

ПЕРЕПЕЛКИНА Ольга Викторовна

**Поведение мышей, селектированных на большой  
и малый вес мозга**

03.00.13 - физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2009

Работа выполнена в лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор биологических наук  
Полетаева Инга Игоревна

Официальные оппоненты:  
профессор

доктор биологических наук,

Дубынин Вячеслав Альбертович

кандидат биологических наук  
Зарайская Ирина Юрьевна

Ведущее учреждение: Институт цитологии и генетики СО РАН.

Защита состоится «12» октября 2009 г. в 15 ч.30 мин. на заседании диссертационного совета Д 501.001.93 Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Воробьевы горы, Биологический факультет МГУ, ауд. М-1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «10» сентября 2009г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Умарова Б. А.

**Актуальность проблемы.** Исследование корреляций между размером мозга и особенностями поведения является одной из важных проблем современной неврологии и нейробиологии, оно способствует выявлению механизмов формирования ЦНС и ее функций, в частности, в аспекте относительной роли генотипа и среды в этих процессах. Изменение строения головного мозга позвоночных (и, в частности, млекопитающих) в процессе эволюции сопровождалось появлением достаточно глубоких различий в поведении животных. Уже давно продемонстрирован параллелизм между степенью цефализации и способностью животных к формированию разнообразных навыков, а также сложностью их естественного поведения (Семенов, 1922; Крушинский, 1986; Rensch, 1956; 1973, Jerison 1973 и др.). Сложность строения мозга определяет и общий уровень когнитивных способностей, которые обеспечивают соответствующие адаптивные возможности животных. Такая точка зрения подтверждается при сравнении мозга и поведения животных, относящихся к разным крупным таксонам (классы, отряды) (Jerison, 1979, Deacon, 1995, Rehkemper et al., 1995). Однако в таких случаях различия обнаруживаются не только в размерах мозга, но и в сложности его строения, что затрудняет интерпретацию подобных данных. В то же время у близкородственных групп столь четкие корреляции выявляются далеко не всегда (Frahm, Rehkämper, 2004, Pravosudov et al., 2006). Существует также и трудная проблема связи между размером мозга и уровнем развития интеллекта (IQ) у человека. Многие данные говорят об отсутствии такой корреляции (за исключением случаев микроцефалии), но сторонники противоположной точки зрения также представляют определенные наличия подобных корреляций, однако, последние не всегда убедительны (Rushton, 1996, 2009). Выявление роли мутаций некоторых генов в снижении веса мозга (и IQ) человека является важной задачей нейробиологии, а создание генетических моделей таких состояний – актуальной проблемой.

В пределах одного вида (в нашем случае - *Mus musculus*) можно обнаружить и индивидуальные вариации поведения, а специальные эксперименты позволили выявить достоверные корреляции между ними, (например, Wimer et al., 1971, Anderson, 1993). Лабораторные мыши - удобный объект для изучения генетической изменчивости размера мозга и корреляции ее с особенностями поведения. К настоящему времени проведено несколько селекционных экспериментов по выведению линий мышей с разным весом мозга, у которых выявлены некоторые различия в поведении (Wimer et al., 1969, Fuller, Herman, 1974, Попова, 1983, Попова, Полетаева, 1983), два из них составили предмет настоящей работы.

Средний вес мозга у мышей таких линий (линия Большой Мозг, (далее БМ) и линия Малый Мозг, (далее ММ)) приходится на противоположные участки нормального распределения признака в гетерогенной популяции мышей, а тестирование поведения таких животных может дать информацию о роли размера мозга в определении его особенностей (Попова, Полетаева, 1983, 1985; Попова и др., 1976, 1981).

**Целью диссертационной работы** было сопоставление межлинейных различий в весе мозга мышей БМ и ММ, полученных в двух селекционных экспериментах, с их поведением. Поскольку различия в весе мозга и в поведении у мышей, селектированных на разный вес мозга, могут быть результатом случайной ассоциации признаков в исходной популяции, было проведено два селекционных эксперимента, совпадение данных которых позволяет исключить такую возможность.

В связи с этим **основными задачами работы** были:

1. Провести два селекционных эксперимента (отличающихся по генетической характеристике исходных популяций) по выведению линий мышей с большим (БМ) и малым (ММ) относительным весом мозга.
2. Тестировать поведения мышей полученных линий в ряде поколений с использованием батареи тестов (обучение, способность к экстраполяции, тревожность, исследовательская активность).

3. Оценить межлинейные различия в поведении у мышей БМ и ММ после их пребывания в «обогащенной» среде.

4. Провести сравнение уровня нейрогенеза взрослого мозга у мышей БМ и ММ, содержащихся в стандартных и «обогащенных» условиях.

#### **Научная новизна и практическая значимость исследования.**

Подробный сравнительный анализ поведения мышей, селектированных на большой и малый вес мозга, проведен впервые. Впервые продемонстрировано устойчивое преимущество мышей, селектированных на большой вес мозга (БМ), в когнитивных тестах (способность к обучению, способность к экстраполяции, тест на поиск входа в укрытие). Уровень исследовательской активности у мышей БМ оказался выше, а склонность к развитию состояния страха-тревоги – ниже, чем у ММ. У мышей линий БМ и ММ впервые выявлены межлинейные различия во влиянии «обогащенной» среды на их поведение и на уровень нейрогенеза взрослого мозга. Подробные характеристики поведения мышей выведенных линий имеют практическое значение для медицины и фармакологии. Линии БМ и ММ могут быть использованы как генетические модели для разработки путей фармакологической коррекции состояний страха и тревоги, а также склонности к потреблению алкоголя. Их перспективно использовать для тестирования веществ, усиливающих когнитивные способности. Данные настоящей диссертации могут также служить теоретической основой для оценки результатов селекции в животноводстве и кинологии, а также для поведенческой ветеринарии.

**Апробация работы.** Данные, полученные в диссертации, были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на XVIII съезде физиол. об-ва им. И.П. Павлова (Казань, 2001), на 2-й конференции об-ва генетиков и селекционеров имени Н.И. Вавилова (Москва, 2003), на Всероссийской конференции «Актуальные вопросы функциональной межполушарной асимметрии» (Москва, 2003), на XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2005» (Москва 2005), на 7<sup>th</sup> Annual meeting of IBANGS, (Sitges, Spain, 2005), на XX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Москва 2007), на междунар конференции памяти Д.К. Беляева (Новосибирск, 2007), на the Eleventh annual conference of IBANGS, (Dresden, 2009), симпозиуме, посвященный 80-летию О.С. Виноградовой «Гиппокмп и память, норма и патология», (Пушино, 2009).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 4 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация имеет объем 197 страниц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 24 таблицы и 27 рисунков. Список литературы включает 251 источник.

### **Материал и методики**

**Экспериментальные животные и процедура селекции.** Основой для селекционного эксперимента, который был начат в 1989 г и назван «С1989-1999-гетероген» - была генетически гетерогенная популяция мышей, полученная от скрещивания 6 инбредных линий (СВА/Са, DBA/2J, C57BL/6J, C57BR/cd, A/Sn, BALB/c). Исходной популяцией для следующего эксперимента - названного «С1999-2009-гибриды» - были гибриды F2 от скрещивания между линиями БМ и ММ эксперимента «С1989-1999-гетероген».

В генетически гетерогенной популяции, а затем по ходу селекции в каждой линии в возрасте 60 - 70 дней у половины животных каждого помета каждой из линий определяли вес мозга и вес тела и строили линию регрессии «вес тела - вес мозга». Если показатели относительного веса мозга для данного помета попадали за пределы доверительного интервала (выше линии регрессии для линии БМ и ниже - для линии ММ), то оставшиеся

мыши этого помета шли на скрещивание для получения следующего поколения селекции. Ход селекции и результат ее описан в разделе «Результаты и обсуждение».

Таблица 1

Количество животных полученных в селекционных экспериментах и использованных в поведенческих тестах.

Поколения	Количество животных полученных в селекционных экспериментах				Количество животных протестированных в поведенческих тестах			
	«С1989-1999-гетероген»		«С1999-2009-гибриды»		«С1989-1999-гетероген»		«С1999-2009-гибриды»	
	БМ	ММ	БМ	ММ	БМ	ММ	БМ	ММ
F3	72	45	84	77	Не проводили			
F4	244	156	181	123				
F5	47	31	118	71				
F6	55	68	94	92				
F7	83	49	83	80				
F8	90	90	149	146	21	18	Не проводили	
F9	136	110	33	28	37	38	21	18
F10	136	121	80	51	Не проводили		19	20
F11	132	121	103	94	Не проводили		8	10
F12	226	199	31	25	32	29	8	10
F13	51	38	127	92	Не проводили		Не проводили	
F14	25	31	112	83	Не проводили		29	27
F15	64	68	138	88	56	40	Не проводили	
F16	38	21	165	72	20	20	12	13
F17	165	64	81	59	29	17	22	21
F18	66	44	103	99	30	30	Не проводили	
F19	45	54	103	61	Не проводили		Не проводили	
F20	37	28	39	28			6	6
F21	31	22	51	48			11	13
Всего по линиям	1743	1296	1875	1420	225	192	136	138
Общая сумма	6334 животных				691 животных			

**Тестирование поведения.** Тест «открытое поле» (круглая арена,  $d=1$  м, сторона квадрата - 10 см, 25 отверстий-“норок”, освещение лампой 40 Вт), длительность - 3 мин. Тест «закрытого крестообразного лабиринта» - камера с центральным и 4 боковыми отсеками (15 X 15 см каждый). Мышь помещали в центральный отсек и давали возможность сделать 13 заходов в боковые отсеки. Целый ряд временных показателей, а также «паттерн» посещения боковых отсеков были показателями обследования мышью лабиринта. Акустическую стартл-реакцию в ответ на короткий щелчок оценивали в баллах по условной шкале. В тесте неизбегаемой скользкой воронки (стеклянная воронка, диам. 27 см, с заполненным водой основанием диам. 5 см, темп. воды - 20°C). Мышь помещали в воду на 3 мин, регистрировали реакции активного избавления, пассивного избегания (активные стратегии) и состояние неподвижности, которое, по аналогии с тестом Порсолта, отражает развитие состояния,

сходного с депрессией (Salimov et al, 1996). В тесте приподнятый крестообразный лабиринт в течение 3 мин оценивали число выходов мыши в светлые рукава и время, там проведенное, а также число «свешиваний» с открытых рукавов, переходов «темный рукав-темный рукав», выглядываний из темных рукавов, вертикальных стоек, а также уровень дефекации. Для теста принудительного плавания (Порсолта) использовали стеклянный, цилиндрический сосуд высотой 45 см и диам. 20см,  $t=26-28^{\circ}\text{C}$ . В тесте «фиксирования на высоте» (tail suspension test) (Ripoll et al., 2003) (аналог теста Порсолта) мышь мягко фиксировали за хвост на 6 мин на высоте 35 см от поверхности стола. Оценивали длительность периодов иммобилизации и наличие дефекации. T-образный лабиринт (обучение инструментальному пищевому навыку) состоял из стартового отсека и центрального рукава (размеры 6 x 6 см и 20 X 6см) и двух 2 боковых рукавов (20 X 6 см), в конце одного из которых помещали каплю молока). После сеанса приучения отмечали время захода голодной мыши (18 ч депривации) в подкрепляемый боковой отсек. Выполнение 80% безошибочных заходов в подкрепляемый отсек в течение эксперимента или семь таких "правильных" побегов подряд принимали за критерий обученности. Проводили 5 ежедневных опытов, по 10 предъявлений в каждом. Для теста водного лабиринта Морриса в упрощенном варианте (Лильп и др., 1997) использовали небольшой квадратный бассейн (37 X 37 X 15 см), заполненный забеленной водой с погруженной в нее невидимой платформой (7 X 9 см), которую помещали стационарно в одном из углов (5 см от борта). Мышь выпускали плавать (6 попыток) из противоположного угла бассейна. Регистрировали время отыскания платформы и траекторию движения животного. Способность к экстраполяции направления движения пищевого стимула оценивали в специальной камере (рис.1) после 18 часов питьевой и пищевой депривации. Тест «поиск входа в укрытие» (burrowing task, Galsworthy et al., 2002) основан на стремлении животного избегать ярко освещенное пространство (рис.2).

Рис.1. Экспериментальная камера для оценки способности мыши к экстраполяции. В передней стенке камеры имеется центральное отверстие и два боковых. Две поилки двигаются вдоль этой стенки снаружи.



В камере мышь начинает пить молоко через центральное отверстие, после чего поилку перемещают вправо или влево, и она скрывается из поля зрения, придвигаясь вплотную к одному из боковых отверстий. Правильное решение теста - подход мыши к боковому отверстию, в направлении которого кормушка переместилась. Контрольная поилка («уравновешивание» запаха молока) двигается в противоположном направлении, оставаясь недосягаемой для мыши. Тест предъявляли не менее 6 раз, а направление движения поилки чередовали в квазислучайном порядке. Результаты теста оценивали по доле (в %) правильных решений при первом предъявлении теста, а также по доле правильных решений суммарно за 6 предъявлений теста.

Рис. 2. Экспериментальная камера для теста «поиск входа в укрытие», (puzzle box).



Пластиковая камера разделена на две неравные части. Большая из них (2/3 площади) ярко освещена, другая – темная, куда мышь стремится скрыться. Мышь может попасть в это укрытие только через специальный лаз, расположенный на уровне пола.

Тест считали выполненным, если мышь быстро (менее чем за 10 мин) проникала в укрытие. Тестирование включало в себя сеансы приучения к обстановке опыта с разным состоянием «лаза» - открытым или замаскированным. Тест продолжался 5 дней. Результат оценивали по времени перехода животного в укрытие (среднее  $\pm$ ош.среднего по группе).

**Эксперимент по влиянию «обогащенной» среды.** Обогащенными условиями содержания было пребывание мышей в трех клетках (59x37x20 см, тип Т3), соединенных между собой черными пластиковыми трубками-переходами. В клетках были установлены колеса для бега, укрытия для гнезд, туннели и лесенки. По истечении 3 месяцев животных из

«обогащенных» условий пересаживали в стандартные клетки. Сразу после этого с ними и с мышами, содержащимися в стандартных клетках, проводили эксперименты. Было проведено 2 эксперимента с «обогащением» среды, в одном из которых этой процедуре подвергались взрослых (2 мес.) самки мышей двух линий, в другой – мыши (обоих полов) выращивались в «обогащенных» клетках, начиная с 1-дн. возраста.

**Иммуногистохимическое окрашивание срезов.** Фиксацию мозга проводили путем транскардиальной перфузии, а иммуногистохимическое окрашивание - с использованием маркера делящихся клеток Ki67 на фронтальных срезах в области зубчатой фасции гиппокампа и субвентрикулярной зоны переднего мозга (SVZ). Подсчет клеточных элементов на срезах осуществляли визуально с электронных микрофотографий (фотокамера Olympus Camedia, C-4000, микроскоп Olympus CX-41 с флуоресцентной насадкой).

**Статистическая обработка данных.** Достоверность различий веса мозга и ряда показателей поведения оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни (U-тест), а также многофакторного ANOVA с post-hoc LSD анализом (пакеты статистических программ STATGRAPH и STATISTICA-6). Результаты теста на экстраполяцию обрабатывались с использованием метода альтернативных долей ( $\phi^2$ , метод Фишера).

**Селекционные эксперименты.** Данные по динамике относительного веса мозга при селекции мышей в двух экспериментах, приведены в табл. 2. Достоверное расхождение по признаку веса мозга начинается уже в третьем поколении, а в последующих поколениях различия были высоко достоверны. Различия в весе мозга в двух селекционных экспериментах в среднем было 77 и 68 мг (что составляло 16 % и 14% от средней величины признака, соответственно).

Таблица 2

Результаты «С1989-1999-гетероген» по выведению линий с большим (БМ) и малым (ММ) весом мозга (n – число животных)						
Поколение	Линия	n	вес тела	p≤	вес мозга	p≤
F3	БМ	33	24,51 ± 0,62	0,51	493,81 ± 4,89	0,017
	ММ	15	23,3 ± 1,00		449,42 ± 3,53	
F4	БМ	111	24,25 ± 0,57	0,68	486,49 ± 2,43	0,015
	ММ	72	24,71 ± 1,14		436,54 ± 2,76	
F7	БМ	38	23,02 ± 1,04	0,008	472,63 ± 8,41	0,0017
	ММ	21	18,62 ± 0,7		389,65 ± 6,04	
F9	БМ	65	26,91 ± 0,41	0,0009	499,94 ± 1,96	0,0001
	ММ	50	24,56 ± 0,57		431,62 ± 2,43	
F10	БМ	65	30,6 ± 0,47	0,52	502,46 ± 2,02	0,0001
	ММ	58	30,02 ± 0,9		438,8 ± 2,86	
F15	БМ	29	27,88 ± 0,71	0,72	484,06 ± 5,42	0,0001
	ММ	31	27,93 ± 0,79		411,00 ± 3,99	
F17	БМ	75	28,2 ± 0,49	0,05	471,56 ± 3,03	0,0001
	ММ	29	25,5 ± 0,67		389,8 ± 4,3	
F18	БМ	30	28,8 ± 0,53	0,05	474,5 ± 8,12	0,0001
	ММ	20	25,5 ± 0,46		376,4 ± 7,6	
F20	БМ	14	28,4 ± 0,96	0,05	454,0 ± 7,04	0,0001
	ММ	10	24,3 ± 0,84		388,8 ± 6,12	
F21	БМ	13	27,8 ± 0,8	0,05	471,12 ± 6,5	0,0001
	ММ	10	25,7 ± 1,3		417,9 ± 6,8	
Результаты «С1999-2009-гибриды» по выведению линий мышей с большим (БМ) и малым (ММ) весом мозга						
Поколение	Линия	n	вес тела	p≤	вес мозга	p≤

F5	БМ	54	22,06±0,26	0,99	438±3,66	0,042
	ММ	30	22,03±0,34		426,43±4,75	
F8	БМ	66	25,59±0,56	0,02	453,29±3,88	0,000
	ММ	65	23,96±0,42		433,9±3,03	
F10	БМ	36	24,68±0,66	0,052	472,94±4,23	0,000
	ММ	25	25,41±0,82		424,66±5,09	
F11	БМ	47	25,75±0,52	0,000	468,91±4,07	0,000
	ММ	44	23,43±0,45		426,55±3,85	
F13	БМ	58	24,6±0,57	0,000	485,6±4,8	0,000
	ММ	47	21,7±0,61		435,4±4,8	
F14	БМ	51	29,32±0,56	0,04	486,92±5,05	0,0000
	ММ	38	26,23±0,71		425,13±3,68	
F15	БМ	63	30,46±0,51	0,0000	511,88±4,25	10 <sup>-7</sup>
	ММ	40	27,04±0,67		445,35±5,28	
F16	БМ	75	29,9±0,46	0,0000	518±4,1	10 <sup>-7</sup>
	ММ	32	26±0,7		426,03±5,28	

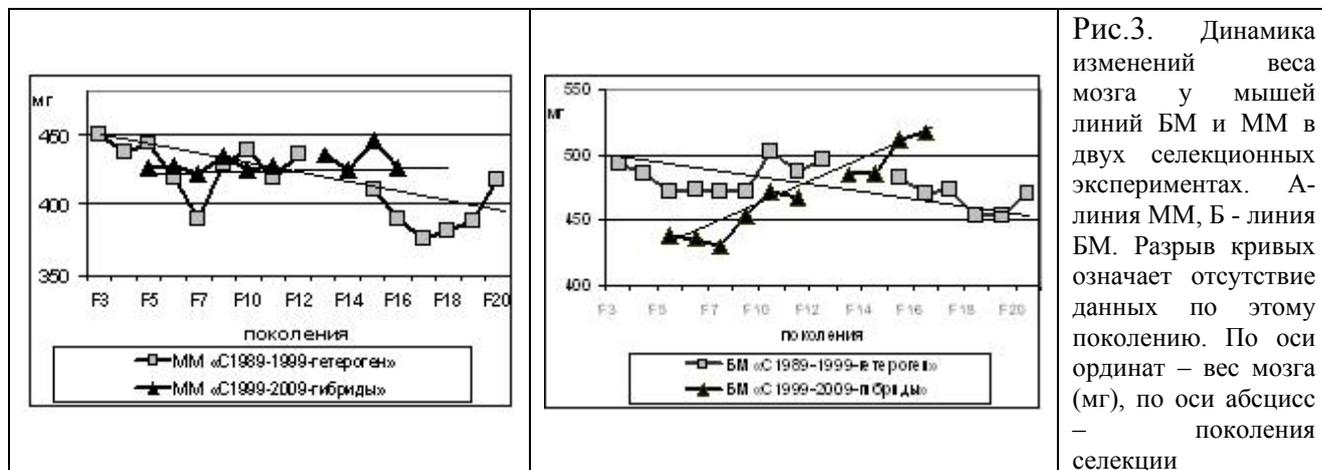
Примечание: в таблице приведены данные по поколениям выборочно, чтобы отразить динамику, для экономии места. Подробные таблицы приведены в диссертации.

Таким образом, в каждом из экспериментов были получены по паре линий (БМ и ММ) с достоверными различиями в весе мозга, при значительно меньшем размахе изменчивости по показателю веса тела. Далее линии называются БМ и ММ с указанием принадлежности к селекционному эксперименту.

На рис. 1А и Б приведена динамика изменений веса мозга и тела по поколениям селекции у мышей линий БМ и ММ

А

Б



У мышей линии ММ в «С1989-1999-гетероген» вес мозга (рис.1 А) плавно снижался по ходу селекции, тогда как в «С1999-2009-гибриды» изменений веса мозга в этой линии почти не было. В линиях БМ двух селекционных экспериментов (рис.1 Б) динамика изменений была обратной – в «С1989-1999-гетероген» этот показатель изменялся мало, тогда как в «С1999-2009-гибриды» он стабильно возрастал в ряду поколений. Следует отметить, что ход изменений веса мозга в поколениях селекции в «С1989-1999-гетероген» был сходен с таковым в работе Н.В.Поповой (1983), для которого также была использована генетически гетерогенная популяция от скрещивания мышей 6 инбредных линий.

**Характеристика поведения мышей двух линий (БМ и ММ).** Различия в поведении между самцами и самками в большинстве экспериментов были недостоверными и данные представлены суммарно.

*Двигательная активность и исследовательское поведение мышей линий БМ и ММ.*

Тест «открытое поле». Как видно из таблицы 2, горизонтальная двигательная активность мышей ММ на периферии «открытого поля» в ряде поколений была достоверно выше, чем у БМ. В то же время число вертикальных стоек и норковых реакций у БМ - было выше, чем у ММ. Возможно, что более высокий уровень двигательной активности мышей ММ в этом эксперименте определялся их более высоким уровнем тревожности.

Таблица 3

Двигательная активность (число пересеченных сторон квадратов) и показатели исследовательской активности мышей линий БМ и ММ в тесте «открытое поле».

Признак поведения	Линия	«С1989-1999-гетероген»	«С1999-2009-гибриды»		
		F18	F10	F11-12	F14
		БМ n=30 ♂♂ ММ n=14 ♂♂, 16 ♀♀	БМ n= 9 ♂♂ ММ n= 8 ♂♂	БМ и ММ n=16 ♀♀	БМ n=19 ♂♂, 10 ♀♀ ММ n=17 ♂♂, 10 ♀♀
Двиг. акт. (периферия)	БМ	27,0±3,52*	208,0±29,8	24,7±7,1**	171,7±15,5
	ММ	41,2±5,58	182,9±31,6	50,05±6,5	162,03±15,9
«Стойки»	БМ	5,9±0,67	12,1±3,9	4,37±1,3	21,9±2,24*
	ММ	4,8±0,67	12,2±4,2	4,73±1,2	14,1±2,44
«Норки»	БМ	-	4,4±1,4	3,9±0,54**	1,59±0,28*
	ММ	-	5,7±1,5	1,8±0,5	0,81±0,22
Двиг. акт. (центр)	БМ	0,03±0,03	10,6±3,6	8,1±2,1	11,1±1,4
	ММ	0,1±0,06	13,3±3,8	10,9±1,9	10,3±2,1

Примечание: \*,\*\* - достоверно отличается от соответствующего показателя мышей линии ММ при  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ , соответственно.

Тест «закрытый крестообразный лабиринт». Этот лабиринт является для животных более комфортной и менее «пугающей» средой, что позволяет более полно оценить их исследовательское поведение. При его обследовании часть времени мыши обычно проводят в центральном отсеке, а часть - в его рукавах. Оценку ориентировочно-исследовательского поведения в незнакомой сложной среде сначала провели в «С1989-1999-гетероген» у мышей F18 (БМ - 21 ♂♂ и ММ - 23 ♂♂). Латентный период (ЛП) начала обследования новой среды (т.е. первого захода в рукав) у мышей БМ и ММ этих групп не различался, т.е. они одинаково быстро реагировали на новую обстановку. Пребывание в рукавах и в центре лабиринта занимало у мышей линий у БМ и ММ примерно одинаковые доли времени (1/3 и 2/3 – соответственно). В то же время, на осуществление 13 заходов в рукава (общее время обследования лабиринта), также как на пребывание в рукавах (их обследование) мыши БМ затрачивали достоверно больше времени, чем ММ (табл. 4).

У мышей линии БМ («С1999-2009-гибриды») было больше «циклов патрулирования», а для осуществления первого цикла им также требовалось меньшее число заходов (показатели 1 и 2, табл.4); это указывает на более эффективное обследование лабиринта (Салимов, 1988).

Мыши БМ этого селекционного эксперимента более долго обследовали новую среду при попадании в нее, что, в сопоставлении с большей успешностью «патрулирования» также может отражать высокую эффективность исследовательского поведения. Ряд показателей стереотипного поведения (повторные заходы в какие-либо два рукава) были выше у мышей линии ММ. Эта склонность к стереотипии у линии ММ может быть связана с их более высоким уровнем тревожности.

*Эмоциональная реактивность, тревожность, «выученная беспомощность» и стресс-реактивность мышей линий БМ и ММ.* Эмоциональная реактивность в тестах с лабораторными грызунами традиционно оценивается по уровню дефекации и уринации.

Таблица 4

Показатели поведения мышей БМ и ММ в закрытом крестообразном лабиринте (F18, «С1989-1999-гетероген»).

Показатели поведения	Линия	Время, с	$p \leq$
Общее время обследования лабиринта, (с)	БМ n=21	513,49±52,51	0,0001
	ММ n=23	281,67±29,29	

Время, проведенное в рукавах, (с)	БМ n=21	370,58±48,34	0,001
	ММ n=23	208,66±28,71	

Таблица 5

Тестирование мышей БМ и ММ в «закрытом крестообразном лабиринте» (F9, 11-12,14, «С1999-2009-гибриды»)

Показатель и поведения	F9			F11-12			F14		
	БМ n=21	ММ n=18	p≤	БМ n=7	ММ n=8	p≤	БМ n=25	ММ n=25	p≤
1.Число циклов патрулир.	2,05±0,17	1,9±0,2	0,54	3,3±0,3	2,0±0,24	<b>0,05</b>	2,2±0,12	2,1±0,12	0,73
2.Число заходов в рукава для 1-го цикла патрулир.	6,95±0,6	6,8±0,6	0,8	4,7±0,7	6,5±0,68	<b>0,05</b>	5,5±0,4	6,1±0,48	0,18
3.Общее время в центре, (с)	255,4±28,8	139,9±29,6	<b>0,008</b>	114,6±11,5	111,3±10,7	0,86	119±19,1	134,5±20,4	<b>0,07</b>
Число эпизодов стереотипии	1,75± 0,17	1,6±0,18	0,63	1,28±0,35	1,37± 0,32	0,36	1,32±0,15	2,08±0,15	<b>0,001</b>
Общее количество стереотипных визитов	5,6±0,6	5,5±0,7	0,88	4,6±1,2	4,9±1,1	0,95	4,5±0,24	6,6±0,29	<b>0,004</b>

Этот показатель является проявлением испуга животного, о нем можно судить также и по другим проявлениям – выраженности (числу эпизодов) реакции замирания и числу эпизодов груминга. Последний показатель является проявлением «конфликта» между тревожностью и исследовательской мотивацией (табл. 6).

Основой процесса адаптации животного к пугающим условиям среды является способность организма противостоять стрессорирующим факторам. В целом состояние тревоги, проявления депрессии и стресс-реактивность, как правило, проявляются совместно. У мышей БМ и ММ эти показатели оценивали в нескольких тестах (см. Методику). Данные этих тестов позволяют количественно оценить тенденцию к использованию разных стратегий реагирования на подобную ситуацию - пассивная (состояние неподвижности) и активные стратегии (попытки сопротивляться ситуации).

В тесте «открытое поле» были обнаружены межлинейные различия в показателях уровня тревожности. Следует отметить, что и «знак» различий и степень достоверности этих различий были разными для разных поколений селекции. Наиболее четкий, с этологической точки зрения, показатель развития реакции страха – реакция замирания - возникла чаще у мышей линии БМ. Можно полагать, что у мышей обеих линий при попадании их в новую обстановку «открытого поля» развивается реакция страха. Однако в силу возникших в ходе селекции различий в поведении, у мышей ММ она проявляется в виде повышенной локомоции (табл. 5), как реакция бегства из «устрашающей» обстановки, тогда как у мышей БМ она проявляется в виде замирания. Можно также полагать, что в ходе селекции мышей на большой и малый вес мозга сформировались межлинейные различия в порогах провокации этих реакций – у мышей ММ в новой обстановке повышается локомоция, а у мышей линии БМ - проявляется замирание (табл. 6), как две формы защитной реакции на стрессорирующую ситуацию.

Таблица 6

Эмоциональная реактивность, груминг и замирание в тесте «открытое поле» у мышей линий БМ и ММ.

Признак поведения	«С1989-1999-гетероген»	«С1999-2009-гибриды»		
	F18	F10	F11-12	F14

		БМ n= 30 ♂♂ ММ n =14♂♂,16♀♀	БМ n= 9 ♂♂ ММ n= 8 ♂♂	БМ, ММ по n=16♀♀	БМ n=19♂♂,10♀♀ ММ n=17♂♂,10♀♀
Груминг (эпизоды)	БМ	0,7±0,16*	0,56± 0,29*	2,0± 0,78**	8,28±1,12*
	ММ	0,27±0,08	2,25±0,75	8,87±3,19	4,96±0,83
Замирание (эпизоды)	БМ	Не регистр.	0,67±0,24**	0,43±0,28	0,34±0,1*#
	ММ	Не регистр.	0	1,05±0,26	0,07±0,05
Дефекация и уринация	БМ	1,77±0,27**	0,8±0,34	0,81±0,31	1,3±0,63
	ММ	1,0±0,2	1,0±0,4	0,84±0,29	1,6±0,78

\* \*\* - достоверно отличается от соответствующего показателя мышей линии ММ при  $p \leq 0,05$ ;  $p \leq 0,01$  соответственно, # показатель за 3-ю мин теста.

Как известно, в тестах Порсолта. фиксирования на высоте и неизбежной скользкой воронки тестируют предрасположенность животных к развитию депрессии (Маркина и др. 1999; Salimov et al, 1996; Ripoll et al., 2003).

Результаты «классического» теста Порсолта (F16, «С1999-2009-гибриды») БМ - 12 ♂♂, ММ - 13 ♂♂) представлены на рис. 3.

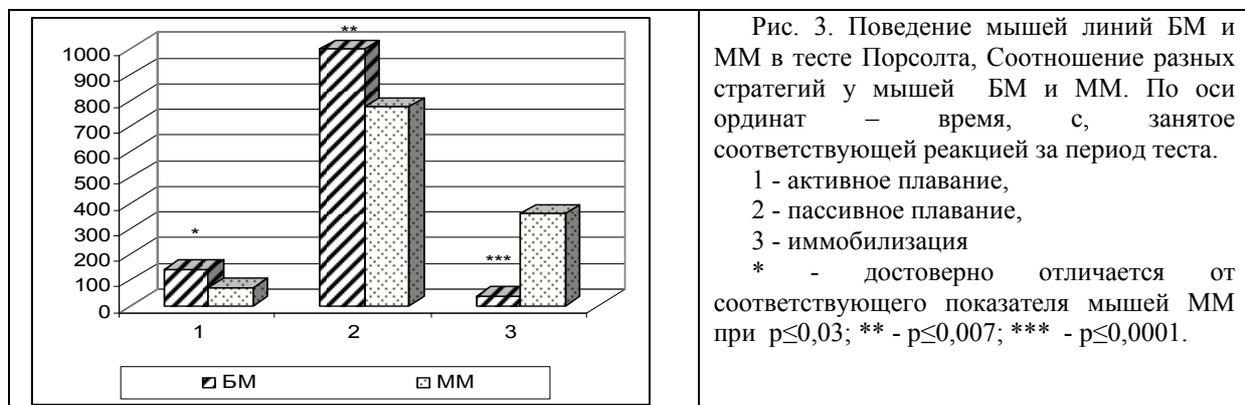


Рис. 3. Поведение мышей линий БМ и ММ в тесте Порсолта, Соотношение разных стратегий у мышей БМ и ММ. По оси ординат – время, с, занятое соответствующей реакцией за период теста.

- 1 - активное плавание,
- 2 - пассивное плавание,
- 3 - иммобилизация

\* - достоверно отличается от соответствующего показателя мышей ММ при  $p \leq 0,03$ ; \*\* -  $p \leq 0,007$ ; \*\*\* -  $p \leq 0,0001$ .

Периоды активного и пассивного плавания были достоверно длиннее у мышей БМ, тогда как мыши линии ММ были более пассивными.

В тесте фиксирования на высоте (F18, «С1989-1999-гетероген», БМ - 18♂♂ и ММ - 17♂♂) время пребывания мышей в состоянии неподвижности, как и в тесте Порсолта, было выше у мышей линии ММ по сравнению с БМ (75,57±7,74 с и 48,25±8,18 с, соответственно,  $p \leq 0,05$ ), а у БМ было выше время активных попыток избавления.

Оценку поведения в «неизбежной скользкой воронке» проводили у мышей БМ и ММ обоих селекционных экспериментов в F18 «С1989-1999-гетероген» (БМ, 23 ♂♂, ММ 21 ♂♂) межлинейные различия касались времени «активного избавления» - попыток выпрыгнуть из воронки - и времени пассивного избегания (распластанная поза над водой) (достоверно,  $p \leq 0,05$ , выше у БМ), тогда как время неподвижного замирания в воде было выше у ММ. Иными словами, поведение «беспомощности» (аналогичное «зависанию» в тесте Порсолта) было выражено более четко у мышей линии ММ.

Аналогичные данные были получены в «С1999-2009-гибриды» (табл. 7). У мышей линии БМ, по сравнению с ММ, было достоверно сильнее выражено поведение активного избавления и пассивного избегания. Таким образом, мыши линии БМ обнаружили предпочтение активной стратегии избавления неприятной ситуации (пребывания в воде), тогда как мыши линии ММ чаще вели себя пассивно.

Таблица 7

Тестирование мышей БМ и ММ в «неизбежной скользкой воронке» («С1999-2009-гибриды»).

Показатели поведения	F9			F11-12			F14		
	БМ n=21	ММ n=18	p≤	БМ n=7	ММ n=8	p≤	БМ n=25	ММ n=25	p≤
Средняя длит. эпиз. пасс. избегания (с)	1,44±1,4	6,15±1,5	<b>0,04</b>	21,2±10,4	29,5±21,2	0,73	2,3±1,5	4,9±1,6	0,26
Средняя продолж.	0,85±1,6	8,1±1,7	<b>0,003</b>	28,5±10,5	49,1±21,1	0,34	3,3±1,2	4,2±1,2	0,7

эпизодов пасс. изб. (с)									
Общее время пассивного избегания (с)	1,6±7,2	27,9±7,8	<b>0,02</b>	97,9±19,2	95,6±24,5	0,6	22,4±8,5	19,7±8,4	0,8
Число эпизодов пассивного избегания	0,29±0,3	1,9±0,35	<b>0,001</b>	5,4±0,9	2,7±0,6	0,07	2,6±0,7	2,2±0,6	0,8
Общее время акт. избавления (с)	21,5±3,9	6,7±4,2	<b>0,02</b>	13,8±3,8	9,1±3,9	0,08	22,7±4,4	9,3±4,4	<b>0,035</b>
Средняя длит. эпиз. акт. избавл. (с)	7,4±1,3	1,8±1,4	<b>0,005</b>	4,9±2,3	4,4±2,8	0,67	5,5±1,17	4,9±1,2	0,6
Число эпиз. акт. изб.	2,24±0,55	1,6±0,6	0,4	2,6±0,6	1,9±0,9	0,45	3,2±0,5	1,3±0,5	<b>0,008</b>

*Акустическая реакция вздрагивания (стартл-реакция).*

В Стартл-реакция была более интенсивной у мышей ММ, в 3 из 5 проб – достоверно («С1989-1999-гетероген»), БМ 20 ♂♂ и ММ - 20 ♂♂). В «С1999-2009-гибриды» достоверных межлинейных различий интенсивности стартл-реакции выявлено не было, как не было различий в изменениях интенсивности реакции по ходу 5 предъявлений стимула.

*Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ).*

В этом тесте оценивали поведение мышей F20 и F21, «С1999-2009-гибриды». У мышей линии БМ было достоверно больше выглядываний из темных рукавов лабиринта, у них было больше стоек, а у мышей линии ММ был достоверно выше уровень дефекации. Число выходов в открытые рукава и число «свешиваний» с открытого рукава было также выше у мышей БМ (на уровне тенденции,  $p < 0,07$ ,  $p < 0,09$ ). Данные теста ПКЛ говорят о более активном поведении мышей БМ, отражающем их более низкий уровень тревожности.

Более активную стратегию поведения мышей линии БМ в описанных выше тестах можно объяснить межлинейными различиями в уровнях тревожности и стресс-реактивности, поскольку сходные по направлению различия были получены в тестах «неизбегаемой скользкой воронки», фиксирования на высоте, в тесте Порсольта и (частично) в реакции на звуковой щелчок. Ранее было показано, что у мышей ММ была повышена судорожная готовность (Богданов и др., 1994), что может отражать их повышенную возбудимость, которая у них сочетается с повышенной тревожностью.

Различия в поведении у мышей БМ и ММ в тестах, оценивающих общий уровень локомоторной активности, тревожность, предрасположенность к развитию состояния беспомощности, свидетельствуют о существовании связи между весом мозга и поведением. Мыши линии ММ оказались более склонными к развитию состояния тревоги и вынужденной беспомощности, тогда как у мышей линии БМ отмечалось более четко выраженное исследовательское поведение. Следует отметить, что такие различия в поведении были обнаружены не во всех сравнивавшихся парах групп. Это может говорить, во-первых, о существовании некоторых колебаний в успешности селекции, когда в некоторых поколениях различия могли иметь невысокий генетический компонент, а, во-вторых, о том, что в целом эти различия невелики по размаху. Последнее обстоятельство позволяет, несмотря на разную выраженность поведения страха-тревоги у линий БМ и ММ, провести сравнение выполнения этими мышами тестов на «пластичность поведения», или когнитивных тестов.

*Способность к инструментальному научению в Т-образном лабиринте.*

Первой задачей было сопоставление способности к обучению в Т-образном лабиринте с пищевым подкреплением («С1989-1999-гетероген»). Данные по обучению пищевому инструментальному навыку представлены в табл. 8.

Таблица 8.

Показатели обучения пищевому инструментальному навыку в Т-образном лабиринте у мышей БМ и ММ.

Линия, поколение	число животных	Ср. время реакции (1-й день), с	Ср. время реакции (2-й день), с	ЛП реакции (сред, 3-й день), с.	Доля (в %) реакций (5-й день)	Достигли усл. крит. (доля,%)	Переделка навыка (доля, %)
БМ F17	29	18,9±3,92	16,5*±3,53	20,3*±4,95	78,3*±2,43	82,8**	3,4
ММ F17	17	20,0±4,84	29,8±5,14	31,5±8,87	63,6±4,76	41,2	5,8

БМ F18	20	18,3±7,13	6,58*±1,58	6,15*±2,02	78*±2,57	85 *	25 *
ММ F18	26	12,3±5,68	15,8±5,04	18,5±6,31	67,5±3,69	60	10

\*, \*\* - достоверно отличается от соответствующего показателя мышей линии ММ при  $p \leq 0,05$  и  $p \leq 0,01$  соответственно (Т - критерий Стьюдента).

В обоих тестируемых поколениях было обнаружено достоверно более быстрое и эффективное обучение мышей линии БМ. Динамика времени побегов в этом лабиринте в течение 3 дней обучения также отражала более высокую обучаемость мышей линии БМ (данные не приводятся). Тест на переделку навыка (переход на получение подкрепления в противоположном отсеке лабиринта) также более успешно решили мыши БМ.

Ранее в других селекционных экспериментах на вес мозга (Fuller, 1979, и в частности в эксперименте Н.В. Поповой, Попова, Полетаева 1983) уже была продемонстрирована более высокая обучаемость мышей линий, селектированных на большой вес мозга.

С целью более подробного сравнения когнитивных способностей мышей БМ и ММ были проведены тесты на пространственную память, способность к экстраполяции, и решению теста на «поиск входа в укрытие».

Таблица 9

Успешность решения задачи на экстраполяцию мышами линий БМ и ММ ( $\phi^2$ , метод Фишера)

	Поколение	Линия (число животных)	Доля правильных решений (%) при 1-м предъявлении задачи	Доля правильных решений (%) суммарно за 6 предъявлений задачи
«С1989-1999-гетероген»	F8	БМ (n=21)	<b>66,7*<sup>&amp;</sup></b>	<b>61,4*<sup>#</sup></b>
		ММ (n=18)	33,3	41,2
	F9	БМ (n=37)	<b>64,9</b>	<b>62,2<sup>#</sup></b>
		ММ (n=38)	68,4 <sup>#</sup>	53,6
	F12	БМ (n=32)	59,4	52,9
		ММ (n=29)	62,1	57,3
	F15	БМ (n=56)	<b>57,1</b>	<b>60,4<sup>#</sup></b>
		ММ (n=40)	45,0	<b>57,3<sup>#</sup></b>
	F17	БМ (n=20)	<b>38,0</b>	<b>53,7*<sup>#</sup></b>
		ММ (n=20)	38,0	38,4
	F18	БМ (n=20)	40,0	59,9
		ММ (n=26)	50,0	49,1
«С1999-2009-гибриды»	F10	БМ (n=10)	<b>75,0*<sup>##</sup></b>	<b>52,6</b>
		ММ (n=12)	50,0	54,2
	F14	БМ (n=25)	<b>74,9*<sup>#</sup></b>	<b>70,2*<sup>#</sup></b>
		ММ (n=25)	34,4	33,3

\* - доля правильных решений задачи мышами линии БМ достоверно отличается от соответствующего показателя ММ при  $p < 0,05$ ;

#, ## - доля правильных решений задачи достоверно отличается от 50% случайного уровня, при  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно.

*Оценка способности к экстраполяции направления движения пищевого стимула (тест на элементарную рассудочную деятельность, Крушинский, 1986, 2009).*

Способность к экстраполяции направления движения стимула (см. Методику) оценивали у мышей линий БМ и ММ в ряде поколений обоих селекционных экспериментов. Результаты этого тестирования представлены в табл. 9. В разных поколениях селекции доля правильных решений теста у мышей БМ и ММ обеих линий различалась, причем в определенной части случаев она недостоверно отличалась от 50% случайного уровня, что следует трактовать как отсутствие соответствующей способности у большинства мышей этих групп.

Доля правильных решений теста на экстраполяцию у мышей линии БМ часто достоверно отличалась от 50% случайного уровня. У мышей линии ММ отличие от 50% случайного уровня (по доле правильных решений за 6 предъявлений теста) было достоверно только в одном случае. Низкий уровень решений теста в F14 у линии ММ с большой вероятностью связано с реакцией испуга, свойственной мышам этой линии.

Таким образом, несмотря на невысокий уровень способности к решению данного теста у лабораторных мышей (Крушинский, 1986, Poletaeva et al., 1994), наши эксперименты показали некоторое превосходство в решении данной задачи у мышей линии БМ.

*Способность к решению теста «поиск входа в укрытие» (burrowing task)* (см. Методика).

В отличие от теста на способность к экстаполяции, данный тест основан на оборонительной мотивации. Логический анализ теста показывает, что для его успешного выполнения животное должно быть способно иметь представление о «константности свойств предметов» («object permanence» по Пиаже, или эмпирический закон «неисчезаемости», по Крушинскому). Т.е. оно должно быть способно понимать, что скрытый (невидимый) предмет продолжает существовать. В тесте мыши сначала знакомятся с расположением лаза, а затем должны его отыскать при его маскировке – слабой (1 тест) и полной (2 тест).

Таблица 10

Время (с) решения теста на «поиск входа в укрытие» мышами БМ и ММ («С1999-2009-гибриды», F17)

Линия, число животных	Первое приучение (с)	Первый тест (с)	Второе приучение (с)	Второй тест (с)	Третий тест (с)
БМ n=8	8,1±3,1**#	11,9±3,9**@	5,25±2,1**	85,6±58,7	131±68,0
ММ n=7	17,9±3,3	22,9±4,2	9,3±2,2	107,4±58,7	247,1±68,0

\*\* - достоверно по ANOVA суммарно по показателям: первое приучение, первый тест и второе приучение,  $p \leq 0,016$  ( $F_{3,11}=5,4$ ); # - по критерию Манна-Уитни (U-тест),  $p \leq 0,02$ ; @ - по тесту Вилкоксона,  $p \leq 0,03$ .

В табл. 10 представлены результаты выполнения данного теста - мыши БМ более успешно справлялись с разными этапами теста (как с двумя тестами разной сложности собственно, так и с выполнением реакций в ходе приучения). Несмотря на малый размер выборок животных межлинейные различия были достоверными.

#### **Влияние условий обогащенной среды на поведение и нейрогенез взрослого мозга у мышей, селектированных на большой и малый относительный вес мозга**

Следующим логическим этапом сравнения особенностей поведения мышей БМ и ММ была оценка эффектов пребывания в «обогащенных» условиях среды. Сравнивали поведение таких животных (с контролем из стандартных условий содержания) в батарее тестов, а также уровень клеточной пролиферации в мозге. Во 2 серии опытов (выращивание животных в «обогащенных» условиях с 1-дневного возраста) у мышей проводили только тест на поиск входа в укрытие. В тесте «открытое поле» (табл. 11) межлинейные различия в целом были такими же, как и в описанных ранее экспериментах. Различия между группами из «обогащенных» и стандартных условиях касались уровня локомоции, выходов в центр арены, числа «стоек и норковых реакций, которые отражали выраженное усиление страха у мышей из «обогащенных» групп, более отчетливое у мышей линии ММ.

Различия между группами мышей из стандартных и «обогащенных» условий в тесте «неизбегаемая скользкая воронка» (табл.12) также свидетельствовали о более сильно выраженной тревожности мышей из «обогащенных» групп (у них было достоверно больше время иммобилизации). Однако важно заметить, что число и время активных попыток выбраться из воронки у мышей из «обогащенных» условий также были выше. Возможно, что этот эффект объясняется тренировкой двигательных навыков в условиях «обогащения» среды. Анализ этих различий отдельно по линиям БМ и ММ (данные представлены в диссертации) показал, что наиболее сильно подобные изменения были свойственны мышам линии ММ. Таким образом, данные и этого теста выявили более четкие изменения в поведении мышей линии ММ, как следствие пребывания в «обогащенных» условиях среды.

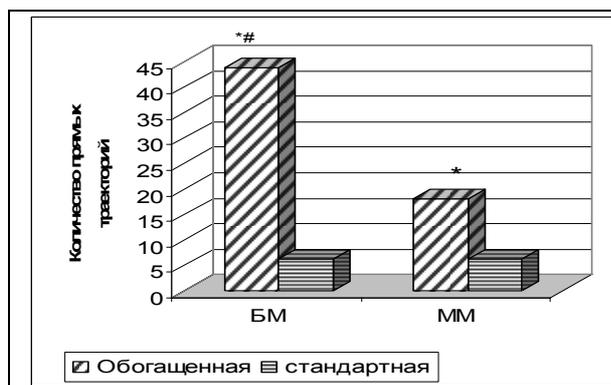


Рис. 4. Число «прямых» траекторий плавания при достижении животными невидимой платформы в упрощенном тесте Морриса у мышей линий БМ и ММ из «обогащенных» и стандартных условий содержания. \* - достоверно отличается от показателя группы из стандартных условий содержания,  $p < 0,05$ , # - достоверно отличается от мышей линии ММ из «обогащённых» условий  $p < 0,05$ .

Таблица 11.

Поведение мышей в тесте «открытое поле» линий БМ и ММ из «обогащенных» и «стандартных» условий (U-критерий Манна -Уитней)

Показатели поведения	Линия	«Обогащенная» среда	Стандартные условия.
	F11-12	БМn=9 ММn=10	БМn=6 ММn=9
Число пересеченных квадратов (периферия арены, 1-я мин) -	БМ	23,1±4,9	17,7±6,5
	ММ	48,3±12,3 <sup>#</sup>	37,4±10,2 <sup>#</sup>
Число пересеченных квадратов (центр арены, 1-я мин)	БМ	2,7±0,44 <sup>**</sup>	5,7±0,9
	ММ	5,5±0,7 <sup>#**</sup>	8,4±1,4 <sup>#</sup>
Число пересеченных сторон квадратов (центр арены, 3-я мин)	БМ	4,2±1,7 <sup>^</sup>	2,1±1,06 <sup>^</sup>
	ММ	1,0±0,59	1,4±1,4
Число «стоек» (2-я мин).	БМ	2,0±0,62 <sup>*</sup>	1,7±0,68
	ММ	2,7±0,68 <sup>*</sup>	0,89±0,77
Число «стоек за 3 мин теста суммарно.	БМ	4,56±1,07 <sup>*</sup>	4,14±1,6
	ММ	6,5±2,08 <sup>*</sup>	2,8±2,04
Число «норковых реакций» (3-я мин).	БМ	1,0±0,41	2,0±0,49
	ММ	0,2±0,13 <sup>###</sup>	0,11±0,11 <sup>###</sup>
Число «норковых реакций» за 3 мин теста суммарно	БМ	3,44±0,89 <sup>#</sup>	4,42±1,1 <sup>#</sup>
	ММ	1,8±0,57	1,9±0,45
Число эпизодов груминга (1-я мин).	БМ	0,33±0,17	0,14±0,14
	ММ	1,0±0,51 <sup>#</sup>	1,0±0,33 <sup>#</sup>
Число эпизодов груминга (за 3 мин теста суммарно)	БМ	3,56±0,8	3,0±1,2
	ММ	4,7±1,03 <sup>^</sup>	6,6±1,37 <sup>^</sup>
Число эпизодов замирания (2-я мин).	БМ	0,22±0,15 <sup>&amp;</sup>	0
	ММ	0,5±0,2 <sup>&amp;</sup>	0,11±0,11
Длительность эпизодов замирания (1-я мин, с).	БМ	6,06±6,06 <sup>&amp;</sup>	0
	ММ	0,63±0,31 <sup>&amp;</sup>	0,18±0,18
Число эпизодов замирания (3-я мин)	БМ	0,33±0,33	0
	ММ	0,5±0,22 <sup>^</sup>	0,33±0,17 <sup>^</sup>
Число эпизодов замирания (за 3 мин теста, суммарно).	БМ	0,67±0,55	0,14±0,14
	ММ	1,6±0,34 <sup>##</sup>	0,4±0,17 <sup>##</sup>

Примечание: \*, \*\* - достоверно отличается от показателей той же линии из стандартных условий при  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно; & - отличается от показателей той же линии из стандартных условий, тенденция,  $0,08 > p > 0,05$ ; #, ### - отличается от показателей БМ при тех же условиях содержания при  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ , соответственно; ^ - отличается от показателей линии БМ при тех же условиях содержания, тенденция,  $0,08 > p > 0,05$ .

Тестирование мышей этих 4 групп проводили и в упрощенном варианте теста Морриса (см. Методику, бассейн небольшого размера, выпуск животного из одной и той же точки). Оно показало, что суммарно у мышей «обогащенных» групп обеих линий за 6 проб теста было достоверно больше ( $p < 0,05$ ) прямых, быстрых (10 сек и менее) траекторий движения к платформе, при этом более высоким этот показатель был у мышей линии БМ из «обогащенных» условий (рис. 4).

Таблица 12

Влияние «обогащенных» условий среды на показатели теста «неизбегаемой скользкой воронки» по обеим линиям (U-критерий Манна -Уитней)

Показатели поведения (время в с)	«Обогащенная среда» n=21	«Стандартные условия» n=15
Общее время эпизодов иммобилизации	107,8±11,9 <sup>#</sup>	75,95±14,8
ЛП первого пассивного избегания	11,3±2,2*	34,4±11,9
Общее время пассивного избегания	45,2±12,2**	92,9±16,4
Ср. длит. эпизода пасс. избегания	9,7±2,9**	39,0±12,3
Общее время активного избавления	28,1±4,98*	12,2±3,8
Число эпизодов акт. избавления	3,6±0,8	2,0±0,6

Примечание: \* , \*\* - достоверно отличается от показателей мышей из стандартных условий при  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно; <sup>#</sup> - тенденция к различиям между группами,  $0,05 < p < 0,09$ .

В итоге, мыши из «обогащенных» условий (в особенности линия ММ) более эффективно избегали пребывания в воде.

Обучение мышей линии БМ из «обогащенных» условий инструментальному пищевому навыку в П-образном лабиринте было более эффективным (данные приведены в диссертации).

Доля правильных решений теста на способность к экстраполяции у мышей линии БМ, содержащихся в «обогащенной» среде при его первом предъявлении теста достоверно отличалась от 50% случайного уровня, а в сумме после 12 предъявлений достоверно ( $p < 0,001$ ) отличались от контроля из стандартных условий (табл. 13).

Суммарные показатели успешности решения после 12 предъявлений теста у линии БМ также достоверно отличались от случайного уровня (табл. 13). Изменений веса мозга мышей обеих линий после пребывания в «обогащенных» условиях не произошло.

Таблица 13

Успешность решения задачи на экстраполяцию, вес мозга и вес тела («обогащенные»- стандартные условия)

Группа, число животных	Доля (в %) правильных решений теста		Морфологические показатели	
	1-е пред. теста	12 пред. теста	Вес мозга	Вес тела
БМ обог., 8	87,54±11,7*	76,4±4,3 <sup>**#</sup>	505,6±12,7 <sup>a</sup>	26,58±1,1
БМ станд., 7	75,0±15,3	52,6±5,1	508,1±6,6 <sup>a</sup>	26,46±0,8
ММ обог., 8	85,7±13,2	63,9±5,25	475,1±8,38	25,97±0,92
ММ станд., 8	50,0±17,7	54,7±5,1	477,6±7,9	25,12±1,4

Примечание: \* , \*\* - достоверно отличается от 50 % случайного уровня решения задачи  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ , соответственно; <sup>#</sup> - достоверно отличается ( $p < 0,001$ ) отличается от соответствующей доли у группы той же линии, содержащейся в стандартных условиях; <sup>a</sup> - достоверно ( $p < 0,02$ ) отличается от веса мозга обеих групп ММ;

Таким образом, пребывание мышей в «обогащенных» средовых условиях сопровождалось улучшением выполнения теста на экстраполяцию направления движения. Это улучшение обнаружилось у мышей обеих линий, но у линии ММ оно не было достоверным, возможно, в связи с малым размером выборки.

Поскольку в первой серии опытов по содержанию мышей в «обогащенных» условиях среды было обнаружено более успешное решение теста на экстраполяцию мышами БМ из «обогащенных» условий, в следующей серии был проведен другой когнитивный тест – на поиск входа в укрытие.

Было тестировано по 6 мышей в каждой из 4 экспериментальных групп. Двухфакторный ANOVA для повторных экспериментов показал, что группы мышей БМ и ММ, выросшие в стандартных условиях, решают данный тест достоверно быстрее ( $F_{5,12}=3,6$ ;  $p \leq 0,03$ ). Приближающиеся к достоверности различия были обнаружены между двумя группами линии ММ – мыши, выросшие в «обогащенной» среде быстрее приучались на первом этапе ( $p \leq 0,08$ ) и быстрее решали тест ( $p \leq 0,06$ ) при втором предъявлении (рис. 5).

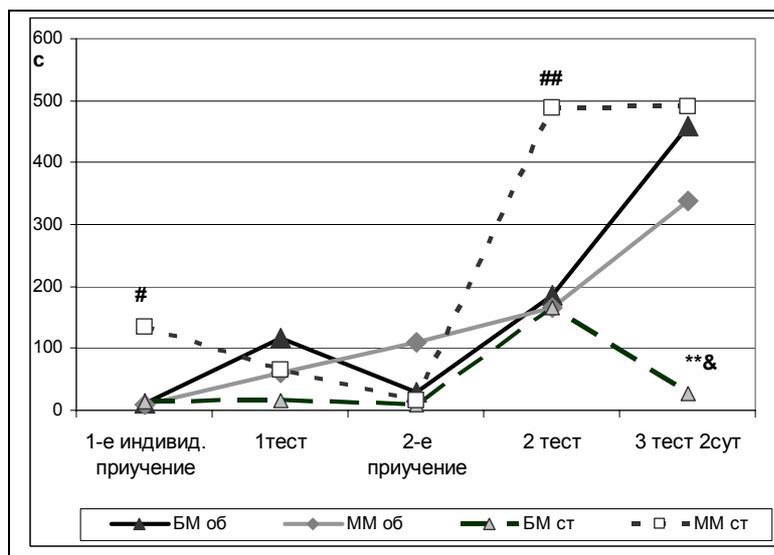


Рис. 5. Динамика обучения мышей линий БМ и ММ, выросших в «обогащенных» и стандартных условиях «поиску входа в укрытие» MANOVA и критерий Манна - Уитни (U-критерий). \*\* - достоверно отличается от показателя для БМ ст. при  $p < 0,01$ ; & - достоверно отличается от показателей БМ об, ММ ст. и ММ об,  $p < 0,05$ .

# - тенденция к различию между группами ММ об и ММ ст,  $p < 0,08$ ; ## - тенденция к различию между группами ММ об и ММ ст,  $p < 0,06$ ;

Следует отметить, что в этой серии были использованы и самцы, и самки, а не только самки, как это было в первой серии экспериментов. По нашим наблюдениям у самок мышей, по-видимому, была более высокой активность «копания» подстилки, что и, видимо, нашло отражение в достоверных половых различиях в выполнении этого теста. Самки решали данный тест достоверно быстрее, чем самцы, по третьему тесту – достоверно,  $p < 0,01$  ( $199,4 \pm 69,9$  с – самки и  $487,0 \pm 75,3$  с - самцы).

#### Влияние условий «обогащенной среды» на уровень нейрогенеза во взрослом мозге у мышей линий БМ и ММ.

Для оценки уровня нейрогенеза взрослого мозга в области зубчатой фасции гиппокампа и в пролиферативной зоне субвентрикулярной области (SVZ) в каждой из серий непосредственно сразу после теста на экстаполяцию использовали 12 мышей, по 3 мыши каждой из групп. Данные подсчета числа клеточных элементов, обнаруживших наличие белка Ki67 (маркера постмитотических клеток) представлены в табл. 13.

У мышей линии БМ, содержащихся в «обогащенных» условиях число новых клеток в зубчатой фасции гиппокампа в среднем не отличалось от такового мышей из стандартных условий. У мышей линии ММ из «обогащенных» условий таких клеток в гиппокампе было достоверно больше. Двухфакторный ANOVA продемонстрировал достоверное влияние на число новых клеток фактора линия,  $F_{1,107}=4,6$ ,  $p < 0,03$ , и условий содержания  $F_{1,18}=10,2$ ,  $p < 0,005$ ). Такой же характер различий был отмечен и для числа клеток в SVZ - у мышей ММ из "обогащенных" условий среднее число постмитотических клеток на срезе было больше, чем у мышей ММ из стандартных условий. В мозге мышей линии БМ различие между группами было сходным. Анализ числа новых клеток в условно выделенных областях SVZ - передней, средней и задней также позволил более четко продемонстрировать и межлинейные различия, и различия между группами с разными условиями содержания. Так, в переднем и среднем отделах SVZ мышей обеих линий число новых клеток было выше у животных содержащихся в «обогащенных» условиях, причем число таких клеток у ММ было достоверно больше, чем у БМ. Отметим, что в обеих сериях экспериментов по «обогащению» среды изменения в числе новых клеток были одинаковыми (табл. 14).

Следовательно, пребывание мышей в «обогащенных» условиях вызвало некоторую активацию процесса нейрогенеза в ростальной части SVZ как у БМ, так и у ММ. В то же время полученные данные свидетельствуют, что в целом число новых клеток (в стандартных и в «обогащенных» группах) было выше у мышей ММ.

Полученный результат оказался неожиданным и нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке, поскольку содержание в «обогащенной» среде оказало более сильное влияние на обучаемость и когнитивные функции, в частности на способность к решению задачи на экстаполяцию, мышей линии БМ. Это может означать, что

активирующий эффект «обогащения» среды имеет не один путь воздействия на физиологию ЦНС, хотя роль активации нейрогенеза взрослого мозга достаточно очевидна.

Таблица 14 .

Число новых клеток (среднее по срезу) в гиппокампе и SVZ у мышей линий БМ и ММ, после содержания в «обогащенных» или стандартных условиях.

Серия, группа, линия	Структура мозга			
	гиппокамп	SVZ		
		суммарно	Области SVZ	
1 серия БМ об	4,5±0,6 <sup>#</sup>	89,1±10,1	ростральная часть	53±8,1
			медиальная часть	150,6±7,6
			каудальная часть	47,3±7,8
1 серия БМ ст	5±0,6 <sup>#</sup>	103,1±10,5,	ростральная часть	61,9±14,9
			медиальная часть	131,1±13,3
			каудальная часть	44,5±3,2
1 серия ММ об	10,4±1,5 <sup>***</sup>	90,5±13,6	ростральная часть	70,7±8,2
			медиальная часть	158,5±15,4
			каудальная часть	91,6±11,4 <sup>##</sup>
1 серия ММ ст	6,3±0,6	116,8±11,3	ростральная часть	30,8±5,9
			медиальная часть	141,7±18,8
			каудальная часть	64,8±12,8 <sup>##</sup>
2 серия БМ об	3,96±0,71	Не подсчитывали		
2 серия БМст»	2,1±0,67	Не подсчитывали		
2 серия ММ об	6,19±0,52 <sup>***</sup> &&	Не подсчитывали		
2 серия ММ ст	2,6±0,74	Не подсчитывали		

Примечание: #, ## - различия достоверны при  $F_{1,107}=4,6$ ,  $p<0,03$  и  $F_{1,18}=10,2$ ,  $p<0,005$ , двухфакторный ANOVA, фактор «линия»; \*\*\* - различия достоверны при  $F_{1,107}=17,9$ ,  $p<0,00004$ , двухфакторный ANOVA, фактор «среда». Достоверно отличается, двухфакторный ANOVA (\*\*\*) фактор «среда»,  $F_{1,143} = 15,7$ ,  $p \leq 0,0001$ , &&- фактор «линия»  $F_{1,143}=6,3$ ,  $p \leq 0,01$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При селекции мышей на большой и малый относительный вес мозга оказалось, что ответ на отбор в «С1989-1999-гетероген» (также как в работе Н.В. Поповой и др., 1983) заключался преимущественно в более быстром снижении веса мозга в линии ММ. Ответ на отбор в виде увеличения веса мозга линии БМ был более умеренным. В то же время ход искусственного отбора в «С1999-2009-гибриды» был иным - вес мозга линии БМ увеличивался быстрее, чем в первых двух случаях, а по абсолютному значению этот показатель оказался выше, чем при других попытках селекции. Вес мозга мышей линии ММ в «С1999-2009-гибриды» был практически стабильным и мало изменился в поколениях отбора. Указанные различия в ходе наших двух экспериментов никогда ранее в литературе описаны не были. Объяснение этим результатам на сегодня может быть только гипотетическим. Основой для них является предположение, что гены, у которых есть аллели, повышающие вес мозга (над среднепопуляционным значением), и гены с «понижающими» аллелями относятся к разным группам и действуют независимо.

По нашему предположению, отсутствие изменений веса мозга у мышей в линии ММ в «С1999-2009-гибриды» может быть связано со следующими гипотетическими генетико-популяционными механизмами. В «С1989-1999-гетероген», когда в поколениях отбора вес мозга линии ММ заметно уменьшался, он достиг некоего естественного нижнего «предела», и генетическая изменчивость этой линии по данному признаку стала очень мала. Величины веса мозга линии БМ по причинам, которым пока нет объяснений, в этом селекционном эксперименте росли медленнее, чем снижались величины этого показателя у ММ. Поскольку

в «С1999-2009-гибриды» исходной популяцией для отбора были мыши-гибриды второго поколения от скрещивания БМ и ММ, то можно предположить следующее. У мышее ММ новой селекции генетическая изменчивость по аллелям, «понижающим» вес мозга, не изменилась (по сравнению с концом «С1989-1999-гетероген»), и это могло стать естественной причиной малого ответа на отбор в линии ММ. Возможно также, что рекомбинация генетического материала линий БМ и ММ при получении их гибридов позволила «снять» какие-то ограничения на увеличение веса мозга в линии БМ, что и обнаружилось в ходе дальнейшей селекции. Однако общим результатом обоих экспериментов было получение линий, достоверно различающихся по весу мозга. Каковы бы ни были генетические основы подобных различий, получение двух фенотипически различающихся линий БИ и ММ позволило сравнить влияние на поведение таких различий в весе мозга. По данным обоих селекционных экспериментов мыши линий БМ и ММ обнаружили устойчивые однонаправленные различия в обучаемости и в уровне тревожности. Было показано, что мыши линии БМ превосходили по способности к обучению мышей линии ММ, у них был выше уровень исследовательской активности, и они более целенаправленно исследовали незнакомое пространство в тесте крестообразного лабиринта. В тестах со стрессирующими воздействиями мыши БМ были склонны выбирать активную стратегию поведения. Мыши линии ММ, в свою очередь, характеризовались более высоким уровнем тревожности и стресс-реактивности, которая, в зависимости от контекста эксперимента, проявлялась у них либо в виде более высокой двигательной активности, либо в виде более длительной иммобилизации. При действии стрессирующей обстановки для них была характерна пассивная стратегия поведения.

У мышей линии БМ была выше способность к решению когнитивных задач - тестов на экстраполяцию направления движения пищевого стимула и на «поиск входа в укрытие». Данные наших селекционных экспериментов, в сопоставлении с данными, полученными ранее другими авторами (Попова и др. 1983; Fuller, Herman, 1974), говорят о неслучайном проявлении этих различий в поведении у мышей с разным весом мозга. Кроме того, полученные нами экспериментальные данные показали, что у мышей-гибридов второго поколения скрещивания между БМ и ММ сохраняется положительная корреляция между весом мозга и выраженностью исследовательского поведения (Salimov et al., 2004). Были также обнаружены межлинейные различия в поведении мышей линий БМ и ММ и их гибридов после введения этанола. Под влиянием этанола у мышей линии БМ повышалась исследовательская активность и развивалась толерантность к этому агенту, тогда как у мышей ММ обследование лабиринта замедлялось, и усиливалась стереотипия (Маркина и др., 2003). Также была выявлена поведенческая и морфологическая асимметрия у селектированных линий - предпочтение правой стороны (особенно у линии ММ) при решении тестов с пищевой мотивацией и у обеих линий масса правого гиппокампа больше, чем левого (особенно для линии ММ), а у линии БМ масса правой части коры мозга больше, чем левой (Маркина и др., 2003). (Этот материал подробнее освещен в диссертации).

В эксперименте по влиянию «обогащенной среды» изменения в поведении мышей и в нейрогенезе взрослого мозга были в большой степени «генотип-специфичными». Пребывание в этих условиях усилило интенсивность пролиферации клеток зубчатой фасции гиппокампа и пролиферативной зоны бокового желудочка, как у животных, подвергшихся «обогащению» среды во взрослом возрасте, так и у выросших там с рождения. После пребывания в «обогащенной среде» у мышей линии БМ были выше показатели теста на обучение и на пространственную память, а также выше способность к экстраполяции направления движения пищевого стимула (по сравнению с контрольными животными из стандартных клеток, а также с обеими группами мышей линии ММ). У мышей линии ММ после пребывания в «обогащенной среде» был выше, чем у контроля, уровень двигательной и исследовательской активности. После пребывания в больших клетках, где было много укрытий и тоннелей-переходов между отсеками, у мышей обеих линий повысился уровень тревожности, причем это усиление было более заметным у мышей линии БМ (в норме -

менее тревожной). Возможно именно это усиление пугливости мышей БМ после пребывания в «обогащенной» среде и помешало им адекватно выполнить тест «поиск входа в укрытие». Другим четким результатом пребывания в «обогащенной» среде было усиление в двигательной сфере у мышей линии ММ (более тревожны и в норме). Это выразилось в повышении использования активной стратегии поведения в стрессирующей обстановке теста «неизбегаемая скользкая воронка». Можно предположить, что за такую смену стратегии могла быть ответственной интенсификация нейрогенеза после «обогащения» среды, четко выраженная у мышей линии ММ (и более слабая у БМ).

В целом, результаты нашего исследования выявляют устойчивые, но тонкие корреляции между размером мозга и особенностями поведения (мозг/поведение) у животных одного вида. Эти корреляции могут видоизменяться при изменении условий, в которых пребывает животное. Можно предположить, что такая «средовая» модуляция межлинейных различий имеет значение в адаптации популяций к существованию в природных условиях.

## **ВЫВОДЫ**

1. Проведено два успешных селекционных эксперимента по созданию линий мышей, различающихся по относительному весу мозга. В каждом из экспериментов получено по 22 селекционных поколения. Вес мозга у мышей селектированных линий различался в среднем на 16 %.

2. Мыши, селектированные на большой вес мозга (БМ), обнаружили устойчивое превосходство над мышами, селектированными на малый вес мозга, в обучаемости пищедобывательному навыку и в решении когнитивных тестов. Уровень исследовательской активности был также выше у мышей с большим мозгом.

3. Мышам, селектированным на малый вес мозга (ММ), свойственен более высокий уровень тревожности, который устойчиво проявлялся в тестах: «открытое поле», «неизбегаемая скользкая воронка», приподнятый крестообразный лабиринт, фиксирование на высоте и в тесте Порсольта.

4. Содержание мышей с разным весом мозга в «обогащенных» условиях среды повысило уровень тревожности у животных обеих линий, что сопровождалось усилением использования активной стратегии в стрессирующей обстановке.

5. Мыши БМ, содержащиеся в «обогащенной среде», превосходили все остальные группы в тестах на способность к экстраполяции и способность к обучению, тогда как у мышей с малым мозгом после содержания в «обогащенных» условиях повысился уровень двигательной и исследовательской активности.

6. Пребывание мышей БМ и ММ в «обогащенных» условиях вызвало некоторую активацию процесса нейрогенеза взрослого мозга в двух пролиферативных зонах переднего мозга (зубчатой фасции гиппокампа и субвентрикулярной зоне бокового желудочка), выраженную более четко у мышей ММ.

7. Селекция мышей на вес мозга, воспроизведенная в двух экспериментах, продемонстрировала устойчивые коррелятивные изменения в поведении, выразившихся в более высоких когнитивных способностях у мышей БМ и в повышенной тревожности у мышей ММ.

Работа частично поддержана грантами РФФИ (№№ 98-04 48440 и №01-04 48290, 04-04-48445, 06-04-01287), РГНФ (№ 06-06-351а), а также грантом NCCR Neural Plasticity and Repair и IP 07 N 62645) Швейцарского национального научного фонда.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор глубоко признателен и благодарен своему научному руководителю И.И.Полетаевой за постоянное внимание, ценнейшие советы и помощь в работе. Также огромная благодарность Н.В. Маркиной за годы плодотворной совместной работы и Т.В.

Тимошенко и А.В. Ревещину за помощь в морфологической и иммуногистохимической части работы. Автор глубоко признателен М.Г. Плескачевой и Р.М. Салимову за предоставление компьютерных программ для обработки данных и коллегам по лаборатории зав. лабораторией З.А.Зориной, А.А. Смирновой, И.Б. Федотовой, П.А. Купцову за ценные советы и обсуждение результатов работы, а также огромная благодарность за разностороннюю помощь в проведении работы Л.Б. Есимовой, Ф.З. Магкоевой, Х.-П. Липу.

## **СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в рецензируемых журналах (Перечень ВАК)**

1. Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Салимов Р.М., Майский О.В., Полетаева И.И. Корреляция веса мозга и изменения поведения в ответ на введение этанола у лабораторных мышей. Ж-л Генетика, 2003, №39(6). С.826-830.
2. Салимов Р.М., Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Полетаева И.И., Майский О.В. Быстрая толерантность к этанолу и добровольное потребление больших доз алкоголя у мышей, селектированных по весу мозга. Журнал высш.нервн. деят., 2003, Т. 53. № 1. С.100-106.
3. Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Плеханова И.Л., Маркова Е.Г., Ревещин А.В., Полетаева И.И. Асимметрия поведения и морфологии мозга у мышей, селектированных по весу мозга. Журнал высш.нервн. деят., 2003, т. 53. № 2. С. 176-183.
4. Перепелкина О. В., Маркина Н.В., Полетаева И.И. Способность к экстраполяции направления движения у мышей, селектированных на большой и малый вес мозга: влияние пребывания в «обогащенной» среде. Журн. высш. нервн. деят. 2006. т.56. N 2.С.282-286.

### **Статьи в журналах (не входящих в список ВАК)**

1. Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Салимов Р.М., Полетаева И.И. Поведение гибридов мышей, селектированных на разный вес мозга. Рос. Физиол. Журн. 2004. Т.90. №8. С.184-185.
2. Salimov R.M., Markina N.V., Perepelkina O.V., Poletaeva I.I. Exploratory behavior of F2 crosses of mouse lines selected for different brain weight: a multivariate analysis. Progr. In Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry 2004, v.28, p.583-589.

### **Тезисы конференций**

1. Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Полетаева И.И. Асимметрия в поведении мышей, селектированных на вес мозга. Сб. XIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. Казань. 2001 С. 151.
2. Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Плеханова И.Л., Маркова Е.Г., Ревещин А.В., Полетаева И.И. Асимметрия поведения и морфологии мозга у мышей, селектированных на большой и малый вес мозга. Актуальные вопросы функц. межполушарной асимметрии. Всерос. конф., Москва, 2003, тез.докл. С. 170
3. Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Салимов Р.М., Майский О.В., Полетаева И.И. Корреляции веса мозга и изменений поведения в ответ на введение этанола у лабораторной мыши. Актуальные проблемы генетики // 2 конф. Моск. о-ва генет. и селекц. им. Н.И. Вавилова, Москва, 2003. С.260-261.
4. Перепелкина О. В., Пинигина Е.А. Влияние условий "обогащенной среды" на поведение мышей, селектированных на большой и малый вес мозга. Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2005" , 2005. С.174-175.

5. Perepelkina O., Pinigina E., Markina N., Poletaeva I. Environmental enrichment behavioural effects in mice, selected for large and small brain weight. 7th Annual meeting of IBANGS, Sitges, Spain, June 9-12, 2005. P.27.
6. Перепелкина О.В., Маркина Н.В., Полетаева И.И., Островская Р.У. Ноотропные свойства Ноопепта (ГВС-111) в тестах на способность к экстраполяции у мышей, селектированных на большой и малый вес мозга. 4-я Международная конференция «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». Материалы конференции, 13-16 марта. 2006. С. 59.
7. Перепелкина О.В., Маркина Н.В., Полетаева И.И., Салимов Р.М. Различные эффекты этанола у мышей с высокой и низкой эффективностью исследовательского поведения. 4-я Международная конференция «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». Материалы конференции, 13-16 марта. 2006. С. 58.
8. Перепелкина О. В., Маркина Н. В., Пинигина Е.А., Ревущин А. В., Тимошенко Т.В., Полетаева И.И. Селекция лабораторных мышей на большой и малый вес мозга-различия в поведении и морфологии переднего мозга, влияние обогащенных условий содержания. XX съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов. Москва 2007. С.370.
9. Перепелкина О. В., Тимошенко Т.В., Ревущин А. В., Полетаева И.И. Влияние условий «обогащенной среды» на уровень нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа у мышей селектированных на большой малый относительный вес мозга. Всероссийская конференция с международным участием памяти О.С. Виноградовой «Гиппокамп и память: норма и патология». Материалы конференции 25-28 июля, Пущино, 2009. С.51-52.