

На правах рукописи

Хоцкий Никита Валерьевич

**Пространственная память и обучение у мышей, различающихся по
предрасположенности к наследственной каталепсии: влияние нейротрофического
фактора мозга BDNF**

Физиология – 03.03.01

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., г.н.с. Куликов А.В.

Новосибирск, 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук"

Научный руководитель (консультант) д.б.н. Куликов Александр Викторович

Официальные оппоненты:

Резникова Жанна Ильинична, д.б.н., профессор, ИСиЭЖ СО РАН, зав. лаб. поведенческой экологии сообществ.

Лисачев Павел Дмитриевич, к.б.н. КТИ ВТ СО РАН, старший научный сотрудник.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «_____» _____ 2015 года на заседании диссертационного совета 001.014.01, на базе НИИФФМ, г.Новосибирск, улица Тимакова 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте

(название организации, на базе которой создан диссертационный совет, адрес сайта, на котором размещена диссертация и автореферат)

Автореферат разослан _____
(дата)

Ученый секретарь
диссертационного совета _____
(фамилия, имя, отчество - при наличии)

Обучение — это сложный процесс формирования нового поведения, и его изучение является очень важным для понимания функционирования нервной системы. Традиционно в экспериментальной науке этот процесс отождествляется с формированием некоего поведенческого акта. На протяжении своей жизни человек очень часто сталкивается с необходимостью научиться делать что-то новое, и способность к усвоению новой информации очень важна для нормального функционирования человека и его социального взаимодействия с другими людьми.

В основе механизмов обучения лежит способность живых организмов к запоминанию. Память — это одна из психических функций и видов умственной деятельности, предназначенная сохранять, накапливать и воспроизводить информацию, и ее нормальное функционирование абсолютно необходимо для любых видов деятельности. С увеличением средней продолжительности жизни человечество все чаще сталкивается с различными патологиями, сопровождающимися нейродегенеративными процессами, такими как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хаддингтона и многими другими (Аршавский, 2011). Поэтому для увеличения продолжительности активной интеллектуальной жизни человека очень важно изучать механизмы возникновения подобных заболеваний и искать способы их коррекции.

Каталепсия — это состояние обездвиженности, характеризующееся пластическим тонусом мускулатуры, при котором животное или человек могут длительное время сохранять приданную им неудобную позу. Выраженные ее формы часто сопровождают такие заболевания как шизофрения, болезнь Паркинсона и экстрапирамидальные дисфункции (Caroff et al., 2000; Daniels, 2009; Lee, 2007, 2010; Paparrigopoulos et al., 2009; Weder et al., 2008).

У лабораторных мышей наследственная каталепсия является очень редким явлением и не наблюдается у животных наиболее распространенных инбредных линий, таких как C57BL/6, DBA/2 или AKR. В то же время около половины мышей линии CBA/Lac имеют предрасположенность к каталепсии (Kulikov et al., 1993).

Главный локус каталепсии, расположенный в 106-116 м.п.о. фрагменте хромосомы 13, был перенесен из генома CBA в геном AKR, и была создана рекомбинантная линия AKR.CBA-D13Mit76. Около 50% мышей этой линии проявляют предрасположенность к каталепсии (Kulikov et al., 2008).

Существуют доказательства связи наследственной каталепсии с нейровоспалительными и нейродегенеративными процессами: наследственная каталепсия сопровождается уменьшением объема гипофиза, гипоталамуса и стриатума (Tikhonova et al., 2013). Провоспалительные агенты, такие как бактериальный липополисахарид (ЛПС) (Vazhenova et al., 2013) и интерлейкин-6 (IL-6) (Bazovkina et al., 2011), вызывают каталепсию у мышей.

Показано участие серотониновой системы мозга в механизме наследственной каталепсии (Попова, 2004). Крысы линии ГК (генетическая каталепсия) (Kulikov et al., 1992) и мыши каталептической линии CBA (Kulikov et al., 1995) характеризуются повышенной активностью ключевого фермента синтеза серотонина в мозге — триптофангидроксилазы 2. Была выявлена однолокусная мутация C1473G в гене триптофангидроксилазы 2, снижающая активность фермента в мозге мышей, гомозиготных по G аллелю (Zhang et al., 2004; Kulikov et al., 2005; Osipova et al., 2010). Были получены конгенные линии мышей B6-1473C и B6-1473G, соответственно с высокой и низкой активностями фермента в мозге (Osipova et al., 2009; Kulikov et al., 2011).

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) имеет решающее значение для развития, выживания и пластичности нейронов (Binder and Scharfman, 2004; McAllister et al., 1999; Thoenen, 1995). Нейродегенеративные процессы часто связаны с дефицитом BDNF (Duman, 2002). Ранее было показано антикаталептическое действие

внутри мозгового введения BDNF мышам (Тихонова и др., 2009; Naumenko et al., 2012; Tikhonova et al., 2012).

Тест водного лабиринта Морриса (ВЛМ) является одним из основных для изучения процессов формирования обучения и пространственной памяти, а также их нарушений (D'Hooge and De Deyn, 2001). Провоспалительные агенты, такие как ЛПС и IL-1 β , нарушают обучение в тесте ВЛМ (Arai et al., 2001; Oitzl et al., 1993; Sparkman et al., 2005a, 2005b). Другой провоспалительный цитокин – IL-6 ухудшает обучаемость (Wei et al., 2012) и усиливает индуцированное ЛПС нарушение рабочей памяти в тесте ВЛМ (Sparkman et al., 2006).

Несмотря на то, что BDNF, несомненно, участвует в формировании долговременной памяти (Lu et al., 2008; Waterhouse and Xu, 2009), данные о его влиянии на формирование и сохранение памяти в тесте ВЛМ противоречивы (Blaha et al., 2000; Cirulli et al., 2004).

Учитывая связь наследственной катаlepsии с нейродегенеративными и воспалительными процессами в мозге, можно ожидать нарушения обучения и памяти в ВЛМ у животных с наследственной катаlepsией. Более того, учитывая выраженное антикатаlepsическое действие BDNF и ключевую роль этого нейротрофина в механизме поддержания пластичности в нервной системе, можно предполагать положительное действие BDNF на обучение и память в ВЛМ у животных с наследственной катаlepsией.

Целью данной работы было изучение связи способности к обучению и формированию пространственной памяти с наследственной предрасположенностью к катаlepsии, экспрессией провоспалительных цитокинов и BDNF, активностью триптофангидроксилазы 2 в мозге у мышей, а также возможности коррекции нарушений обучения и памяти у катаlepsиков при помощи экзогенного BDNF.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать методику автоматического тестирования пространственной памяти и способности к обучению у мышей в ВЛМ и сделать возможным автоматическую трассировку белых мышей на белом фоне.

2. Сравнить способности к обучению и память в ВЛМ у мышей, различающихся по предрасположенности к катаlepsии линий.

3. Изучить влияние введения BDNF на наследственные нарушения процессов памяти и обучения в ВЛМ у мышей с наследственной предрасположенностью к катаlepsии.

4. Исследовать связь между уровнем мРНК генов *Il-1 β* , *Il-6*, *Bdnf* и выполнением теста ВЛМ, а также оценить влияние введения BDNF на экспрессию этих генов в мозге животных.

5. Выяснить влияние мутации C1473G, снижающей активность триптофангидроксилазы 2, на обучение в ВЛМ.

Научная новизна

Разработана оригинальная методика автоматической трассировки животных в тесте ВЛМ с инвертированным освещением, позволяющая трассировать белое животное на белом фоне.

Впервые показана связь предрасположенности к наследственной катаlepsии с нарушенной способностью к обучению в ВЛМ у мышей рекомбинантной линии AKR.CBA-D13Mit76.

Впервые установлено, что BDNF способен корректировать наследственные нарушения процесса обучения и формирования пространственной памяти у мышей рекомбинантной линии AKR.CBA-D13Mit76.

Научно-практическая ценность

Создан оригинальный программно-аппаратный комплекс для автоматического тестирования пространственной памяти и способности к обучению в тесте ВЛМ, который позволяет надежно трассировать перемещение животного вне зависимости от его окраса. Данный комплекс имеет большую практическую ценность для автоматизации поведенческих исследований и реализован в ряде вивариев на территории России.

Изучено влияние наследственной каталепсии на процессы формирования обучения в ВЛМ у мышей и показано снижение способности к пространственному обучению у мышей линии AKR.CBA-D13Mit76.

Показано, что однократное внутримозговое введение BDNF способно улучшать обучение и память ВЛМ у мышей линии AKR.CBA-D13Mit76. Этот факт свидетельствует о перспективности BDNF для лечения нейродегенеративных расстройств.

Мыши линии AKR.CBA-D13Mit76 являются новой и перспективной моделью для изучения генетико-молекулярных механизмов нарушения обучения и памяти и поиска способов их фармакологической коррекции.

Полученные данные используются в курсе «Молекулярные механизмы поведения» для магистрантов факультета естественных наук Новосибирского госуниверситета.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика тестирования пространственной памяти и способности к обучению в ВЛМ с обращенным освещением позволяет надежно трассировать перемещение животного вне зависимости от его окраса.

2. У мышей рекомбинантной линии AKR.CBA-D13Mit76 выявлены значительные нарушения в процессе обучения в ВЛМ.

3. Показано увеличение уровня мРНК *Il-6* в гиппокампе и коре и *Il-1 β* в коре у мышей каталептической линии AKR.CBA-D13Mit76 по сравнению с животными некаталептической линии AKR.

4. Нейротрофический фактор BDNF способен нормализовать наследственные нарушения памяти и обучения в ВЛМ у мышей AKR.CBA-D13Mit76.

Апробация работы

Материалы данной работы были доложены и обсуждены на Международных студенческих конференциях (Новосибирск, 2012, 2013), Пущинской школе-конференции молодых ученых (Москва, 2013), VII Сибирском физиологическом съезде (Красноярск, 2012), VI съезде ВОГиС (Ростов-на-Дону, 2014), Конференции FENS (Милан, Италия, 2014).

Публикации

Материалы диссертации представлены в 9 публикациях, в том числе в трех статьях в отечественных (1) и зарубежных (2) реферируемых журналах.

Соавторство и благодарности

Все эксперименты по изучению поведения и определения уровня экспрессии генов проведены лично автором. Автор совместно с к.т.н. Куликовым В.А. (ФГБУН Институт автоматизации и электрометрии СО РАН) участвовал в тестировании программно-аппаратного комплекса EthoStudio. Автор благодарит асп. Фурсенко Д.В. за помощь в проведении экспериментов и д.б.н. Науменко В.С. за помощь с введением BDNF в мозг.

Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю, Куликову А.В. за терпение и неоценимую помощь в написании этой работы.

Структура и объем работы

Работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы (163 источника). Общий объем составляет 84 машинописных листа. Включает девять оригинальных рисунков и одну таблицу.

1. Материалы и методы

1.1. Животные

Эксперименты проводились на половозрелых самцах мышей линий AKR/J, C57BL/6/J (B6), CBA/Lac, рекомбинантной линии AKR.CBA-D13Mit76, конгенных линий B6-1473C, B6-1473G и беспородных мышах. Рекомбинантная линия AKR.CBA-D13Mit76 была создана в лаборатории нейрогеномики поведения ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН посредством переноса дистального фрагмента хромосомы 13, содержащего главный локус каталепсии, от CBA в геном AKR (Kulikov et al., 2008). Конгенные линии B6-1473C и B6-1473G были созданы в лаборатории нейрогеномики поведения ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН переносом G аллеля, снижающего активность триптофангидроксилазы 2, от мышей линии C57Br в геном C57BL/6 (Osipova et al., 2009; Kulikov et al., 2011). Все мыши были в возрасте 8-10 недель, весили 25 ± 2 г и содержались в стандартных лабораторных условиях при естественном дневном цикле (12 ч день и 12 ч ночь), при температуре окружающей среды $22 \pm 0.2^\circ\text{C}$ со свободным доступом к воде и пище. За три дня до начала эксперимента мыши были рассажены в отдельные клетки, чтобы снизить «эффект группы». Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с Директивой Совета Европейских Сообществ от 24 ноября 1986 (86/609/ЕЕС). Были предприняты все усилия, чтобы минимизировать количество используемых животных и их страдания.

1.2. Эксперименты

Первый эксперимент являлся методическим и был направлен на изучение влияния окраса животного на возможность автоматической его трассировки в водном лабиринте Морриса с инвертированным освещением. Для этого были взяты по 10 самцов линии C57BL/6 (черного окраса) и беспородных (альбинос) и были построены кривые их обучения в ВЛМ.

Во втором эксперименте исследовали влияние C1473G полиморфизма в гене триптофангидроксилазы 2 на обучение в ВЛМ. Для этого сравнивали динамику обучения у мышей конгенных линий B6-1473C и B6-1473G. Было исследовано по 10 животных каждой линии.

Целью третьего эксперимента было сравнение влияния наследственной предрасположенности к каталепсии на способность к обучению и приобретению пространственной памяти в тест ВЛМ. Для этого у самцов устойчивой к каталепсии линии AKR и каталептических линий CBA и AKR.CBA-D13Mit76 в течение четырех последовательных дней изучали динамика обучения в ВЛМ, а на пятый проводили ретест для оценки закрепления следов пространственной памяти. Было исследовано по 10 животных от каждой линии.

Целью четвертого эксперимента было изучение различий в уровне уровня мРНК генов *Il-1 β* , *Il-6* и *Bdnf* в головном мозге у мышей линий AKR, CBA и AKR.CBA-D13Mit76. Для этого были отобраны три группы интактных самцов линий AKR (n=15), CBA (n=16) и AKR.CBA-D13Mit76 (n=15). Они были декапитированы, быстро на холоде были выделены гиппокамп и кора головного мозга, заморожены в жидком азоте и хранили при -70°C до экстракции РНК.

В пятом эксперименте исследовали действие BDNF на способность к обучению и память в ВЛМ у мышей линии AKR.CBA-D13Mit76. Двадцать шесть самцов линии

AKR.CBA-D13Mit76 были разделены на две группы, одной из которых был введен BDNF (14 животных), а другой – физиологический раствор (12 животных). Спустя семь дней после введения в течение четырех последовательных дней животных обеих групп тестировали на способность обучения в ВЛМ, а на пятый проводили ретест для оценки закрепления следов пространственной памяти. Через четырнадцать дней после введения BDNF животные были декапитированы, быстро на холоде были выделены гиппокамп и кора головного мозга, заморожены в жидком азоте и хранили при -70°C до экстракции РНК.

Человеческий рекомбинантный BDNF (5 мкг, Sigma-Aldrich, США) разбавляли в 85 $\mu\text{л}$ стерильного физиологического раствора и вводили боковой желудочек в дозе 300 нг в 5 $\mu\text{л}$. Контрольной группе животных вводили 5 $\mu\text{л}$ стерильного физиологического раствора в боковой желудочек (Naumenko et al., 2012; Tikhinova et al., 2012).

1.3. Водный лабиринт Морриса

В работе был впервые разработан и сконструирован ВЛМ с проходящим (обращенным) освещением, когда свет проходит снизу через воду и затем попадает в видеокамеру. При таком освещении мыши вне зависимости от окраса выглядят как темные силуэты на светлом фоне (Рис.1). Тест проводили в две стадии: обучение и ретест. В ходе обучения животное в течение 4 последовательных дней обучали находить скрытую под водой платформу. Для этого животное помещали в воду в фиксированной точке (у края бака на границе II и III четвертей) и давали ему возможность искать платформу в течение не более 60 с. Независимо от успеха, животное помещалось на платформу на 15 с для осуществления

положительного подкрепления и обозначения местоположения платформы. Каждый из тренировочных дней включал три последовательных попытки с интервалом 60 с. Успешность обучения оценивали по уменьшению латентного времени (с) нахождения платформы, расстояния (см), пройденного животным до платформы, и суммы расстояний (см) между мышью и платформой. По каждому дню считались средние показатели из всех трех тестовых процедур. На пятый день проводился «ретест» - платформа убиралась, и мышь выпускалась в установку так же три раза по 60 с каждый. Память оценивали по доле времени нахождения (%) и пройденного пути (%) в целевом секторе и по суммарному расстоянию между мышью и платформой (см). Если мышь помнит место нахождения платформы, то она будет больше время проводить в целевом секторе и кружиться недалеко от предполагаемого места платформы.

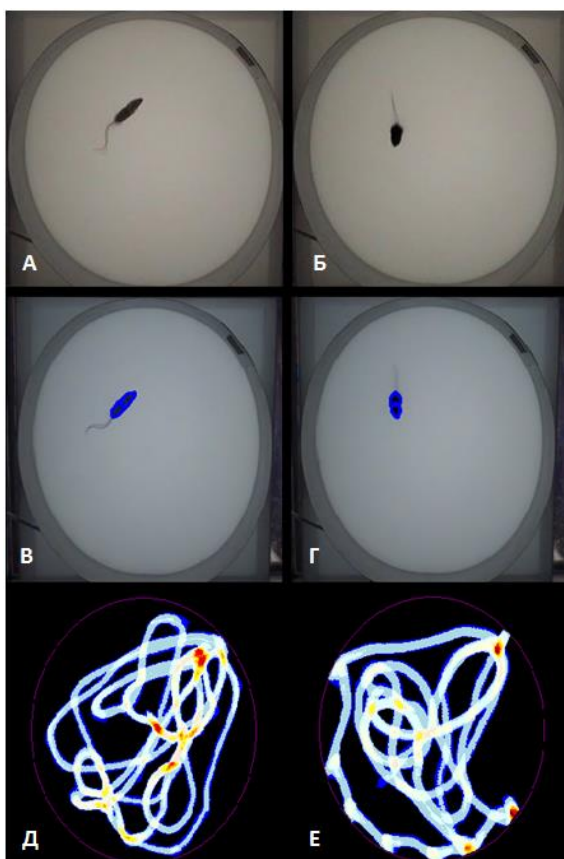


Рис. 1 Силуэты (А,Б), построенные EthoStudio контуры (В,Г) и карты плотности (Д,Е) мышей белой (левая панель) и черной (правая панель) окраски.

1.4. ОТ- ПЦР

Уровень экспрессии генов *Bdnf*, *Il-1 β* и *Il-6* определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР реального времени с использованием геномной ДНК мыши в качестве внешнего стандарта для калибровки флуоресценции и мРНК ДНК-зависимой РНК полимеразы 2 (*Polr2a*) в качестве внутреннего стандарта, SYBR Green I в качестве интеркалирующего флуорофора (Kulikov et al., 2014). Все анализы проводили в трех повторах и средние значения были рассчитаны. Экспрессия генов оценивалась по количеству копий мРНК на 100 копий мРНК гена *Polr2a*.

1.5. Статистический анализ

Значения представлены как средние \pm ошибка средних и анализировались с помощью двухфакторного ANOVA для повторных измерений (ВЛМ) или однофакторного ANOVA (ОТ-ПЦР) с последующим сравнением по Фишеру. Время и путь в секторах водного лабиринта Морриса выражали в процентах и сравнивали со случайным посещением (25%) с помощью одностороннего критерия Стьюдента ($\alpha = 0.1$) с последующей коррекцией уровня значимости по методу Бонферрони. Уровень мРНК генов в структурах головного мозга у животных, подвергшихся введению физиологического раствора, сравнивался с интактными животными при помощи t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

2. Результаты и обсуждение

2.1 Сравнение способности к обучению в водном лабиринте Морриса у мышей линий В6-1473С и В6-1473G

Мыши линий В6-1473С и В6-1473G хорошо обучались в тесте водного лабиринта Морриса. Значения латентного времени ($F_{3,45}=10.48$, $p < 0.000024$) пройденного пути ($F_{3,45}=48.63$, $p < 0.0000001$) и суммы расстояний ($F_{3,45}=13.64$, $p < 0.000002$) у мышей линий В6-1473С и В6-1473G прогрессивно уменьшались в процессе обучения (Рис.2). Не выявлено статистически достоверных различий между мышами линий В6-1473С и В6-1473G по величине латентного времени ($F_{1,15} < 1$) и сумме расстояний ($F_{1,15} < 1$), однако мыши этих линий существенно отличались по величине пройденного пути ($F_{1,15} = 6.62$, $p = 0.021$). Различие между мышами по величине пройденного пути связано с тем, что мыши линии В6-1473С в первый день обучения проходили большее расстояние до платформы по сравнению с животными В6-1473G ($p = 0.0022$). Однако это увеличение пройденного пути у мышей линии В6-1473С не связано с генетически обусловленной их подвижностью, так как не было обнаружено влияние генотипа ($F_{1,15} < 1$), дня тестирования ($F_{3,45}=1.56$, $p > 0.05$) или их взаимодействия ($F_{3,45} < 1$) на скорость передвижения мышей.

Таким образом С1473G полиморфизм и связанные с ним изменения активности ТПГ2, по-видимому, не влияли на обучение мышей в ВЛМ.

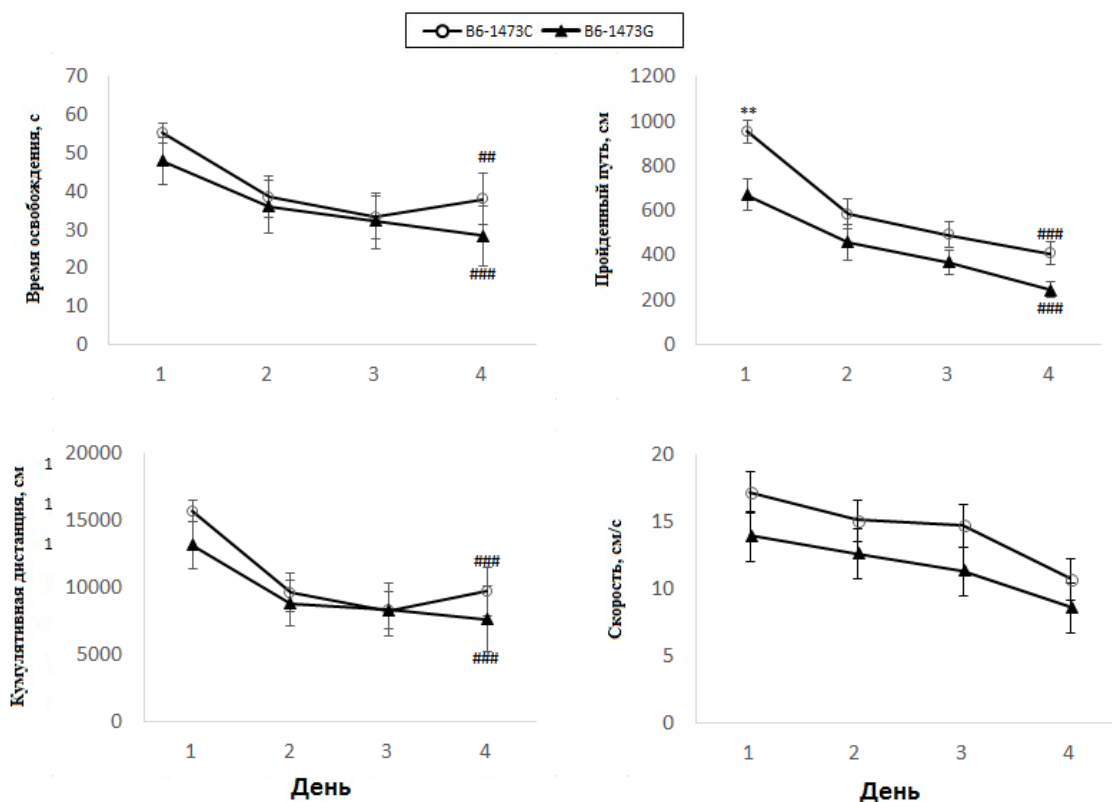


Рис.2. Динамика изменения латентного времени (с), пройденного пути (см), суммарной дистанции от платформы (см) и скорости движения (см/с) в процессе обучения у мышей линий B6-1473C и B6-1473G
 ** $p < 0.01$ по сравнению с B6-1473G. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ по сравнению с первым днем обучения.

2.2 Динамика обучения и сохранение памяти о положении платформы у мышей устойчивой к катаlepsии линии AKR и катаlepsических линий CBA и AKR.CBA-D13Mit76.

Динамика обучения у данных линий представлена на Рис.3. Анализ динамики обучения выявил достоверные различия между днями проведения теста для времени освобождения ($F_{3,78}=8.38$, $p < 0.001$), пути ($F_{3,78}=16.97$, $p < 0.001$), кумулятивной дистанции ($F_{3,78}=11.32$, $p < 0.001$) и скорости ($F_{3,78}=5.72$, $p < 0.01$). В то же время, статистическое значимое влияние фактора линия было выявлено только для пройденного пути ($F_{2,26}=3.64$, $p < 0.05$) и суммарной дистанции до платформы ($F_{2,26}=3.76$, $p < 0.05$). Не было выявлено статистически значимого влияния взаимодействия линия \times день на латентное время ($F_{6,28} < 1$), пройденный путь ($F_{6,28}=1.41$; $p > 0.05$) и суммарное расстояние от платформы ($F_{6,28} < 1$).

Обнаружено уменьшение времени, пути, кумулятивной дистанции и скорости на четвертый день по сравнению с первым для линий CBA ($p < 0.001$ для времени, $p < 0.001$ для пути, $p < 0.001$ для дистанции и $p < 0.01$ для скорости) и AKR ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.01$ и $p < 0.05$, соответственно). В свою очередь, животные линии AKR.CBA-D13Mit76 не продемонстрировали уменьшения этих параметров на четвертый день в сравнении с первым. Этот результат может свидетельствует о том, что главный ген катаlepsии снижает способность к обучению у мышей AKR.CBA-D13Mit76 по сравнению с AKR.

В течении ретеста животные линий AKR и AKR.CBA-D13Mit76 не демонстрируют предпочтения к целевой четверти, отличного от случайных 25% (Рис.4). В то же время CBA демонстрируют предпочтение ко второй четверти ($p = 0.009$) и избегают четвертую ($p = 0.0001$). Сравнение целевой и противоположной четвертей не выявило какого-либо эффекта генотипа ($F_{2,26} < 1$ для времени и пути) и взаимодействия четверть \times генотип ($F_{2,26}$

= 1.6 для времени, $F_{2,26} = 2.4$ для пути, $p > 0.05$). В то же время, было выявлено значительное влияние четверти ($F_{1,26} = 14.2$ для времени $F_{1,26} = 26.7$ для пути, $p < 0.001$). СВА проводят меньше времени ($p = 0.002$) и проходят меньший путь ($p = 0.0003$) в целевой четверти, по сравнению с соседними. АКР проходят меньший путь ($p = 0.0003$) в соседних с противоположной четвертях ($p = 0.002$). Разницы по показателю кумулятивной дистанции не было обнаружено для СВА (191142.5 ± 528.4 см), АКР (18483.5 ± 557.0 см) и АКР.СВА-D13Mit76 (18857.4 ± 528.4 см, $F_{2,26} < 1$).

По-видимому, четырех дней недостаточно, чтобы мыши исследуемых линий запомнили место расположения платформы.

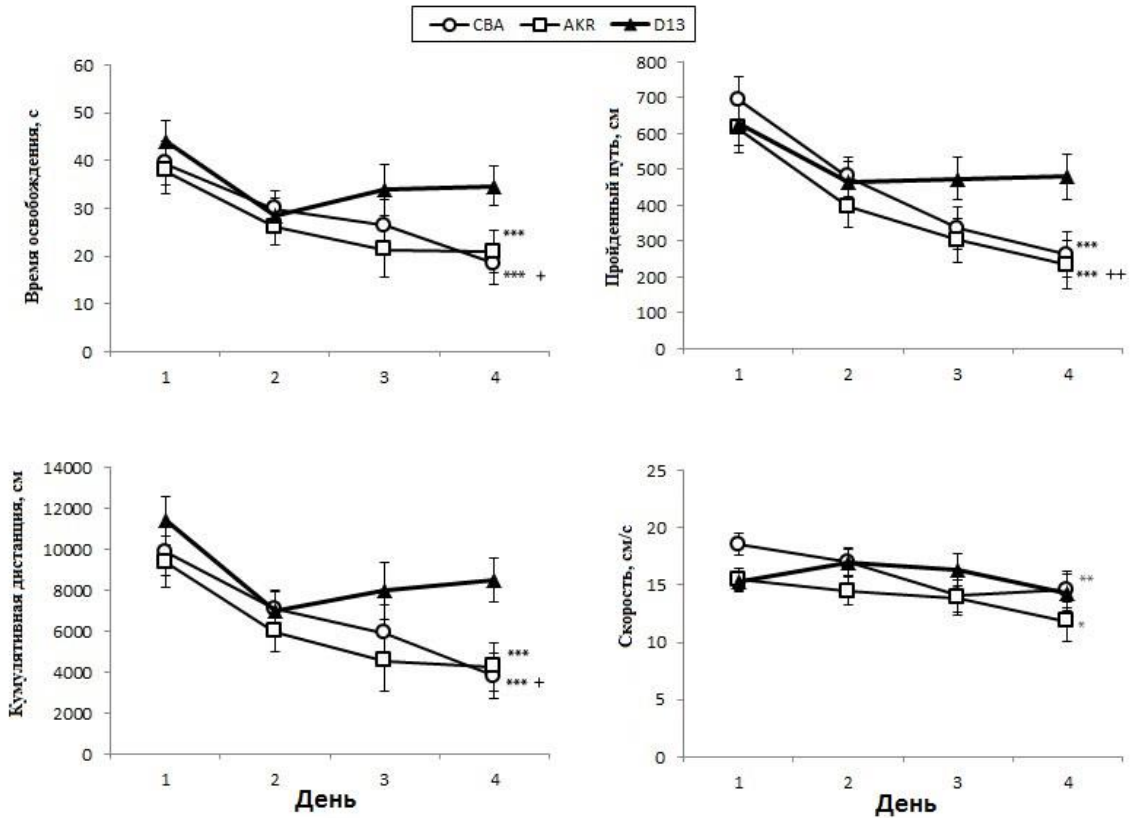


Рис. 3 Динамика изменения латентного времени (с), пройденного пути (см), суммарной дистанции от платформы (см) и скорости движения (см/с) у мышей линий СВА, АКР и АКР.СВА-D13Mit76 (D13). Каждая точка – среднее значение по группе.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с первым днем; + $p < 0.05$ по сравнению с АКР.СВА-D13Mit76 (D13)

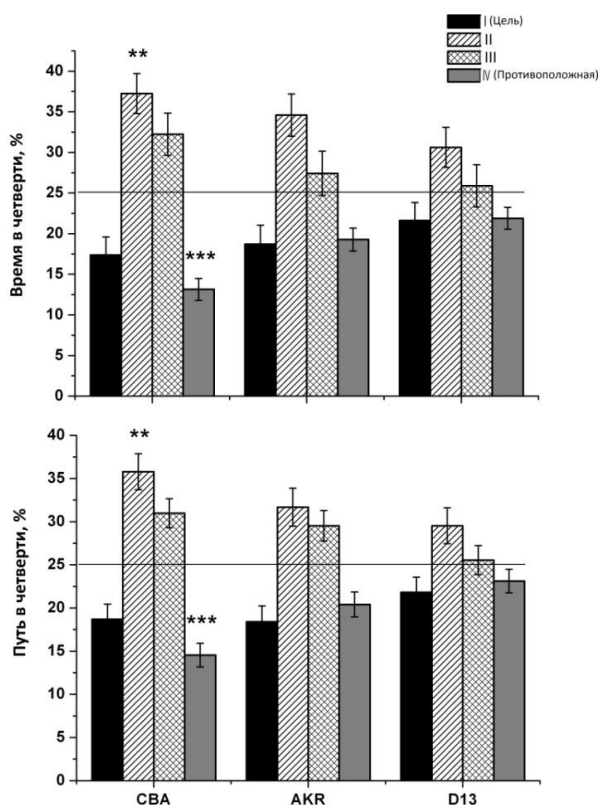


Рис. 4. Время пребывания и пройденный путь в секторах ВЛМ в ретесте у мышей линий СВА, АКР и АКР.СВА-D13Mit76 (D13)

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению со случайным шансом (25%)

2.3 Уровень экспрессии мРНК *Bdnf*, *Il-1b* и *Il-6* у интактных животных линий АКР, СВА и АКР.СВА-D13Mit76.

Уровень мРНК генов в коре и гиппокампе у мышей трех исследованных линий показан на Рис.5.

Не выявлено статистически достоверных различий по уровню экспрессии гена *Bdnf* в коре ($F_{2,19} < 1$) и в гиппокампе ($F_{2,19} = 1.06$, $p > 0.05$) у мышей трех исследованных линий (Рис.5).

Мыши трех линий не различались между собой по уровню мРНК гена *Il-1b* в гиппокампе ($F_{2,42} = 1.32$, $p > 0.05$). В то же время, было обнаружено статистически достоверное влияние генотипа на уровень мРНК этого гена в коре ($F_{2,40} = 3.24$, $p < 0.05$). Концентрация мРНК гена *Il-1b* в коре мышей каталептических линий АКР.СВА-D13Mit76 ($p = 0.02$) и СВА ($p = 0.05$) значительно выше по сравнению с животными устойчивой к каталепсии линии АКР (Рис.5).

Были выявлены значительные межлинейные различия у интактных животных в уровнях мРНК *Il-6* в гиппокампе ($F_{2,43} = 4.43$, $p < 0.05$) и коре ($F_{2,41} = 8.64$, $p < 0.001$). Уровень мРНК *Il-6* у животных линии АКР.СВА-D13Mit76 был выше как в гиппокампе, так и в коре по сравнению с таковым у мышей линии АКР ($p < 0.01$ в коре, $p < 0.01$ в гиппокампе) или СВА ($p < 0.01$ в коре, $p < 0.05$ в гиппокампе) (Рис.5).

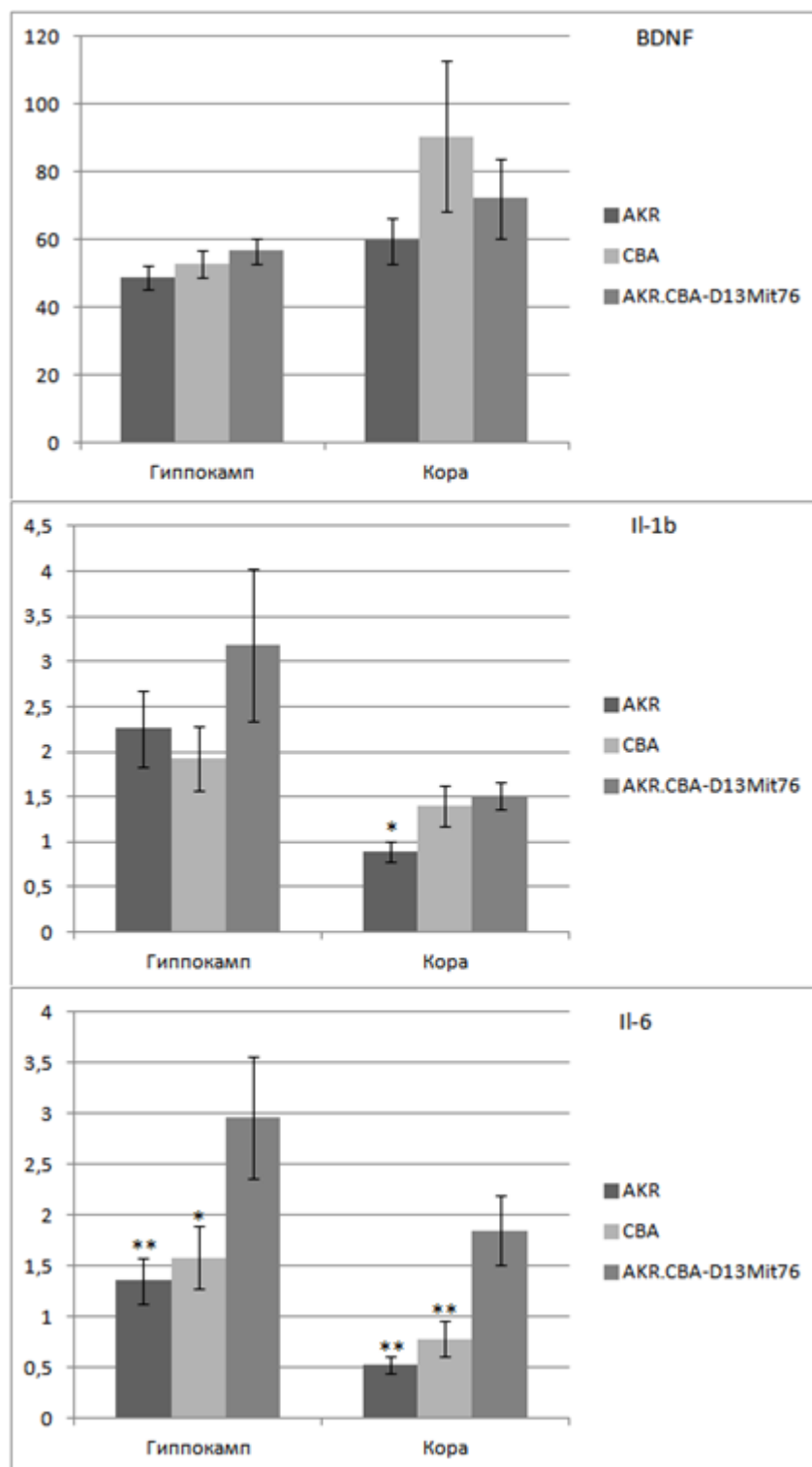


Рис.5 Уровень мРНК генов *Bdnf*, *Il-1b* и *Il-6* у интактных животных линий AKR, CBA и AKR.CBA-D13Mit76.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с линией AKR.CBA-D13Mit76

2.4 Влияние BDNF на поведение и уровень мРНК генов *Bdnf*, *Il-1 β* и *Il-6* в головном мозге мышей линии AKR.CBA-D13Mit76 при выполнении водного лабиринта Морриса.

В течении обучения не было выявлено влияния BDNF ($F_{1,24}=2.6$, $p>0.05$), дня ($F_{1,24}=1.6$, $p>0.05$) или взаимодействия этих факторов ($F_{1,24}=1.2$, $p>0.05$) на показатель латентного времени освобождения. В то же время, было показано значительное влияние BDNF ($F_{1,24}=5.6$, $p<0.05$), но не дня ($F_{1,24}=1.8$, $p>0.05$) или их взаимодействия ($F_{1,24}<1$) на продолжительность пути, а также значительный эффект фактора дня на показатель кумулятивной дистанции ($F_{1,24}=2.76$, $p<0.05$). Мыши, находящиеся под воздействием BDNF, значительно уменьшают свой путь ($p<0.05$) и кумулятивную дистанцию ($p<0.01$) на четвертый день по сравнению с первым, тогда как у контрольных мышей не выявлено снижения величины кумулятивной дистанции в процессе обучения (Рис.6). Скорость движения у мышей с введением BDNF достоверно увеличивается на четвертый день в сравнении с первым ($p<0.01$) (Рис. 6).

При выполнении задачи на сохранение памяти как контрольные ($p=0.008$), так и с введением BDNF ($p=0.005$) животные линии AKR.CBA-d13Mit76 продемонстрировали предпочтение второй четверти. Так же животные, которым вводили BDNF, избегают четвертую четверть ($p=0.005$). Сравнение целевой и противоположной четверти не выявили какого-либо эффекта препарата ($F_{1,24} < 1$ для времени $F_{1,24} = 1.2$, $p>0.05$ для дистанции) или четверти ($F_{1,24}= 2.8$, $F_{1,24}= 2.9$, $p>0.05$). В то же время, значительный эффект взаимодействия показателей препарата и четверти был выявлен ($F_{1,24} = 4.42$, $p<0.05$ для времени, $F_{1,24} = 4.52$, $p<0.011$ для пути). Однократное введение BDNF увеличивает время ($p = 0.024$) и путь ($p = 0.006$) в целевой четверти по сравнению с контрольными животными (Рис.7). Показатель кумулятивной дистанции у экспериментальной группы (18146.8 ± 415.4 см) значительно меньше, чем у контрольных животных (19931.9 ± 448.7 см, $F_{1,24} = 8.5$, $p = 0.0075$). Таким образом, экзогенный BDNF существенно увеличивал способность к обучению и формированию памяти в ВЛМ

Не было обнаружено различий в уровне мРНК гена *Il-6* в коре ($F_{1,11}<1$) и гиппокампе ($F_{1,11}<1$) у животных, которым вводили физиологический раствор или BDNF в желудочки мозга (Рис.8). Более того, уровень мРНК *Il-6* как в коре ($t_{19} = 1.65$, $p>0.05$), так и в гиппокампе ($t_{19} = 0.89$, $p>0.05$) у мышей AKR.CBA-D13Mit76, которым вводили физиологический раствор в боковые желудочки мозга, не отличаются от интактных животных

Уровень экспрессии мРНК генов *Bdnf* и *Il-1 β* также не различается у контрольных и получавших BDNF как в гиппокампе ($F_{1,11}<1$), так и в коре ($F_{1,11}= 1.76$; $p>0.05$ для *Bdnf* и $F_{1,11}= 1.6$; $p>0.05$ для *Il-1 β*). (Рис.8)

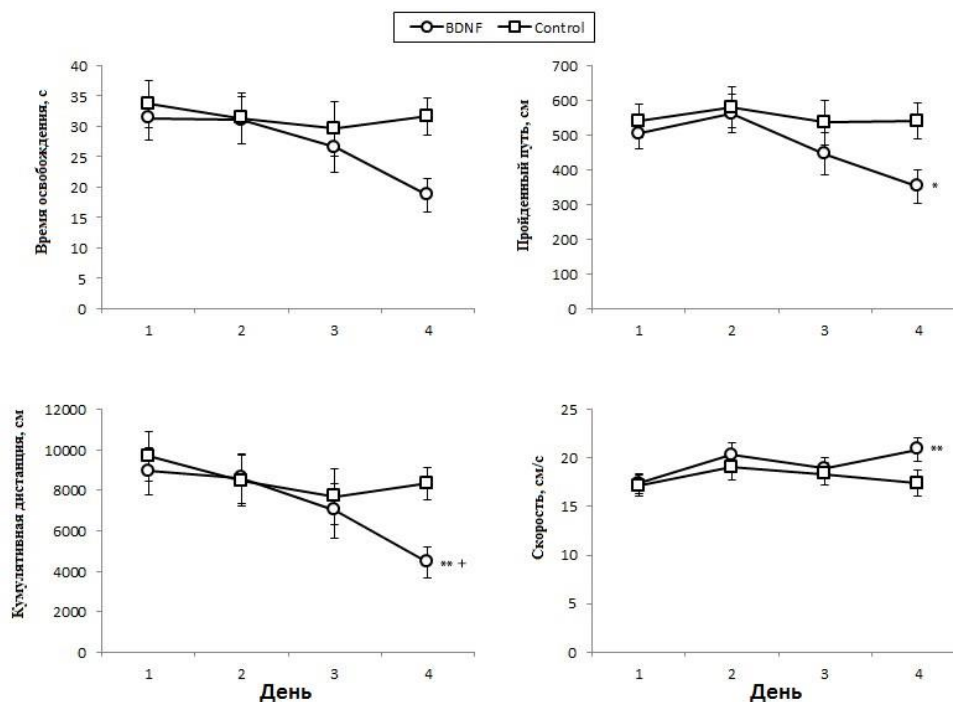


Рис. 6 Динамика изменения латентного времени (с), пройденного пути (см), суммарной дистанции от платформы (см) и скорости движения (см/с) у контрольной и экспериментальной групп мышей линии AKR.CBA-D13Mit76. Каждая точка – среднее значение по группе.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с первым днем; + $p < 0.05$ по сравнению с контролем

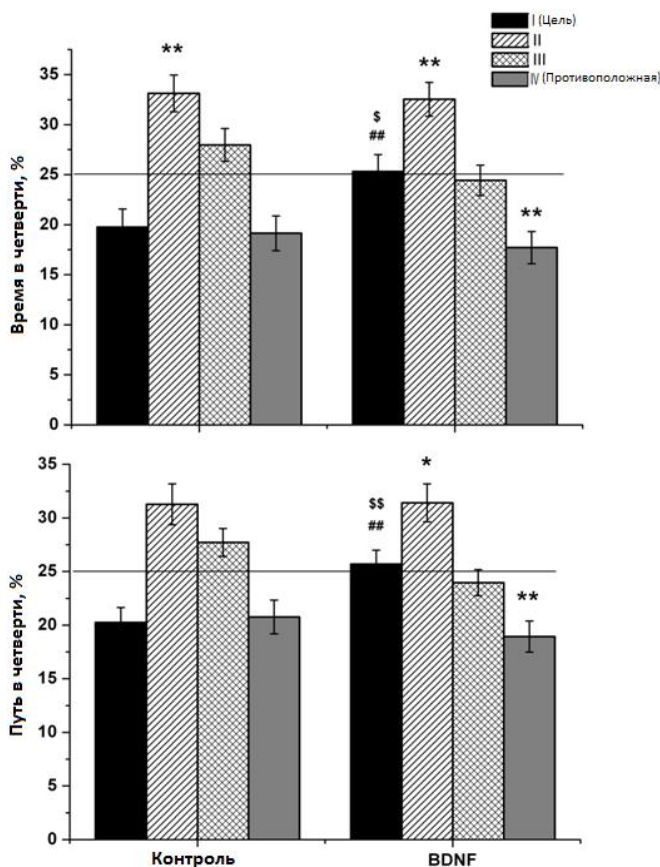


Рис. 7 Время пребывания и пройденный путь в секторах водного лабиринта Морриса в ретесте у контрольной и экспериментальной групп мышей линии AKR.CBA-D13Mit76.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со случайным (25%); \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ по сравнению с группой с физраствором; ## $p < 0.01$

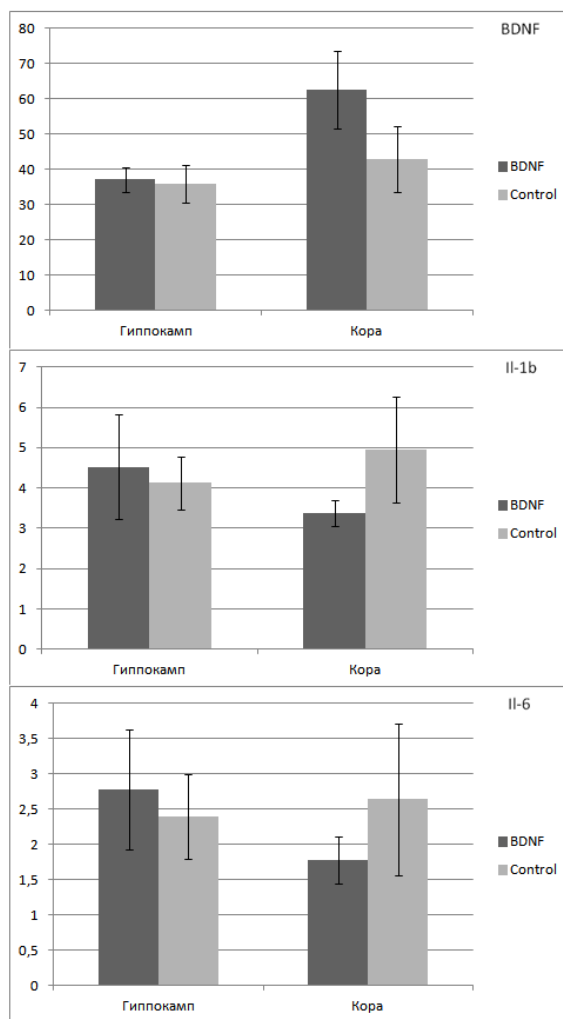


Рис.8 Уровень мРНК генов *Bdnf*, *Il-1b* и *Il-6* у животных линии AKR.CBA-D13Mit76 через 14 дней после внутримозговое введение BDNF или физиологического раствора.

Заклучение

В ходе работы была значительно модифицирована техника трассировки мышей в водном лабиринте Морриса: была разработана принципиально новая установка с обращенным освещением, позволяющая с высокой точностью трассировать как окрашенных, так и белых животных (Хоцкин и др., 2014).

Было установлено, что активность ТПГ2 ассоциирована с предрасположенностью к каталепсии у крыс (Kulikov et al., 1992) и мышей (Kulikov et al. 1995), а каталепсия в свою очередь связана со снижением способности к обучению в ВЛМ у мышей, однако нами не было выявлено влияния мутации, снижающей активность ТПГ2 на способность к обучению в ВЛМ (Хоцкин и др. 2014). В настоящем исследовании при сравнении мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G, различающихся активностью ТПГ2, не было обнаружено влияние С1473G полиморфизма на способность к обучению. Ранее было показано, что этот полиморфизм влияет на выраженность депрессивно-подобного поведения мышей в тесте принудительного плавания (Osipova et al., 2009). Наши данные, следовательно, не выявили связи между способностью к обучению и депрессивно-подобным поведением.

Сравнение кривых обучения у родительской линии АКР и рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76, различающихся СВА-фрагментом хромосомы 13, содержащим аллель, вызывающую предрасположенность к каталепсии, выявило ассоциацию наследственной каталепсии с нарушением обучения в водном лабиринте Морриса. В то же время у родительской линии СВА, так же предрасположенной к каталепсии подобных нарушений выявлено не было, что может объясняться наличием у них генетических компенсаторных механизмов, которых лишена рекомбинантная линия.

Это нарушение обучения у мышей АКР.СВА-D13Mit76 сопровождается значительным увеличением уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина *Il-6* в коре и гиппокампе мышей этой линии по сравнению с животными родительских линий с «нормальным» обучением. Учитывая тесную связь между нарушением обучения и памяти, каталепсией и воспалительными процессами в нервной системе, можно предположить воспалительный процесс в мозге, как одна из причин плохой обучаемости мышей АКР.СВА-D13Mit76

Несмотря на то, что у животных рекомбинантной линии не было выявлено дефицита уровня мРНК *Bdnf*, однократное его введение в боковые желудочки значительно улучшает обучение и пространственную память у мышей АКР.СВА-D13Mit76 неделю спустя. Это хорошо согласуется с выраженным антикаталептическим действием этого нейротрофина на мышей с наследственной каталепсией (Тихонова и др., 2009; Tikhonova et al., 2012; Naumenko et al., 2012).

Мыши линии АКР.СВА-D13Mit76 являются удобной генетической моделью для изучения механизма нарушения обучения и памяти.

Выводы.

1. Создана принципиально новая методика автоматической регистрации и анализа процесса обучения и формирования пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, основанная на идее инвертированного освещения и позволяющая одинаково эффективно трассировать перемещение животного любого окраса.
2. У мышей рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76 с наследственной предрасположенностью к каталепсии выявлены существенные нарушения в процессе обучения в тесте водного лабиринта Морриса по сравнению с родительскими линиями АКР и СВА.
3. Было установлено увеличение уровня мРНК интерлейкина *Il-6* в коре и гиппокампе у интактных мышей линии АКР.СВА-D13Mit76 по сравнению с животными родительских линий АКР и СВА.
4. Выявлено увеличение уровня мРНК гена интерлейкина *Il-1 β* в коре головного мозга мышей, предрасположенных к каталепсии линий СВА и АКР.СВА-D13Mit76, по сравнению с животными устойчивой к каталепсии линии АКР.
5. Не выявлено различий по уровню мРНК гена *Bdnf* в коре и гиппокампе мышей линий АКР, СВА и АКР.СВА-D13Mit76.
6. Однократное введение экзогенного BDNF в боковые желудочки мозга нормализует генетически обусловленные нарушения обучения и резко усиливает пространственную память у мышей линии АКР.СВА-D13Mit76.
7. Не выявлено влияния функционального полиморфизма C1473G в гене триптофангидроксилазы 2 на способность к обучению в водном лабиринте Морриса у мышей конгенных линий В6-1473С и В6-1473G.

Список публикаций

Тезисы данной работы были представлены на следующих конференциях:

1. Фурсенко Д.В. Хоцкин Н.В. Пространственное обучение в водном лабиринте Морриса у мышей с наследственными различиями по катаlepsии. МНСК (Новосибирск, 2012)
2. Фурсенко Д.В. Хоцкин Н.В. Исследование способностей к обучению у мышей, различающихся по наследственной предрасположенности к катаlepsии. Пущинская школа-конференция молодых ученых. (Москва, 2013)
3. Фурсенко Д.В. Хоцкин Н.В. Однократное введение нейротрофического фактора (BDNF) корректирует нарушение обучения в водном лабиринте Морриса у мышей линии AKR.CBA-D13Mit76. МНСК (Новосибирск, 2013)
4. Хоцкин Н.В., Фурсенко Д.В., Базовкина Д.В., Куликов В.А. Пространственное обучение в водном лабиринте морриса у мышей с генетическими отличиями в предрасположенности к катаlepsии: влияние нейротрофического фактора мозга. VII Сибирский физиологический съезд (Красноярск, 27.06 – 29.06.2012 С.19)
5. Хоцкин Н. В., Фурсенко Д.В., Базовкина Д.В., Куликов В.А. Пространственное обучение в водном лабиринте Морриса у мышей с генетическими отличиями в предрасположенности к катаlepsии: влияние нейротрофического фактора мозга. VI съезд ВОГиС (Ростов-на-Дону, 15.06 – 20.06.2014. С.45)
6. D. Fursenko, N.V. Khotskin, D.V. Bazovkina, A.V. Kulikov. Single Administration of BDNF, but not GDNF, Improves Spatial Learning in Mice with Genetically Impaired Learning Ability. Конференция FENS (Federation of European Neuroscience Societies, Милан 2014).

Так же данные, представленные в этой работе, были опубликованы в следующих статьях:

1. Хоцкин Н. В., Фурсенко Д. В., Базовкина Д. В., Куликов В. А ., Куликов А. В. Автоматическое измерение характеристик пространственного обучения у мышей в тесте Водный Лабиринт Морриса с обращенным освещением. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова . - 2014 - Т.100. - С. 36-44
2. Kulikov AV, Fursenko DV, Khotskin NV, Bazovkina DV, Kulikov VA, Naumenko VS, Bazhenova EY, Popova NK. Spatial learning in the Morris water maze in mice genetically different in the predisposition to catalepsy: the effect of intraventricular treatment with brain-derived neurotrophic factor. // Pharmacol Biochem Behav. 2014 – Vol.122 – p.266-272.
3. Naumenko VS, Kondaurova EM, Bazovkina DV, Tsybko AS, Ilchibaeva TV, Khotskin NV, Semenova AA, Popova NK. Effect of GDNF on depressive-like behavior, spatial learning and key genes of the brain dopamine system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains. // Behav Brain Res. 2014 – Vol.274C – p.1-9.