотношении 3/1 и инкубировали в течение 5 мин при 95 °С, далее образцы хранили при -80 °С.

Определение экспрессии белков SYP, proBDNF и PREP методом иммуноблоттинга. Концентрацию общего белка в образцах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда [42]. В каждую лунку 8%-ного (w/v) полиакриламидного разрешающего геля загружали подготовленные образцы всех исследованных белков (140 мкг общего белка/проба) и проводили электрофорез 120 V, 90 мин), после чего разделённые образцы переносили на целлюлозную мембрану («Bio-Rad») при помощи электроосмоса (100 V, 60 мин). Блокирование неспецифического связывания антител проводили путём погружения мембраны в 5%-ный раствор обезжиренного молока в PBS («Bio-Rad»), содержащий 0,1% (v/v) Tween 20 и 0,02% азид Na, на 1 ч при 4 °С. Одновременно с этим первичные моноклональные антитела мыши к SYP (2): sc-136271, 38–48 кДа, антитела мыши к proBDNF (5H8): sc-65514, 32 кДа, антитела мыши к PREP (C-12): sc-365416, 80 кДа и антитела мыши к β -Actin (C4): sc-47778, 43 кДа («Santa Cruz Biotechnology Inc.», США) были преинкубированы при 4 °С в растворе молока (5% обезжиренного молока, 0,1% (v/v) Tween 20 и 0,02% азид Na в PBS). Затем мембрану инкубировали в растворе первичных антител ещё 15 ч при 4 °С. После промывания блоты в течение 60 мин инкубировали в растворе вторичных антител (goat anti-mouse IgG-HRP: ab6789 («Abcam», США) при 4 °С. Белки выявляли при помощи ECL-реagenta («Pierce Biotechnology», США). Затем мембрану помещали под фотоплёнку («Kodak», США) на 10 мин. Для денситометрии полученных результатов использовали программу Adobe Photoshop 7.0 («Adobe Systems», США). Результаты приведены в относительных денситометрических единицах (ОДЕ). Помимо оценки

концентрации белка в образцах по методу Брэдфорда, в качестве дополнительного контроля равномерности загрузки проб производили окрашивание нитроцеллюлозной мембраны на общий белок (Ponceau S) и измеряли экспрессию β -актина (белок внутреннего контроля).

Статистическая обработка результатов. Использовали алгоритмы программы Statistica 12.0. Проверка по тесту Шапиро–Уилка не подтвердила соответствия распределения эмпирических данных нормальному закону по ряду показателей в небольших по объёму группах. На этом основании статистический анализ по всем показателям был проведён с помощью непараметрического двустороннего U -критерия Манна–Уитни для независимых переменных. Принятый уровень значимости составлял 5%. Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение p ($p_{кр}$) по методу FDR-контроля [43]. Соотношение $p_{кр} < p < 0,05$ рассматривали как выраженную тенденцию, соотношение $0,05 < p < 0,06$ – как тенденцию. Дополнительно рассчитывали размер эффекта (Effect size, ES). Использовали индексы оценочной статистики η^2 (объяснённая дисперсия для выборки) и d_{Cohen} (Cohen's d , стандартизированная мера эффекта) [44]. Применяли следующую интерпретацию размера эффекта d_{Cohen} : 0,20–0,40 – ES маленький, 0,50–0,70 – средний, от 0,80 и выше – большой; η^2 : 0,010–0,039 – маленький, 0,060–0,110 – средний, 0,140–0,200 – большой [45].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка поведения крыс. Тест автоматизированного «Открытого поля». Двигательная активность всех самок (содержавшихся в группах и изолированно) превышала двигательную активность всех самцов (содержавшихся в группах и изолированно) ($U = 18,0$; $p = 0,015$; $\eta^2 = 0,293$; $d_{Cohen} = 1,286$) (рис. 1, а), однако двигательная активность всех крыс-изолянтов (самцы + самки) не отличалась от величины показателя у всех крыс, содержащихся в группах ($U = 34,0$; $p = 0,247$). Статистически значимых различий по данному показателю между крысами одного пола, содержащимися в изоляции и в группах, не выявлено.

Тест классического «Открытого поля». В этом тесте также двигательная активность у всех самок была выше, чем у всех самцов ($U = 23,5$; $p = 0,043$; $\eta^2 = 0,201$; $d_{Cohen} = 1,002$), причём это различие было обусловлено вкладом крыс, содержащихся в группах, а не в изоляции [$U = 0,0$; $p = 0,008$ ($p_{кр} = 0,013$); $\eta^2 = 0,682$;

$d_{Cohen} = 2,928$] (рис. 1, б). У крыс, находившихся на изолированном содержании (самцы + самки), двигательная активность не отличалась от двигательной активности крыс, содержащихся в группах (самцы + самки) ($U = 29,0$; $p = 0,123$). Однако выявлено статистически значимое увеличение двигательной активности у самцов, содержащихся в изоляции, по сравнению с самцами, содержащимися в группах [$U = 1,0$; $p = 0,016$ ($p_{кр} = 0,025$); $\eta^2 = 0,577$; $d_{Cohen} = 2,336$]. У крыс, содержащихся в изоляции (самцы + самки), реакция на новизну была снижена по сравнению с крысами, которых содержали в группах ($U = 18,0$; $p = 0,015$; $\eta^2 = 0,293$; $d_{Cohen} = 1,286$) (рис. 1, в). Не выявлено различий в реакции на новизну в зависимости от пола крыс.

Тест УРПИ. На этапе обучения латентный период перехода в тёмный отсек установки в группах не различался (рис. 1, г). Через сутки после обучения снижение длительности латентного периода перехода в тёмный отсек у крыс-изолянтов (самцы + самки) по сравнению с животными, находившимися на групповом содержании (самцы + самки), было статистически значимым: $U = 23,0$; $p = 0,043$; $\eta^2 = 0,208$; $d_{Cohen} = 1,026$) (рис. 1, д). На этапе проверки памяти через неделю после первого тестирования латентный период перехода в тёмный отсек установки у крыс-изолянтов (самцы + самки) также был ниже, чем у крыс, содержащихся в группах (самцы + самки): $U = 2,5$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,645$; $d_{Cohen} = 2,694$) (рис. 1, е). Выявлена выраженная тенденция к уменьшению длительности латентного периода перехода в тёмный отсек как у самцов, находившихся на изолированном содержании, по сравнению с самцами, содержащимися в группах [$U = 0,0$; $p = 0,016$ ($p_{кр} = 0,013$); $\eta^2 = 0,682$; $d_{Cohen} = 2,928$], так и у самок, находившихся на изолированном содержании, по сравнению с самками контрольной группы [$U = 2,0$; $p = 0,032$ ($p_{кр} = 0,025$); $\eta^2 = 0,481$; $d_{Cohen} = 1,926$]. На всех этапах проверки памяти не выявлено различий по длительности латентного периода перехода в тёмный отсек установки у крыс разного пола, находившихся в одних и тех же условиях содержания.

Тест «Водный лабиринт Морриса». Все крысы, которых содержали поодиночке (самцы + самки), не отличались от всех крыс, содержащихся в группах, по относительному времени, проведённому в краевой зоне лабиринта: $U = 31,0$; $p = 0,165$. Не выявлено статистически значимых различий по данному показателю при сравнении всех самок (содержавшихся в группах и изолированно) со всеми самцами: $U = 27,0$; $p = 0,089$. Однако у самок, находив-

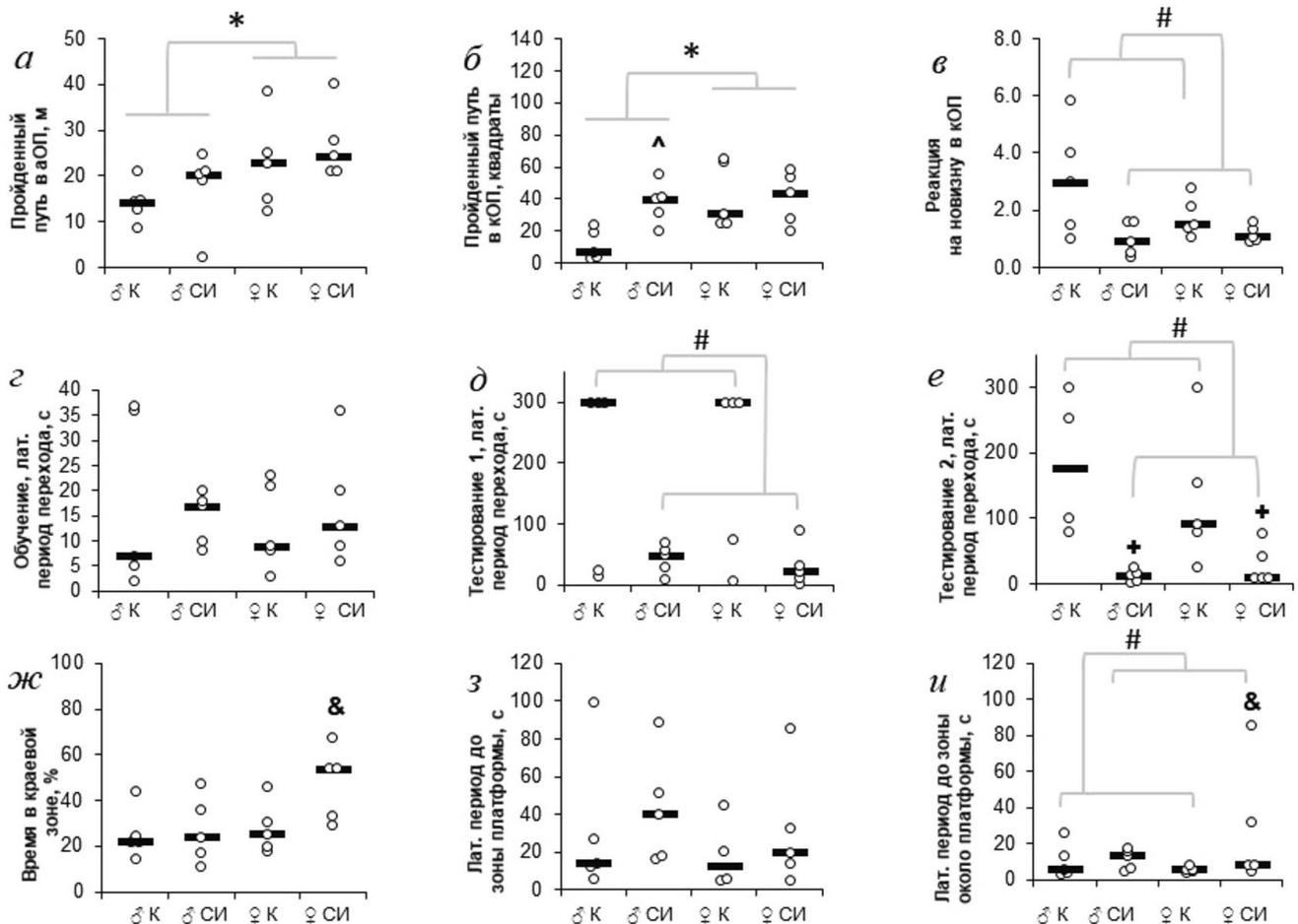


Рис. 1. Показатели двигательной активности, обучения и памяти у крыс, находившихся в условиях длительной социальной изоляции (СИ), и контрольных животных (К) в возрасте 9–10 мес. В каждой группе $n = 5$. Тест автоматизированного «Открытого поля» (аОП) (а) – двигательная активность, суммарно за 10 мин; тест классического «Открытого поля» (кОП) (б) – двигательная активность, суммарно за 3 мин; в – реакция на новизну; тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (г) – латентный период перехода в темный отсек камеры на стадии обучения; д – тот же показатель на стадии проверки сохранности памяти через 24 ч после обучения (Тестирование 1); е – через неделю после первой проверки (Тестирование 2); тест «Водный лабиринт Морриса» (ж) – относительное время, проведённое в краевой зоне лабиринта; з – латентный период достижения зоны платформы; и – латентный период достижения зоны, прилегающей к платформе (обозначение по вертикальной оси – зона около платформы). * $p < 0,05$ – Статистически значимые различия между всеми самцами и всеми самками; # $p < 0,05$ – статистически значимые различия между всеми крысами, находившимися на изолированном содержании, и всеми крысами, которых содержали в группах; ^ $p < 0,05$ – по сравнению с самцами, содержащимися в группах; + $p_{кр} < p < 0,05$ – по сравнению с животными того же пола, находившимися на групповом содержании; & $0,05 < p < 0,06$ – по сравнению с самками, находившимися на групповом содержании (U-критерий Манна–Уитни с поправкой на множественность сравнений по методу FDR-контроля)

шихся в длительной изоляции, по сравнению с самками, содержащимися в группах, обнаружена тенденция к увеличению этого показателя (рис. 1, ж): $U = 3,0$; $p = 0,056$; $\eta^2 = 0,394$; $d_{Cohen} = 1,612$.

Различий по длительности латентного периода достижения зоны платформы между всеми крысами, содержащимися в изоляции и в группах, а также между всеми самцами и самками не было обнаружено (рис. 1, з).

Крысы, содержащиеся изолированно (самцы + самки), достигали зоны, прилегающей к

платформе, позже крыс, содержащихся в группах (самцы + самки): $U = 22,0$; $p = 0,035$; $\eta^2 = 0,224$; $d_{Cohen} = 1,075$. По данным, приведённым на рис. 1, и, видно, что у некоторых самок-изолянтов был значительно увеличен латентный период достижения зоны, прилегающей к платформе. Однако статистический анализ выявил только тенденцию к увеличению этого показателя у самок, находившихся в изоляции, по сравнению с контрольным значением у самок, содержащихся в группах: $U = 3,0$; $p = 0,056$; $\eta^2 = 0,394$; $d_{Cohen} = 1,612$.

Экспрессия белков SYP, proBDNF и PREP в структурах мозга. В ГП экспрессия SYP, proBDNF и PREP у крыс-изолянтов не отличалась от экспрессии этих белков у животных того же пола, которых содержали в группах (рис. 2, *a* (1 и 2), *б* и *в*; рис. 3, *a* (1 и 2), *б* и *в*; рис. 4, *a* (1 и 2), *б* и *в*). Просматриваемое различие в содержании SYP у самцов, которых содержали поодиночке и в группах (рис. 2, *б*), не достигло уровня статистической значимости: $U = 5,0$; $p = 0,151$; $\eta^2 = 0,245$; $d_{\text{Cohen}} = 1,141$.

В ФК была обнаружена тенденция к снижению экспрессии SYP у самцов, находившихся в изоляции, по сравнению с самцами, содержащимися в группах (рис. 2, *a* (3), *з*): $U = 3,0$; $p = 0,056$; $\eta^2 = 0,394$; $d_{\text{Cohen}} = 1,612$. Экспрессия proBDNF у самок, находившихся на изолированном содержании, была статистически значимо снижена по сравнению с экспрессией белка у самок, которых содержали в группах (рис. 3, *a* (4), *д*): $U = 2,0$; $p = 0,032$; $\eta^2 = 0,481$; $d_{\text{Cohen}} = 1,926$. Как у самцов, так и у самок крыс, находившихся в изоляции, экспрессия PREP не отличалась от экспрессии белка у животных, которых содержали в группах (рис. 4, *a* (3 и 4), *г* и *д*).

В СТР экспрессия PREP у самцов, которых содержали в изоляции, была статистически зна-

чимо меньшей, чем у самцов, которых содержали в группах (рис. 4, *a* (5), *е*): $U = 0,0$; $p = 0,029$; $\eta^2 = 0,667$; $d_{\text{Cohen}} = 2,828$. У самок, находившихся на изолированном содержании, наблюдалась тенденция к снижению экспрессии PREP (рис. 4, *a* (6), *ж*): $U = 1,0$; $p = 0,057$; $\eta^2 = 0,51$; $d_{\text{Cohen}} = 2,042$. Отличий в содержании SYP и proBDNF у крыс одного и того же пола, содержащихся в социальной изоляции и в группах, в СТР не выявлено.

Статистически значимых различий в экспрессии β -актина в структурах мозга крыс, которых содержали в группах или в социальной изоляции, не обнаружено. Результаты анализа уровня β -актина в структурах мозга методом иммуноблоттинга и примеры проявленных плёнок и окрашенных на общий белок мембран с маркерами молекулярных масс представлены на рис. S1 и S2 в Приложении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе анализ поведения на использованной выборке крыс ($n = 20$) выявил более высокую двигательную активность у самок по сравнению с самцами в двух тестах ОП. Реак-

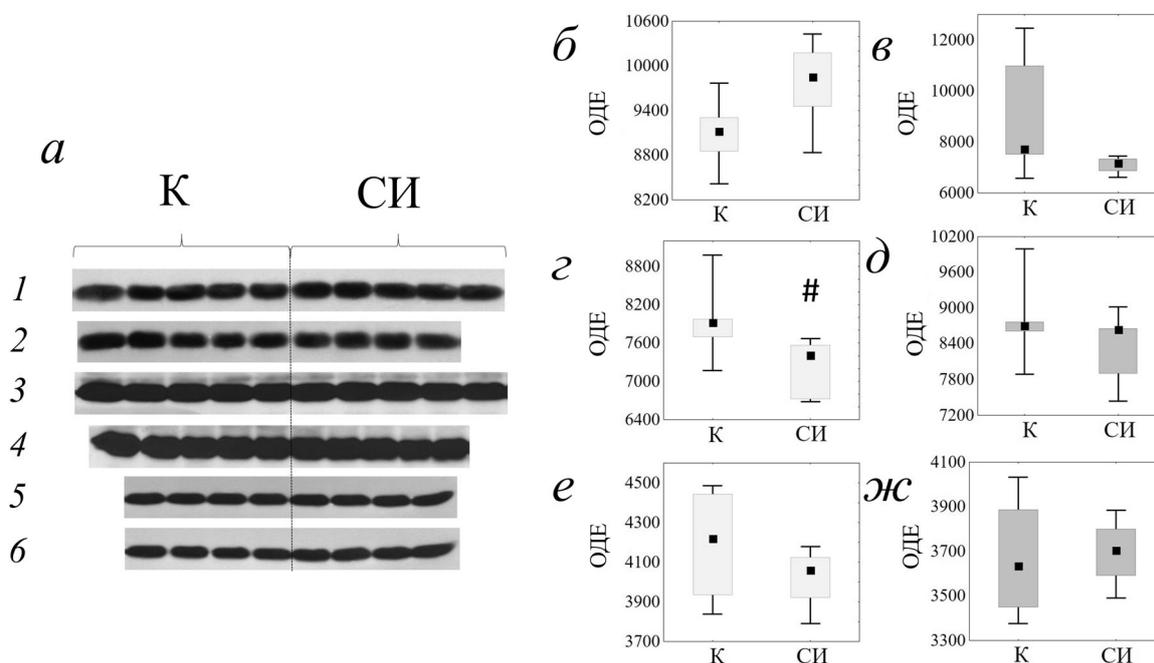


Рис. 2. Результаты анализа уровня SYP методом иммуноблоттинга (*a*) ГП самцов (1), ГП самок (2), ФК самцов (3), ФК самок (4), СТР самцов (5) и СТР самок (6). *б–ж* – Уровень экспрессии SYP в структурах мозга крыс, содержащихся в течение 9 мес. в социальной изоляции (СИ) или в контрольных группах (К): ГП самцы (*б*), ГП самки (*в*), ФК самцы (*г*), ФК самки (*д*), СТР самцы (*е*), СТР самки (*ж*). На блочной диаграмме нижняя сторона блока – Q1 (первый квартиль), верхняя сторона блока – Q3 (третий квартиль), квадратиком в блоке отмечена медиана – Q2 (второй квартиль), высота блока – интерквартильный размах. ОДЕ – относительные денситометрические единицы. $0,05 < p < 0,06$ сравнение с крысами того же пола, находившимися на групповом содержании (двусторонний U -критерий Манна–Уитни)

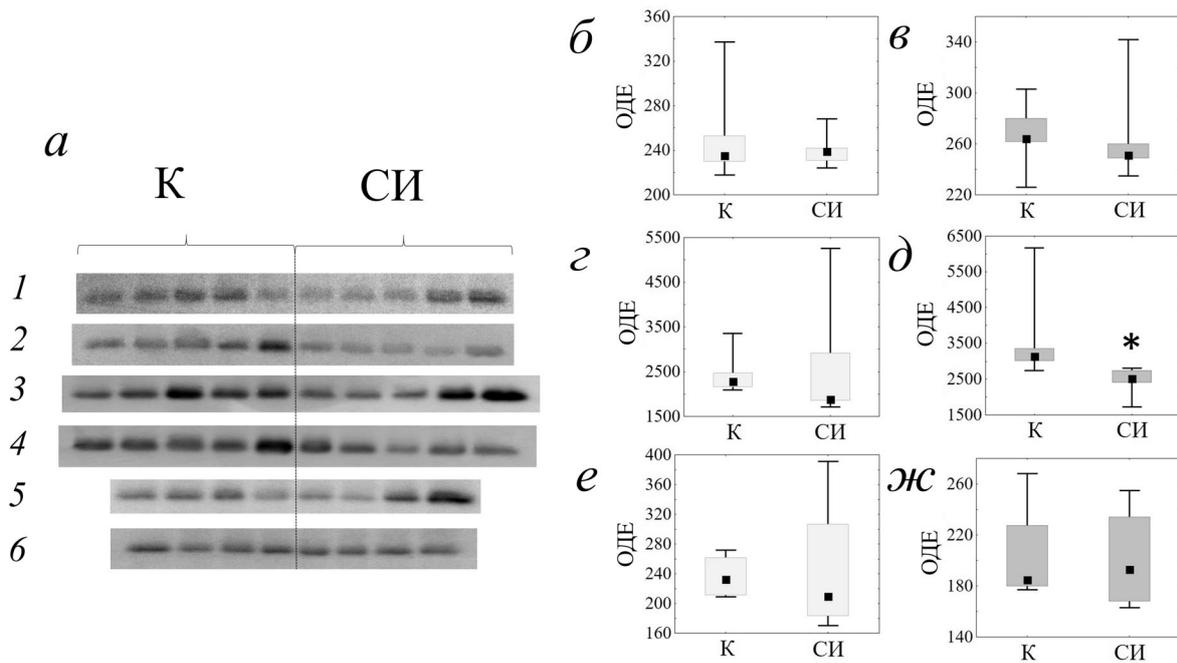


Рис. 3. Результаты анализа уровня proBDNF методом иммуноблоттинга (а) ГП самцов (1), ГП самок (2), ФК самцов (3), ФК самок (4), СТР самцов (5), СТР самок (6). б–ж – Уровень экспрессии proBDNF в структурах мозга крыс, содержащихся в течение 9 мес. в социальной изоляции (СИ) или в контрольных группах (К): ГП самцы (б), ГП самки (в), ФК самцы (г), ФК самки (д), СТР самцы (е), СТР самки (ж). ОДЕ – относительные денситометрические единицы. * $p < 0,05$ – сравнение с крысами того же пола, находившимися на групповом содержании (двусторонний U -критерий Манна–Уитни)

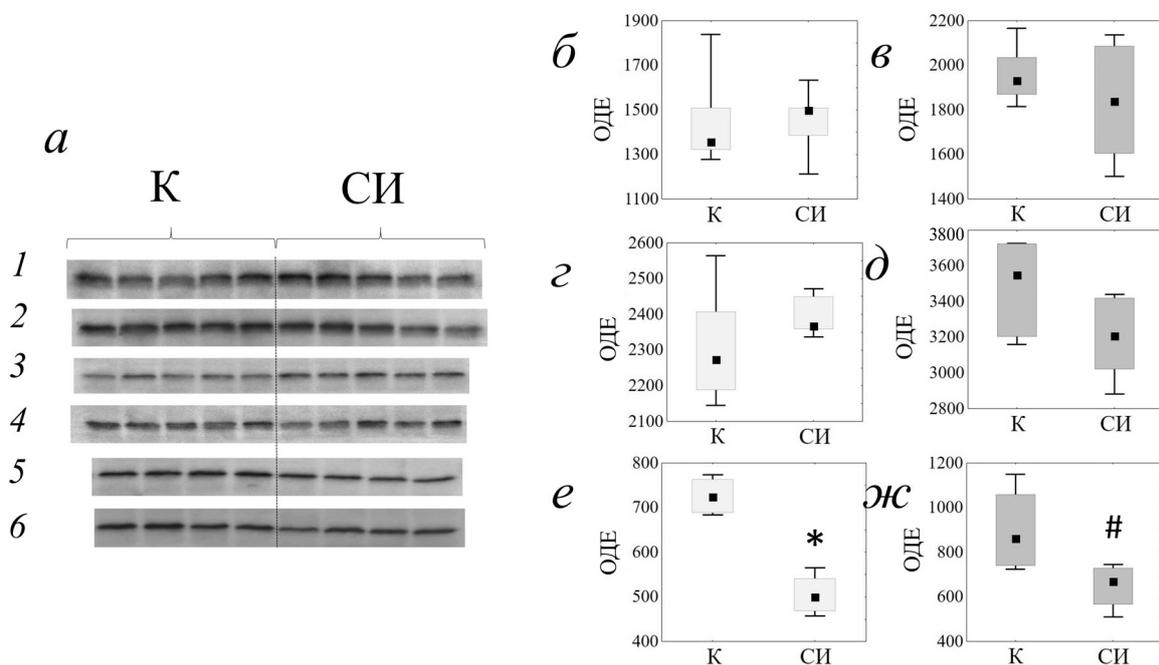


Рис. 4. Результаты анализа уровня PREP методом иммуноблоттинга (а) ГП самцов (1), ГП самок (2), ФК самцов (3), ФК самок (4), СТР самцов (5), СТР самок (6). б–ж – Уровень экспрессии PREP в структурах мозга крыс, содержащихся в течение 9 мес. в социальной изоляции (СИ) или в контрольных группах (К): ГП самцы (б), ГП самки (в), ФК самцы (г), ФК самки (д), СТР самцы (е), СТР самки (ж). ОДЕ – относительные денситометрические единицы. * $p < 0,05$; # $p < 0,06$ – сравнение с крысами того же пола, находившимися на групповом содержании (двусторонний U -критерий Манна–Уитни)

ция на новизну в классическом ОП у крыс, содержащихся ~8 мес. в изоляции, была снижена независимо от пола. Эти данные принципиально схожи с данными, полученными в указанных тестах на больших группах крыс Wistar (размер всей выборки $n = 69$), подвергнутых социальной изоляции той же длительности [40]. Результаты оценок когнитивных функций в тестах УППИ и ВЛМ также свидетельствуют о сходной направленности нарушений у крыс из малой и большой выборки: независимо от пола СИ приводила к ухудшению пассивного избегания и пространственной памяти (по показателю длительности латентного периода достижения зоны, прилежащей к платформе) (рис. S3 в Приложении). Полученные данные позволяют говорить о том, что малая выборка крыс, на которой оценивали уровень белков – маркёров нейропластичности и PREP в структурах мозга, по характеру нарушений поведения животных достаточно хорошо представляет исходную большую группу крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции.

В настоящем исследовании снижение уровня proBDNF было выявлено только у самок, которых содержали поодиночке, и только в ФК. Результаты, полученные в тесте на пространственную память в ВЛМ на малой выборке, дают основание предполагать, что в условиях хронического стресса СИ память у самок может быть хуже, чем у групповых крыс и у изолированных самцов (рис. 1, *ж* и *и*). Это предположение согласуется с заключением, сделанным в нашем недавнем исследовании на большой выборке крыс: в условиях длительной социальной изоляции, начинавшейся в раннем возрасте, у самок крыс по сравнению с самцами когнитивные нарушения в парадигме ВЛМ более выражены, что может указывать на бóльшую уязвимость самок к стрессу длительной СИ [40]. В работе Marco et al. [46] показано, что ухудшение распознавания нового объекта, выявленное у самок, но не у самцов крыс, подвергнутых стрессу суточной депривации от матери в раннем постнатальном периоде, не сопровождалось различиями в снижении уровня экспрессии BDNF в ФК и ГП у крысят разного пола в подростковом возрасте. Однако надо принять во внимание тот факт, что мы оценивали экспрессию не зрелого BDNF, а только его предшественника, регулирующего синаптическую пластичность и формирование нервных связей в подростковом возрасте [27]. Результаты настоящего исследования поддерживают гипотезу о том, что разнообразие функций нейротрофинов может частично модулироваться регулируемым высвобождением зрелых и про-изоформ в нерв-

ной системе [47]. Возможно, снижение proBDNF в ФК у 10-месячных самок крыс отражает нейропластические изменения, возникшие в раннем периоде развития, когда животные уже находились в условиях социальной изоляции. Если такие изменения сопровождались дисбалансом proBDNF/mBDNF, то это могло быть одним из механизмов, лежащих в основе бóльшей уязвимости самок к стрессу длительной СИ, начинавшейся в раннем возрасте. Есть свидетельства того, что функционирование сигнального каскада proBDNF–p75NTR в нейронах взрослых мышей тормозило активность пирамидных клеток V-слоя энторинальной коры ГП, возбуждение которых является ключевым компонентом рабочей и пространственной памяти [48]. Блокировка proBDNF антителами усиливала возбудимость пирамидных нейронов ГП.

В ряде работ обнаружено, что когнитивные нарушения у крыс, индуцированные социальной изоляцией, продолжавшейся от 4 до 8 недель в разные периоды постнатального онтогенеза, сопровождались усилением экспрессии белков-маркёров апоптоза [49–51]. В экспериментах на культуре клеток симпатических нейронов выявлено, что proBDNF может оказывать проапоптотическое действие в случае образования комплекса рецепторов p75NTR (рецептор нейротрофинов) и NTSR3/сортилина (не сопряженный с G-белками рецептор нейротензина-3) [47]. Возможно, выявленное в настоящем исследовании снижение уровня proBDNF в ФК у самок крыс с развившимся на фоне социальной изоляции нарушением памяти является адаптивным ответом на проапоптотическое действие этого белка.

В нашем исследовании на малой выборке мы обнаружили лишь тенденцию к снижению уровня SYP у самцов-изолянтов только в ФК. В работе Carvalho-Netto et al. [52] показано, что иммунореактивность SYP в префронтальной коре не подвергавшихся стрессу крыс Sprague-Dawley была ниже у самцов по сравнению с самками. Авторы рассматривали этот факт, как свидетельство половых различий в физиологической организации пресинаптической иннервации у крыс, однако 14-дневный хронический непредсказуемый стресс не изменял иммунореактивность белка ни у самцов, ни у самок. В нашем исследовании хронический стресс был принципиально другого характера и значительно бóльшей продолжительности, однако и в этом случае статистически значимых различий в экспрессии SYP выявить не удалось. Надо отметить, что изменения уровня одного из маркёров нейропластичности BDNF (в настоящем исследовании –

его незрелой формы proBDNF) или SYP в одной и той же структуре мозга может происходить без изменения уровня другого [53].

Неожиданным результатом настоящей работы является то, что при длительном 9-месячном стрессе СИ нам не удалось выявить изменений маркёров нейропластичности в ГП, тогда как при действии других видов стресса и менее продолжительной СИ (длительностью 2 и 8 недель) такие изменения были многократно описаны [16, 20, 21, 23, 24]. Однако после острого стресса депривации от матери у крысят подросткового возраста обоего пола и при 8-недельной СИ взрослых самок крыс не было выявлено изменений уровня SYP в ГП [22, 46]. Можно полагать, что одним из ключевых моментов в объяснении отсутствия изменения уровня маркёров нейропластичности в ГП в нашем исследовании является большой срок изоляции, за время которого могла произойти адаптация к нейропластическим изменениям, развившимся в раннем возрасте.

В настоящей работе, насколько нам известно, впервые получены данные о том, что длительная СИ приводит к снижению уровня PREP в СТР у самцов. У самок крыс статистически значимых изменений экспрессии PREP в этой структуре выявить не удалось, хотя у животных обоих полов была снижена реакция на новизну и ухудшалось обучение в тесте УРПИ. Когнитивный дефицит, предположительно, связывают с повышением активности PREP в структурах мозга, а некоторые ингибиторы PREP проявляют антиамнестические свойства [39, 54]. В настоящее время нет ответа на вопрос, сопровождается ли снижение уровня PREP в СТР у самцов крыс, подвергнутых длительному стрессу СИ, изменением экспрессии гена *prep* и активности фермента. О роли снижения уровня PREP можно судить, только сопоставляя эти данные. Однако обращает на себя внимание тот факт, что изменение экспрессии гена *prep* после 10-недельной СИ самцов крыс, начинавшейся в раннем постнатальном периоде, происходило в ФК [33], тогда как после 9-месячной СИ изменение уровня белка PREP у самцов выявлены в другой структуре мозга – в СТР. В процессы обучения вовлечены обе структуры мозга [55]. Каким образом PREP участвует в этих процессах у крыс разного пола, и происходит ли изменение её роли при увеличении длительности социальной изоляции – ещё предстоит выяснить.

Возможна ли взаимосвязь выявленных изменений экспрессии предшественника нейротрофического фактора BDNF и белка PREP в мозге под влиянием стресса длительной социальной

изоляции? На первый взгляд, ответ должен быть, скорее, отрицательным, и выявленные изменения отражают включение независимых механизмов – изменений в нейротрофической системе мозга и активности одной из пролин-специфических пептидаз. Однако полностью исключить такую взаимосвязь нельзя. Выше мы привели свидетельства того, что хроническая СИ усиливает апоптоз в структурах мозга [49–51], и этот процесс в определенных обстоятельствах может быть запущен предшественником BDNF [47]. Нам не удалось найти в научной литературе прямых доказательств связи PREP с процессами апоптоза. В экспериментах с ингибиторами фермента были получены противоречивые данные: в работе Fiedorowicz et al. [56] ингибирование PREP не предотвращало индуцированную нейротоксином гибель гранулярных нейронов зубчатой извилины ГП; в исследованиях других авторов, напротив, ингибиторы PREP эффективно предотвращали возрастную апоптоз культивируемых нейронов корковых клеток головного мозга крысы и гранулярных клеток мозжечка, а также отсроченную гибель нейронов ГП, индуцированную транзиторной ишемией [цит. по 57]. Авторы работ, в которых было показано нейропротективное действие ингибиторов PREP, считают, что это действие может быть опосредовано нейропептидами – субстратами фермента, которые участвуют в реализации антиапоптотических механизмов. В контексте сказанного привлекает внимание нейропептид с промнестическим действием, нейротензин, который экспрессируется в стриатуме [58, 59] и расщепляется PREP [60, 61]. Нейротензин оказывает антиапоптотическое действие в ЦНС через взаимодействие со своими рецепторами, в частности, с NTSR3/сортилином [62]. NTSR3/сортилин способен формировать гетеродимеры (белковые комплексы) с рецепторами нейротрофинов, в том числе с p75NTR, что, как сказано выше, является триггером proBDNF-индуцированной гибели нейронов, а нейротензин способен противодействовать пронеуротрофин-индуцированному апоптозу путём конкуренции за сайт связывания NTSR3/сортилина, действуя как конкурентный ингибитор [47, 63]. Если исходить из того, что пролонгированная СИ сопровождалась развитием процессов апоптоза у крыс (а это ещё нужно показать на данной модели), то можно предположить, что у животных разного пола включились различные защитные механизмы: у самцов – снижение экспрессии PREP в СТР, ведущее к увеличению уровня антиапоптотического субстрата нейротензина, у самок – снижение экспрессии proBDNF в ФК, ведущее к

уменьшению проапоптотических эффектов. Это предположение требует серьёзной экспериментальной проверки.

Наше исследование имеет ограничения, что важно учитывать при интерпретации полученных данных. В первую очередь отметим, что выборка крыс была невелика. Кроме того, помимо экспрессии белков, мы не оценивали экспрессию генов, кодирующих эти белки, и не оценивали, как сказано выше, активность пролинспецифической протеазы PREP. Мы не исследовали динамику нейропластичности и изменений активности фермента в условиях пролонгированного стресса социальной изоляции. Принимая во внимание сказанное, мы рассматриваем настоящую работу как пилотное исследование, продолжение которого позволит получить новые данные о влиянии продолжительного стресса социальной изоляции на состояние нейротрофической системы мозга и роли PREP в индуцированных стрессом нарушениях поведения и когнитивных функций у крыс в зависимости от пола животных.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-315-90110) и государственного задания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей пато-

логии и патофизиологии (рег. № НИОКТР АА-АА-А19-119100790089-5).

Благодарности. Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Юлии Игоревне Кировой за консультации и помощь в проведении исследований методом иммуноблоттинга.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежашей лабораторной практики», утверждёнными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и ГОСТ 33215-2014, 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП» (протокол утверждения проекта исследования № 6 от 23.11.2018, протокол окончательного утверждения проведённого исследования № 3 от 16.06.2020). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 6, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walker, A. J., Kim, Y., Price, J. B., Kale, R. P., McGillivray, J. A., et al. (2014) Stress, inflammation, and cellular vulnerability during early stages of affective disorders: biomarker strategies and opportunities for prevention and intervention, *Front. Psychiatry*, **5**, 34, doi: 10.3389/fpsy.2014.00034.
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., and Lajud, N. (2016) Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with post-weaning social isolation in rats, *PLoS One*, **11**, e0162665, doi: 10.1371/journal.pone.0162665.
- Friedler, B., Crapser, J., and McCullough, L. (2015) One is the deadliest number: the detrimental effects of social isolation on cerebrovascular diseases and cognition, *Acta Neuropathol.*, **129**, 493-509, doi: 10.1007/s00401-014-1377-9.
- Duffy, K. A., McLaughlin, K. A., and Green, P. A. (2018) Early life adversity and health-risk behaviors: proposed psychological and neural mechanisms, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1428**, 151-169, doi: 10.1111/nyas.13928.
- Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M., and Dehpour, A. R. (2018) Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model – a comprehensive review, *Biomed. Pharmacother.*, **105**, 1205-1222, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.086.
- Schweinfurth, M. K. (2020) The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*), *Elife*, **9**, e54020, doi: 10.7554/eLife.54020.
- Fone, K. C., and Porkess, M. V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents – relevance to developmental neuropsychiatric disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **32**, 1087-1102, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.003.17.
- Liu, N., Wang, Y., An, A. Y., Banker, C., Qian, Y.-H., and O'Donnell, J. M. (2020) Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling, *Eur. J. Neurosci.*, **52**, 2694-2704, doi: 10.1111/ejn.14565.
- Siuda, D., Wu, Z., Chen, Y., Guo, L., Linke, M., et al. (2014) Social isolation-induced epigenetic changes in mid-brain of adult mice, *J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 247-255.
- Murgatroyd, C., Patchev, A., Wu, Y., Micale, V., Bockmühl, Y., et al. (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress, *Nat. Neurosci.*, **12**, 1559-1566, doi: 10.1038/nn.2436.
- Gapp, K., von Ziegler, L., Tweedie-Cullen, R. Y., and Mansuy, I. M. (2014) Early life epigenetic programming and transmission of stress-induced traits in mammals, *BioEssays*, **36**, 491-502, doi: 10.1002/bies.201300116.

12. Gulyaeva, N. V. (2017) Molecular mechanisms of neuroplasticity: an expanding universe, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 237-242, doi: 10.1134/S0006297917030014.
13. Korzhevskii, D. E., Petrova, E. S., Kirik, O. V., Beznin, G. V., and Sukhrukova, E. G. (2010) Neural markers used for investigation of differentiation of stem cells, *Geny Kletki*, **5**, 57-63.
14. Kolos, E. A., Grigoriev, I. P., and Korzhevskii, D. E. (2015) Marker of synaptic contacts – synaptophysin, *Morfologiya*, **147**, 79-83.
15. Hao, Y., Shabanpoor, A., and Metz, G. A. (2017) Stress and corticosterone alter synaptic plasticity in a rat model of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **651**, 79-87, doi: 10.1016/j.neulet.2017.04.063.
16. Xu, H., He, J., Richardson, J. S., and Li, X. M. (2004) The response of synaptophysin and microtubule-associated protein 1 to restraint stress in rat hippocampus and its modulation by venlafaxine, *J. Neurochem.*, **91**, 1380-1388, doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02827.x.
17. Gemmel, M., Kokras, N., Dalla, C., and Pawluski, J. L. (2018) Perinatal fluoxetine prevents the effect of pre-gestational maternal stress on 5-HT in the PFC, but maternal stress has enduring effects on mPFC synaptic structure in offspring, *Neuropharmacology*, **128**, 68-180, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.10.009.
18. Zhang, L., Luo, J., Zhang, M., Yao, W., Ma, X., and Yu, S. Y. (2014) Effects of curcumin on chronic, unpredictable, mild, stress-induced depressive-like behaviour and structural plasticity in the lateral amygdala of rats, *Int. J. Neuropsychopharmacology*, **17**, 793-806, doi: 10.1017/S1461145713001661.
19. Heschem, S., Grace, L., Kellaway, L. A., Bugarith, K., and Russell, V. A. (2009) Effect of exercise on synaptophysin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress, *Metab. Brain Dis.*, **24**, 701-709, doi: 10.1007/s11011-009-9165-2.
20. Andersen, S. L., and Teicher, M. H. (2004) Delayed effects of early stress on hippocampal development, *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1988-1993, doi: 10.1038/sj.npp.1300528.
21. Dandi, E., Kalamari, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Nousiopolou, E., et al. (2018) Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **67**, 19-32, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003
22. Ramos-Ortolaza, D. L., Doreste-Mendez, R. J., Alvarado-Torres, J. K., and Torres-Reveron, A. (2017) Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress, *Behav. Brain Res.*, **328**, 115-122, doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.016.
23. Varty, G. B., Marsden, C. A., and Higgins, G. A. (1999) Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats, *Brain Res.*, **824**, 197-203, doi: 10.1016/S0006-8993(99)01173-7.
24. Das, S. K., Baitharu, I., Barhwal, K., Hota, S. K., and Singh, S. B. (2016) Early mood behavioral changes following exposure to monotonous environment during isolation stress is associated with altered hippocampal synaptic plasticity in male rats, *Neurosci. Lett.*, **612**, 231-237, doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.038.
25. Bondar, N. P., and Merkulova, T. I. (2016) Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay, *J. Biosci.*, **41**, 751-758, doi: 10.1007/s12038-016-9648-3.
26. Paltsyn, A. A. (2019) Neurotrophic brain factor – BDNF, *Patogenez*, **17**, 83-88, doi: 10.25557/2310-0435.2019.03.83-88.
27. Hempstead, B. L. (2015) Brain-derived neurotrophic factor: three ligands, many actions, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **126**, 9-19.
28. Giacobbo, L. B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R. A. J. O., Bromberg, E., and de Vries, E. F. J. (2019) Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation, *Mol. Neurobiol.*, **56**, 3295-3312, doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
29. Wang, M., Xie, Y., and Qin, D. (2021) Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases, *Brain Res. Bull.*, **166**, 172-184, doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.005.
30. Hill, R. A., Klug, M., Kiss Von Soly, S., Binder, M. D., Hannan, A. J., and van den Buuse, M. (2014) Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a "two hit" rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. *Hippocampus*, **24**, 1197-1211, doi: 10.1002/hipo.22302.
31. Yeh, C. M., Huang, C. C., and Hsu, K. S. (2012) Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF, *J. Physiol.*, **590**, 991-1010, doi: 10.1113/jphysiol.2011.222042.
32. Li, M., Du, W., Shao, F., and Wang, W. (2016) Cognitive dysfunction and epigenetic alterations of the BDNF gene are induced by social isolation during early adolescence, *Behav. Brain Res.*, **313**, 177-183, doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.025.
33. Zubkov, E. A., Zorkina, Ya. A., Orshanskaya, E. V., Khlebnikova, N. N., Krupina, N. A., and Chekhin, V. P. (2019) Post-weaning social isolation disturbs gene expression in rat brain structures, *Bull. Exper. Biol. Med.*, **166**, 364-368, doi: 10.1007/s10517-019-04351-0.
34. Garcia-Horsman, J. A. (2020) The role of prolyl oligopeptidase, understanding the puzzle, *Ann. Transl. Med.*, **8**, 983, doi: 10.21037/atm-20-3412.
35. Männistö, P. T., and Garcia-Horsman, J. A. (2017) Mechanism of action of prolyl oligopeptidase (PREP) in degenerative brain diseases: has peptidase activity only a modulatory role on the interactions of PREP with proteins? *Front. Aging Neurosci.*, **9**, 27, doi: 10.3389/fnagi.2017.00027.
36. Kushnareva, E. Yu., Krupina, N. A., Khlebnikova, N. N., Zolotov, N. N., and Kryzhanovskii, G. N. (2011) Activities of proline-specific peptidases in brain structures of rats with experimental anxiety-depressive state caused by administration dipeptidyl peptidase IV inhibitor in the early postnatal period, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **151**, 675-679, doi: 10.1007/s10517-011-1413-x.
37. Khlebnikova, N. N., Krupina, N. A., Kushnareva, E. Yu., and Orlova, I. N. (2015) Differences in active avoidance conditioning in male and female rats with experimental anxiety-depressive disorder, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **159**, 337-340, doi: 10.1007/s10517-015-2956-z.
38. Zubkov, E. A., Zorkina, Ya. A., Orshanskaya, E. V., Khlebnikova, N. N., Krupina, N. A., and Chekhonin, V. P.

- (2017) Changes in gene expression profiles in adult rat brain after neonatal action of dipeptidyl peptidase-IV inhibitors, *Neuropsychobiology*, **76**, 89-99, doi: 10.1159/000488367.
39. Nazarova, G. A., Zolotov, N. N., Krupina, N. A., Kraineva, V. A., Garibova, T. L., and Voronina, T. A. (2007) Changes in proline-specific peptidase activity in experimental model of retrograde amnesia, *Eksp. klinich. farmakol.*, **70**, 6-8, doi: 10.30906/0869-2092-2007-70-6-6-8.
40. Krupina, N. A., Shirenova, S. D., and Khlebnikova, N. N. (2020) Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex, *Brain Sci.*, **10**, 799, doi: 10.3390/brainsci10110799.
41. Hall, F. S., Humby, T., Wilkinson, L., and Robbins, T. (1997) The effects of isolation-rearing of rats on behavioural responses to food and environmental novelty, *Physiol. Behav.*, **62**, 281-290, doi: 10.1016/S0031-9384(97)00115-7.
42. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
43. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289-300, doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
44. Psychometrica: Computation of effect sizes. 11. Effect size calculator for non-parametric tests: Mann-Whitney-U, Wilcoxon-W and Kruskal-Wallis-H, URL: https://www.psychometrica.de/effect_size.html.
45. Cohen, J. (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, Edn. 2, Hillsdale, Erlbaum.
46. Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., et al. (2013) Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats, *Neuropharmacology*, **68**, 223-231, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.08.014.
47. Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., et al. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin, *J. Neurosci.*, **25**, 5455-5463, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005.
48. Gibon, J., Buckley, S. M., Unsain, N., Kaartinen, V., Seguela, P., and Barker, P. A. (2015) proBDNF and p75NTR control excitability and persistent firing of cortical pyramidal neurons, *J. Neurosci.*, **35**, 9741-9753, doi: 10.1523/jneurosci.4655-14.2015.
49. Park, S.-S., Park, H. S., Kim, T. W., and Lee, S. J. (2020) Effects of swimming exercise on social isolation-induced memory impairment and apoptosis in old rats, *J. Exerc. Rehabil.*, **16**, 234-241, doi: 10.12965/jer.2040366.183.
50. Park, H.-S., Kim, T.-W., Park, S.-S., Lee, S.-J. (2020) Swimming exercise ameliorates mood disorder and memory impairment by enhancing neurogenesis, serotonin expression, and inhibiting apoptosis in social isolation rats during adolescence, *J. Exerc. Rehabil.*, **16**, 132-140, doi: 10.12965/jer.2040216.108.
51. Kim, T.-W., Park, S.-S., Shin, M.-S., Park, H.-S., and Baek, S.-S. (2020) Treadmill exercise ameliorates social isolation-induced memory impairment by enhancing silent information regulator-1 expression in rats, *J. Exerc. Rehabil.*, **16**, 227-233, doi: 10.12965/jer.2040400.200.
52. Carvalho-Netto, E. F., Myers, B., Jones, K., Solomon, M. B., and Herman, J. P. (2011) Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress, *Physiol. Behav.*, **104**, 242-247, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.01.024.
53. Yau, S. Y., Li, A., Zhang, E. D., Christie, B. R., Xu, A., et al. (2014) Sustained running in rats administered corticosterone prevents the development of depressive behaviors and enhances hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity without increasing neurotrophic factor levels, *Cell Transplant.*, **23**, 481-492, doi: 10.3727/096368914X678490.
54. Babkova, K., Korabecny, J., Soukup, O., Nepovimova, E., Jun, D., and Kuca, K. (2017) Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors, *Future Med. Chem.*, **9**, 1015-1038, doi: 10.4155/fmc-2017-0030.
55. Yavas, E., Gonzalez, S., and Fanselow, M. S. (2019) Interactions between the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala support complex learning and memory, *F1000Res.*, **31**, 8, doi: 10.12688/f1000research.19317.1.
56. Fiedorowicz, A., Figiel, I., Kamińska, B., Zaremba, M., Wilk, S., and Oderfeld-Nowak, B. (2001) Dentate granule neuron apoptosis and glia activation in murine hippocampus induced by trimethyltin exposure, *Brain Res.*, **912**, 116-127, doi: 10.1016/s0006-8993(01)02675-0.
57. Bär, J. W., Rahfeld, J.-U., Schulz, I., Gans, K., Ruiz-Carrillo, D., et al. (2006) Prolyl endopeptidase cleaves the apoptosis rescue peptide humanin and exhibits an unknown post-cysteine cleavage specificity, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **575**, 103-108, doi: 10.1007/0-387-32824-6_11.
58. Zahm, D. S. (1987) Neurotensin-immunoreactive neurons in the ventral striatum of the adult rat: ventromedial caudate-putamen, nucleus accumbens and olfactory tubercle, *Neurosci. Lett.*, **81**, 41-47, doi: 10.1016/0304-3940(87)90337-5.
59. Liu, Q., Hazan, A., Grinman, E., and Angulo, J. A. (2017) Pharmacological activation of the neurotensin receptor 1 abrogates the methamphetamine-induced striatal apoptosis in the mouse brain, *Brain Res.*, **1659**, 148-155, doi: 10.1016/j.brainres.2017.01.029.
60. Jalkanen, A. J., Puttonen, K. A., Venäläinen, J. I., Sinervä, V., Mannila, A., et al. (2006) Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old scopolamine-treated rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **100**, 132-138, doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.00021.x.
61. Peltonen, I., Myöhänen, T. T., and Männistö, P. T. (2012) Different interactions of prolyl oligopeptidase and neurotensin in dopaminergic function of the rat nigrostriatal and mesolimbic pathways, *Neurochem. Res.*, **37**, 2033-2041, doi: 10.1007/s11064-012-0825-y.
62. Devader, C., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2013) The anti-apoptotic role of neurotensin, *Cells*, **2**, 124-135, doi: 10.3390/cells2010124.
63. Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2012) Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function, *Trends Neurosci.*, **35**, 261270, doi: 10.1016/j.tins.2012.01.003.

LONG-TERM SOCIAL ISOLATION REDUCES BDNF PRECURSOR AND PROLYL ENDOPEPTIDASE EXPRESSION IN RAT BRAIN STRUCTURES

S. D. Shirenova*, N. N. Khlebnikova, and N. A. Krupina

Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315 Moscow, Russia; E-mail: Shirenova.jr@gmail.com

Early-life stress is a risk factor for the development of behavioral and cognitive disorders in humans and animals. Such stressful situations include social isolation in early postnatal ontogenesis. Behavioral and cognitive impairments associated with neuroplastic changes in brain structures. We have found that after ten weeks of social isolation, male Wistar rats show behavioral abnormalities and cognitive deficit, accompanied by an increase in the relative expression of gene encoding serine protease prolyl endopeptidase (PREP, EC 3.4.21.26) in the brain frontal cortex. The present study aimed to assess synaptophysin (SYP), brain-derived neurotrophic factor precursor (proBDNF), and PREP expression using Western blot in the brain structures – the hippocampus, frontal cortex, and striatum of the rats subjected to prolonged social isolation compared with group-housed animals. Twenty Wistar rats were used for this study (10 males and 10 females). Experimental animals (5 males and 5 females) were kept one per cage for nine months, starting from the age of one month. Ten-month-old socially isolated rats showed memory deficit in passive avoidance paradigm and Morris Water Maze and reactivity to novelty reduction. We used monoclonal antibodies for the Western blot analysis of the expression of SYP, proBDNF, and PREP in the rat brain structures. Social isolation caused a proBDNF expression reduction in the frontal cortex in females and a reduction in PREP expression in the striatum in males. These data suppose that neurotrophic factors and PREP are involved in the mechanisms of behavioral and cognitive impairments observed in the rats subjected to prolonged social isolation with an early life onset.

Keywords: social isolation, neuroplasticity, synaptophysin, BDNF precursor, prolyl endopeptidase, brain structures, Western blot