

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Тарасова Александра Юрьевна

**НЕОФИЛИЯ И ТРЕВОЖНОСТЬ В ПРОЯВЛЕНИИ
КОГНИТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ
(НА ПРИМЕРЕ ЛАБОРАТОРНОЙ МЫШИ)**

Специальность 03.03.06 - нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2018

Работа выполнена на кафедре высшей нервной деятельности биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Научный
руководитель**

Полетаева Инга Игоревна - доктор биологических наук,
старший научный сотрудник.

**Официальные
оппоненты**

Левицкая Наталья Григорьевна - доктор биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Степаничев Михаил Юрьевич - доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии».

Сварник Ольга Евгеньевна - кандидат психологических наук, старший научный сотрудник лаборатории психофизиологии им. В.Б. Швыркова Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт психологии Российской академии наук».

Защита диссертации состоится 3 декабря 2018 года в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12, ауд. М-1. Факс: (495)939-43-09.

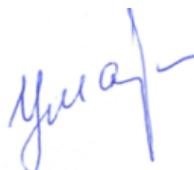
E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/150559861/>

Автореферат разослан «1» ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.03.06,
доктор биологических наук

Умарова Б.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование когнитивных способностей животных – одна из областей нейробиологии, получившая большое развитие в конце XX - начале XXI века. В настоящее время определение этой категории реакций животных базируется на включении в нее таких проявлений пластичности поведения, как способность к обучению, формирование памяти, исследовательское поведение, реакция на новое, а также способность к решению элементарных логических задач (Poletaeva, Zorina, 2014). Исследование когнитивных способностей животных (преимущественно грызунов) разных генотипов – это перспективное направление, которое способствует созданию адекватных лабораторных моделей заболеваний ЦНС человека, в частности, нейродегенеративных заболеваний. Это означает, что детальный анализ поведения животных с генетически детерминированными особенностями адаптивного поведения – актуальная задача современной нейробиологии. В ходе подобных исследований предполагается не только выявлять коррелятивные соотношения разных признаков поведения, но и выяснять их причинную взаимосвязь. С этой целью в нейробиологии используются достаточно разработанные нейрогенетические подходы к исследованию признаков поведения, в частности, сравнительное исследование животных с различающимися генотипами.

Выполнение настоящей диссертационной работы было актуальным, поскольку в экспериментах планировалось оценить взаимосвязь различных проявлений когнитивных способностей, в особенности реакции на новизну, и связанных с ними других аспектов поведения (в особенности уровня тревожности) у мышей разных генотипов: мышей, селектированных на когнитивный признак и мышей контрольной популяции; двух линий мышей, селектированных по нейроморфологическому признаку (на крайние значения веса мозга), а также у мышей-нокауты по важному генетическому элементу – гену β -аррестина 2, связанного с регуляцией активности мембранных рецепторов (GPCR).

Цель работы: оценить взаимосвязь между проявлением когнитивных способностей лабораторных мышей разного генотипа и признаками поведения, которые зависят от уровня тревожности (неофилия, неофагофобия, агрессия).

Задачи работы:

1. сравнить решение тестов, оценивающих когнитивные способности (задачи на экстраполяцию и на поиск входа в укрытие) у мышей ряда генотипов.
2. исследовать уровень тревожности этих мышей в батарее тестов.
3. проанализировать реакции мышей разных генотипов на новизну обстановки.
4. оценить уровень межсамцовой агрессии и агрессии хищника в сопоставлении с уровнем тревожности животных.
5. исследовать влияние обогащенных условий содержания мышей на их поведение и на нейроморфологические показатели.

Научная новизна. В работе впервые проанализирована взаимосвязь реакции на новизну и уровня тревожности в различных тестах у мышей, селектированных по когнитивному признаку, и мышей, селектированных на разный вес мозга. Также впервые проведен эксперимент по влиянию содержания в «обогащенной» среде мышей, селектированных по когнитивному признаку. Исследование разных реакций поведения лабораторных мышей, которые были селектированы на высокие показатели когнитивных способностей, достаточно уникально. Следует отметить, что селекционных экспериментов на высокие показатели других когнитивных признаков (например, на выраженность пространственного научения и памяти) не проводилось. Использование метода классической генетики (искусственного отбора) отличает настоящую работу от большинства исследований, посвященных анализу нейробиологической основы

когнитивного поведения (и тесно связанных с ним других признаков поведения), так как большинство из современных исследований базируется преимущественно на выявлении роли отдельных генетических элементов с использованием методов генной инженерии.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы. Как признают многие авторы, на пути успешного использования генетических моделей на животных с перспективами разработки будущих терапевтических подходов, имеется много трудностей, связанных главным образом со сложностью моделируемых процессов. Расширение представлений о взаимосвязи между проявлением когнитивных способностей лабораторных мышей разного генотипа и признаками поведения, которые зависят от уровня тревожности (неофилия, неофагофобия, агрессия) может помочь в будущем разработать лабораторные модели, позволяющие более полный, чем в настоящее время, анализ данных процессов.

Результаты настоящей работы получены на мышах нескольких генотипов (с использованием оригинальных селектированных линий мышей). Проведенные эксперименты позволили получить данные по поведению мышей в батарее тестов разного уровня сложности. Эти данные и результат их анализа в своей совокупности являются новым вкладом в анализ поведения лабораторной мыши. Результаты данного исследования уточняют характер взаимодействия когнитивных способностей, проявлений тревожности, исследовательского поведения и неophobia у лабораторных мышей разного генотипа и могут быть вкладом в понимание структуры «сложных» форм поведения. Понимание генетических и физиологических особенностей организации когнитивного поведения у лабораторных животных имеет большое практическое значение, в дальнейшем совокупность полученных данных может быть полезной для разработки моделей некоторых аспектов когнитивного поведения человека.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Впервые проведено сравнение выполнения когнитивных тестов, а также тестов на новизну у мышей ряда генотипов – линия ЭКС и популяция КоЭКС (селекция на высокие показатели когнитивного теста и контроль к ней), линии БМ и ММ (селекция на большой и малый относительный вес мозга), мыши с нокаутом по гену, кодирующему белок β -аррестин 2.
2. В 15-18-м поколениях селекции мыши линии ЭКС обнаруживали улучшение способности решать когнитивный тест на поиск входа в укрытие при отсутствии улучшения показателей решения теста на экстраполяцию.
3. У мышей линии ЭКС отмечалась сниженная тревожность-осторожность по отношению к новым объектам, слабо выраженная межсамцовая агрессия и одновременно - более интенсивная агрессия хищника.
4. Пребывание в обогащенных условиях среды способствовало усилению уровня нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа и повышению уровня тревожности у мышей линии ЭКС.
5. У мышей линии ММ в ряду поколений обнаружена более четко выраженная неophobia и тревожность, по сравнению с линией БМ, в том числе после введения метилглиоксаля.

Апробация работы. Данные, полученные в диссертации, были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на XXI, XX Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2016, 2017 год соответственно); на IX, XX, XXI Школах-конференциях молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности (Москва, 2015, 2016, 2017 год соответственно); на IV Всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, 2018); на V съезде фармакологов России «Научные основы

поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); на III международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (Москва, 2017); на 47th European Brain & Behaviour Society Meeting (Bilbao, Spain 2017); на XII, XIII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016, 2017 год соответственно); на 19th Annual Meeting of IBANGS (Madrid, Spain, 2017); на Всероссийской научной конференции «Процедуры и методы экспериментально-психологических исследований» (Москва, 2016); на VII, VIII международной конференции по когнитивной науке (Светлогорск, 2016, 2018 год соответственно); на X съезде териологического общества при РАН (Москва, 2016); на V международной конференции «Психология индивидуальности» (Москва, 2015); на VI международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Москва, 2015); на III конференции «Когнитивная наука в Москве: новые исследования» (Москва, 2015); на 17th Annual meeting international of the behavioural and neural genetics society (IBANGS) (Uppsala, Sweden, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в их числе 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация включает в себя следующие разделы: введение, главы с изложением обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы (306 источников). Работа изложена на 219 страницах, содержит 44 оригинальных рисунка и 37 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Были использованы мыши (самцы и самки) нескольких генотипов. Это были: 1) мыши разных поколений селектированной линии ЭКС и контрольной неселектированной популяции КоЭКС; 2) мыши ряда поколений линий, селектированных на большой (БМ) и малый (ММ) относительный вес мозга; 3) мыши-нокауты по гену β -аррестин 2 и контрольные мыши с нормальным генотипом («дикий тип»). Суммарно эксперименты были проведены на 836 мышах линии ЭКС и КоЭКС (466 самцов и 370 самок), 322 мышах линий БМ и ММ (101 самец и 221 самка), 10 самцах нокаутов по гену β -аррестина 2 и 10 самцах мышей «дикого типа».

Мышей содержали в стандартных пластиковых клетках (33 x 22 x 8 см или 42 x 26 x 15 см) по 4-6 или 7-12 в каждой, соответственно, в условиях естественной смены освещенности и свободного доступа к комбикорму (фирма Чара) и воде (за исключением периодов пищевой и питьевой депривации перед тестами на способность к экстраполяции и на гипонеофагию). Эксперименты проводили на животных в возрасте 3–4 мес. Все эксперименты проводились в соответствии с международными правилами по работе с лабораторными животными (Декларация ЕС 2010).

Тестирование поведения животных: Способность к экстраполяции оценивали у мышей после питьевой и пищевой депривации в специальной камере, в центре которой находилось отверстие, через которое мышь могла пить молоко из маленькой поилки, которая могла перемещаться за стенкой вдоль нее. Предварительно мышей группой приучали к обстановке камеры и питью молока из центрального отверстия. В опыте мышь (лишенную воды и пищи на 16-18 часов) помещали в камеру и после того, как она начинала пить, поилку отодвигали вправо или влево, и она скрывалась из поля зрения животного. Правильным решением теста был подход мыши к боковому отверстию в стенке камеры с той стороны, куда отодвинулась поилка. Неправильным решением был подход к противоположному, «пустому» отверстию. Отсутствие подхода к центральному отверстию в течение 3 мин. было принято считать «отказом» от решения. Если мышь, после исчезновения поилки из поля зрения не подошла к боковому отверстию, решение

считалось «нулевым» (рис.1). Направление перемещения поилки чередовали в квазислучайном порядке.

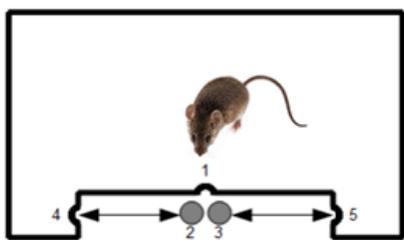


Рис. 1. Схема «экстраполяционной» камеры.
1-центральное отверстие;
2,3-направление передвижения поилки;
4,5-боковые отверстия.

Тест на поиск входа в укрытие проводили в пластиковой камере, состоящей из темного и светлого отсеков, соединенных углубленным в пол «лазом», который, в зависимости от пробы теста, мог быть открыт или замаскирован. В «когнитивных» пробах теста этот лаз закрывали, либо засыпая его стружкой вровень с полом, либо вставляя в него пластиковую пробку. В последней пробе теста всю стенку камеры, в основании которой был лаз, засыпали стружкой на 5-7 см. Успешность решения теста оценивали по времени, требующемуся мыши для перехода в темное отделение камеры (для решения проб с «пробкой» критерием был период в 240 с, для остальных проб - 180 с). Таким образом оценивали «решение» и «не-решение» той или иной проб теста.

Тест приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) (ширина рукавов - 4,7 см, длина - 20 см, высота стенок - 14,2 см). Животное помещали в центр ПКЛ и в течение 3 мин оценивали число выходов мыши в светлые рукава, время в светлых рукавах, время в центре лабиринта, число «свешиваний» с открытых рукавов, вертикальных стоек и эпизодов груминга, а также число переходов между темными рукавами (Т-Т переходы).

Тест темно-светлая камера (ТСК). Животное помещали в освещенный отсек камеры и в течение 3 мин регистрировали время, проведенное в нем, время, проведенное в темном отсеке, число выходов мыши в светлую часть камеры, выглядываний из темного отсека и число заглядываний в темный отсек.

Закрытый крестообразный лабиринт (ЗКЛ). Лабиринт состоял из 4 боковых и соединяющего их центрального отсека (каждый размером 15 x 15 см). Мышь помещали в центр и в полуавтоматическом режиме регистрировали ряд показателей поведения. Это были: время пребывания в центре и в каждом из боковых отсеков, латентный период первого захода в отсек, а также частота повторных заходов в уже посещенные отсеки, число заходов, которое потребовалось для посещения всех 4 отсеков («патрулирование»), а также число и длительность эпизодов «стереотипных» заходов в 2 боковых отсека.

Тест «неизбегаемая скользкая воронка». Мышь помещали на 3 минуты в большую стеклянную воронку, дно которой было заполнено водой. В полуавтоматическом режиме регистрировали число эпизодов неподвижности, пассивного избегания и активного избавления, а также длительность этих эпизодов.

Распознавание нового предмета в ЗКЛ. В течение 5 мин мышь свободно обследовала лабиринт, в одном из отсеков которого находился незнакомый предмет. После этого предмет извлекали из лабиринта, протирали разбавленным спиртом и перемещали в другой отсек. Оценивали число посещения отсека с предметом и время в нем, а также суммарное число посещения отсеков с предметом в период 1-го и 2-го тестов.

Реакция на новый предмет в большой камере. Камера состояла из 3 отсеков (центрального, куда помещали животное, и двух боковых, где располагались предметы). В фоновом тестировании в них было 2 одинаковых предмета, и в течение 3 мин мышь могла их обследовать. Далее один из предметов заменяли на новый, и процедуру повторяли.

Тест на гипонеофагию (боязнь новой пищи). Мышь, лишенную на 18 часов пищи (но не воды) помещали в камеру на 10 мин, регистрировали длительность потребления пищи, число подходов к кормушке, а также вес съеденной пищи.

Исследование проявлений «хищнического» поведения мышей. Оценивали реакцию мыши на живого сверчка. Вручную регистрировали время подхода к «добыче», число эпизодов приноживания, преследования жертвы, число нанесенных укусов и длительность поедания «добычи».

Исследование межсамцовой агрессии (тест со стандартным оппонентом). Тест длился 20 мин., регистрировали: время первой атаки, число атак, а также эпизоды приноживаний и принудительных чисток оппонента.

Эксперимент с «обогащением среды». Животных содержали либо в стандартных условиях (стандартные пластиковые клетки 42,5 x 26,6 x 15 см), либо в условиях «обогащенной» среды. «Обогащение» условий обеспечивали содержанием мышей двух в больших клетках (размером 59×37×20 см), соединенных трубками. В клетках было несколько кормушек и поилок, имелись трубки-тоннели, укрытия, разнообразные по форме и текстуре, а также колеса активности. По истечении срока пребывания в «обогащенной» среде у части животных (по 2 мыши каждой группы в F16 и по 3 мыши - в F18) была проведена транскардиальная перфузия для фиксации мозга и дальнейшего анализа нейрогенеза взрослого мозга. У остальных животных (F16 ЭКС n=10, КоЭКС n=10; F18 ЭКС n=14, КоЭКС n=15), которых далее содержали в стандартных клетках, тестировали поведение.

Уровень нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа оценивали на срезах мозга мышей (с иммуногистохимическим выявлением делящихся клеточных элементов, маркер Ki-67) (Тимошенко и др., 2009). Подсчет клеточных элементов проводили визуально с помощью микроскопа Olympus CX-41 с флюоресцентной насадкой, с определением среднего числа клеток на срезе (более подробное описание данной методики приводится в диссертации).

Статистическую значимость различий оценивали с помощью одно- и двухфакторного ANOVA с последующим *post hoc LSD* анализом по Фишеру. Достоверность различия долей животных оценивали по методу ϕ Фишера, различия в ходе кривых накопления доли правильных решений оценивали по критерию знаков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Способность к решению когнитивных тестов у мышей ЭКС и КоЭКС.

В начальных поколениях отбора (Перепелкина и др., 2013), мыши селектированной линии (ЭКС) решали тест на экстраполяцию несколько более успешно, чем мыши контрольной неселектированной популяции (КоЭКС). Однако, начиная уже с F10 - F12, достоверные отличия от 50% случайного уровня в доле правильных решений этого теста мышами ЭКС перестали обнаруживаться устойчиво. Показатели решения теста на экстраполяцию у мышей ЭКС и КоЭКС практически не отличались. В данной работе рассматривается поведение мышей ЭКС и КоЭКС в поколениях F14-F18. Поскольку во время первого предъявления данной задачи у животного нет опыта ее решения (Перепелкина и др., 2013), то именно его решение наиболее показательно в аспекте когнитивных способностей. Доля правильных решений теста при 1-м его предъявлении у мышей ЭКС в F14, F18 не отличалась от 50% случайного уровня и практически во всех этих поколениях (кроме F15) была ниже (недостоверно) таковой контрольных мышей. У мышей КоЭКС этот показатель был выше случайного 50% уровня во всех поколениях, тогда как у ЭКС он превышал случайный уровень в F15, F16, F17 (данные приведены в диссертации). Суммарная доля правильных решений за 1-6 предъявления у мышей ЭКС и КоЭКС достоверно отличалась от 50% случайного уровня во всех поколениях (за исключением F16 у ЭКС) (рис. 2). На рис. 3 А и Б представлены данные по успешности решения данного теста мышами 17-го поколения. Следует отметить, что у мышей ЭКС была более высокая доля быстрых правильных решений теста, когда мышь целенаправленно бежала к боковому отверстию (рис.3 Б), не отвлекаясь на обследование

камеры. Однако в этом же F17 в опытах с многократным (30 раз) предъявлением теста (в течение 5 опытных дней) показатели мышей КоЭКС были выше. Таким образом, к F18 у мышей ЭКС не было обнаружено более высоких показателей решения теста на экстраполяцию по сравнению с контролем. Вероятно, такой слабый ответ на отбор на способность к экстраполяции связан со сложностью «требований» к поведению животного в тесте. Правильное решение теста требует, чтобы мышь успешно проследила направление поилки, «поняла», где ее следует искать, и при этом не использовала стереотипную реакцию чередования направлений побежки, а также не использовала воспоминание о месте получения пищи в предыдущем успешном поиске.

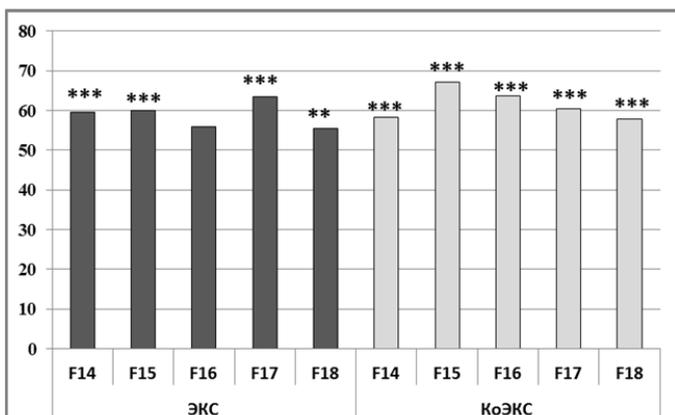


Рис. 2. Решение теста на экстраполяцию направления движения за 1-6 предъявлений теста в F14-18 поколениях селекции (ось ординат - доли правильных решений,%). **, *** — дост. отличие доли от 50%-ного случайного уровня при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$, соответственно.

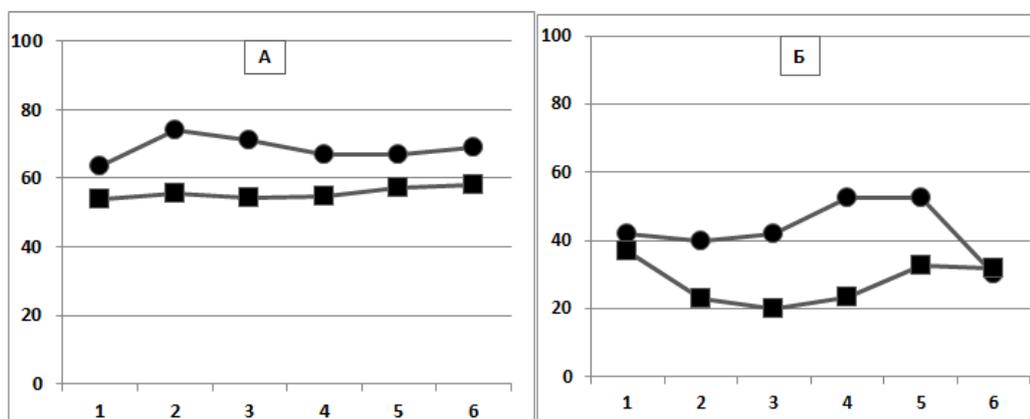


Рис. 3. Успешность решения теста на экстраполяцию мышами ЭКС (круги) и КоЭКС (квадраты) в F17 (ось ординат - доля правильных решений, %, ось абсцисс - предъявления теста). А - суммарная доля правильных решений, Б - доля быстрых (<20 с) целенаправленных правильных решений (дост. по критерию знаков, $p \leq 0,05$).

В селекционном эксперименте с формированием линии ЭКС первым критерием было успешное решение теста на экстраполяцию, а вторым критерием был отбор против проявлений страха и тревоги в процессе выполнения теста на экстраполяцию (а именно, отсутствие «отказов» и «нулевых» решений). По ходу селекции была обнаружена эффективность такого отбора - доля «отказов» от решения задачи у мышей ЭКС была ниже, чем в контроле, как в начале селекции, так и в последующих поколениях (Перепелкина и др., 2015). В F14 - 18 доля отказов от решения теста также была выше у мышей КоЭКС (рис. 4). Иными словами, ответ на отбор по второму критерию (против проявлений страха-тревоги при решении этой задачи) был обнаружен.

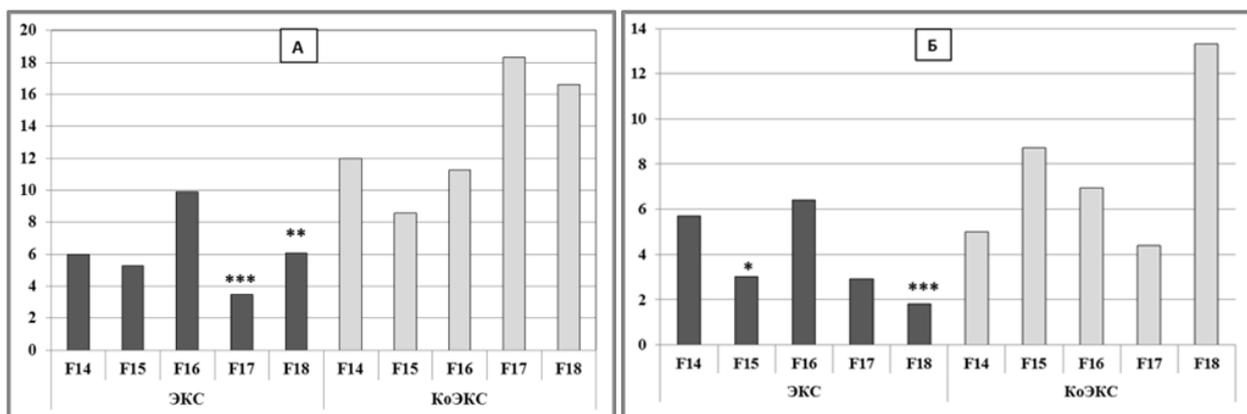


Рис. 4. Доля «отказов» от решения теста на экстраполяцию (А) и доля «нулевых» решений (Б) у мышей ЭКС и КоЭКС в F14-18. *, **, ***- дост. отличается от показателя мышей КоЭКС этого же поколения при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$, соответственно.

Несмотря на отсутствие различий в решении теста на экстраполяцию у самцов мышей ЭКС и КоЭКС, мыши ЭКС более успешно, чем КоЭКС решали другой когнитивный тест - на поиск входа в укрытие (Perепелкина et al., 2014, Перепелкина и др., 2015). Начиная с F9 (когда этот тест использовали впервые) мыши ЭКС были достоверно более успешны как по времени перехода в темную часть камеры, так и по доле животных, успешно решивших наиболее «трудную» пробу теста (когда нужно было вынуть «пробку», закрывающую лаз). Исследование поведения мышей в этом тесте в F16 (ЭКС $n=7$, КоЭКС $n=12$) и F18 (ЭКС $n=12$, КоЭКС $n=12$) по техническим причинам проводилось в настоящей работе только у самок. В F16 мыши ЭКС быстрее выполняли все пробы этого теста (рис. 5). Кроме того, в F16 доля мышей, которые успешно решили наиболее сложные пробы (когда надо было извлечь из лаза «пробку») была достоверно ($p \leq 0,05$) выше у мышей ЭКС, как это было показано и ранее (Перепелкина и др. 2015). В 18-м поколении (данные не приводятся) скорость решения двух этапов с «пробкой» самками была достоверно выше у мышей линии КоЭКС по сравнению с ЭКС. Наряду с этим, внутри линии КоЭКС все экспериментальные животные достоверно решили хотя бы один этап с «пробкой», тогда как мыши линии ЭКС оказались менее успешными (табл. 1). Таким образом, анализ решения теста на поиск входа в укрытие показал, что в F16 (как и во всех тестируемых ранее поколениях) мыши ЭКС решали данный тест достоверно успешнее. Возможно, что меньшая успешность ЭКС в решении теста самками F18 могла быть связана с неустойчивым эффектом селекции на фоне небольшого размера выборки животных, поскольку этот тест, предъявленный большому числу мышей этого поколения (опыты лаборатории) показал достоверное ($p \leq 0,01$) превосходство доли мышей ЭКС, решивших пробы теста с «пробкой» над мышами КоЭКС.

Таким образом, отбор на когнитивный признак – на способность к экстраполяции, привел к непрямому результату - увеличению способности решать другой когнитивный тест - на поиск входа в укрытие.

Логическая структура данных тестов имеет общую черту – необходимость оперировать законом (правилом) «неисчезаемости объекта» (по Ж. Пиаже). В тесте на экстраполяцию – это «неисчезаемость» поилки (скрывшейся из поля зрения), а в тесте на поиск входа в укрытие - «неисчезаемость» лаза, который бывает замаскирован. В то же время тест на способность к экстраполяции, по всей видимости, представляет для мыши большую сложность, чем поиск входа в укрытие. В тесте на экстраполяцию животное должно оперировать и законом «движения» (Крушинский, 2009), и обнаруживать способность преодолевать врожденное стремление к чередованию направления побегов, и находить «компромисс» между требованиями процедурной памяти (зарегистрировавшей

направление движения) и усвоенным инструментальным навыком бега к боковому отверстию.

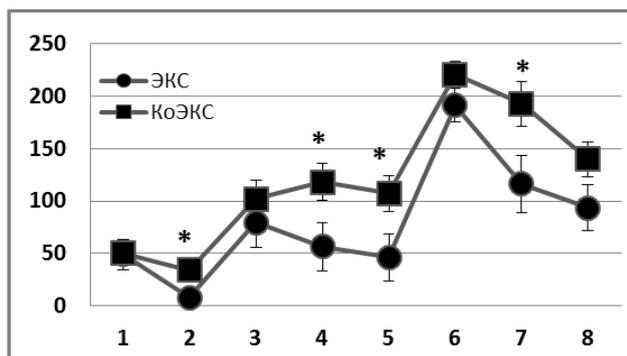


Рис. 5. Среднее время (ось ординат, с) решения теста на поиск входа в укрытие мышами ЭКС и КоЭКС F16. * - дост. отличается от показателя ЭКС при $p \leq 0,05$. Значения вероятности по *post hoc* LSD анализу (по Фишеру). По оси абсцисс - последовательные пробы теста: 1 и 2 - пробы с открытым лазом; 3, 4 и 5 - лаз присыпан стружкой; 6 и 7 - лаз закрыт пробкой, 8 - стенка с лазом засыпана стружкой на высоту 5-7 см.

Поколение	генотип	Доля (%) животных, решивших этап с «пробкой»
F16	ЭКС	87,5 *
	КоЭКС	41,7
F18	ЭКС	33 **
	КоЭКС	100

Табл. 1. Доля самок мышей ЭКС и КоЭКС, решивших сложный этап теста на поиск входа в укрытие (оценивали факт решения теста в хотя бы одном из двух предъявлений этапа с «пробкой»). *, ** – дост. отличается от КоЭКС при $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,001$, соотв. (метод «ф» по Фишеру).

Однако, как показали результаты, полученные в ходе данной диссертационной работы, проведенная селекция имела результатом не только улучшение способности находить вход в укрытие, но и изменения в исследовательской активности, в частности ситуации с новыми элементами среды и в уровне тревожности у мышей линии ЭКС.

Реакция на новизну у мышей ЭКС и КоЭКС.

Выраженность реакции животного на новизну (или обстановки в целом, или на введение в нее нового элемента) определяется балансом исследовательской активности и боязни нового. Для того, чтобы оценить реакцию на новизну у мышей ЭКС и КоЭКС были проведены тесты на гипонеофагию и тесты, основанные на контактах мыши с новым и/или уже знакомым предметом.

Реакцию на новую пищу оценивали у мышей ЭКС (n=16 самцов, 15 самок) и КоЭКС (n=14 самцов, 14 самок) в F17. При контакте с новой пищей даже голодная мышь может проявлять признаки осторожности (боязни нового – т.е. неофобии) по отношению к ней. Считается, что такое поведение частично можно объяснить отсутствием рвотного рефлекса у грызунов, вследствие чего избегание новой пищи – адекватная реакция осторожности (Deason et al., 2002). Двухфакторный ANOVA (факторы «генотип» и «пол») выявил достоверное влияние фактора «генотип» на все три основные показатели данного теста (вес съеденного, число подходов к пище и время еды). Вес пищи, съеденной за 10 мин теста (рис.6 А), был наибольшим у самцов ЭКС (с достоверным отличием $p \leq 0,05$ от самцов КоЭКС). Кроме того, у них было больше и число подходов к новой пище (рис.6 Б), а также время, занятое едой (рис.6 В). Аналогичная тенденция наблюдалась и среди самок ЭКС. Мыши КоЭКС, таким образом, избегали подходить к новой пище, съедали меньшее количество пищи, не задерживались около кормушки, т.е. обнаруживали признаки неофобии. «Позитивная» реакция мышей ЭКС на новую пищу была, таким образом, такой же, как и в предыдущих поколениях селекции (Голибродо и др., 2014).

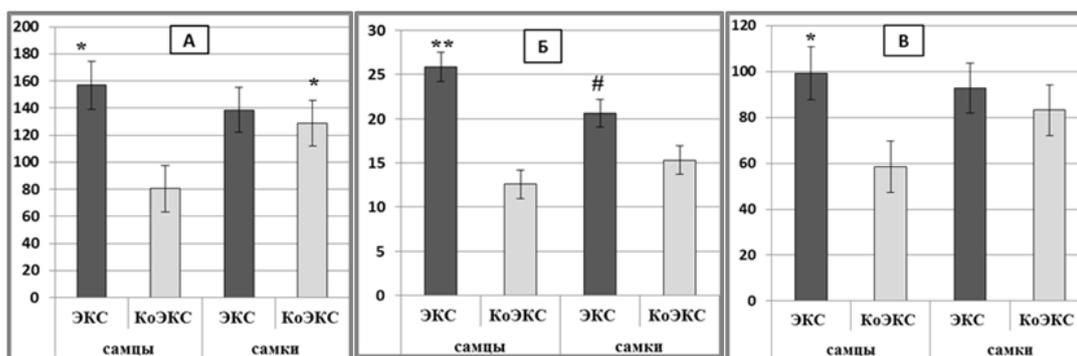


Рис. 6. Тест на гипонеофагию у мышей ЭКС и КоЭКС (F17). А - вес (ось ординат, мг) съеденной пищи (средние значения \pm ош. средн.). * - дост. отличается от показателя самцов линии КоЭКС при $p \leq 0,05$. Б - число (средние значения \pm ош. средн.) подходов к новой пище (ось ординат). ** - дост. отличается от показателя самцов КоЭКС при $p \leq 0,001$; # - дост. отличается от показателя КоЭКС самок того же поколения при $p \leq 0,05$. В - время (ось ординат, с) поедания порции сыра. Значения вероятности по *post hoc LSD* анализу (по Фишеру).

Реакция мышей на новый предмет в ЗКЛ. У мышей ЭКС и КоЭКС ее оценивали в двух независимых выборках мышей F15. В одной из них тест проводили до тестирования способности к экстраполяции (ЭКС $n=16$ самцов, 11 самок; КоЭКС $n=14$ самцов, 14 самок), во второй - после этого (ЭКС $n=15$ самцов, 11 самок; КоЭКС $n=11$ самцов, 11 самок). Предварительный опыт (прохождения теста на экстраполяцию) мог быть либо нейтральным для показателей реакции на новизну в последующем тесте, либо привести к модуляции (снижению или повышению) осторожности в реакции на новое. При тестировании до теста на экстраполяцию (рис.7) мыши линии ЭКС чаще заходили и проводили больше времени в отсеке с предметом, тогда как мыши КоЭКС избегали заходить в отсек с предметом, а если заходили, то проводили в нем меньше времени. Это можно рассматривать как проявление их неофобии. В следующем эксперименте, после теста на экстраполяцию (рис.8), число посещений отсека с предметом и длительность пребывания в нем у мышей КоЭКС также были ниже, чем у ЭКС, т.е. неофобия мышей КоЭКС обнаружилась и после эксперимента на способность к экстраполяции. По данным трехфакторного ANOVA влияние фактора «опыт» (отсутствие или наличие опыта теста на экстраполяцию) оказалось достоверным для показателей времени пребывания в отсеке с предметом как при 1-ом (новая обстановка в целом), так и при 2-ом тестировании (новый предмет), а также для числа заходов в отсек с предметом в 1-ом тестировании. Таким образом, при распознавании нового предмета в ЗКЛ мыши ЭКС были менее осторожны, чем КоЭКС, по отношению к новому предмету и проявляли более высокую исследовательскую активность. Мышам КоЭКС, также как и в тесте на гипонеофагию, была свойственна неофобия.

Реакцию на новый предмет в большой камере оценивали у самцов мышей линии ЭКС и КоЭКС в F16 и F18. Данный тест позволил оценить реакцию животных на вновь появившийся элемент обстановки в камере иной конфигурации, чем ЗКЛ.

F16 (ЭКС $n=18$; КоЭКС $n=19$). По данным однофакторного ANOVA число заходов в отсек с новым предметом оказалось под достоверным влиянием фактора «генотип», также как и число контактов мыши с ранее знакомым предметом. *Post hoc LSD* анализ показал (рис.9 А), что в F16 мыши ЭКС достоверно чаще, чем КоЭКС, заходили в отсек с новым предметом. У мышей ЭКС было достоверно больше контактов с новым предметом (рис.9 Б) по сравнению с уже знакомым (они чаще дотрагивались до него лапами или носом). Соответственно, мыши КоЭКС реже, чем ЭКС, заходили в отсек с новым предметом, и они достоверно чаще контактировали с уже знакомым предметом, чем с новым, то есть проявляли признаки неофобии.

F18. (ЭКС n=24; КоЭКС n=24). В этом поколении достоверных различий между ЭКС и КоЭКС в числе посещений отсека с новым предметом выявлено не было, однако число контактов с новым предметом у КоЭКС было достоверно больше, чем со знакомым (критерий Вилкоксона). Таким образом, как и при тестировании в ЗКЛ, показатели второго теста на новизну позволяют сделать заключение, что в F16 мыши КоЭКС были более осторожны в контакте с новым предметом и демонстрировали признаки неофобии (по сравнению с ЭКС). Следует отметить, что в тесте на поиск входа в укрытие и при контактах с новым предметом в большой камере, поведение мышей ЭКС F18 несколько отличалось от такового предыдущих поколений. Это обстоятельство, по всей видимости, отражает сложность экспрессии поведения у мышей и его зависимость от факторов, которые трудно контролировать. Отметим также (забегая вперед), что влияние обогащенных условий среды на поведение мышей F18, отличалось от такового в F16.

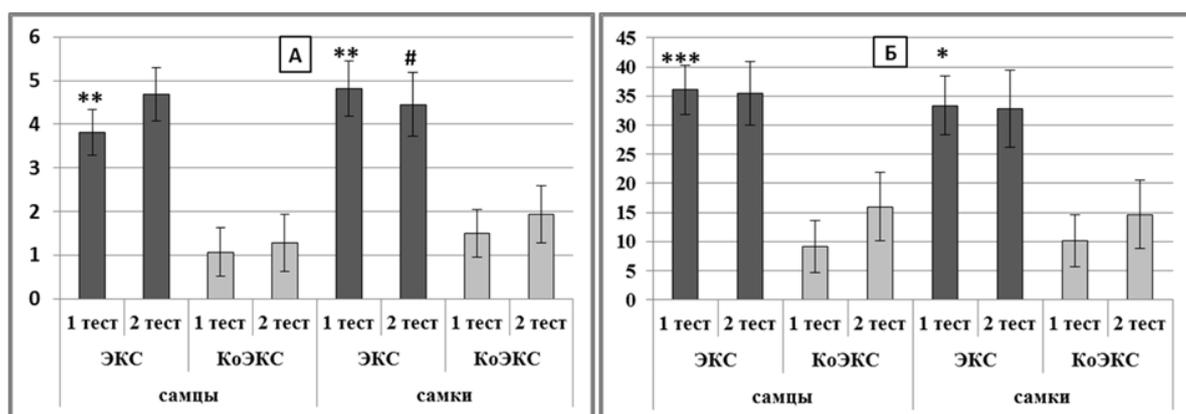


Рис. 7. Тест ЗКЛ с предметом до теста на экстраполяцию у мышей ЭКС и КоЭКС (F15). А - число (средние значения \pm ош. средн.) посещений отсека с предметом (ось ординат). Б - длительность (ось ординат, с) пребывания мыши в отсеке с предметом у этих мышей. *, **, *** - дост. отличие от мышей этого же пола, но другого генотипа при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, соответственно при первом тестировании. # - дост. отличие от мышей этого же пола, но другого генотипа во втором тестировании при $p \leq 0,01$. Значения вероятности по данным ANOVA и *post hoc* LSD анализу (по Фишеру).

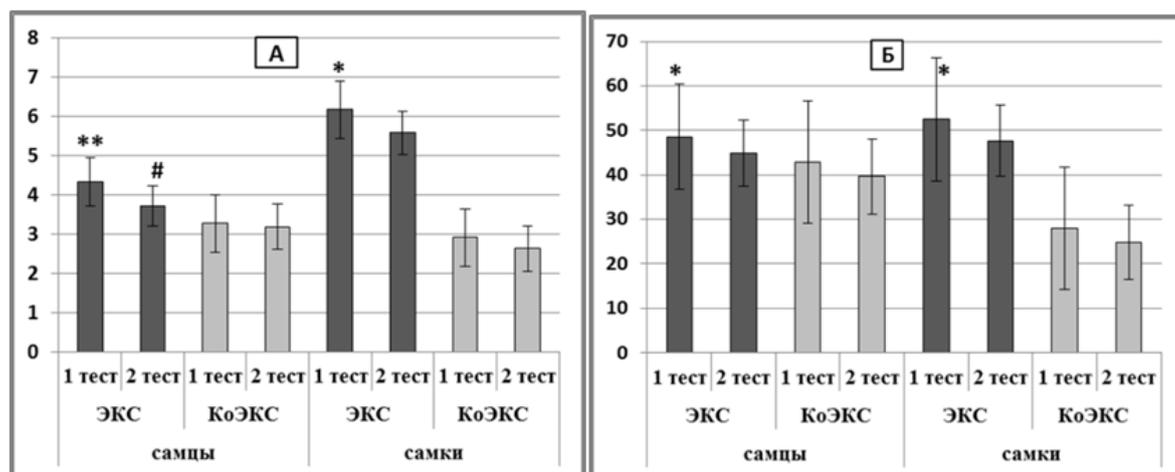


Рис. 8. Тест ЗКЛ с предметом после теста на экстраполяцию. А - число (средние значения \pm ош. средн.) посещений отсека с предметом (ось ординат) у мышей ЭКС и КоЭКС (F15). Б - длительность пребывания в отсеке с предметом у этих мышей. Обозначения, как на рис. 7.

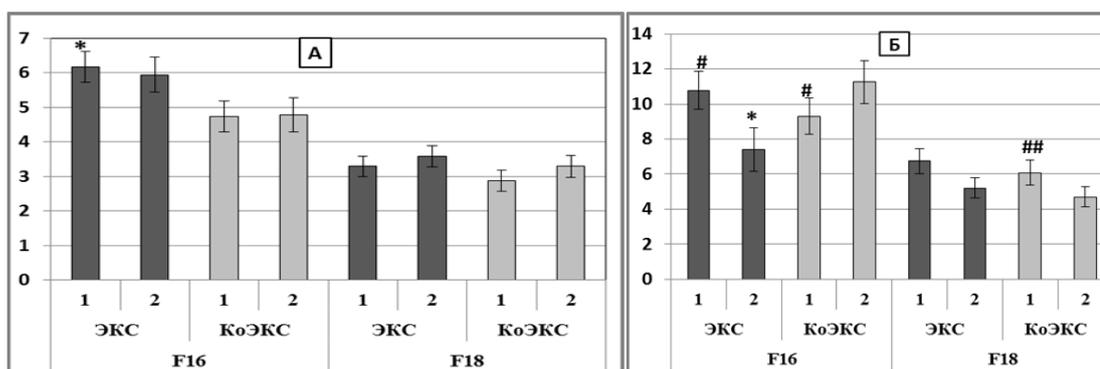


Рис. 9. Реакции мышей ЭКС и КоЭКС двух поколений на новый и знакомый предметы в камере с тремя отсеками. А - число посещений (ось ординат) отсеков с новым или знакомым предметом. 1- реакция на новый предмет, 2- реакция на знакомый предмет. Б - число контактов (ось ординат) с новым и знакомым предметами у этих животных. * - дост. отличается от данного показателя у КоЭКС при $p \leq 0,05$, *post hoc* LSD анализ по Фишеру. #, ## - дост. отличается от показателя для знакомого предмета у мышей этой же линии в данном поколении при $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ соответственно (критерий Вилкоксона).

Наблюдаемая сниженная тревожность-осторожность по отношению к новому у мышей линии ЭКС и выраженная неофобия у мышей КоЭКС неожиданно обнаружили в опытах на «агрессию хищника» с предъявлением им живой «добычи» - сверчка. В F18 (ЭКС n=17 самцов, 18 самок; КоЭКС n=22 самца, 23 самки) при оценке выраженности хищнического поведения, которое было тестировано у этих мышей впервые, был отмечен ряд достоверных межлинейных различий в реакции на новый объект (живого сверчка). Мыши линии ЭКС активнее, чем КоЭКС контактировали с «добычей» и меньше ее боялись, а также более активно ее преследовали. Мыши КоЭКС отчетливо избегали «добычу» и приближались к сверчку достоверно реже, чем ЭКС. Самки КоЭКС после поимки «добычи», поедали ее дольше, что можно также трактовать как проявление боязни новой пищи. На выраженность агрессии хищника практически не влиял уровень пищевой мотивации (данные представлены в диссертации).

Таким образом, повышенная исследовательская активность и сниженная осторожность (т.е. изменение тревожности) мышей ЭКС по сравнению с мышами КоЭКС в ряду поколений и в разных тестах может быть одним из свидетельств изменения поведения мышей ЭКС в ходе селекции. Иными словами, помимо более успешного решения теста на поиск входа в укрытие у мышей ЭКС в ходе селекции проявилась также выраженная неофилия.

Исследование уровня тревожности у мышей ЭКС и КоЭКС.

Известно, что важная роль в реализации поведения животного и успешности выполнения когнитивных тестов принадлежит проявлениям тревожности. В начальных поколениях нашего селекционного эксперимента уровень тревожности мышей ЭКС в тесте ПКЛ по сравнению с контрольной популяцией был достоверно ниже, однако в последующих поколениях эти различия стали менее отчетливыми.

Для оценки уровня тревожности мышей линии ЭКС и КоЭКС в данной работе использовали несколько тестов: ТСК (F16), ПКЛ (F16, F17). В тесте ТСК мышь попадает на ярко освещенную площадку, с которой стремится уйти. В F16 (ЭКС n=23 самцов, 13 самок; КоЭКС n=18 самцов, 14 самок) суммарное время «на свету» у мышей КоЭКС было выше, чем у ЭКС (за счет более высоких величин этого признака у самцов этой группы). Этот результат можно достаточно «прямолинейно» трактовать как более низкий уровень тревожности у мышей КоЭКС. Однако у мышей другой выборки того же, 16-го, поколения в тесте ПКЛ (ЭКС n=16 самцов, 15 самок; КоЭКС n=14 самцов, 14 самок) (табл. 2) наблюдалась обратная картина. Мыши ЭКС быстрее решались обследовать

лабиринт, не боялись выходить в его открытые рукава, чаще переходили из одного темного рукава в другой и совершали больше «свешиваний», что, в целом, указывает на сниженный уровень тревожности мышей ЭКС по сравнению с мышами КоЭКС. В F17 в тесте ПКЛ (ЭКС n=26 самцов, 31 самка; КоЭКС n=29 самцов, 29 самок) (табл. 3) у мышей КоЭКС обнаружился сниженный (по сравнению с ЭКС) уровень тревожности (в соответствии с традиционной интерпретацией данных теста ПКЛ). В то же время мыши линии ЭКС быстрее решались обследовать этот лабиринт, проводили за обследованием больше времени и совершали большее количество исследовательских стоек. Иными словами, оказалось, что более четко выраженное исследовательское поведение мышей ЭКС, по сравнению с КоЭКС, продолжало обнаруживаться.

Табл.2

Поведение мышей F16 (ЭКС и КоЭКС) в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

Показатели теста ПКЛ (средн.±ош.ср.)	генотип	Самцы	Самки	p (одноф. ANOVA)
Время в центре (с)	ЭКС	1±0,6	2,93±0,62 *	0,01
	КоЭКС	3,9±0,64 **	3,21±0,64	
Вр. в св. рукавах (с)	ЭКС	0,31±0,45	0,93±0,48	0,2
	КоЭКС	0 ±0,5	0 ±0,5	
Т-Т переходы	ЭКС	2,63±0,4	1,3±0,41 *	0,2
	КоЭКС	1,93 ± 0,42	0,93 ±0,42	
Стойки	ЭКС	4,31±0,7	6±0,72	0,8
	КоЭКС	3,43±0,75	6,5±0,75 #	
Свешивания	ЭКС	0,56±0,16	0,47±0,17	0,01
	КоЭКС	0 ±0,17 *	0,14±0,17	
Груминг	ЭКС	0,94± 0,3	1,53± 0,32	0,97
	КоЭКС	0,86±0,33	1,57±0,33	

Примечание. Данные однофакторного ANOVA с *post hoc* LSD анализом (по Фишеру). *, **,- дост. отличается от данного показателя у самцов мышей линии ЭКС при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$. #- дост. отличается от данного показателя у самцов мышей КоЭКС при $p \leq 0,01$ (*post hoc* LSD).

Табл.3

Поведение мышей F17 (ЭКС и КоЭКС) в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

Показатели теста ПКЛ (средн.±ош.ср.)	генотип	Самцы	Самки	p (одноф. ANOVA)
Время в центре (с)	ЭКС	1,23±1,09	4±0,99	0,02
	КоЭКС	4,97±1,03	2,72±1,03	
Вр.в св. рукавах (с)	ЭКС	0,0±0,27	0,29±0,25	0,2
	КоЭКС	0,1±0,26	0,93±0,26	
Число Т-Т переходов	ЭКС	0,76±0,24	0,51±0,022 *	0,008
	КоЭКС	0,24±0,22	1,2±0,22	
Стойки	ЭКС	5,73±0,74 *	5,87±0,68	0,03
	КоЭКС	2,48±0,7	5,8±0,7	
Свешивания	ЭКС	0,27±0,37	0,54±0,33 **	0,05
	КоЭКС	0,31±0,35	2±0,35	
Груминг	ЭКС	2,07±0,27	1,55±0,25 ***	0,003
	КоЭКС	1,79±0,26	2,86±0,26 #	

Примечание. Данные однофакторного ANOVA с *post hoc* LSD анализом (по Фишеру). *, **,***- дост. отличается от данного показателя у мышей того же пола, но другого генотипа при $p \leq 0,05$, $p < 0,01$, $p \leq 0,001$. #- дост. отличается от данного показателя у самцов мышей КоЭКС при $p \leq 0,01$ (*post hoc* LSD).

Важно отметить, что в тестах на «*межсамцовую агрессию*» (тест со стандартным оппонентом, т.е. с низко агрессивным самцом того же веса и возраста) ранее, в F5 (ЭКС n=8, КоЭКС n=8), достоверно более агрессивными были мыши ЭКС (у которых в этом поколении был невысокий уровень тревожности в ПКЛ), тогда как в более поздних поколениях (F10, F12), а также и в F15 (ЭКС, n=18, КоЭКС, n=18) более высокая межсамцовая агрессия была характерна для мышей КоЭКС (у которых в этих поколениях уровень тревожности в ПКЛ, в целом, был ниже, чем у ЭКС).

В ходе выполнения данного теста и в F15, и в F18 (ЭКС n=6, КоЭКС n=7) в течение всех трех дней тестирования мыши КоЭКС были более агрессивными – у них была короче латентность первой атаки, а число атак было достоверно больше, чем у ЭКС (данные представлены в диссертации).

Таблицы 2 и 3 показывают, что у мышей ЭКС и КоЭКС показатели поведения не обнаруживают «содружественных» различий между самцами и самками, а также между последовательными поколениями (F16-17). Эти данные свидетельствуют о том, что уровень тревожности мышей ЭКС и КоЭКС нестабилен, и, видимо, подвержен изменениям под действием факторов, которые в экспериментах не удавалось контролировать. Определенную часть таких расхождений можно предположительно объяснить генетической гетерогенностью мышей обеих групп.

«Несовпадения» знаков межлинейных различий, выявленные в показателях поведения в разных тестах - в ПКЛ, ТСК, тестах на новизну и др., требуют анализа. Эти данные заставляют высказать предположение, что многие из «популярных» у нейробиологов тестов, адресованных оценке тревожности, могут на самом деле характеризовать несколько различающиеся по своему биологическому смыслу, а может быть и по механизмам, виды тревожности. Подобные выводы делают и другие авторы (Ennaceur, 2014, File, 2001 и др.). Возможно, что уровень тревожности, который обнаруживается у мышей в тесте ПКЛ, может быть более лабильным по своему выражению, и он может отличаться, например, от более устойчивых проявлений тревожности в тесте на экстраполяцию («отказы» от решения теста и «нулевые» решения). Тревожность, тестируемая в ПКЛ, по нашему предположению, отличается от тревожности-осторожности, проявляющейся в контактах с новой средой и ее элементами. Такие проявления тревожности могут быть выражены по-разному в зависимости от генотипа животных. Наши данные, на основании которых высказывается это предположение, находятся в соответствии с фактами, описанными в литературе, но нуждаются в подтверждении, т.е. в специальных экспериментах. Важно, однако, отметить, что судить об уровне тревожности животных следует не по данным одиночных тестов, а по результатам использования батареи тестов.

Влияние «обогащенной» среды на мышей ЭКС и КоЭКС.

Эксперименты по влиянию обогащенных условий среды, проводят, как правило, на самках, поскольку при помещении в такие условия мышей-самцов происходит быстрое установление межсамцовой иерархии, а неизбежные при этом проявления агрессивности оказываются дополнительным фактором, влияющим на результаты экспериментов. Было проведено два эксперимента по влиянию «обогащения» среды на поведение и нейрогенез. В 1-м из них мыши-самки F16 ЭКС и КоЭКС содержались в условиях «обогащенной» или стандартной среды в течение 3 мес., а во 2-м эксперименте (F18) - в течение 2 мес. В табл.4 представлены данные, указывающие на сходства и различия в эффектах 2 мес. и 3 мес. экспозиции животных действию обогащенных условий.

Эффекты, сходные по «знаку» в двух экспериментах по «обогащению» среды.

По данным теста ПКЛ у мышей ЭКС и КоЭКС после пребывания в обогащенных условиях был выше уровень двигательной активности и уровень тревожности (по времени пребывания в светлых частях ПКЛ). Тест на неофагофобию показал более сильно выраженную боязнь новой пищи в новой обстановке у мышей ЭКС и КоЭКС после

пребывания в обогащенных условиях. Пребывание мышей ЭКС и КоЭКС в обогащенных условиях сопровождалось более высокими показателями решения когнитивных тестов (тесты на поиск входа в укрытие и на экстраполяцию). У групп мышей ЭКС и КоЭКС из «обогащенных» условий были выше показатели относительного веса мозга.

Эффекты, различающиеся по «знаку» в двух экспериментах по «обогащению» среды.

В 1-м эксперименте уровень нейрогенеза взрослого мозга (по данным иммуногистохимического окрашивания на маркер деления клеток Ki-67, число клеток) в пролиферативной зоне зубчатой извилины гиппокампа был достоверно выше у мышей ЭКС, по сравнению с КоЭКС, и выше в группе ЭКС «обогащенные» по сравнению с ЭКС «стандартные». Во 2-м эксперименте этот эффект обнаружен не был (рис.10). Следует отметить, что существуют экспериментальные свидетельства того, что изменения в поведении, которые индуцируются пребыванием животных в обогащенных условиях среды, могут не зависеть от собственно нейрогенеза взрослого мозга (Silva et al., 2011, Lipp, 2016).

Отсутствие изменений в уровне нейрогенеза после 2 мес. пребывания в обогащенных условиях среды может быть связано с иным, чем в 1-м опыте (зима), календарным временем проведения эксперимента (весна). Одним из объяснений данного феномена может быть уровень мелатонина в организме. Уровень мелатонина (участвующего в регуляции циркадных ритмов многих нейрофизиологических процессов и пролиферации нейральных стволовых клеток), по литературным данным, у мышевидных грызунов (полевок) бывает выше в зимнее время, а к началу репродуктивного периода – снижается (Кравченко и др. 2016). Возможно, что наряду с более коротким периодом «обогащения» во 2-м эксперименте, «весенний» уровень мелатонина мог также стать причиной отсутствия влияния «обогащения» на нейрогенез.

Важно отметить усиление тревожности мышей ЭКС и КоЭКС (тест ПКЛ) из обогащенных условий, выявленное в обоих экспериментах. Данные литературы также свидетельствуют о возможности обнаружения модулирующего тревожность эффекта «обогащения» среды (van de Weerd et al., 1994, Baldini et al., 2013, Friske, Gammie, 2005 и др.).

Табл. 4.

Сравнение данных 1-ого и 2-ого экспериментов по обогащению условий среды.

Номер эксп.	Генотип	«Вход в укрытие»	Экстра-поляция	Тест ПКЛ		Боязнь новой пищи	Нейрогенез	Относ. вес мозга
				Двиг. акт.	Тревож.			
1	ЭКС	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	КоЭКС	↑	↑	↑	↑	↑	↑слабое	↑
2	ЭКС	↑	↑	↑	↑	↑	Нет эффекта	↑
	КоЭКС	↑	↑	↑	↑	↑	Нет эффекта	↑

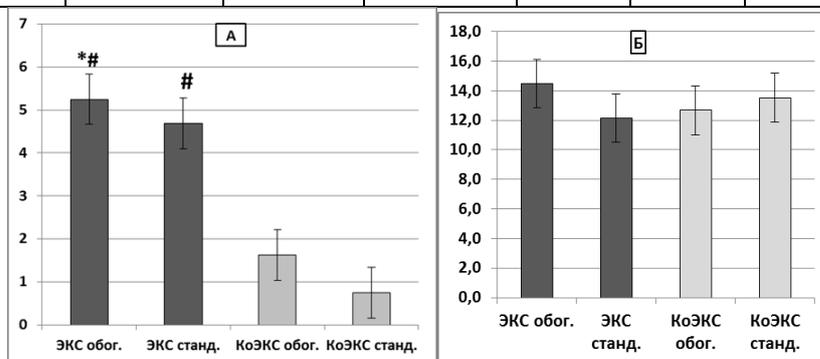


Рис.10. Число клеток у мышей ЭКС и КоЭКС двух групп, обнаруживших иммуногистохимическую окраску на Ki-67 после 3 мес. (А) и 2 мес. (Б) пребывания в обогащенных условиях. * - дост. ($p \leq 0,05$) отличается от группы из станд. условий, # - дост. ($p \leq 0,05$) отличается от показателей КоЭКС такой же группы. Статистическая значимость - по однофакторному ANOVA с *post hoc* LSD анализом по Фишеру.

Определенные закономерности поведения (в том числе и межлинейные и межпопуляционные различия), которые характерны для мышей одной пары генотипов, не всегда обнаруживаются у животных других генотипов в аналогичных тестах. Ввиду этого в данной работе было также проведено исследование мышей других «пар» генотипов (мышей БМ и ММ и мышей-нокауты по гену β -аррестина 2 и мышей «дикого типа»).

Поведение мышей линии БМ и ММ.

Мыши БМ и ММ были сформированы путем селекции на большой малый относительный вес мозга (Перепелкина и др., 2013). В очередном селекционном эксперименте, после получения 23-го поколения селекции процесс собственно отбора на разный вес мозга был прекращен, и далее эти линии разводились путем свободного внутрелинейного скрещивания. После прекращения отбора на вес мозга, у БМ и ММ сохранились достоверные различия в относительном весе мозга, как сохранились и некоторые межлинейные различия в поведении (Perepelkina et al., 2013). Ранее мыши линии БМ достоверно превосходили мышей ММ по способности к обучению, способности решать тест на экстраполяцию и поиск входа в укрытие, у них был выше и уровень исследовательской активности в ПКЛ (Перепелкина и др., 2006, 2013). В тесте «неизбегаемой скользкой воронки» мыши БМ были склонны выбирать активную стратегию поведения, тогда как мыши линии ММ характеризовались более высоким уровнем тревожности и реагировали выбором пассивной стратегии. Различия в поведении между мышами БМ и ММ в ряде тестов были показаны и в наших экспериментах с мышами F33 и F36 (т.е. более чем через 10 поколений после прекращения селекции по признаку «относительный вес мозга»).

Решение мышами БМ и ММ когнитивного теста на экстраполяцию. Его оценивали при многократном (30 предъявлений) теста на экстраполяцию. По результатам многократного предъявления теста на экстраполяцию у самцов и самок мышей БМ (n=24) и ММ (n=26) (F36) суммарных достоверных межлинейных различий между линиями не было, однако при этом выявились половые различия в выполнении этого теста, с более высокими показателями решения у самок ММ. В литературе описано более успешное выполнение самцами мышей тестов на пространственную память, тогда как самки лучше решают задачи, связанные с эмоциональным контекстом. Возможно, что самки ММ успешнее справились с данным тестом именно благодаря «позитивному» эмоциональному контексту (более высокой пищевой мотивации).

Тест на гипонеофагию (F33). Несмотря на большой объем экспериментов, проведенных на мышах этих линий, исследований их реакции на новизну (новую пищу или новый предмет) ранее не проводили. В тесте на неофагию (проведенном на самцах и самках обеих линий мышей БМ n=27 и ММ n=28) мыши БМ (особенно самцы) быстрее подходили к кормушке, то есть меньше боялись новой обстановки, чем мыши ММ. Количество съеденной пищи у БМ и ММ достоверно не различалось, а число подходов к кормушке было достоверно выше у мышей БМ (рис.11 А). Наряду с этим, мыши линии БМ дольше ели новый для них сыр, причем достоверными были различия между самками БМ и ММ (рис.11 Б). Таким образом, неофагофобия (боязнь новой пищи) была выше у мышей линии ММ, тогда как мыши БМ проявляли большую исследовательскую активность и меньшую боязнь новой пищи. Это, в целом, совпадает с общим характером межлинейных различий, которые были выявлены у этих мышей в период активной селекции на вес мозга.

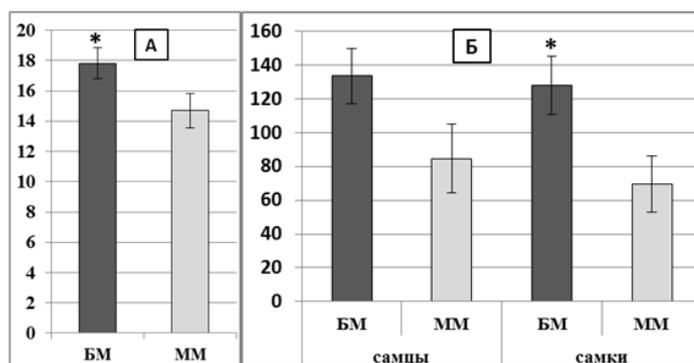


Рис.11. Тест на неофагию у мышей БМ и ММ (F33). А – число подходов к новой пище (ср. значения ± ош. средн.). * - дост. отличается от ММ при $p \leq 0,05$. Б - время поедания сыра (с, средние значения ± ош. средн.). * - дост. отличается от самок ММ при $p \leq 0,05$. Статистическая значимость представлена по данным ANOVA и post hoc LSD анализу (по Фишеру).

В другом тесте с **оценкой числа контактов с новым предметом в большой камере (F36)** у самцов и самок обеих линий (БМ $n=27$; ММ $n=28$) наблюдалась неофобия - они больше времени контактировали со знакомым предметом по сравнению с новым. Возможно, что повышение тревожности-осторожности у мышей линии БМ в этом тесте, связано с «нейтральностью» этого теста, т.е. с отсутствием дополнительной мотивации к обследованию (тогда как в тесте на гипонеофагию животное испытывает повышенную пищевую мотивацию, которая дополнительно побуждает его обследовать место расположения кормушки).

Уровень тревожности в тесте ПКЛ. Его проводили у мышей обоего пола БМ и ММ F36 (БМ $n=27$; ММ $n=28$). Было показано (данные приведены в диссертации), что мыши линии БМ проводили достоверно меньше времени в центре лабиринта по сравнению с мышами ММ. Это может отражать их более высокую готовность выходить (и обследовать) открытые части ПКЛ, что (имея в виду и большее число стоек у этой линии) можно интерпретировать как их меньшую тревожность и более выраженную исследовательскую активность. Для уточнения характера различий в проявлении тревожности в зависимости от генотипа у мышей линий БМ и ММ было проведено исследование эффектов введения метилглиоксала (МГ). МГ - это достаточно токсичное соединение межклеточного пространства, является промежуточным продуктом гликолиза и рассматривается как потенциальное анксиолитическое средство. На мышах инбредных линий показано снижение тревожности при введении этого соединения (Distler et al., 2012, Hamsch et al., 2010).

Влияние метилглиоксала на поведение мышей БМ и ММ (БМ, метилглиоксаль $n=32$, контроль $n=27$; ММ метилглиоксаль $n=24$, контроль $n=23$) (данные приведены в диссертации). Введение МГ (в.бр., в дозе 100 мг/кг за 20 мин до тестов) вызвало у мышей линии ММ повышение тревожности в тесте ЗКЛ (увеличение ЛП выхода из центра) и ослабление исследовательского поведения (усиление стереотипии, снижение числа «патрулирований» лабиринта), тогда как у БМ эти показатели практически не изменились. В тесте неизбежной скользкой воронки у мышей ММ на фоне МГ было выше, чем в контроле, время иммобилизации, являющегося показателем склонности к развитию депрессивно-подобного поведения (Маркина и др. 1999). У мышей БМ введение МГ вызвало укорочение времени активного поведения и усиление «пассивной» стратегии избегания стрессующей обстановки данного теста. У мышей обеих линий введение МГ замедлило ЛП решения теста на экстаполяцию по сравнению с введением физ. р-ра, но особенно заметным этот эффект был у мышей ММ. В тесте на поиск входа в укрытие введение МГ способствовало увеличению времени решения наиболее трудного этапа - пробы с «пробкой». Таким образом, наши эксперименты показали четкий анксиогенный генотип-зависимый эффект МГ (с более сильным эффектом на мышей ММ). Можно

предположить, что причиной этого эффекта может быть большая склонность (интактных) мышей ММ к проявлению тревожности (обнаруживавшаяся ранее). Выявленный анксиогенный эффект МГ, полученный на генетически гетерогенных мышах БМ и ММ, свидетельствует о важности тестирования фармакологических агентов на животных разных генотипов.

Поведение мышей с нокаутом по гену β -аррестина 2.

Были проведены эксперименты на еще одной «паре» генотипов – мышах-нокаутах и контрольных мышах «дикого типа». У мышей с нокаутом гена β -аррестина 2 был обнаружен повышенный уровень тревожности в тесте ПКЛ, а также более сильно выраженная тревожность-осторожность при контакте с новым предметом. Возможно, что выявленные различия могут быть связаны с аномалиями дофаминергической системы (Hranilovic et al., 2008) при нокауте этого гена. β -аррестин 2 (мембранный белок, регулирующий функцию большой группы GPCR рецепторов) регулирует и функцию дофаминергических нейронов (Gainetdinov et al., 2003). Поскольку это система нейронов, в частности, в прилежащем ядре, участвует в реализации реакции животного на новизну (Fink, Smith, 1979), особенности выполнения этой реакции мышами-нокаутами по данному гену, четко показывает перспективность использования животных разных генотипов в оценке экспрессии когнитивных признаков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопоставление способности к решению когнитивных тестов с общей характеристикой поведения (какой являются проявления тревожности), выполненное на мышах селекционированных линий, позволило выявить ряд новых фактов. Полученные в работе данные свидетельствуют, что селекция на такой сложный признак, каким является способность правильно решить тест на экстраполяцию направления движения стимула, исчезнувшего из поля зрения животного, не повысилась в ходе многих поколений селекции. Попытка селекции крыс на этот признак (Полетаева, Романова, 2013) была неудачной (несмотря на 3 повтора такого эксперимента) – сформировались популяции крыс с экстремальной тревожностью в ситуации теста. В связи с этим при начале селекции мышей на этот признак (формирование линии ЭКС) был использован еще и второй критерий отбора – в размножение брали мышей, у которых (помимо высоких значений когнитивного признака) не было проявлений страха-тревоги в обстановке опыта. Хотя по ходу селекции не было получено устойчивых изменений доли положительных решений теста на экстраполяцию у мышей линии ЭКС, мыши этой селекционированной линии обнаружили четкое превосходство в решении теста на поиск входа в укрытие. Как тест на экстраполяцию (где корм скрывается из поля зрения животного), так и тест на поиск входа в укрытие (где вход в комфортное отделение установки маскируется и животному не виден) имеют общий элемент логической структуры. Как упоминалось выше, животное должно быть способно оперировать понятием «неисчезаемость», т.е. должно понимать, что предмет, наличие которого оно только что воспринимало, продолжает существовать, даже если он более невидим, и что его можно искать. Эту способность впервые описал французский психолог Ж. Пиаже, и она известна, как понимание свойства «неисчезаемости» (object permanence). Таким образом, можно полагать, что отсутствие видимых изменений в исходном для данного селекционного эксперимента когнитивном признаке (способность к экстраполяции) сопровождалось, тем не менее, изменениями в способности к решению задачи на «неисчезаемость». Это можно интерпретировать как ответ на селекцию.

Возможно, что изменения в решении теста на неисчезаемость, как ответ на отбор, свидетельствуют о более простой «генетической архитектуре» признака «поиск входа в укрытие» (по сравнению с признаком «способность к экстраполяции»), однако прямые доказательства этого вывода еще следует получить. Отметим, что два теста, основанные

на решении животным элементарной логической задачи, базируются как на пищевой (экстраполяция), так и на оборонительной (тест на поиск входа в укрытие) мотивациях. Это может служить подтверждением существования общих механизмов (на сегодня гипотетических), определяющих когнитивные способности, т.е. способностей к выполнению задач, для решения которых у животного нет готового решения (по А.Р. Лурия).

При анализе результатов данной работы следует также упомянуть о понятии «исполнительные функции» (executive function). Исполнительные функции – это группа когнитивных процессов, которые включают в себя внимание, тормозный контроль, рабочую память, когнитивную пластичность, а также решение задач и планирование. Использование этого понятия может помочь в выявлении общих схем в организации сложных форм поведения. Можно сказать, что в реализации когнитивных способностей животных выявляются как генотипические особенности, так и влияние внешних условий («обогащение» среды). Как показала настоящая работа, «исполнительные функции» – реализация поведения, требующего проявления способности к решению логических задач, внимания, способности к ориентации и др., обнаруживают генетический компонент и могут быть предметом нейрофизиологического анализа на лабораторных моделях.

Изменения тревожности, которые сопровождали селекцию мышей на способность к решению теста на экстраполяцию, можно интерпретировать как подтверждение (сейчас уже достаточно обоснованного) мнения о неоднородности поведения тревоги в адаптивном поведении грызунов. На основе данных, полученных в настоящей работе, можно говорить о проявлениях общей, видоспецифической реакции тревоги, как боязни открытого освещенного пространства (тесты ПКЛ, ТСК и др.), которая свойственна мышам использованных нами генотипов. А также о проявлении тревожности-осторожности, которую животное преодолевает в ситуации тестов на новизну (и по которым были выявлены различия, свидетельствующие о связи реакции на новизну с выполнением когнитивных тестов). Эта категория «тревожных» реакций была изменена у мышей селектированной линии ЭКС, в сравнении с контрольной, неселектированной популяцией КоЭКС, и этот результат (более низкая тревожность-осторожность у ЭКС) можно рассматривать как ответ на отбор по второму признаку (отсутствие тревожной реакции на обстановку опыта). Такой ответ на селекцию (склонность к исследованию новой среды, которая не несет непосредственной угрозы животному) есть результат отбора особей, которые не боялись новой для них обстановки теста на экстраполяцию. Нельзя исключить также и существования ассоциации между способностью к решению элементарных логических задач (экстраполяция, поиск входа в укрытие) и усиленной реакцией на новизну. Такая связь, установленная в проведенных нами экспериментах, подтверждает правильность отнесения реакции на новое у мышей к категории когнитивных признаков.

Тестирование мышей других генотипов (линии БМ и ММ, нокауты по гену β -аррестина 2) подтвердило основные выводы, которые были сделаны на основе экспериментов с мышами ЭКС и КоЭКС.

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнение выполнения когнитивных тестов, а также тестов на новизну у мышей ряда генотипов – линия ЭКС и популяция КоЭКС (селекция на высокие показатели когнитивного теста и контроль к ней), линии БМ и ММ (селекция на большой и малый относительный вес мозга), мыши с нокаутом по гену, кодирующему белок β -аррестин 2.
2. У мышей исследованных в работе поколений линии ЭКС (F15-F18) не обнаружилось усиления экспрессии когнитивного признака, на который шел отбор (правильного решения теста на экстраполяцию), но наблюдалось устойчиво более

- успешное, чем у контроля, решение другого когнитивного теста – поиск входа в укрытие.
- У мышей линии ЭКС наблюдалось четко выраженное исследовательское поведение и сниженная тревожность-осторожность по отношению к новым объектам, тогда как для мышей контрольной популяции КоЭКС характерна боязнь новизны (неофобия).
 - Пребывание мышей линии ЭКС в обогащенных условиях вызвало у них достоверное повышение уровня тревожности и неофагофобии по сравнению с контролем, а также увеличение числа новых клеток (маркер Ki 67) в пролиферативной зоне зубчатой извилины гиппокампа, более четко выраженное, чем у контрольной популяции КоЭКС.
 - У мышей ЭКС наблюдалась более низкая межсамцовая агрессивность, но более интенсивная агрессия хищника (в тестах со сверчком).
 - У мышей линий БМ и ММ сохранились достоверные различия в относительном весе мозга (после прекращения отбора) и продолжают обнаруживаться межлинейные различия в поведении – более высокая тревожность и склонность к депрессии у ММ, в том числе после введения метилглиоксала.
 - Мыши-нокауты по гену, кодирующему белок β -аррестин 2, не отличались от контроля в тесте на экстраполяцию, но обнаруживали неофобию при контакте с новым предметом, чего не обнаруживалось у мышей «дикого типа».
 - Несовпадения показателей поведения в разных тестах, обнаруженные у мышей разных генотипов, заставляют предположить существование у грызунов двух видов тревожности: тревожности-страха и тревожности-осторожности (обнаруживается в тестах на новизну). Сниженный уровень тревожности-осторожности, по-видимому, стал результатом отбора мышей линии ЭКС на когнитивный признак (вместе с отсутствием боязни обстановки опыта), и он по всей видимости, связан с проявлением способности к экстраполяции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности нейробиология 03.03.06:

- Перепелкина О.В., **Тарасова А.Ю.**, Сурина Н.М., Лильп И.Г., Голибродо В.А., Полетаева И.И. Межсамцовая агрессия у мышей, селектированных на когнитивный признак // 2017. Докл. Акад. наук, изд-во Наука (М.), том 475, № 4, с. 465-468
- Тарасова А.Ю.**, Перепелкина О.В., Лильп И.Г., Ревущин А.В., Павлова Г.В., Полетаева И.И. Влияние пребывания в «обогащенной среде» на поведение и уровень нейрогенеза у мышей, селектированных по когнитивному признаку // 2017. Бюлл. эксп. биол. мед., изд-во Рос. акад. мед. наук (М.), том 164, № 11, с. 532-535.
- Перепелкина О.В., **Тарасова А.Ю.**, Голибродо В.А., Лильп И.Г., Полетаева И.И. Поведение мышей, селектированных на высокие значения когнитивного признака // 2018. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова, изд-во Наука (М.), том 68, № 4, с. 434-447.

Другие издания

- Perpelkina O.V., **Tarasova A. Yu**, Surina N.M., Lilp I.G., Golibrodo V. A., Poletaeva I. I. Intermale aggression in laboratory mice, selected for the cognitive trait // 2018. Int. J. Genetic Science. V 5(1), p. 1-8.
- Перепелкина О.В., Полетаева И.И., **Тарасова А.Ю.** Моделирование заболеваний мозга человека в экспериментах на грызунах (краткий обзор) // 2016. Совр. зарубежная психология, том 5, № 4, с. 13-23.

3. Perepelkina O. V., Lilp I.G., **Tarasova A.Yu**, Golibrodo V.A., Poletaeva I.I. Changes in Cognitive Abilities of Laboratory Mice as a Result of Artificial Selection // 2015. Russ. J. Cogn. Sci., V. 2, p. 29-35.
4. Полетаева И.И., **Тарасова А.Ю.**, Лильп И.Г., Перепелкина О.В. Трудности разносторонней оценки когнитивных способностей грызунов//2016. В сб.: Процедуры и методы экспериментально-психологических исследований. Интеграция академической и университетской науки // Отв. ред. В.А. Барабанщиков, место изд. Ин-т психологии РАН, Москва, с. 403-40.

Тезисы конференций

1. **Тарасова А.Ю.** Идентификация нового объекта у мышей, селектированных по когнитивному признаку // в сб. XXI школа-конф. молодых ученых по физиол. высш. нерв. деят. Тезисы докладов. Место издания ИВНД и НФ РАН. Москва. 2017.
2. **Тарасова А.Ю.**, Полетаева И.И., Перепелкина О.В. Особенности поведения мышей, селектированных по когнитивному признаку // в сб. нелинейная динамика в когн. исслед., тезисы. Тезисы докладов. Место издания Нижегород. Университет. 2017. с. 210-211.
3. **Тарасова А.Ю.** Особенности поведения мышей, селектированных по когнитивному признаку, в тестах на тревожность // в сб. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2017", серия Секция "Биология". Тезисы докладов. Место издания Товарищество научных изданий КМК, Москва. 2017.
4. **Тарасова А.Ю.** Влияние обогащенных условий среды на вес мозга и нейрогенез мышей, селектированных по когнитивному признаку // в сб. тезисов XX школы–конф. молодых ученых по физиол. высшей нерв. деят. и нейрофизиол. Тезисы докладов. Место издания ИВНД и НФ РАН, Москва. 2016.
5. **Тарасова А.Ю.**, Перепелкина О.В., Лильп И.Г., Полетаева И.И. Различия в реакции на новизну у мышей, селектированных по когнитивному признаку, и у мышей-нокауты // В сб. VII межд. конф. по когн. Науке. Тезисы докладов. Место издания МАКИ, Калининград. 2016. с. 569-570.
6. **Тарасова А.Ю.**, Перепелкина О.В., Лильп И.Г., Полетаева И.И. Реакция на новизну (идентификация нового предмета) мышами разных генотипов // в сборнике Териофауна России и сопредельных территорий. Международное совещание (X съезд Териологического общества при РАН). Тезисы докладов. Место издания Товарищество научных изданий КМК Москва, тезисы. 2016. с. 417-417
7. **Тарасова А.Ю.**, Перепелкина О.В., Лильп И.Г., Полетаева И.И. Влияние метилглиоксаля на поведение мышей линий селектированных на большой и малый вес мозга // 2015 в сб. Материалы XIX Школы-конф. молодых учёных по физиол. высш. нерв. деят. и нейрофизиол. Тезисы докладов. Место издания ИВНД и НФ РАН Москва. 27 – 28 октября Москва. 2015. с. 57-57.
8. **Тарасова А.Ю.**, Перепелкина О.В., Огиенко Н.А., Лильп И.Г., Полетаева И.И. Межлинейные и половые различия в поведении (реакция на новизну, агрессия) у лабораторных мышей, проходящих селекцию на когнитивный признак. В сб. VIII межд. конф. по когн. науке. Тезисы докладов. Место издания МАКИ, Калининград. 2018. с. 962-964.