

**Российская Академия Наук**  
**Сибирское отделение**  
**ФГБУН Институт Цитологии и Генетики**

На правах рукописи

**Хоцкин Никита Валерьевич**

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

Физиология – 03.03.01

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

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

Новосибирск, 2015

## Список сокращений

BDNF - brain-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор мозга

D13 – линия животных АКР.СВА-D13Mit76

И-1 $\beta$  – интерлейкин 1 $\beta$

И-6 – интерлейкин-6

LTD – long-term depression, долговременная депрессия

LTP – long-term potentiation, долговременная потенциация

NMDA - N-метил-D-аспартат

TNF $\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$ , фактор некроза опухоли альфа

ВЛМ – водный лабиринт Морриса

ЛПС - липополисахарид

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.....	4
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	7
НАУЧНАЯ НОВИЗНА.....	7
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ.....	8
ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.....	8
<b>ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ В НОРМЕ И ПРИ</b>	
<b>ПАТОЛОГИИ .....</b>	<b>10</b>
2.1 ОБУЧЕНИЕ.....	10
2.2 МЕХАНИЗМЫ ПАМЯТИ.....	12
2.3. Водный лабиринт Морриса (ВЛМ).....	18
2.4 КАТАЛЕПСИЯ.....	22
2.5. СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМА МОЗГА.....	25
2.5 ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ И ПАМЯТЬ.....	27
2.6 НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР BDNF.....	29
<b>ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>34</b>
3.1. ЖИВОТНЫЕ.....	34
3.2. ЭКСПЕРИМЕНТЫ.....	34
3.4. ВОДНЫЙ ЛАБИРИНТ МОРРИСА.....	36
3.5. ОТ- ПЦР.....	39
3.6. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	41
<b>ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>42</b>
4.1 АВТОМАТИЧЕСКАЯ ТРАССИРОВКА ЖИВОТНЫХ В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА С ИНВЕРТИРОВАННЫМ (ОБРАЩЕННЫМ) ОСВЕЩЕНИЕМ.....	42
4.2. СРАВНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ОБУЧЕНИЮ В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ В6-1473С И В6-1473G.....	44
4.3. ДИНАМИКА ОБУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЕ ПАМЯТИ О ПОЛОЖЕНИИ ПЛАТФОРМЫ У МЫШЕЙ УСТОЙЧИВОЙ К КАТАЛЕПСИИ ЛИНИИ АКР И КАТАЛЕПТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ СВА И АКР.СВА-D13Mп76. ....	46
4.4 УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНОВ <i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> И <i>BDNF</i> У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ ЛИНИЙ АКР, СВА И АКР.СВА-D13Mп76. ....	50
4.5 ВЛИЯНИЕ BDNF НА ПОВЕДЕНИЕ И УРОВЕНЬ МРНК ГЕНОВ <i>BDNF</i> , <i>IL-1β</i> И <i>IL-6</i> В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ АКР.СВА-D13Mп76 ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ВОДНОГО ЛАБИРИНТА МОРРИСА.....	52
<b>ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>57</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>64</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>65</b>

## Введение

### Актуальность проблемы

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., 2008a).

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) (Bazhenova 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 внутримозгового 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 $\beta$ , 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 каталепсии с нейродегенеративными и воспалительными процессами в мозге, можно ожидать нарушения обучения и памяти в ВЛМ у животных с наследственной каталепсией. Более того, учитывая выраженное антикаталептическое 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 каталепсией.

## Цели и задачи

**Целью** данной работы было изучение связи способности к обучению и формированию пространственной памяти с наследственной предрасположенностью к каталепсии, экспрессией провоспалительных цитокинов и BDNF, активностью триптофангидроксилазы 2 в мозге у мышей, а также возможности коррекции нарушений обучения и памяти у каталептиков 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 каталепсии линий.
3. Изучить влияние введения BDNF на наследственные нарушения процессов памяти и обучения в ВЛМ у мышей с наследственной предрасположенностью к каталепсии.
4. Исследовать связь между уровнем мРНК генов *Il-1 $\beta$* , *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 каталепсии 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 государственного университета.

### **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 $\beta$*  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 автоматки 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.

#### **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.

## Глава 2. Обзор литературы. Обучение и память в норме и при патологии

Обучение и тесно связанная с ним память являются важнейшими эволюционно приобретенными механизмами, повышающими адаптацию организма к изменяющимся условиям внешней среды.

### 2.1 Обучение

Согласно Торпу обучение можно определить «как процесс, состоящий в появлении адаптивных изменений индивидуального поведения в результате приобретения опыта» (Меннинг, 1982).

Различают следующие виды обучения:

1. Габитуация является разновидностью безусловного обучения и проявляется как постепенное угасание реакции на стимул, не имеющий непосредственной биологической значимости. Например, многократное прикосновение к сифону приводит к постепенному снижению выраженности защитной реакции втягивания жабр у моллюска аплизии (*Aplysia californica*) (Кендел, 1980; Kandel, 2007).

2. Сенситизация – другая форма безусловного обучения и проявляется как усиление реакции на стимул, получивший непосредственную, чаще негативную, биологическую значимость. Например, удар электрическим током непосредственно перед прикосновением к сифону, резко усиливает защитную реакцию втягивания жабр у аплизии (Кендел, 1980; Kandel, 2007).

3. Классический условный рефлекс (по Павлову) – выработка условной физиологической реакции на ранее индифферентный стимул с использованием безусловного подкрепления. Например, у собак вырабатывалось слюноотделение (физиологическая реакция) на включение света (первоначально биологически индифферентный стимул) путем последовательного его предъявления одновременно с кормлением (безусловное подкрепление).

4. Оперантное обучение – выработка последовательности поведенческих актов для достижения определенной цели (корма, высвобождения из клетки и т.п.). Идея оперантного обучения основана на предложенном Торндайком эксперименте с «проблемным ящиком» (Скиннер, 1986), когда животное (например, кошка) помещается в установку, представляющую собой закрытый ящик, открыть который изнутри можно лишь совершив определенную последовательность действий. Животное должно самостоятельно найти выход из установки, совершая случайные действия. Благодаря этой работе, он открыл так называемый «закон эффекта», говорящий о подкреплении поведения самим фактом освобождения из ситуации и ввел понятие «кривой научения», показывающей скорость уменьшения числа необходимых для освобождения действий (проб) при повторном помещении животного в проблемный ящик. Это было первой попыткой количественного описания процесса обучения (Скиннер, 1986). К оперантному можно отнести обучение в различных лабиринтах. Способность к обучению оценивают по «кривой научения» (кривой проб и ошибок).

5. Аверсивное обучение – животное обучается избегать неприятных ощущений, (например ударов электрическим током) используя прежде индифферентные световые и/или звуковые стимулы. Например, в челночной камере животное обучается избегать ударов электрическим током и переходить из одного отсека установки в другой при подаче ранее индифферентного звукового и/или светового сигнала, предшествующего удару током. Аверсивное обучение также можно рассматривать как разновидность оперантного и оценивать с помощью кривой проб и ошибок.

6. Импринтинг – мгновенное запоминание (запечатление) объекта. Как показал К. Лоренц, новорожденные утята начинают воспринимать как родителя первый увиденный ими движущийся объект (например, экспериментатора) и в дальнейшем следуют за ним.

7. Пространственное обучение – запоминание положения предметов или объектов в пространстве. Например, в Т-образном лабиринте животное обучается находить «призывную» камеру с едой, отмеченную ориентиром, даже при условии перемещения стартовой точки вплоть до зеркального, относительно стартовым тренировкам (Chamizo, 2002). Наиболее распространенной лабораторной установкой для изучения механизмов пространственного обучения является ВЛМ (D'Hooge and DeDeyn, 2001).

## 2.2 Механизмы памяти

Память можно определить, как способность сохранять некоторое время следы от прошедших событий. По длительности сохранения следа различают кратковременную (от нескольких минут, до нескольких часов) и долговременную (от нескольких дней до пожизненной). Кратковременная память должна предшествовать долговременной. Переход кратковременной памяти в долговременную память называется консолидацией.

Механизм кратковременной памяти основан на изменении свойств белковых структур (ферментов, рецепторов, ионных каналов). Например, стимуляция ряда мембранных рецепторов приводит к увеличению концентрации вторичных посредников цАМФ и  $Ca^{+2}$  внутри нейрона, последние, соответственно, активируют протеинкиназу А (цАМФ) (Chain et al., 1999) и кальций кальмодулин зависимую протеинкиназу 2 ( $Ca^{+2}$ ) (Lisman et al., 2002).

Протеинкиназа А является тетрамером, состоящим из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц. В собранном (неактивном) состоянии регуляторные единицы ингибируют каталитические. После присоединения четырех молекул цАМФ к регуляторным субъединицам комплекс распадается, и появляются активированные (свободные) каталитические субъединицы. Если сигнал слабый или кратковременный, то уровень цАМФ быстро снижается ферментами фосфодиэстеразами, и четыре субъединицы протеинкиназы А

вновь собираются в неактивный комплекс. Если сигнал длительный или сильный, субъединицы находятся в свободном состоянии длительное время, за которое часть регуляторных субъединиц будет разрушена внутриклеточными протеазами. Как следствие, часть каталитических субъединиц останется в свободном (активном) состоянии после окончания сигнала и разрушения цАМФ, сохраняя память о сигнале еще некоторое время после его прекращения, до тех пор, пока они не будут разрушены протеиназами (Schulman and Roberts, 2008).

Протеинкиназа 2 является мультимером, состоящим из 10-12 субъединиц, каждая из которых включает каталитический и регуляторный домены. Каждая субъединица активируется после присоединения комплекса белка кальмодулина и четырех  $\text{Ca}^{+2}$ . Другой механизм активации включает обратимое фосфорилирование субъединицы. Кратковременный или слабый сигнал увеличивает концентрацию ионов  $\text{Ca}^{+2}$  и вызывает активацию части субъединиц. После окончания сигнала и снижения концентрации  $\text{Ca}^{+2}$  фермент быстро возвращается в неактивное состояние. Если сигнал длительный и/или сильный, то активированные субъединицы фосфорилируют соседние субъединицы (автофосфорилирование). Эти фосфорилированные субъединицы остаются активными после окончания сигнала и удаления  $\text{Ca}^{+2}$  и сохраняют воспоминание о сигнале длительное время, пока не будут дефосфорилированы фосфатазами (Schulman and Roberts, 2008).

Молекулярные механизмы кратковременных габитуации и сенситизации изучены на аплизии и связаны с регуляцией кальциевых каналов (Кендел, 1980; Шеперд, 1987). Механизм кратковременной габитуации включает ингибирование кальциевых каналов на пресинаптическом окончании и, как следствие, уменьшение амплитуды кальциевого тока, что приводит к уменьшению количества высвобождаемых квантов медиатора (глутамата). При сенситизации воздействие электрическим током активирует серотониновые интернейроны. Выделяющийся серотонин действует на

рецепторы пресинаптического сенсорного нейрона что приводит к активации аденилатциклазы и увеличении концентрации цАМФ в сенсорном нейроне, которая через каскад внутриклеточных реакций с участием протеинкиназ вызывает активацию кальциевых каналов, и облегчает секрецию медиатора. Длительность кратковременной сенситизации зависит от продолжительности фосфорилированного состояния белков (Byrne, 2008).

У млекопитающих ключевую роль в механизме памяти играют долговременная потенцияция (long-term potentiation, LTP), которая впервые была продемонстрирована на нейронах гиппокампа кролика (Bliss and Lomo, 1973). Несколько позже LTP была обнаружена в других областях мозга, к тому же стало известно, что механизмы LTP могут варьироваться для различных синапсов (Byrne, 2008). Суть LTP состоит в резком и длительном усилении сигнала на слабую низкочастотную стимуляцию после предварительной кратковременной высокочастотной стимуляции нейрона. Долговременная потенцияция происходит в несколько стадий: инициация, каскад внутриклеточных реакций, экспрессия и поддержание. В LTP выделяют две стадии: раннюю (E-LTP), не требующую синтеза новых белков, и позднюю (L-LTP), при которой запускается транскрипция и трансляция.

Механизм E-LTP связан со строением ионотропного NMDA (связывающего N-метил-D-аспартат) рецептора глутамата, расположенного на постсинаптической мембране. В покое этот канал заблокирован ионом  $Mg^{+2}$ , но, при деполяризации мембраны, вызванной высокочастотной кратковременной стимуляцией нейрона, ион  $Mg^{+2}$  уходит, и NMDA рецептор активируется. Присоединение глутамата к активированному NMDA рецептору, сопровождается мощным притоком ионов  $Ca^{+2}$  и  $Na^{+}$  внутрь нейрона и к его более выраженной реакции (Luscher and Malenka, 2012). Длительная стимуляция NMDA рецепторов приводит к изменению экспрессии генов и синтезу новых белков, что, в свою очередь,

сопровождается модификацией существующего или образованием нового синапса.

Для формирования долговременной памяти требуется синтез мРНК и белков. Протеинкиназа А, митогенактивируемая протеинкиназа и другие киназы активируют транскрипционные факторы, такие как CREB, которые регулируют экспрессию генов раннего ответа, чьи продукты необходимы в модифицируемом синапсе. Нарушение формирования поздней стадии долговременной потенциации, аналогичной долговременному хранению памяти, наблюдается у трансгенных мышей с неактивным ферментом протеинкиназой А (Kandel, 2001) и при введении ингибитора синтеза белка анизомицина (Meiri and Rosenblum, 1998; Naghdi et al., 2003).

Существуют две основные гипотезы механизма долговременной памяти: синаптическая и эпигенетическая. Синаптическая гипотеза, предложенная Дональдом Хеббом (Hebb, 1949), предполагает, что память формируется в виде изменений межнейронных синаптических связей. В современном виде синаптическая гипотеза памяти утверждает, что новое впечатление связано с образованием новых синаптических связей. Например, в процессе постнатального онтогенеза по мере накопления опыта увеличивается число связей между нейронами в коре мозга (Прибрам, 1975). Недавно было показано увеличение числа шипиков на дендритах нейронов моторной коры головного мозга в процессе обучения мыши на вращающемся стержне (rotarod) (Yang et al., 2009).

В отличие от синаптической гипотезы эпигенетическая гипотеза основное внимание уделяет модификации молекулы ДНК и связанным с ней уровню экспрессии генов. В клетке молекула ДНК связана с белками-гистонами, которые определяют плотность укладки ДНК. Высокая плотность укладки снижает экспрессию генов, тогда как снижение плотности приводит к активации генов (Lester et al., 2011). Плотность укладки, в свою очередь, зависит от степени модификации гистонов с помощью метилирования, ацетилирования и фосфорилирования белковых

молекул. Раз возникнув, изменения в укладке ДНК способны сохраняться длительное время, определяя уровень экспрессии генов в данном нейроне.

Метилирование остатков цитозина, которое осуществляется ферментами DNMT3a/3b, способно длительное время (практически пожизненно) сохраняться в молекуле ДНК и влиять на экспрессию генов (Bird, 2002; Bogdanovic and Veenstra, 2009). В большинстве случаев метилирование остатков цитозина в промоторе какого-либо гена сопровождается снижением уровня экспрессии данного гена. Механизм снижения экспрессии связан с тем, что метилированные цитозины являются мишенями для связывания специфических транскрипционных факторов, таких как MeCP2, MBD1-5 и Kaiso, которые, в свою очередь, препятствуют связыванию ДНК-зависимой РНК-полимеразы (Bird, 2002).

Мозг ежеминутно сталкивается с множеством различных воздействий и очевидно, что только небольшая часть этих воздействий сохраняется в памяти. Обычно в памяти сохраняются воздействия, выходящие из рутинной последовательности событий и потенциально значимые для организма. Ключевую роль в сохранении новых и важных событий играют гены быстрого ответа, экспрессия которых резко увеличивается в течение десятка минут после воздействия. Многие из этих генов экспрессируются в мозге и кодируют транскрипционные факторы (c-fos, c-jun, zif268, и др.), синаптические белки (Arc, homer1a), белки внутриклеточной трансдукции сигнала (Rheb, Cox2, и др.), секреторные факторы (BDNF, tPA, и др.), а также мембранные белки (Arcadin, CPG15) (Okuno, 2011). Практически все из них имеют в составе своего промотора CREB связывающий участок, и, как следствие, их экспрессия усиливается при индукции LTP.

Было показано, что экспрессия генов быстрого ответа не изменяется в ответ на обыденные воздействия, такие как пища, ожидаемые изменения в окружающей обстановке и т.п. В то же время рассогласование внешних изменений с ожидаемыми вызывает резкое увеличение экспрессии этих генов (Анохин, 2003).

Однако, что касается экспрессии *c-fos*, полученные данные противоречивы. С одной стороны утверждается, что обучение в ВЛМ не имеет взаимосвязи с увеличением экспрессии этого гена (D'Hooge and DeDeyn, 2001; Zhang et al., 2002). С другой стороны в ряде работ было показано, что выполнение задач, требующих вовлечения пространственной памяти, в особенности теста ВЛМ, сопровождается увеличением экспрессии *c-fos* (Feldman et al., 2010; Mendez-Couz et al., 2014). Нокаутные мыши с избирательным нарушением экспрессии гена *c-fos* в головном мозге обладают сниженным LTP и страдают нарушением памяти (Fleischmann et al., 2003). Кроме того, изменения экспрессии генов *c-fos* и *zif268* наблюдаются в некоторых областях мозга при формировании кратковременной пространственной памяти (Shires and Aggleton, 2008). На мышях с нокаутом гена *Arg* была показана его критическая роль в консолидации продолжительной синаптической пластичности и хранении памяти (Plath et al. 2006). *Arg* так же участвует в структурных изменениях во время обучения, увеличивая долю тонких, более пластичных дендритов (Korb and Finkbeiner, 2011).

Пространственная память является чрезвычайно важной разновидностью памяти и сохраняет информацию о пути животного в пространстве. О высокой фундаментальной и медицинской значимости пространственной памяти свидетельствует присуждение в 2014 г. Нобелевской премии Д. О'Кифу и супругам Мозер за объяснение клеточного механизма пространственной памяти лабораторных грызунов. В мозге крысы известны две нейронные системы, ответственные за кодирование собственного местоположения. Это нейроны решетки энторинальной коры (*grid cells*) и нейроны места гиппокампа (*place cells*) (Derdikman and Moser, 2010; Moser et al., 2015).

*Place cells* - это пирамидальные клетки гиппокампа которые активируются, когда животное оказывается в специфическом месте в пространстве. Они могут активироваться как на свету, так и в темноте, что

позволяет предположить, что зрение не является ответственным за их срабатывание. Несмотря на то, что разные клетки срабатывают в разных местах, нет очевидной топографии в их местах срабатывания. Мозг считывает активность локальной группы этих клеток для определения положения животного в экспериментальной зоне. В тех ситуациях, когда активность «записывается» большим количеством клеток, позиция животного может впоследствии быть воспроизведенной со значительной точностью, что свидетельствует о том, что группы этих клеток способны создавать достаточно точную карту окружающего пространства (Moser et al, 2015).

В свою очередь *grid cells* медиальной энторинальной коры характеризуются тем, что активируются в нескольких местах пространства в процессе, к примеру, теста открытого поля, образуя гексагональную сетку по всему пространству, доступному для животного. Эти клетки так же могут использоваться для ориентирования животного в пространстве и составления карты окружающего пространства (Moser and Moser, 2014).

Нейродегенеративные процессы, приводящие к гибели нейронов при старении, воспалении, травмах мозга, а также неблагоприятное сочетание генетических факторов (например, при болезни Альцгеймера), вызывают потерю памяти (Аршавский, 2011). Для изучения механизмов памяти в норме и при ее нарушении, и для поиска способов ее коррекции используют разнообразные модели памяти и обучения. Самой распространенной моделью является обучение в ВЛМ.

### 2.3. Водный лабиринт Морриса (ВЛМ)

ВЛМ был предложен более 30 лет назад в качестве устройства для исследования пространственного обучения и памяти у лабораторных крыс (Morris, 1984). В настоящее время он стал одним из наиболее используемых лабораторных инструментов в поведенческой неврологии. ВЛМ широко используется для изучения механизмов нарушения памяти и поиска способов ее восстановления (Bromley-Brits et al., 2011). Являясь, в сущности

своей, классическим «проблемным ящиком» Торндайка, этот тест отлично подходит для количественного описания обучения у животных с помощью «кривых научения».

Установка представляет собой бассейн цилиндрической формы, наполненный подкрашенной сухим молоком или другим нетоксичным красителем водой. Поверхность бассейна виртуально разделяется на четыре равных сектора или четверти. В одной из четвертей (целевой) находится платформа, высота которой немного ниже уровня воды и, поэтому, она невидима для животного. Помещенное в воду животное начинает искать способ выбраться из воды, при этом оно обучается находить платформу и взбираться на нее. В начале обучения животное не имеет информации о месте платформы и находит ее случайным путем, или при помощи экспериментатора, но с течением времени животное обычно обучается находить платформу при помощи пространственной памяти и выбираться на нее уже самостоятельно (D'Hooge and DeDeyn, 2001). При обучении животное может руководствоваться расположением дальних и ближних ориентиров, а также запоминать последовательность движений, необходимых для достижения платформы.

Эксперимент состоит из двух стадий: обучения (acquisition) и проверки запоминания положения платформы (retention). На первом этапе в течение нескольких (обычно 4-6) последовательных дней животное обучают находить скрытую платформу, используя как внешние ориентиры, так и кинестетическую память. Эффективность обучения оценивают главным образом с помощью двух показателей латентного времени освобождения и пройденного животным пути (D'Hooge and DeDeyn, 2001). Латентное время соответствует времени от помещения в воду до «спасения» на платформе. Пройденный путь соответствует расстоянию, которое животное проходит от точки помещения в воду до центра платформы. Очевидно, что в ходе успешного обучения эти показатели должны уменьшаться. Несмотря на простоту и очевидность, эти параметры имеют ряд недостатков. Во-первых,

они определены только в случае успешного решения задачи («спасения» на платформе), что, однако, бывает не всегда. В случае же неудачи эти показатели, в общем, теряют смысл. Во-вторых, эти показатели в значительной степени зависят от скорости движения животного и размера бассейна. Более того, некоторые животные при помещении в воду замирают, что может существенно увеличить латентное время. Чтобы избежать негативных моментов, связанных с классическими показателями, был предложен новый показатель - сумма расстояний между животным и платформой, позволяющая с высокой точностью судить об удаленности его от платформы в каждый момент времени (Dalm et al., 2000; 2009). Очевидно, что этот показатель в меньшей степени зависит от скорости животного и имеет смысл, как в случае успеха, так и в случае неудачи.

После нескольких дней обучения проводится проверка насколько хорошо животное помнит расположение платформы. Животное помещается в установку, в которой отсутствует платформа. Предполагается, что оно будет выказывать предпочтение целевой четверти, в которой ранее находилась платформа (D'Hooge and DeDeyn, 2001). Статистической оценкой предпочтения служит отклонение времени нахождения в целевом секторе от случайного равного 25% (очевидно, что если животное не имеет предпочтения, то оно находится в каждом из четырех секторов примерно равное время). Другой статистической оценкой памяти служит сравнение времени в целевом секторе и противоположном секторе (обычно расположенном по диагонали). Недостатками этих оценок являются 1) зависимость времени нахождения животного в секторе от точки его помещения в воду и 2) от подвижности животного и размера бассейна. Очевидно, что сектора, расположенные вблизи от точки помещения животного, имеют преимущества по сравнению с удаленными секторами. Если подвижность животного велика, а размер бассейна мал, то, не найдя платформы в ожидаемом секторе оно начнет ее искать по всему бассейну и, как следствие, посетит все сектора примерно в течение одинакового

времени. Чтобы избежать этих негативных моментов, было предложено использовать сумму расстояний животного от центра бывшей платформы. Очевидно, что если животное помнит место платформы, оно будет находиться вблизи этого места, пусть даже в других секторах (Dalm et al., 2000; 2009).

В целом проблема выбора адекватных оценок обучения и запоминания и их правильного использования до настоящего времени не решена, что в значительной мере затрудняет интерпретацию результатов экспериментов с водным лабиринтом.

В последнее время для оценки обучения в водном лабиринте Морриса используют автоматическую регистрацию движений (трассировку) животных. В то же время автоматическая трассировка сталкивается с рядом технических проблем, самой значительной из которых является недостаточная контрастность животного и среды: белое животное в подкрашенной молоком воде практически невидимо для камеры. Эту проблему принято решать покраской животного перед проведением эксперимента, но подобная практика имеет ряд существенных недостатков: во-первых, из-за водной природы теста краска смывается, что заставляет экспериментатора повторять процедуру покраски и дополнительно стрессировать животное; во-вторых, большая часть красителей токсичны в той или иной степени, что приводит к отравлению животного в процессе умывания после водного теста, что не может не сказаться на последующих результатах. Одним из способов решения данной проблемы является использование установки с инвертированным (проходящим) освещением: свет от помещенного под бассейном источника свободно проходит через подкрашенную воду, но не проходит через животное, вне зависимости от его окраса, которое, поэтому, выделяется на фоне арены темным силуэтом. Эта идея была впервые успешно применена при трассировке мышей в тестах открытого поля (Куликов и др., 2007; Kulikov et al., 2008b) и принудительного плавания (Kulikov et al., 2010a).

Так же при работе с мышами возникают проблемы из-за поведения, свойственного этим животным, но не свойственного крысам, для которых, изначально, был разработан тест: дрейф (floating) и тигмотаксис (следование стенке бассейна) (D'Hooge and DeDeyn, 2001). Первая проблема наблюдается у животных с ярко выраженным депрессивно-подобным поведением, которые вместо того, чтобы искать платформу замирают, подобно тому, как они это делают в тесте принудительного плавания (D'Hooge and DeDeyn, 2001). Вторая же проблема наблюдается у животных с ярко-выраженной тревожностью, попадание которых в стрессовую ситуацию заставляет их прижаться к стенке бассейна и плавать вдоль нее, что мешает поиску находящейся в открытой части платформы (D'Hooge and DeDeyn, 2001).

Водный лабиринт Морриса широко используется для изучения воздействия неблагоприятных генетических (мутации) и средовых (инфекции, травмы) факторов на способность к обучению и для поиска способов коррекции нарушений способности к обучению и памяти (D'Hooge and DeDeyn, 2001).

#### 2.4 Каталепсия

Одним из нарушений поведения является каталепсия – длительная неподвижность с повышенным тонусом гравитационной мускулатуры, неспособность корректировать искусственно приданную неудобную позу (Карманова, 1964; Klemm, 1989). Этот феномен представляет собой пассивно-оборонительное поведение и, в той или иной степени, обнаружен у всех позвоночных. У птиц и млекопитающих каталепсия обычно ассоциируется со страхом и проявляется как оцепенение в ответ на появление хищника или другого раздражающего стимула в качестве альтернативы активному избеганию или агрессии (Попова, 1997, 1999, 2004; Dixon, 1998;).

У человека оборонительная функция каталепсии потеряла свою актуальность, к тому же каталепсия в гипертрофированной форме является симптом ряда психических и нервных заболеваний, таких как шизофрения, паркинсонизм и депрессия (Колпаков, 2004; Caroff et al., 2000; Daniels, 2009; Lee, 2007, 2010; Paparrigopoulos et al., 2009; Weder et al., 2008).

У лабораторных грызунов каталепсию чаще всего вызывают введением антагониста D2 рецепторов дофамина, галоперидола (галоперидоловая каталепсия) (Klemm, 1989) или агониста опиатных  $\mu$ -рецепторов морфина (морфиновая каталепсия) (Vander-Wende and Spoerlein, 1972; De Ryck and Teitelbaum, 1984).

В то же время спонтанная (drug-free) каталепсия чрезвычайно редкое явление у лабораторных грызунов и может рассматриваться как признак значительных нарушений функции нервной системы. У крыс спонтанная каталепсия наблюдается менее чем у 10% особей. В Институте цитологии и генетики СО РАН была проведена успешная селекция крыс Вистар на предрасположенность к каталепсии и получена линия крыс ГК (генетическая каталепсия), у которой длительное замирание наблюдалась у 50% крыс (Колпаков и др., 1999). Установлено, что наследственная каталепсия у крыс ГК соответствует критериям face, predictive и construct validity, предъявляемым к моделям депрессии (Kulikov et al., 2006).

У мышей длительное замирание можно вызвать с помощью щипка кожи за гривка (Ornstein and Amir, 1981; Amir et al., 1981). «Щипковая каталепсия» чрезвычайно редкое явление и не наблюдается у мышей большинства линий, таких как AKR, C57BL/6, DBA2 и др. В то же время была обнаружена единственная линия – CBA/Lac, у половины животных которой можно вызвать выраженную каталепсию (Kulikov et al., 1993). С помощью гибридологического анализа было установлено, что высокая предрасположенность к каталепсии у мышей линии CBA наследуется как рецессивный аутосомный признак с неполной пенетрантностью (50%) (Куликов и др., 1989; Kulikov et al., 1993).

С помощью QTL анализа, проведенного на бэкрассах между каталептической линией СВА и устойчивой к каталепсии линией АКР с использованием 65 полиморфных микросателлитных маркеров, равномерно покрывающих геном мыши, было показано сцепление признака с микросателлитами D13Mit76 и D13Mit78, локализованными на терминальном фрагменте хромосомы 13 мыши (Куликов и др., 2003; Куликов и Базовкина, 2003). Сцепление каталепсии с микросателлитным маркером D13Mit76 было подтверждено в опытах по селекции и переносу фрагментов хромосомы 13 от каталептической линии СВА в геном устойчивой к каталепсии линии АКР (Kondaurova et al., 2006; Kulikov et al., 2008a).

Длительная селекция бэкрассов между линиями СВА и АКР на каталепсию привела к значительному увеличению процента проявляющих каталепсию животных (до 80%) (Базовкина и др., 2005). Была создана линия ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy), которая характеризовалась усилением «депрессивных» черт поведения (Базовкина и др., 2005), нарушением иммунитета (Альперина и др., 2007), аномально длительной реакцией условного избегания в челночной камере (Дубровина и др., 2008; Зиновьев и др., 2009) и сниженным порогом эпилептиформной реакции нейронов гиппокампа (Лисачев и др., 2008). Кроме того, каталепсия у мышей ASC (Тихонова и др., 2006; 2010) была чувствительна к хроническому, но не острому действию антидепрессантов. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что наследственная каталепсия у мышей является свидетельством значительных нарушений функции нервной системы «депрессивного» типа (Kulikov et al., 2008a).

В ИЦиГ СО РАН с помощью переноса фрагмента хромосомы 13, маркированного микросателлитом D13Mit76, от СВА в геном АКР была получена рекомбинантная линия АКР.СВА-D13Mit76. Около половины мышей этой линии демонстрировали выраженную каталепсию (Kulikov et al., 2008a; Кондаурова и др., 2010). Пара линий мышей АКР.СВА-D13Mit76

и АКР представляет очень важную генетическую модель для изучения молекулярных механизмов патологического поведения, поскольку эти линии различаются только СВА-фрагментом 106 – 116 м.п.о. хромосомы 13. Мыши линии АКР.СВА-D13Mit76 были более чувствительны к ЛПС по сравнению с животными АКР (Куликов и др., 2010; Kulikov et al., 2010b; Vazhenova et al., 2013).

Недавно было установлено, что наследственная катаlepsия у мышей сопровождается уменьшением объема некоторых структур головного мозга и гипофиза (Tikhonova et al., 2013), что может свидетельствовать о нейроденгенерации. Более того серотониновая система мозга мышей катаlepsических линий СВА и АКР.СВА-D13Mit76 была более чувствительна к эмоциональному стрессу (Tikhonova et al., 2013) и действию ЛПС (Vazhenova et al., 2013) по сравнению с животными некатаlepsической линии АКР.

## 2.5. Серотониновая система мозга

Серотониновые нейроны синтезируют серотонин (5-НТ) как основной медиатор. В головном мозге тела большинства серотониновых нейронов локализованы в ядрах среднего и продолговатого мозга и посылают проекции во все области переднего и спинного мозга соответственно. 5-НТ система является самой экспансивной медиаторной системой головного мозга (Jacobs and Azmitia, 1992).

Благодаря высокой плотности 5-НТ окончаний в различных отделах мозга и наличию 14 различных типов рецепторов, 5-НТ система обладает полифункциональностью и вовлечена в регуляцию многих процессов в центральной нервной системе, физиологических функций и различных форм поведения (Zifa and Fillion, 1992; Barnes and Sharp, 1999; Saudou and Hen, 1994a, 1994b; Попова и Куликов, 2003). Так 5-НТ участвует в регуляции сна, пищевого, агрессивного и полового поведения, терморегуляции и целого ряда других форм поведения и физиологических функций (Попова и др.,

1978; Lucki, 1998; Popova, Amstislavskaya, 2002a; 2002b; Popova, 2006; Markus, 2008).

5-НТ синтезируется из незаменимой аминокислоты – L-триптофана. Ключевой реакцией синтеза 5-НТ в головном мозге является гидроксирование L-триптофана до L-5-окситриптофана, которое катализируется ферментом триптофангидроксилазой 2 (ТПГ2) (Walther et al., 2003; Walther and Bader, 2003).

В гене, кодирующем ТПГ2 у лабораторных мышей, обнаружен функциональный полиморфизм С1473G, приводящий к замене пролина в 447 позиции молекулы ТПГ2 на аргинин (Zhang et al., 2004). Эта мутация приводит к близкому к 50% снижению активности ТРН2, экспрессирующейся в клетках РС12 (Zhang et al., 2004) и кишечной палочки (*Escherichia coli*) (Sakowski et al., 2006). Было установлено, что полиморфизм С1473G является основным фактором, определяющим наследственную изменчивость активности ТРН2 в мозге мыши (Kulikov et al. 2005). Было показано, что 1473G аллель сцеплен с пониженной интенсивностью межсамцовой агрессии (Kulikov et al. 2005; Osipova et al. 2009). К тому же было показано, что данный полиморфизм влияет на время депрессивно-подобной неподвижности в тесте принудительного плавания (Osipova et al. 2009; Kulikov et al. 2011).

Имеются экспериментальные доказательства связи активности ТПГ2 с наследственной каталепсией крыс (Kulikov et al., 1992) и мышей (Kulikov et al., 1995). Крысы и мыши каталептических линий характеризуются повышенной активностью ТПГ2 в стриатуме, тогда как ингибитор ТПГ2 пара-хлорофенилаланин оказывает выраженное антикаталептическое действие (Kulikov et al., 1992; 1995).

В институте Цитологии и Генетики были созданы конгенные линии В6-1473С и В6-1473G, несущие С и G аллели полиморфизма С1473G, соответственно, и характеризующиеся высокой и низкой активностью ТПГ2 в мозге (Osipova et al., 2009). Эти две линии являются удобной моделью для

изучения влияния функционального полиморфизма C1473G на наследственные формы поведения и способности к обучению.

## 2.5 Провоспалительные цитокины и память

Нарушения обучения и памяти могут быть результатом воспалительных процессов в мозге. Некоторые исследователи считают воспалительный процесс причиной прогрессивного нарушения памяти у пациентов с болезнью Альцгеймера (Аршавский, 2011). Значительную роль в механизме воспаления играют цитокины.

Цитокины – это гормоноподобные белки и пептиды, которые синтезируются и секретируются различными типами клеток, главным образом клетками иммунной системы. Биологические функции цитокинов можно разделить на три группы: первая – управление развитием и гомеостазом иммунной системы, вторая – контроль роста и дифференциации клеток, а третья – участие в механизме неспецифического иммунитета и воспалительных процессах (Пальцев и др., 2003).

Ключевую роль в процессе воспаления играют три провоспалительных цитокина: интерлейкины IL-1 $\beta$ , IL-6 и фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ ). Воспалительные процессы и бактериальные токсины, такие как ЛПС, усиливают секрецию этих цитокинов лимфоцитами (Dantzer, 2004) и экспрессию генов, кодирующих эти цитокины в нервной системе (Kim et al., 2006a, 2006b; Rummel et al., 2011; Russo et al., 2004). Иными словами, увеличение уровня IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  или увеличение экспрессии кодирующих их генов в тканях (в том числе и в нервной ткани) являются маркерами воспалительных процессов (Kim et al., 2006a, 2006b; Rummel et al., 2011; Russo et al., 2004). Эти цитокины осуществляют свою регуляторную функцию через специфические рецепторы, расположенные на цитоплазматической мембране. Эти рецепторы являются димерами и состоят из собственно рецепторной субъединицы, связывающей цитокин, и ауксиллярного (вспомогательного) белка, осуществляющего

внутриклеточную трансдукцию сигнала. Так, рецептор IL-1 $\beta$  состоит из рецепторного IL1R1 и ауксиллярного белка ILRAcP, рецептор IL-6 – из рецепторного белка IL6R и ауксиллярного белка gp130, тогда как рецептор TNF $\alpha$  включает рецепторный белок TNF $\alpha$ R1 и ауксиллярный белок TRADD или TRAF. Отличительной особенностью рецепторов цитокинов семейств IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  является то, что они лишены собственной киназной активности и рекрутируют цитоплазматические киназы: серин/треониновые киназы (IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ ) или тирозиновые киназы JAK (IL-6). Активация всех трех рецепторов в конечном счете ведет к активации фактора транскрипции NF $\kappa$ B и в случае рецептора IL-6 – STAT белков, которые вовлечены в регуляцию экспрессии многих генов (Chesnokova and Melmed, 2002).

Введение ЛПС вызывает т.н. «синдром больного», который проявляется как снижение двигательной и исследовательской активностей, нарушения коммуникативного поведения, замирание, анорексия (Клименко, 2005; Dantzer, 2004). Из трех цитокинов, секретируемых в ответ на ЛПС, в полной мере «синдром» больного вызывает только IL-1 $\beta$ , в то время как TNF $\alpha$  и IL-6 оказывают слабое воздействие на некоторые симптомы. В то же время, IL-6 необходим для проявления «синдрома» больного – ЛПС не вызывает полного спектра нарушений поведения у мышей с нокаутом по гену IL-6 (Bluthe et al., 2000).

Важно отметить тесную связь между провоспалительными цитокинами и каталепсией. Во-первых, заторможенность, как уже говорилось, является одним из симптомов «синдрома» больного. Во-вторых, ЛПС вызывает каталепсию у мышей некаталептической линии (Базовкина и Куликов, 2009; Bazovkina et al., 2011) и усиливает выраженность наследственной каталепсии у мышей каталептических линий (Kulikov et al., 2010b; Bazhenova et al., 2013). Наконец главный ген каталепсии тесно сцеплен с геном *Il6st*, кодирующем белок gp130, который участвует в трансдукции сигнала с рецепторов IL-6 (Kulikov et al., 2008a).

Ранее было показано, что провоспалительные агенты, такие как  $IL-1\beta$  и ЛПС способны нарушать процесс обучения в водном лабиринте Морриса: так было показано, что внутрибрюшинное введение раствора ЛПС замедляет обучение в тесте водного лабиринта Морриса и стимулирует экспрессию  $IL-1\beta$  в мозге (Arai et al., 2001; Sparkman et al., 2005a, 2005b).

Данные по другому провоспалительному цитокину –  $IL-6$  не столь однозначны: некоторые источники говорят, что он не имеет влияния на пространственное обучение (Oitzl et al., 1993), в то же время другие исследования утверждают обратное: так было показано, что внутримозговое введение Ad-GFP- $IL-6$  (GFP- $IL-6$  аденовирус), вызывающего гиперэкспрессию  $IL-6$ , значительно ухудшает обучение в водном лабиринте Морриса в сравнении с контрольными животными, которым вводили Ad-GFP (Wei et al., 2012). К тому же было показано, что животные, имеющие нокаут по гену  $IL-6$ , оказались устойчивы к нарушениям пространственного обучения, спровоцированного внутрибрюшинным введением бактериального ЛПС (Sparkman et al., 2006). По всей видимости это достигается тем, что дефицит  $IL-6$  вызывает уменьшение экспрессии гена  $IL-1\beta$  в центральной нервной системе (Sparkman et al., 2006).

## 2.6 Нейротрофический фактор BDNF

BDNF является небольшим димерным протеином, который проявляет высокое сродство к тирозинкиназному TrkB рецептору (Lu et al. 2008). Присоединение BDNF к TrkB индуцирует димеризацию рецептора, автофосфорилирование и активацию его внутриклеточных тирозинкиназных доменов. Эти события инициируют ряд сложных внутриклеточных, преобразующих сигнал каскадов, которые затем вызывают биологические ответы (Tariá-Arancibia et al., 2004). Основными путями, через которые реализуются внутриклеточные и транскрипционные эффекты TrkB на различные нейрохимические системы, являются митоген-активированная протеинкиназа (МАРК), фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K) и

фосфолипаза C- $\gamma$  (PLC-  $\gamma$ ) (Pataroutian and Reichardt, 2001). Так, например, BDNF вызывает формирование дендритов путем активации MAPK и PI3K путей (Kaplan and Miller, 2000). Кроме того, активация MAPK важна для образования аксонов (Airaksinen and Saarna, 2002).

BDNF образуется в ядрах нейронов, а затем транспортируется и упаковывается в эндоплазматической сети. Оттуда он переходит в цитоплазму или транспортируется в более отдаленные участки (Young, 2001). Транспорт BDNF может происходить как ретроградно, так и антероградно. В первом случае извлеченный из клетки-мишени нейротрофин захватывается нейроном и ретроградно транспортируется в тело клетки (Tapia-Arancibia et al., 2004). Так при помощи инъекции меченных йодом нейротрофинов было обнаружено, что BDNF может ретроградно транспортироваться нейронами периферической и центральной нервной системы, преодолевая большие дистанции для достижения тел нервных клеток (DiStefano et al., 1992).

При антероградской передаче сигнала каждый нейрон способен передавать синтезированный им нейротрофин по аксону, либо для достижения непосредственной цели, либо для достижения дендритов для последующего поглощения и ретроградного транспорта постсинаптическим нейроном (Tapia-Arancibia et al., 2004). Многие быстрые эффекты нейротрофинов больше согласуются с локальным действием BDNF, чем с передачей сигналов, опосредованных ретроградным транспортом на большие дистанции (Tapia-Arancibia et al., 2004).

Очевидно, что действие BDNF в организме напрямую связано с его распространением, и оно весьма широко – ареалы его экспрессии выходят за пределы нервной системы, на основе чего можно предположить, что и действие его не ограничивается пределами мозга.

В настоящее время установлено, что BDNF играет существенную роль как в развивающейся, так и в зрелой нервной системе. В первом случае он важен для нейрогенеза, выживания и дифференцировки нейронов (Schwartz

et al., 1997; Chan et al., 2008) и нормального созревания нейрональных путей. Во взрослом же организме он необходим для окончательной дифференцировки новых нейронов в гиппокампе (Chan et al., 2008), а также для поддержания синаптической пластичности и роста дендритов (Post, 2007).

Было обнаружено, что экспрессия BDNF повышается при повреждениях нейронов, вызванных гипоксией, нейротоксинами и ишемией, оказывая нейропротекторный эффект (Goldberg et al., 2000; Liu et al. 2006).

Согласно современным представлениям BDNF играет ключевую роль в механизме таких психических нарушений как шизофрения и депрессия (Duman, 2002). Стресс приводит к увеличению уровня кортикоидов, которые блокируют синтез BDNF, что приводит к развитию нейродегенеративных изменений в мозге и, в конечном итоге, к психопатологиям. Наоборот, антидепрессанты активируют сопряженные с аденилатциклазой рецепторы 5-НТ, что приводит к увеличению уровня цАМФ и фосфорилированию фактора транскрипции CREB и последующему увеличению экспрессии BDNF. Увеличение уровня BDNF подавляет нейродегенеративные процессы в мозге и оказывает антидепрессантный эффект. Показано, что введение BDNF в мозг снижает «депрессивное» время неподвижности в тесте принудительного плавания (Shirayama et al. 2002), который является основным тестом на антидепрессантное действие препаратов (Castagné et al. 2010).

Недавно было показано, что однократное введение 300 нг BDNF в боковые желудочки мозга снижают выраженность каталепсии (Тихонова и др., 2009; Tikhonova et al., 2012), «депрессивного» поведения в тесте tail suspension и 5-НТ систему (Naumenko et al., 2012) у мышей линии ASC. Это антикаталептическое действие BDNF можно рассматривать как еще одно доказательство ассоциации наследственной каталепсии с нейродегенеративными изменениями в мозге.

BDNF известен как фактор, вовлеченный в процессы синаптической пластичности, необходимой для обучения и памяти. BDNF влияет на синаптические связи несколькими способами: он увеличивает сложность аксонального дерева, расширяя синаптическую территорию аксона, наряду с тем, что одновременно координирует образование синапсов и стабилизацию между пре- и пост-синаптическими нейронами (Sanchez et al., 2006). Выявлена существенная роль BDNF в формировании долговременной нейрональной и поведенческой пластичности в ответ на негативные социальные события (Berton et al., 2006).

BDNF является одним из факторов, играющих важную роль в синаптической пластичности (Bramham and Messaoudi, 2005; Lu et al. 2008), в частности оказывая разрешающее влияние на LTP. Эти механизмы делают синапсы компетентными для LTP. Немедленное выделение BDNF регулирует индукцию и поддержание ранней фазы LTP (Kossel et al., 2001). Формирование же стабильного LTP связано с длительным освобождением BDNF и активацией TrkB рецепторов (Aicardi et al., 2004).

Исходя из общебиологических соображений, можно предположить, что BDNF играет важную роль в формировании памяти и, как следствие, в обучении. Однако, результаты экспериментального изучения связи BDNF и пространственного обучения крайне противоречивы. Ряд авторов не выявили влияния введения BDNF в мозг на скорость обучения или память в водном лабиринте Морриса (Cirulli et al., 2000; Vlaha et al., 2000). В то же время было показано, что однократное введение чрезвычайно высокой дозы BDNF непосредственно перед ретестом улучшает воспроизведение сформированной способности находить платформу у крыс (Cirulli et al., 2004).

Таким образом, наследственная каталепсия у мышей ассоциирована с рядом поведенческих, морфологических и нейрохимических изменений нервной системы, которые носят патологический характер. Высокая ассоциация каталепсии с провоспалительными цитокинами позволяет

предполагать, что эти нарушения в мозге у животных-каталептиков могут быть результатом воспалительных процессов и увеличения уровня цитокинов. Все вышесказанное позволяет предположить, что связанные с каталепсией изменения в нервной системе могут нарушать процессы обучения и формирования памяти у каталептических мышей. Поскольку BDNF оказался эффективным в нормализации ассоциированных с наследственной каталепсией негативных изменений в мозге мышей (Тихонова и др., 2009; Tikhonova et al., 2012), можно ожидать, что этот нейротрофин будет улучшать обучение и память у мышей с наследственной каталепсией.

Поэтому в настоящем исследовании мы поставили своей целью изучить взаимосвязь между предрасположенностью к наследственной каталепсии и нарушениями в обучении и формировании пространственной памяти в ВЛМ. Было запланировано (1) разработать оригинальную методику, установку и программное обеспечение, для эффективного автоматического изучения поведения животного в ВЛМ; (2) изучить влияние полиморфизма C1473G в гене TPG2 на обучение в ВЛМ; (3) исследовать влияние наследственной каталепсии на обучение и память в ВЛМ; (4) изучить возможности коррекции наследственных нарушений обучения и памяти с помощью BDNF; (5) выяснить связь уровня мРНК генов провоспалительных цитокинов и BDNF с обучением и памятью в ВЛМ.

## Глава 3. Материалы и методы

### 3.1. 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., 2008a). 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 CC57Br в геном C57BL/6 (Osipova et al., 2009; Kulikov et al., 2011). Все мыши были в возрасте 8-10 недель, весили  $25 \pm 2$  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 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.

### 3.2. Эксперименты

Первый эксперимент являлся методическим и был направлен на изучении 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 течении 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 $\beta$* , *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 течении 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  $-70^{\circ}\text{C}$  до экстракции РНК.

Для введения использовался человеческий рекомбинантный BDNF (5 мкг, Sigma-Aldrich, США) разбавленный в 85  $\mu\text{л}$  стерильного физиологического раствора, который был введен в левый боковой желудочек под краткосрочной анестезией диэтиловым эфиром (время воздействия паров эфира - 40-50 с) 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).

#### 3.4. Водный лабиринт Морриса

В качестве основного теста для изучения процессов формирования пространственной памяти и обучения был выбран водный лабиринт Морриса. В связи с тем, что беспородные мыши и животные линий AKR и AKR.CBA-D13Mit76 имеют белый окрас, обычно возникают определенные трудности при отслеживании их в подкрашенной молоком воде, в связи с низкой степенью контрастности животного по сравнению с окружающей средой. Для повышения контрастности в работе впервые применяли регистрацию в проходящем свете, которая была разработана ранее и успешно применялась в тестах открытое поле и принудительное плавание (Куликов и др., 2007; Kulikov et al., 2008b; 2010a). Животное любого окраса не прозрачно для света и, поэтому, в проходящем свете будет выглядеть как темный силуэт на ярком фоне. Установка для тестирования животных в водном лабиринте Морриса в проходящем свете состояла из квадратного пластикового бака 70 x 70 x 25 см, в который вставляли пластиковый цилиндрический вкладыш диаметр 70 см и высотой 25 см, для получения цилиндрического рабочего пространства. Бак помещали на стенд над четырьмя галогеновыми лампами по 12 Вт каждая (Рис.1). Бак заполняли до 15 см подкрашенной сухим молоком водой, температурой  $25^{\circ}\text{C}$ . Поверхность бака была виртуально разделена на 4 равных сектора

(четверти). Стеклоплатформа, (диаметр 5 см, высота 14,5 см), скрытая под поверхностью воды и невидимая для животного, помещалась в центре одной из четвертей (I или целевой) бака. Передвижение животных автоматически отслеживалось и фиксировалось при помощи комплекса, состоящего из цифровой видеокамеры (Sony), компьютера и специальной программы, EthoStudio, разработанной в ФГБУН Институте автоматизации и электротехники СО РАН.

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. Момент нахождения платформы определяли, когда животное полностью выбиралось на нее (четырьмя лапами). 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.

В течении обучения фиксировались следующие параметры:

1. Латентное время освобождения (с), в течение которого животное находило платформу и выбралось на нее. В процессе обучения латентное время должно уменьшаться. Для животных, которые не смогли найти платформу, латентное время, в общем не определено, и принимается равным 60 с.
2. Пройденный путь (см), который животное прошло, прежде чем найти платформу и выбраться на нее. В процессе обучения поведение оптимизируется и, как следствие, необходимый путь уменьшается. Для животных, которые не смогли найти платформу, пройденный путь, в общем не определен, и принимается равным пройденному за 60 секунд расстоянию.
2. Кумулятивная дистанция до платформы (сумма расстояний между животным и платформой в каждый момент времени; см) Этот показатель отражает близость животного к платформе в каждый отдельный момент

времени. В отличие от двух предыдущих показателей кумулятивное время определено всегда вне зависимости от того нашло ли животное платформу или нет. Этот показатель также будет уменьшаться в процессе обучения.



*Рис. 1 Внешний вид установки для проведения теста водного лабиринта Морриса в проходящем освещении. 1- отверстие для объектива камеры 2 - круглый вкладыш для формирования арены 3 - платформа 4 - герметичный, квадратный бассейн 5 - металлические стенки поддона 6 - осветительные лампы*

По каждому тренировочному 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. Фиксировались следующие параметры:

1. Предпочтение определенной четверти. Показатель отражает долю времени, которое животное проводит в каждой четверти (% от 60 с). Если животное помнит место платформы, оно должно больше время проводить в целевой четверти.
2. Пройденный путь в определенной четверти (% от пути, пройденного за 60 с). Если животное помнит место платформы, оно должно проходить большее расстояние в целевой четверти.
3. Кумулятивная дистанция до платформы (сумма расстояний между животным и местом нахождения платформы в каждый момент времени; см) Этот показатель отражает удаленность животного от места, где ранее располагалась платформа. Если животное помнит место платформы, оно должно находиться поблизости от места платформы.

### 3.5. ОТ- ПЦР

Определение уровня экспрессии генов *Bdnf*, *Il-1 $\beta$*  и *Il-6* проводили с помощью оригинальной методики ОТ-ПЦР реального времени (Kulikov et al., 2005; Науменко, Куликов, 2006; Naumenko et al., 2008). Калибровку значений осуществляли с помощью двух стандартов: внутреннего – мРНК гена ДНК-зависимой РНК полимеразы 2 (*Polr2a*) и внешнего – геномной ДНК из печени самца C57BL/6. Для большинства генов, представленных в геноме мыши двумя копиями, каждый нг геномной ДНК содержит около 200 копий (Kulikov et al., 2005).

РНК выделяли с использованием TRIzol (Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом производителя, разбавлялась DEPC-обработанной водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранили при -70° С.

Один микрограмм РНК (8 мкл) смешивали с 180 нг случайной гексануклеотидной смеси, 2.25 мкл стерильного KCl (1 М) и стерильной водой до конечного объема 16 мкл, денатурировали при 94° С в течение 5 мин и оставляли для отжига при 41 ° С в течение 15 мин. После этого добавляли 15мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу М-MLV (200 U, Biosan, Новосибирск, Россия), Трис- HCl (рН 8.3, 0.225 мкмоль), смесь трифосфатов (0.015 мкмоль), дитиотреитол (0.225 мкмоль) и MnCl<sub>2</sub> (0.03 мкмоль). Полученный раствор (31 мкл) инкубировали при 41° С в течение 1 часа. Синтезированную кДНК хранили при -20 ° С (Kulikov et al., 2005; Науменко и Куликов, 2006).

Для количественной ПЦР в реальном времени использовался набор реактивов R-414 (Синтол, Москва, Россия). Один мкл кДНК смешивали с 2 мкл ПЦР-буфера, 2 мкл смеси трифосфатов, 2 мкл MgCl<sub>2</sub>, 2 мкл смеси из прямых и обратных праймеров, 0.16 мкл Taq-полимеразы и доводили стерильной водой до конечного объема 20 мкл. Во внешние стандарты добавляли 1 мкл растворов ДНК, содержащих 4, 8, 16, 32 или 64 нг ДНК для *Polr2a* и *Bdnf* или 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 и 2.0 нг ДНК для *Il-1β* и *Il-6*. В отрицательный контроль добавляли 1 мкл стерильной воды.

Таблица 1. Сиквенсы и температуры отжига использованных в работе праймеров и размеры соответствующих им ампликонов

Ген	Последовательность нуклеотидов	t°С отжига	Длина ампликона, п.о.
<i>Polr2a</i>	F: 5'-GTTGTCGGGCAGCAGAATGTAG-3' R: 5'-ТСААТGAGАССТТСТСГТССТСС-3'	63°С	188
<i>Bdnf</i>	F: 5'-TAGCAAAAAGAGAATTGGCTG-3' R: 5'-ТТТСАГГТСАТGGАТАТGTСС-3'	59°С	255
<i>Il-1b</i>	F: 5'-GATCCCAAGCAATACCCAAA-3' R: 5'-TAGAAACAGTCCAGCCCАТАС-3'	60°С	226
<i>Il-6</i>	F: 5'-ТААААТАGТССТТСТТАССС-3' R: 5'-GAACAACATAAGTCAGATACC-3'	56°С	244

ПЦР проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) в соответствии со следующим протоколом: 1) 3 мин при 94° С; 2) 40 циклов: 10 сек при 94 ° С, 30 с при соответствующей температуре отжига, 20 с при 72 ° С.

Все анализы проводили в трех повторах и средние значения были рассчитаны. Экспрессия генов оценивалась по количеству копий мРНК на 100 копий мРНК гена *Polr2a*.

### 3.6. 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.

## Глава 4. Результаты

### 4.1 Автоматическая трассировка животных в водном лабиринте Морриса с инвертированным (обращенным) освещением.

С инвертированным освещением силуэты как белых (беспородных), так и черных (C57BL/6) мышей выглядят одинаково контрастными на фоне яркого белого фона арены (Рис.2А, Б). Программа EthoStudio выделяет силуэты мышей белого и черного окрасов, вычисляет центры массы животных (Рис.2В, Г), трассирует движения их центров, определяет длину пройденного пути, сумму расстояний до центра платформы и создает карту плотности, которая соответствует числу ассоциированных с животным пикселей в конкретной точке пространства за все время тестирования (Рис.2Д, Е).

Обе линии хорошо обучаются в водном лабиринте Морриса, что видно по уменьшению латентного времени и пройденного пути во время обучения (Рис.3).

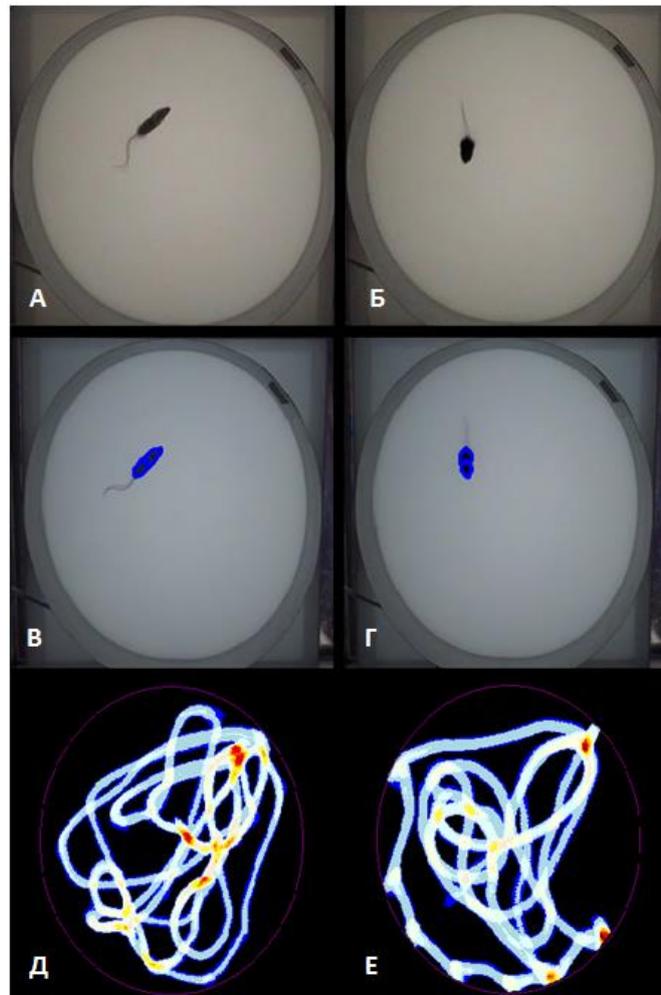


Рис. 2 Силуэты (А, Б), построенные EthoStudio контуры (В, Г) и карты плотности (Д, Е) мышей белой (левая панель) и черной (правая панель) окраски.

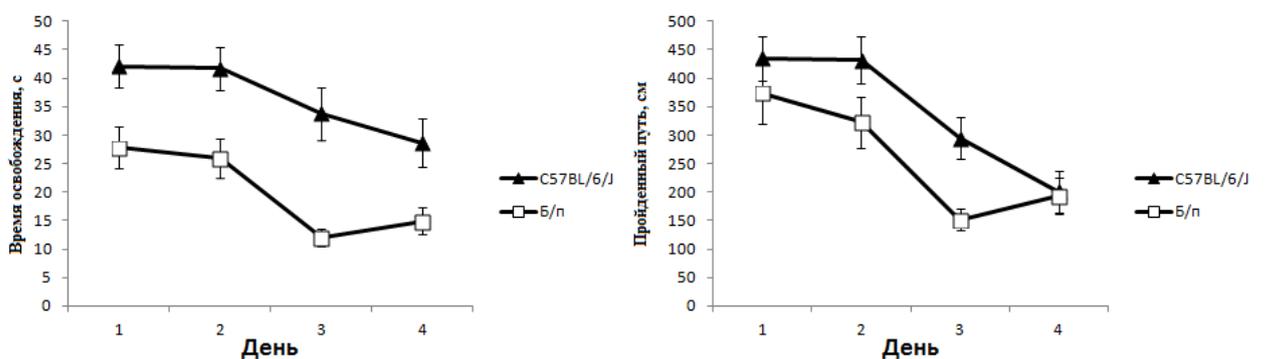


Рис. 3 Динамика изменения латентного времени (с) и пройденного пути (см) для беспородных мышей и животных линии C57BL/6 в течение 4 дней обучения в водном лабиринте Морриса. Каждая точка – среднее значение по группе.

#### 4.2. Сравнение способности к обучению в водном лабиринте Морриса у мышей линий B6-1473C и B6-1473G

В качестве первого приложения разработанной методики мы исследовали влияние полиморфизма C1473G в гене, кодирующем ТПГ2, на способность мышей к обучению в ВЛМ. Для этого проводили сравнение динамики обучения у мышей конгенных линий B6-1473C (высокая активность ТПГ2) и B6-1473G (низкая активность ТПГ2).

Мыши линий B6-1473C и B6-1473G 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 B6-1473C и B6-1473G прогрессивно уменьшались в процессе обучения (Рис.4). Не выявлено статистически достоверных различий между мышами линий B6-1473C и B6-1473G 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 B6-1473C в первый день обучения проходили большее расстояние до платформы по сравнению с животными B6-1473G ( $p = 0.0022$ ). Однако это увеличение пройденного пути у мышей линии B6-1473C 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.

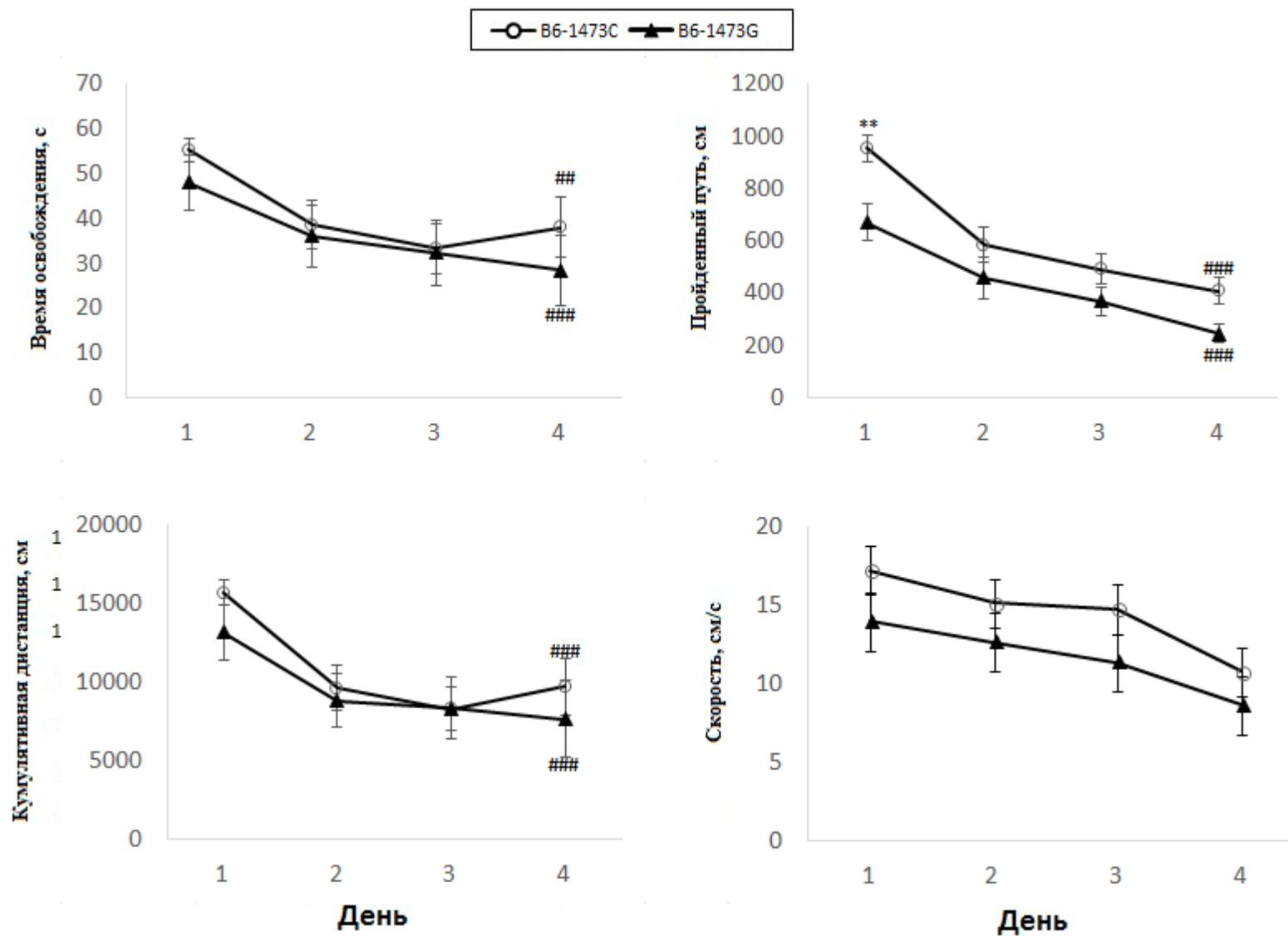


Рис.4. Динамика изменения латентного времени (с), пройденного пути (см), суммарной дистанции от платформы(см) и скорости (см/с) в процессе обучения у мышей линий B6-1473C и B6-1473G \*\* $p < 0.01$  по сравнению с первым днем обучения линий B6-1473G. ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  по сравнению с первым днем обучения.

4.3. Динамика обучения и сохранение памяти о положении платформы у мышей устойчивой к каталепсии линии АКР и каталептических линий СВА и АКР.СВА-D13Mit76.

Динамика обучения у данных линий представлена на Рис.5. 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 x 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 СВА ( $p<0.001$  для времени,  $p<0.001$  для пути,  $p<0.001$  для дистанции и  $p<0.01$  для скорости) и АКР ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.01$  и  $p<0.05$ , соответственно). В свою очередь, животные линии АКР.СВА-D13Mit76 не продемонстрировали уменьшения этих параметров на четвертый день в сравнении с первым.

В течении ретеста животные линий АКР и АКР.СВА-D13Mit76 не демонстрируют предпочтения к целевой четверти, отличного от случайных 25% (Рис.6). В то же время СВА 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 x 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 ( $191142.5 \pm 528.4$  см), АКР ( $18483.5 \pm 557.0$  см) и АКР.СВА-D13Mit76 (D13) ( $18857.4 \pm 528.4$  см,  $F_{2,26} < 1$ ).

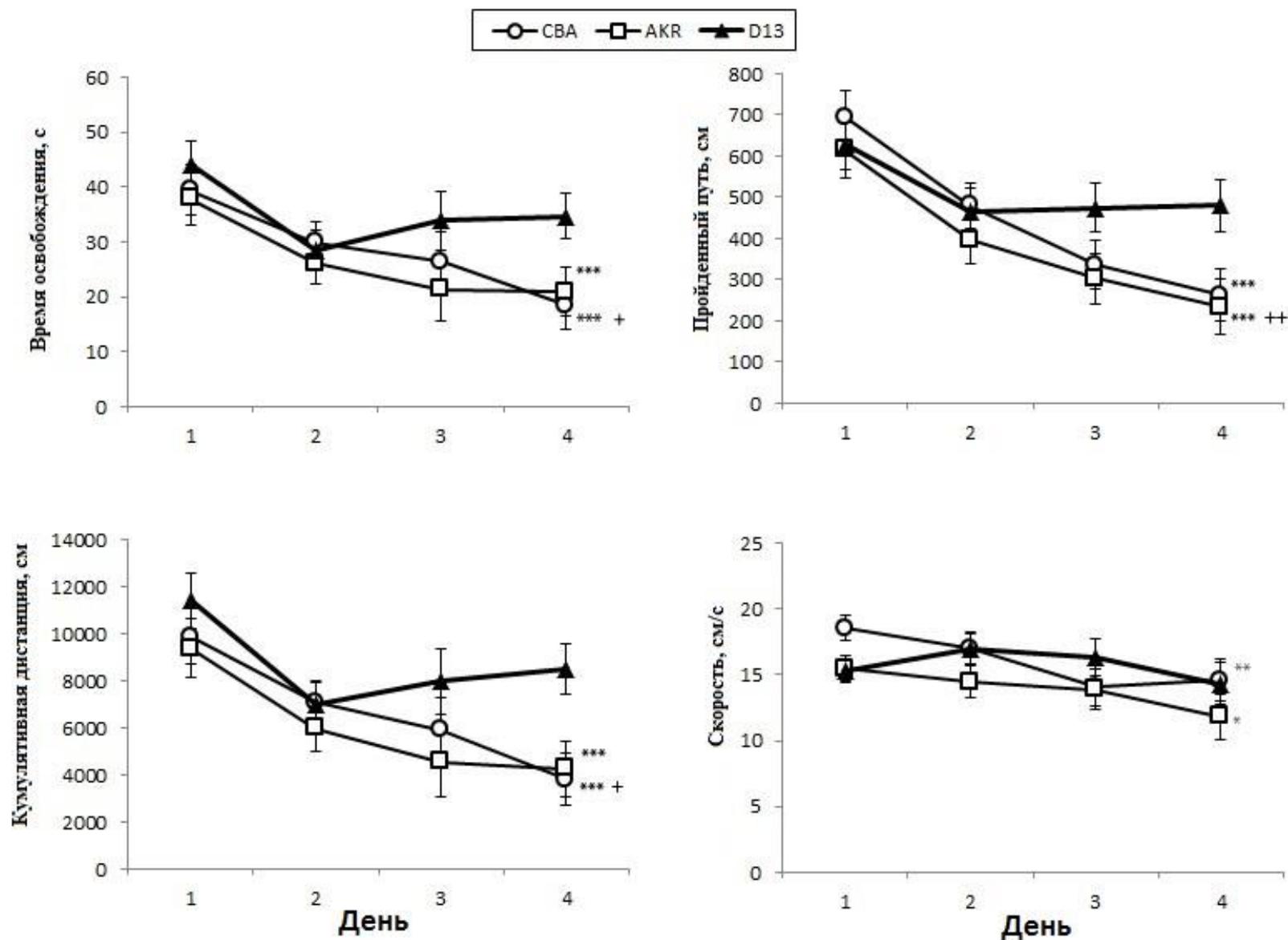


Рис. 5 Динамика изменения латентного времени(с), пройденного пути(см), суммарной дистанции от платформы(см) и скорости движения(см/с) у мышей линий CBA, AKR и AKR.CBA-D13Mit76 (D13). Каждая точка – среднее значение по группе.

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

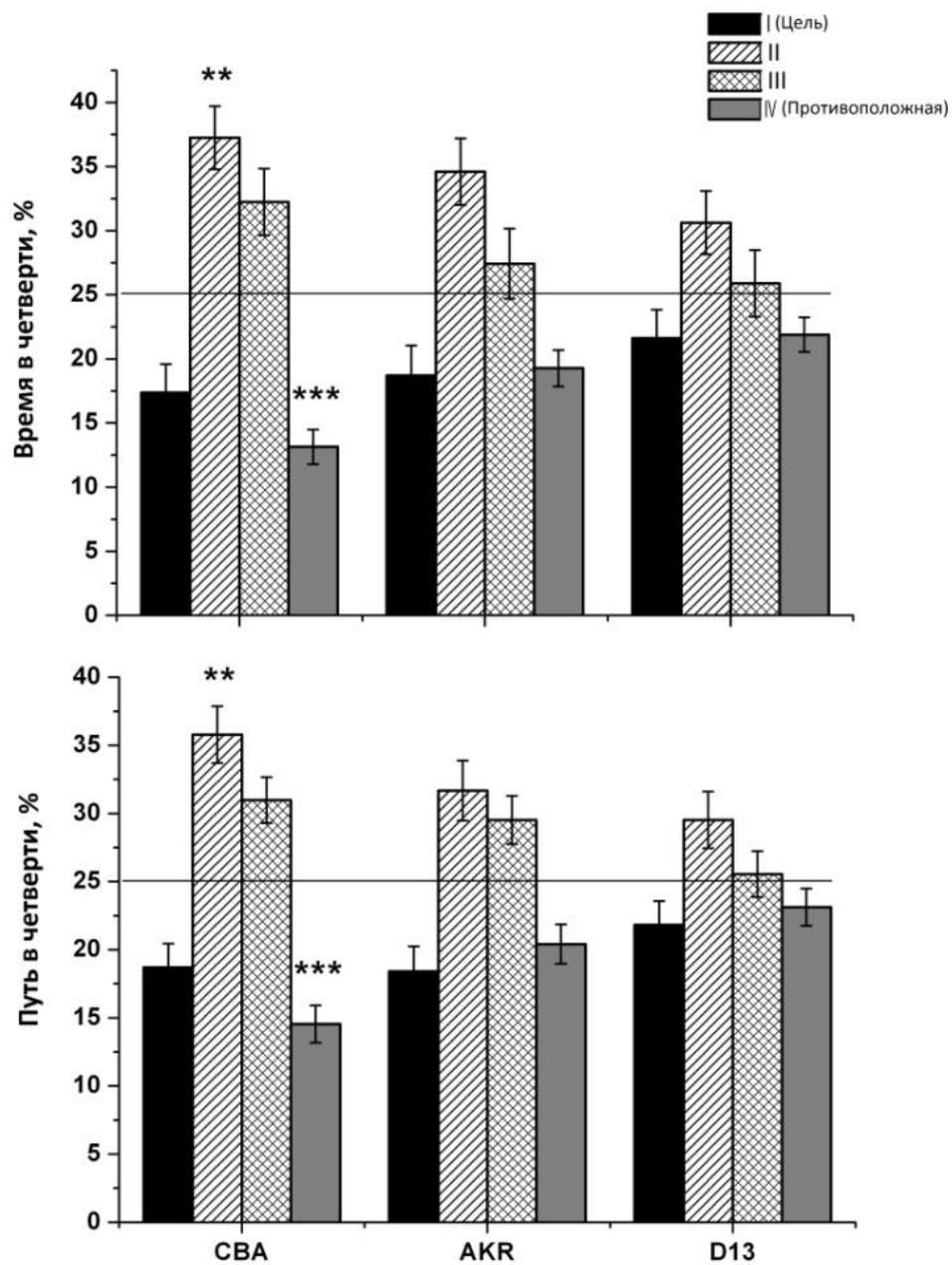


Рис. 6. Время пребывания и пройденный путь в секторах ВЛМ в ретесте у мышей линий CBA, AKR и AKR.CBA-D13Mit76 (D13)

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

4.4 Уровень экспрессии мРНК генов *Il-1 $\beta$* , *IL-6* и *Bdnf* у интактных животных линий АКР, СВА и АКР.СВА-D13Mit76.

Уровень мРНК генов *Il-1 $\beta$* , *IL-6* и *Bdnf* в коре и гиппокампе у мышей трех исследованных линий показан на Рис.7.

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.7).

Мыши трех линий не различались между собой по уровню мРНК гена *Il-1 $\beta$*  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-1 $\beta$*  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.7).

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.7).

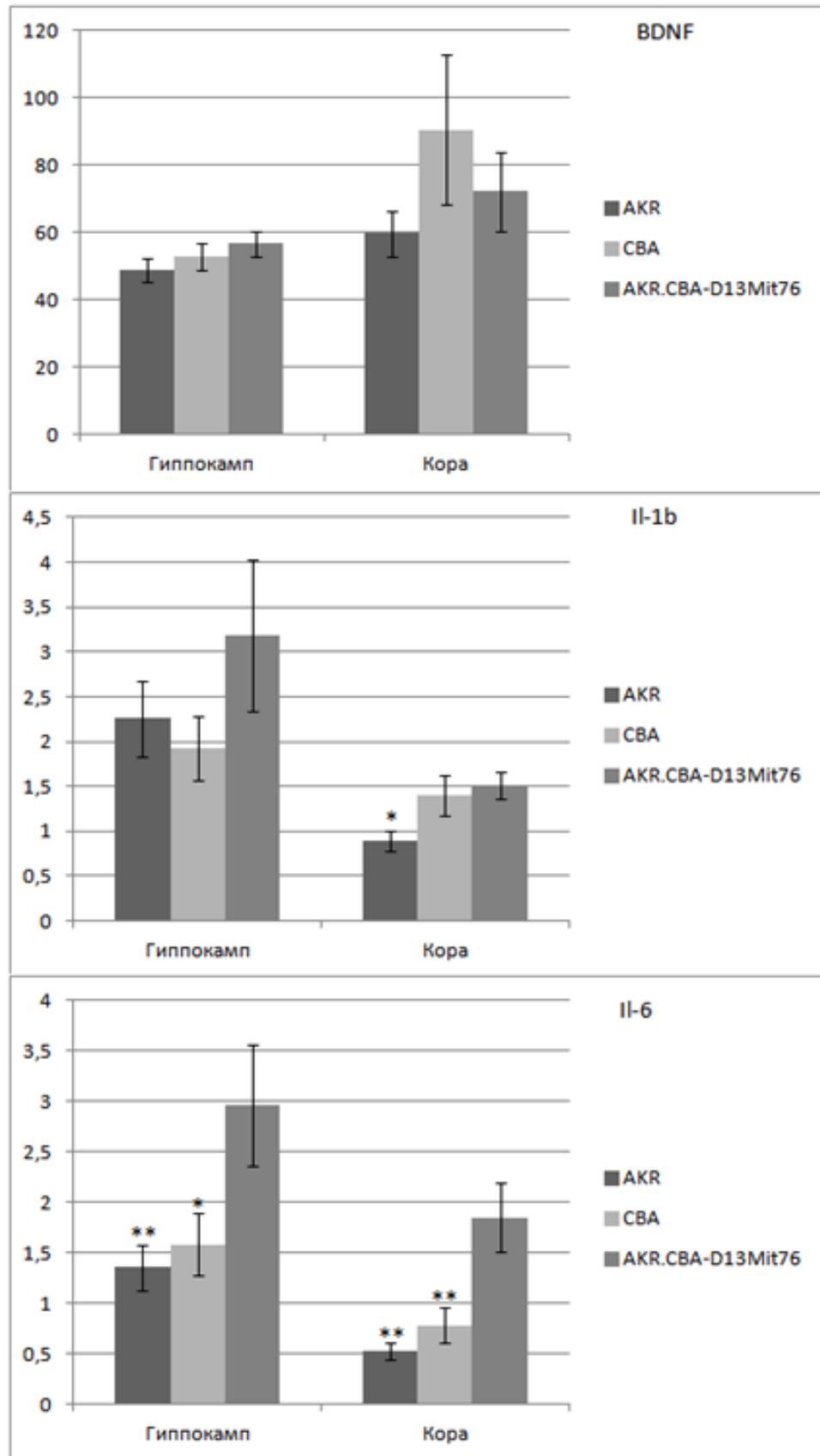


Рис.7 Уровень мРНК генов *Bdnf*, *Il-1b* и *Il-6* у интактных животных линий AKR, CBA и AKR.CBA-D13Mit76.

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

4.5 Влияние BDNF на поведение и уровень мРНК генов *Bdnf*, *Il-1 $\beta$*  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.8). Скорость движения у мышей с введением BDNF достоверно увеличивается на четвертый день в сравнении с первым ( $p<0.01$ ) (Рис. 8).

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.9). Показатель кумулятивной дистанции у экспериментальной группы ( $18146.8 \pm 415.4$  см)

значительно меньше, чем у контрольных животных ( $19931.9 \pm 448.7$  см,  $F_{1,24} = 8.5$ ,  $p = 0.0075$ ).

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.10). 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 АКР.СВА-D13Mit76, которым вводили физиологический раствор в боковые желудочки мозга, не отличаются от интактных животных

Уровень экспрессии мРНК генов *Bdnf* и *Il-1 $\beta$*  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 $\beta$* ). (Рис.10)

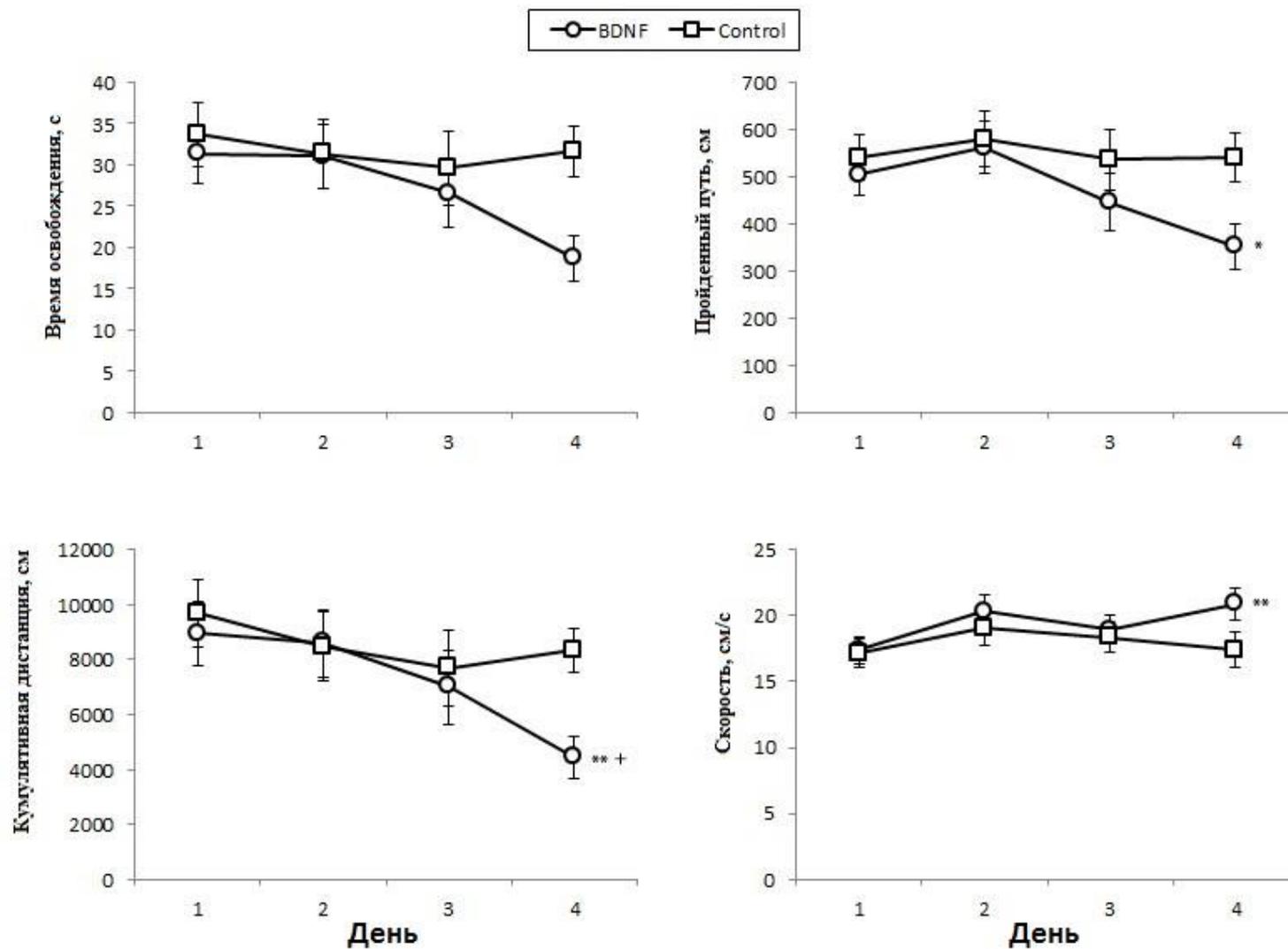


Рис. 8 Динамика изменения латентного времени(с), пройденного пути(см), суммарной дистанции от платформы(см) и скорости движения(см/с) у контрольной и экспериментальной групп мышей линии AKR.CBA-D13Mit76. Каждая точка – среднее значение по группе.

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

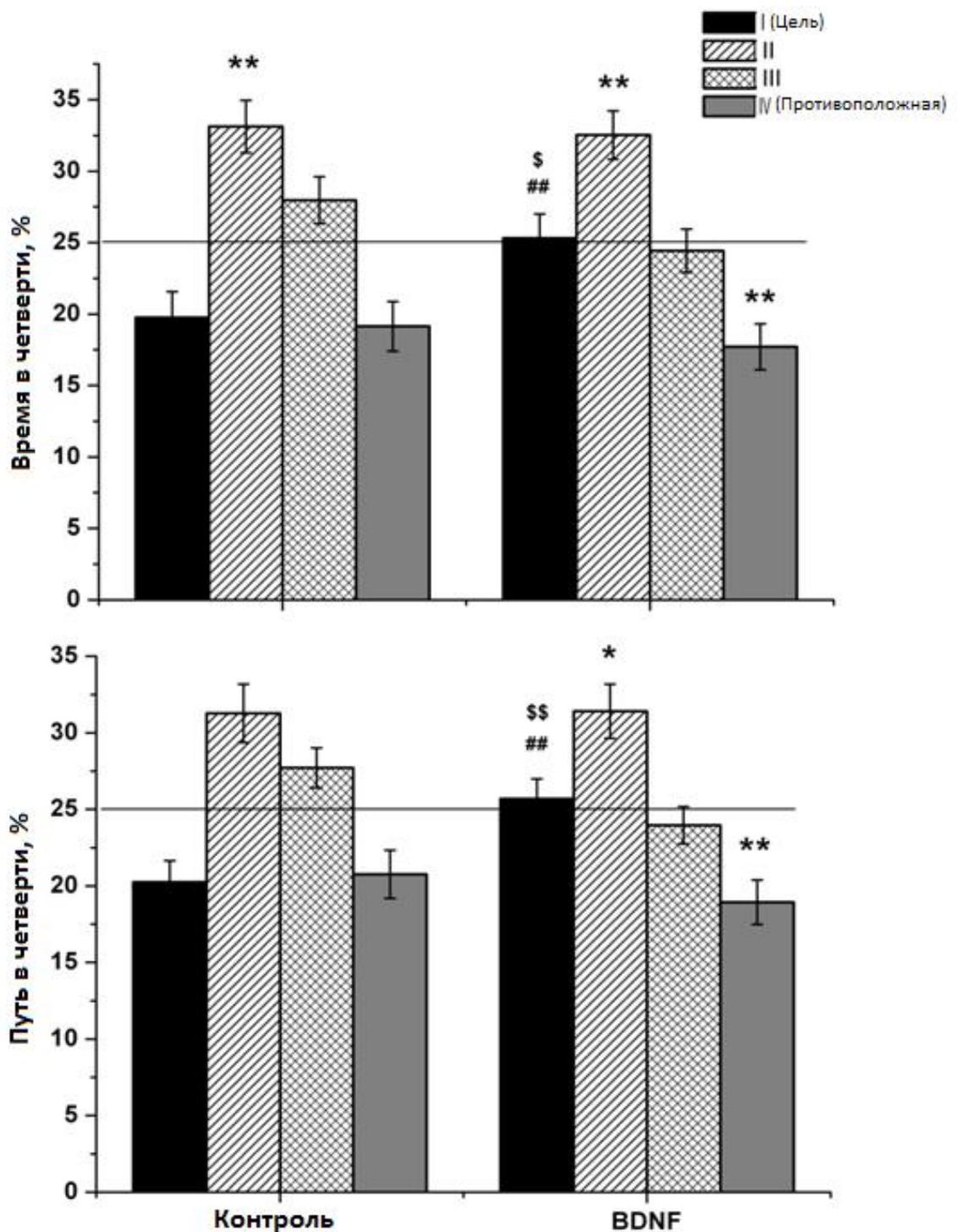
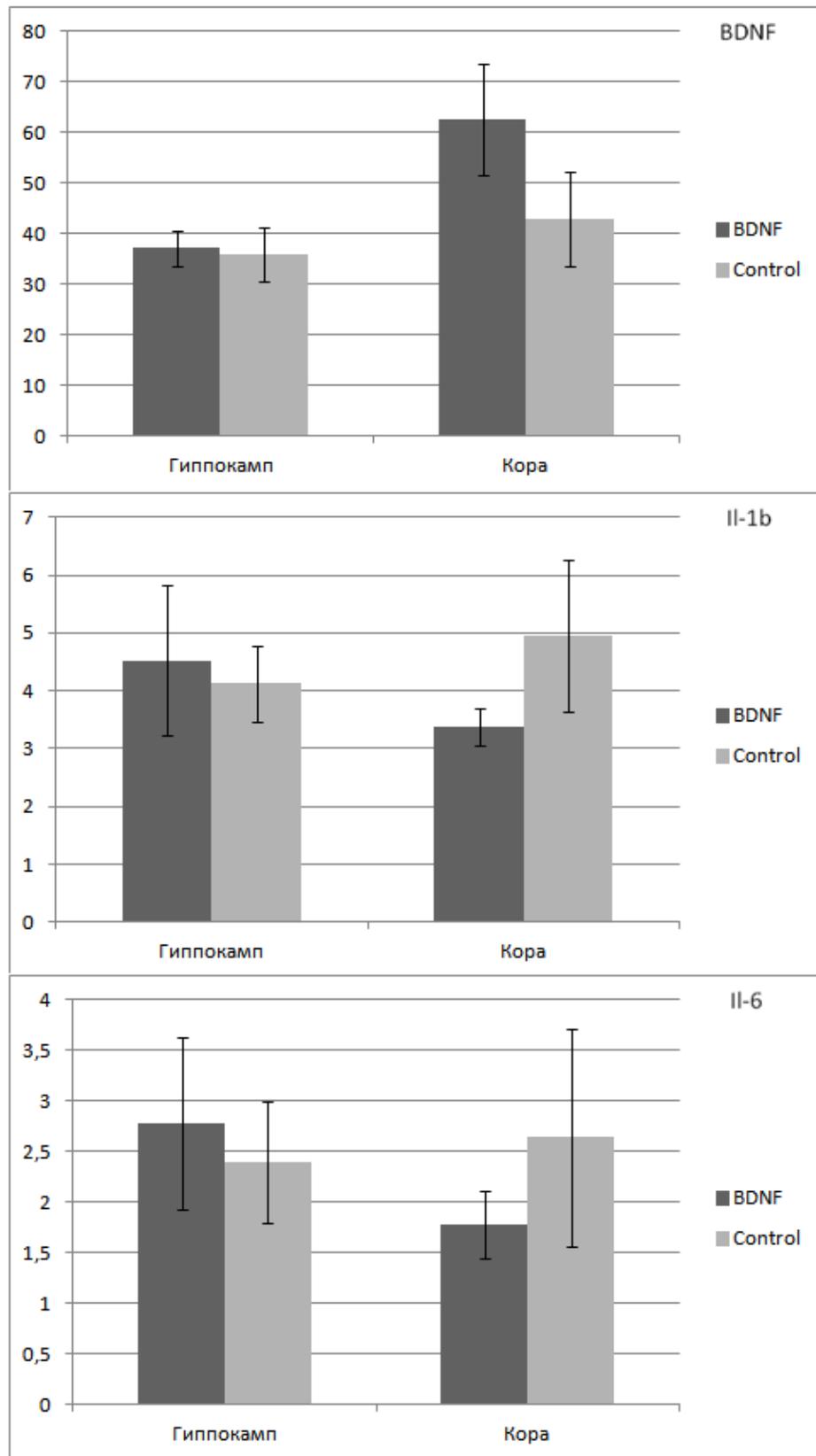


Рис. 9 Время пребывания и пройденный путь в секторах водного лабиринта Морриса в ретесте у контрольной и экспериментальной групп мышей линии AKR.CBA-D13Mit76.

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



*Рис.10 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.*

## Глава 5. Обсуждение результатов

В настоящее время ряд ведущих компаний по производству оборудования для тестирования лабораторных животных, такие как Noldus (Голландия), TSE (Германия), San Diego Instruments (США), производят оборудование для автоматической трассировки животных в ВЛМ. Одной из основных и нерешенных проблем автоматической трассировки животных белого окраса в водном лабиринте Морриса является их низкая контрастность на фоне белой поверхности бассейна, которая не позволяет компьютерным программам безошибочно отделить ассоциированные с животным пиксели от фона. До настоящего времени надежного технического решения этой проблемы не существовало. В ходе настоящего исследования эта проблема была успешно решена. Было предложено повысить контрастность с помощью представления объекта (животного) в проходящем (обращенном) свете, что значительно повышало контрастность вне зависимости от окраски. Эта идея впервые была предложена Куликовым В.А. (ФГБУН Институт автоматики и электрометрии СО РАН) и успешно реализована для задачи автоматической трассировки животных в тестах открытого поля (Куликов и др., 2007; Kulikov et al., 2008a) и принудительного плавания (Kulikov et al., 2010a). Поскольку животные любого окраса являются непрозрачными для света, в проходящем свете они будут выглядеть как темные силуэты и контрастировать с ярко освещенным фоном.

Создание установки с обращенным освещением для автоматической трассировки животных в водном лабиринте Морриса являлось значительно более сложной технической задачей в связи с большим весом бака с водой и потребовало значительных усилий и времени. Однако эта задача была успешно выполнена и установка создана. Было показано, что в данной установке можно одинаково эффективно трассировать животных разных окрасов, белого (AKR, AKR.CBA-D13Mit76, беспородные), агути (CBA) или черного (C57BL/6).

В ходе работы были написаны скрипты для EthoStudio, позволяющие вычислять как традиционные показатели обучения, латентное время и пройденный путь, время, проведенное в четвертях, так и новые перспективные параметры: суммарное расстояние до платформы и путь, пройденный в четверти.

Разработанный нами программно-аппаратный комплекс является оригинальным и не имеет аналогов в нашей стране и в мире. В настоящее время он интенсивно эксплуатируется в виварии ФГБУН Института цитологии и генетики СО РАН. Кроме того была создана и запущена версия для SPF-вивария, включающая ультрафиолетовый стерилизатор воды. Эти комплексы привлекают большой интерес отечественных и зарубежных исследователей.

Мы использовали эти новые разработки для получения основных результатов, представленных в диссертации. В настоящее время эти разработки активно используются для поведенческого фенотипирования новых трансгенных линий мышей, созданных отечественными исследователями.

Основной целью настоящей работы являлось изучение влияния наследственной предрасположенности к каталепсии на обучение и память в ВЛМ. Для решения этой задачи мы сравнили обучение и память у мышей устойчивой к каталепсии линии АКР и животных двух предрасположенных к каталепсии линий СВА и АКР.СВА-D13Mit76. Линия СВА отличается от АКР большим числом генов, и поэтому возможные изменения в их поведении могут быть не связаны с наследственной каталепсией. В то же время, рекомбинантная линия АКР.СВА-D13Mit76 получена посредством переноса дистального фрагмента тринадцатой хромосомы (106-116 м.п.о.), содержащего главный локус каталепсии, из генома СВА в геном АКР и отличается от реципиентной линии АКР только этим фрагментом (Kulikov et al., 2008a). Именно поэтому эта линия в паре с родительской АКР являются

наиболее адекватной моделью для изучения эффектов основного гена каталепсии.

Сравнение обучаемости в ВЛМ у животных линий АКР и АКР.СВА-D13Mit76 показало связь между предрасположенностью к каталепсии и нарушением способности к обучению в этом тесте у мышей рекомбинантной линии. В то же время относительно высокую успешность обучения в этом тесте наблюдается у другой родительской линии – предрасположенной к каталепсии СВА, что может быть объяснено генетическими компенсаторными механизмами, свойственными этой линии (Kulikov et al. 2014).

Пятый день тестирования – ретест – показал, что у мышей линий АКР и рекомбинантных АКР.СВА-D13Mit76 пространственное предпочтение к четвертям соответствует случайному. В то же время животные линии СВА, как и ожидалось, предпочитают II четверть, в которую ее помещали в начале каждого теста. Это показывает, что хотя интактные АКР и СВА смогли научиться выбираться на платформу, они не были в состоянии вспомнить точное ее местоположение в финальном тесте. Очевидно, что четырех дней недостаточно чтобы сформировать долгосрочную память о положении платформы у животных этих линий.

Очень важным является тот факт, что были показаны явные нарушения в процессах обучения и формирования пространственной памяти у животных линии АКР.СВА-D13Mit76. Этот результат свидетельствует о связи наследственной каталепсии с нарушением обучения. Таким образом, эта линия может быть предложена в качестве новой модели генетических, молекулярных и нейробиологических механизмов нарушений памяти и обучения (Kulikov et al. 2014).

Механизмы функционирования долговременной памяти и ее нарушений еще слабо изучены. Показано, что активация неспецифической иммунной системы с помощью ЛПС уменьшает эффективность обучения и выполнения ретеста в тесте водного лабиринта Морриса (Arai et al., 2001; Oitzl et al., 1993;

Sparkman et al., 2005a). В то же время введение ЛПС увеличивает уровень экспрессии мРНК таких маркеров воспаления как  $IL-6$  и  $IL-1\beta$  в мозге (Aid et al., 2008; Burton et al., 2011; Damm et al., 2011). Также существуют экспериментальные доказательства вовлечения  $IL-6$  в механизмы пространственного обучения в тесте водного лабиринта Морриса. У мышей гиперэкспрессия гена  $IL-6$  в мозге ослабляет пространственное обучение (Wei et al. 2012), и в то же время нокаут гена  $IL-6$  предотвращает вызванное ЛПС нарушение выполнения теста Морриса (Sparkman et al., 2006). В данном исследовании мы показали, что неспособность к обучению в тесте водного лабиринта Морриса у животных линии АКР.СВА-D13Mit76 сопровождается двух или трехкратным увеличением уровня мРНК гена  $IL-6$ , соответственно, в гиппокампе и коре по сравнению с животными линий АКР и СВА. Это увеличение уровня мРНК гена  $IL-6$  может быть интерпретировано как признак дисфункции иммунной системы мозга мышей линии АКР.СВА-D13Mit76 (Kulikov et al. 2014). Это предположение согласуется с высокой чувствительностью мозга этих животных к ЛПС (Bazhenova et al., 2013; Kulikov et al., 2010) и с негативным действием  $IL-6$  на обучение в тесте водного лабиринта Морриса (Sparkman et al., 2006; Wei et al., 2012).

Важно отметить увеличение уровня мРНК гена  $IL-1\beta$  в коре мозга каталептических линий АКР.СВА-D13Mit76 и СВА по сравнению с животными устойчивой к каталепсии линии АКР. Этот результат не кажется случайным, поскольку  $IL-1\beta$  является главным фактором возникновения синдрома больного, одним из проявлений которого являются каталептоподобное (летаргическое) снижение моторной активности (Клименко, 2005; Dantzer, 2004).

Итак, полученные нами данные позволяют ассоциировать наследственную предрасположенность к каталепсии с возможными воспалительными процессами в головном мозге предрасположенных к каталепсии животных. Однако это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

BDNF и его рецепторы экспрессируются на высоком уровне в гиппокампе, где они участвуют в долговременной потенциации и формировании долговременной памяти (Lu et al., 2008; Waterhouse and Xu, 2009). Не было выявлено ассоциации наследственной каталепсии или сниженной способности к обучению у мышей AKR.CBA-D13Mit76 с дефицитом уровня мРНК *Bdnf* в мозге. В то же время было показано, что однократное введение 300 нг BDNF в желудочек головного мозга за неделю до начала теста значительно улучшает как обучаемость животных линии AKR.CBA-D13Mit76, так и память, демонстрируемую в процессе ретеста. В отличие как от интактных животных своей линии, так и от контроля, перенесшего введение физиологического раствора, животные, получившие инъекцию BDNF, показали быстрое и значительное снижение таких параметров как путь и кумулятивная дистанция до платформы в течении первых четырех дней тестирования, что свидетельствует об оптимизации усилий и, согласно теории Торндайка, является очевидным свидетельством успешного обучения (Kulikov et al. 2014). В то же время у них не было выявлено значимого снижения времени освобождения. Этот результат показывает, что длина пути и кумулятивная дистанция являются более чувствительными параметрами для отслеживания динамики обучения в этом тесте, чем классический показатель латентного времени освобождения, во всяком случае, у мышей.

С одной стороны, было показано, что внутрочерепное введение BDNF, антител к нему или антисенс олигодеоксинуклеотидов к BDNF не имеют эффекта на выполнение теста, а также хроническое внутрочерепное введение BDNF, как в относительно низких (1.2  $\mu\text{g}$  в день), так и в высоких (12  $\mu\text{g}$  в день) дозах не способствовало восстановлению нормального выполнения теста водного лабиринта Морриса у животных с травматическим повреждением головного мозга (Blaha et al., 2000). С другой стороны, высокая доза (24  $\mu\text{g}$ ), введенная после последнего

установочного дня тестирования, улучшала выполнение ретеста на последний день, способствуя сохранению воспоминаний (Cirulli et al., 2004).

В данном исследовании было обнаружено, что однократное введение значительно меньшей дозы (300 нг) BDNF за неделю до начала обучения значительно способствует сохранению пространственной памяти у мышей линии AKR.CBA-D13Mit76: экспериментальные животные оказались способны вспомнить местоположение платформы в ретесте и предпочитали целевую четверть противоположной (Kulikov et al. 2014).

Не было выявлено связи между уровнем мРНК гена *Il-6* и BDNF у крыс с ЛПС-индуцированными нарушениями в обучении (Zhu et al. 2014). В нашей работе было показано, что однократное введение BDNF в желудочек головного мозга не влияет на уровень мРНК генов *Il-1 $\beta$*  и *Bdnf* в мозге и, более того, не уменьшает высокий уровень мРНК гена *Il-6*, который свойственен животным линии AKR.CBA-D13Mit76. Этот факт в совокупности с тем, что введение BDNF купирует генетически обусловленные нарушения в обучении в тесте водного лабиринта Морриса у животных линии AKR.CBA-D13Mit76, показывает, что данный эффект достигается не нормализацией иммунной системы, а каким-то другим способом.

Ранее было показано, что BDNF снижает выраженность каталепсии у мышей линии ASC (Тихонова и др., 2009; Tikhonova et al., 2012). Способность BDNF подавлять каталепсию и улучшать способность к обучению и память у животных – каталептиков, можно рассматривать как еще одно доказательство связи между наследственной каталепсией и нарушениями обучения и памяти.

Важно так же отметить, что другой нейротрофин – глиальный трофический фактор GDNF, в отличие от BDNF не оказывает влияния на выполнение ВЛМ у мышей (Naumenko et al. 2014).

Таким образом, наследственная каталепсия, по-видимому, связана со сниженной способностью к обучению в ВЛМ. Однако этот негативный

эффект главного гена каталепсии на обучение может быть компенсирован другими генами. Доказательством этого является нормальная способность к обучению мышей другой каталептической линии СВА.

Несмотря на то, что нарушения обучения у мышей AKR.CBA-D13Mit76, по-видимому, не обусловлено какими-либо нарушениями BDNF в мозге, экзогенный BDNF даже после однократного введения не только нормализует способность к обучению, но и значительно усиливает память у этих мышей. Этот факт позволяет надеяться, что в дальнейшем будут разработаны препараты на основе BDNF для улучшения когнитивных способностей. Основным недостатком BDNF является его слабая устойчивость и неспособность проникать в мозг. Недавно был создан синтетический агонист BDNF -7,8-дигидроксифлавон, который обладает высокой устойчивостью и способен проникать в мозг (Yang et al., 2014). Был показан терапевтический эффект 7,8-дигидроксифлавона в тесте ВЛМ (Yang et al., 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.

## 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 $\beta$*  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 цитируемой литературы

1. Альперина, Е.Л. Характер иммунного ответа у мышей новой линии ASC (antidepressant sensitive catalepsy) / Е.Л. Альперина, А.В. Куликов, Н.К. Попова, Т.В. Идова // Бюлл. exper. биол. мед. — 2007. — Т.8. — № 1-2. — с.188-190
2. Анохин К.В. Молекулярная генетика памяти: когнитивная регуляция экспрессии генов в мозге при обучении / К.В. Анохин // Успехи функциональной нейрохимии (ред.С.А.Дамбинова, А.В.Арутюнян), СПб, изд.СП.ун-та — 2003 — с.33-45
3. Аршавский Ю.И. Нейронные механизмы памяти: синаптическая и геномная гипотезы / Ю.И. Аршавский // ЖВНД 2011 — Т.61 — с.660-674.
4. Базовкина Д.В. Каталептогенное действие бактериального липополисахарида у мышей / Д.В. Базовкина, А.В. Куликов // ДАН — 2009 — Т.428 — с.411-412.
5. Базовкина Д.В. Селекция на предрасположенность к катаlepsии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей / Д.В. Базовкина, А.В. Куликов, Е.М. Кондаурова, Н.К. Попова // Генетика — 2005. — Т.41. — Т.9. — с.1222-1228.
6. Дубровина И.И. Обучение и угашение реакции пассивного избегания мышей с высокой предрасположенностью к катаlepsии / И.И. Дубровина, Д.Р. Зиновьев, Д.В. Зиновьева, А.В. Куликов // Рос. Физиол. Журн. — 2008. — Т.94. — с.609-616.
7. Зиновьев Д.Р. Развитие амнезии у мышей разных линий / Д.Р. Зиновьев, Н.И. Дубровина, А.В. Куликов // БЭБМ — 2009 — Т.147 — с.484-486.
8. Карманова И.Г. Фотогенная катаlepsия / И.Г. Карманова // М., Л. Наука. —1964. — с.25

9. Кендел Э. Клеточные основы поведения. / Э. Кендел // М.: Мир. — 1980 — с.598.
10. Колпаков В.Г. Куликов А.В., Алехина Т.А., Чугуй В.Ф., Петренко О.И., Барыкина Н.Н. Кататония или депрессия? Линия крыс ГК – генетическая животная модель психопатологии. / В.Г.Колпаков, А.В. Куликов, Т.А. Алехина, В.Ф.Чугуй, О.И. Петренко, Н.Н.Барыкина // ГЕНЕТИКА — 2004 — Т.40 — №6 — с. 827-834.
11. Колпаков, В.Г. Взаимоотношение между некоторыми формами каталепсии у крыс. Попытка генетического анализа / В.Г. Колпаков, Н.Н. Барыкина, В.Ф. Чугуй, Т.А. Алехина // Генетика. — 1999. — Т.35. — № 6. — с.807-810.
12. Кондаурова, Е.М. Исследование взаимосвязи каталепсии с тревожностью, агрессией и депрессивно-подобным поведением с помощью конгенных линий мышей / Е.М. 3 Кондаурова, Д.В. Базовкина, А.В. Куликов // Рос. Физиол. журн. — 2010. — Т.96. — № 5. — с.464-471.
13. Куликов А., Базовкина Д. Проверка гипотез о сцеплении в гибридологическом анализе альтернативных поведенческих признаков с неполной пенетрантностью // Генетика. — 2003. — Т.39. — с.1066-1072.
14. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. Генетический контроль каталепсии у мышей / А.В. Куликов, Е.Ю. Козлачкова, Н.К. Попова // Генетика. — 1989. — Т.25. — с.1402-1408.
15. Куликов В.А., Киричук В.С., Тихонова М.А., Куликов А.В. Использование плотности вероятности для автоматизации измерения пространственного предпочтения в этологическом эксперименте / В.А. Куликов, В.С. Киричук, М.А. Тихонова, А.В. Куликов // ДАН — 2007 — Т.417. — с.279-283.

16. Куликов, А.В. Картирование гена предрасположенности к каталепсии у мышей с помощью полиморфных микросателлитных маркеров / А.В. Куликов, Д.В. Базовкина, М.П. Муазан, П. Мормэд // Докл. Акад. Наук. — 2003. — Т. 393. — №1. — с. 134-137.
17. Куликов, А.В. Проверка гипотез о сцеплении в гибридологическом анализе альтернативных поведенческих признаков с неполной пенетрантностью / А.В. Куликов, Д.В. Базовкина // Генетика. — 2003. — Т. 39. — № 8. — с. 1066-1072.
18. Куликов, А.В. Роль гликопротеида gr130 в регуляции серотониновой медиаторной системы головного мозга мышей / А.В. Куликов, В.С. Науменко, А.С. Цыбко, Н.А. Синякова, Д.В. Базовкина, Н.К. Попова // Молек. биол. — 2010. — Т.44. — № 5. — с. 904-910.
19. Лисачев, П.Д. Эпилептиформная активность в гиппокампе мышей с разной предрасположенностью к щипковой каталепсии / П.Д. Лисачев, Т.А. Запара, А.В. 64 Куликов, Д.В. Базовкина, Н.К. Попова // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 2008. — Т. 145. — № 3. — С. 263-265.
20. Меннинг О. Поведение животных. / О. Меннинг // Мир — 1982 — с.256
21. Науменко, В.С. Количественное определение экспрессии гена 5-НТ1А серотонинового рецептора в головном мозге / В.С. Науменко, А.В. Куликов // Мол. Биол. — 2006. — Т.40. — № 1. — с.37-44.
22. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин — Москва : Медицина, — 2003. — 288 с.
23. Попова Н.К. Роль серотонина мозга в экспрессии генетически детерминированного защитно-оборонительного поведения / Н.К. Попова // Генетика. — 2004. — Т.40. — № 6. — с.770-778.
24. Попова Н.К., Куликов А.В. Многообразие серотониновых рецепторов как основа полифункциональности серотонина. Успехи функциональной нейробиологии / Н.К. Попова, А.В. Куликов, под общ.

- ред. С.А. Дамбиновой, А.В. Арутюнян — Из-во С.- Петербургского университета — 2003. — с.56-73
25. Попова, Н.К. Серотонин в генетически детерминированных видах защитного поведения / Н.К. Попова // Журн. Высш. Нервн. Деят. — 1997. — Т.47. — № 2. — с.350-357
26. Попова, Н.К. Серотонин и поведение / Н.К. Попова, Е.В. Науменко, В.Г. Колпаков. — Новосибирск : Наука, 1978. — с.304
27. Прибрам К. ЯЗЫКИ МОЗГА. Экспериментальные парадоксы и принципы нейропсихологии. / К.Прибрам Под редакцией и с предисловием действительного члена АПН СССР А. Р. Лурия // Издательство "Прогресс" Москва — 1975
28. Скиннер. Б.Ф. Оперантное поведение. , 1986 Из книги: 5-е издание. - История психологии: XX век. - Хрестоматия : учебное пособие. // М.: Академический проект; Екатеринбург: Деловая книга, 2003. – с.37
29. Тихонова, М.А. Влияние хронического введения флуоксетина на выраженность полового мотивационного и социального поведения мышей линии ASC / М.А. Тихонова, Е.А. Отрощенко, А.В. Куликов // Росс. физиол. журн. — 2010. — Т.96. — № 2. — с.163-172.
30. Тихонова, М.А. Внутримозговое введение нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) снижает выраженность каталептического замирания у мышей с генетической предрасположенностью к каталепсии / М.А. Тихонова, А.В. Куликов, В.С. Науменко, М.В. Морозова., Д.В. Базовкина, Н.К. Попова // Бюл. Эксп. Биол. Мед. — 2009 — Т.148. — № 12. — с.649-652.
31. Тихонова, М.А. Эффект имипрамина на поведение и 5-НТ1А-серотониновые рецепторы мозга у мышей с генетической предрасположенностью к реакции замирания / М.А. Тихонова, В.В. Лебедева, А.В. Куликов, Д.В. Базовкина, Н.К. Попова // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. — 2006. — Т.141. — № 1. — с.53-55.

32. Хоцкин Н. В. Автоматическое измерение характеристик пространственного обучения у мышей в тесте Водный Лабиринт Морриса с обращенным освещением. / Н.В. Хоцкин, Д.В. Фурсенко, Д.В. Базовкина, В.А. Куликов, А.В. Куликов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова — 2014 — Т.100. — с.36-44
33. Клименко В.М. Цитокины и нейробиология поведения больного. / В.М. Клименко под ред. В.Г. Шаляпиной и П.Д. Шибинова. Основы нейробиологии // СПб.: Элсби-СПб — 2005 — с.249-306.
34. Шеперд Г. Нейробиология. / Г.Шеперд // Т.1. М.: Мир — 1987 — с.454
35. Aicardi G. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. / G. Aicardi, E. Argilli, S. Cappello, S. Santi, M. Riccio, H. Thoenen, M. Canossa. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2004. — Vol.101 — N44 — p.15788-15792.
36. Aid S. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2. / S. Aid, R. Langenbach, F. Bosetti. // J Neuroinflammation. — 2008. — Vol.5 — p.17
37. Airaksinen MS. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. / MS Airaksinen, M. Saarma. // Nat Rev Neurosci. — 2002 — Vol.3 — N5 — p.383-394.
38. Amir S. Body pinch induces long lasting cataleptic like immobility in mice: behavioral characterization and the effect of naloxone. / S. Amir, ZW Brown, Z Amit, K. Ornstein. // Life Sci. — 1981 — Vol.28 — N10 — p.1189-1194.
39. Arai K. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. / K. Arai, N. Matsuki, Y. Ikegaya, N. Nishiyama. // Jpn J Pharmacol — 2001 — Vol.87 — P.195–201.

40. Barnes NM. A review of central 5-HT receptors and their function. / NM Barnes, T Sharp // *Neuropharmacology*. — 1999 — Vol.38 — N8 — p.1083-1152.
41. Bazhenova EY. On the association between lipopolysaccharide induced catalepsy and serotonin metabolism in the brain of mice genetically different in the predisposition to catalepsy. / EY Bazhenova, AV Kulikov, MA Tikhonova, DV Bazovkina, DV Fursenko, NK Popova. // *Pharmacol Biochem Behav* — 2013 — Vol.111 — p.71–75.
42. Bazovkina DV. Effects of lipopolysaccharide and interleukin-6 on cataleptic immobility and locomotor activity in mice. / DV Bazovkina, MA Tibeikina, AV Kulikov, NK Popova. // *Neurosci Lett* — 2011— Vol.487 — p.302–304.
43. Berton O. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. / O Berton, CA McClung, RJ Dileone, V Krishnan, W Renthal, SJ Russo, D Graham, NM Tsankova, CA Bolanos, M Rios, LM Monteggia, DW Self, EJ Nestler. // *Science* — 2006 — Vol.311 — N5762 — p.864-868.
44. Binder DK. Brain-derived neurotrophic factor. / DK Binder, HE Scharfman. // *Growth Factors* 2004 — Vol.22 — p.123–131.
45. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. / A Bird // *Genes Dev*. — 2002 — Vol.16 — p.6-21
46. Blaha GR. Brain-derived neurotrophic factor administration after traumatic brain injury in the rat does not protect against behavioral or histological deficits. / GR Blaha, R Raghupathi, KE Saatman, TK McIntosh. // *Neuroscience* — 2000 — Vol.99 — p.483–93.
47. Bliss TV. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. / TV Bliss, T Lomo. // *J Physiol*. — 1973 — Vol.232 — N2 — p.331-356.

48. Bluthé RM. Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. / RM Bluthé, B Michaud, V Poli, R Dantzer // *Physiol Behav.* — 2000 — Vol.70 — N3-4 — p. 367-373.
49. Bogdanović O. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. / O Bogdanović, GJC Veenstra // *Chromosoma* — 2009 — Vol.118 — N5 — p.549–565
50. Bramham CR. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. / CR Bramham, E Messaoudi. // *Prog Neurobiol.* — 2005 — Vol.76 — N2 — p.99-125.
51. Bromley-Brits K. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. / K Bromley-Brits, Y Deng, W Song. // *J Vis Exp.* — 2011 — Vol.20 — N53 — p.2920.
52. Burton MD. Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. / MD Burton, NL Sparkman, RW Johnson. // *J Neuroinflammation* — 2011 — Vol.8 — p.54.
53. Byrne J.H. Learning and Memory: Basic Mechanisms / JH Byrne. // *Fundamental neuroscience; Third edition* — 2008 — p.1133-1152
54. Caroff SN. Residual catatonic state following neuroleptic malignant syndrome./ SN Caroff, SC Mann, Jr PE Keck, A Francis // *J Clin Psychopharmacol* — 2000 — Vol.20 — p.257–259.
55. Castagné V. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. / V Castagné, P Moser, S Roux, RD Porsolt. // *Curr Protoc Pharmacol.* — 2010 — Chapter 5 — Unit 5.8.
56. Chain DG. Mechanisms for generating the autonomous cAMP-dependent protein kinase required for long-term facilitation in *Aplysia*. / DG Chain, A Casadio, S Schacher, AN Hegde, M Valbrun, N Yamamoto, AL Goldberg, D Bartsch, ER Kandel, JH Schwartz. // *Neuron.* — 1999 — Vol.22 — N1 — p.147-156.

57. Chamizo V.D. Spatial Learning: Conditions and Basic Effects / V.D. Chamizo. // *Psicológica* — 2002 — Vol.23 — p.33-57
58. Chan JP. Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. / JP Chan, J Cordeira, GA Calderon, LK Iyer, M Rios // *Mol Cell Neurosci.* — 2008 — Vol.39 — N3 — p.372-383.
59. Cirulli F. Intracerebroventricular administration of brain-derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behavior but not memory retention in a Morris water maze task. / F Cirulli, A Berry, E Alleva. // *Neurosci Lett* — 2000 — Vol.287 — p.207–210.
60. Cirulli F. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. / FCirulli, A Berry, F Chiarotti, E Alleva // *Hippocampus* — 2004 — Vol.14 — p.802–807.
61. Dalm S. Post-training self administration of sugar facilitates cognitive performance of male C57BL/6J mice in two spatial learning tasks. / S Dalm, L. Schwabe, H Schachinger, M.S. Oitzl // *Behav Brain Res* — 2009 — Vol.198 — p.98-104.
62. Dalm S. Quantification of swim patterns in the Morris water maze. /S Dalm, J Grootendorst, ER de Kloet, MS Oitzl. // *Behav Res Methods Instrum Comput.* — 2000 — Vol.32 — p.134-139.
63. Damm J. Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. / J Damm, GN Luheshi, R Gerstberger, J Roth, C Rummel. // *J Comp Neurol.* — 2011 — Vol.519 — p.480-505.
64. Daniels J. Catatonia: clinical aspects and neurobiological correlates. / J Daniels. // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* — 2009 — Vol.21 — N4 — p.371-380.

65. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. / R Dantzer // *Eur J Pharmacol.* — 2004 — Vol.500 — N1-3 — p.399-411.
66. De Ryck M, Teitelbaum P. Morphine catalepsy as an adaptive reflex state in rats. / M De Ryck, P Teitelbaum // *Behav Neurosci.* — 1984 — Vol.98 — N2 — p.243-261.
67. Derdikman D, Moser EI. A manifold of spatial maps in the brain. / D Derdikman, EI Moser. // *Trends Cogn Sci.* — 2010 — Vol.14 — N12 — p.561-569.
68. D'Hooge R, De Deyn PP. Application of the Morriswater maze in the study of learning and memory. / R D'Hooge, PP De Deyn. // *Brain Res Rev* — 2001 — Vol.36 — p.60–90.
69. DiStefano PS. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. / PS DiStefano, B Friedman, C Radziejewski, C Alexander, P Boland, CM Schick, RM Lindsay, SJ Wiegand. // *Neuron.* — 1992 — Vol.8 — N5 — p.983-993
70. Dixon AK. Ethological strategies for defense in animals and humans: their role in some psychiatric disorders. / AK Dixon. // *Br J Med Psychol* — 1998 — Vol.71 — p.417–445.
71. Duman RS. Synaptic plasticity and mood disorders. / RS Duman // *Mol Psychiatry* — 2002 — Vol.7(Suppl. 1) — p.29–34.
72. Feldman LA, Shapiro ML, Nalbantoglu J. A novel, rapidly acquired and persistent spatial memory task that induces immediate early gene expression. / LA Feldman, ML Shapiro, J Nalbantoglu. // *Behav Brain Funct.* — 2010 — Vol.6 — p.35.
73. Fleischmann A. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. / A Fleischmann, O Hvalby, V Jensen, T Strekalova, C Zacher, LE Layer, A

- Kvello, M Reschke, R Spanagel, R Sprengel, EF Wagner, P Gass. // *J Neurosci.* — 2003 — Vol.23 — N27 — p.9116-9122.
74. Goldberg JL. The relationship between neuronal survival and regeneration. / JL Goldberg, BA Barres // *Annu Rev Neurosci.* — 2000 — Vol.23 — p.579-612.
75. Hebb, DO. The organization of behavior. / DO Hebb. // New York, Wiley. — 1949
76. Jacobs BL. Structure and function of the brain serotonin system. / BL Jacobs, EC Azmitia. // *Physiol Rev.* — 1992 — Vol.72 — N1 — p.165-229.
77. Kandel ER The molecular biology of memory storage: A dialog between genes and synapses. / ER Kandel // *Science* — 2001 — Vol.294. — p.1030-1038 .
78. Kandel, E.R. In search of memory |the emergence of a new science of mind / ER Kandel // New York; Norton — 2007 — N XV
79. Kaplan DR. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. / DR Kaplan, FD Miller // *Curr Opin Neurobiol.* — 2000 — Vol.10 — N3 — p.381-391.
80. Kim BH. Inhibitory effect of chroman carboxamide on interleukin-6 expression in response to lipopolysaccharide by preventing nuclear factor-kappaB activation in macrophages. / BH Kim, KH Lee, EY Chung, YS Chang, H Lee, CK Lee, KR Min, Y Kim. // *Eur J Pharmacol.* — 2006a — Vol.543 — N1-3 — p.158-165
81. Kim YJ. Il-1beta, an immediate early protein secreted by activated microglia, induces iNOS/NO in C6 astrocytoma cells through p38 MAPK and NF-kappaB pathways. / YJ Kim, SY Hwang, ES Oh, S Oh, IO Han // *J Neurosci Res* — 2006b — Vol.84 — p.1037–1046.

82. Klemm WR. Drug effects on active immobility responses: what they tell us about neurotransmitter systems and motor functions. / WR Klemm // *Prog Neurobiol.* — 1989 — Vol.32 — N5 — p.403-422.
83. Kondaurova EM. Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT serotonin receptor gene in mice. / EM Kondaurova, DV Bazovkina, AV Kulikov, NK Popova // *Genes Brain Behav.* — 2006 — Vol.5 — N8 — p.596-601.
84. Korb E. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. / E Korb, S Finkbeiner // *Trends Neurosci.* — 2011 — Vol.34 — N11 — p.591-598.
85. Kossel AH. A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation. / AH Kossel, SB Cambridge, U Wagner, T Bonhoeffer. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2001 — Vol.98 — N25 — p.14702-14707
86. Kulikov A. Correlation between tryptophan hydroxylase activity in the brain and predisposition to pinch-induced catalepsy in mice / A Kulikov, E Kozlachkova, N Kudryavtseva, N Popova. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1995. — Vol.50. — p.431-435.
87. Kulikov AV. Activity of tryptophan hydroxylase in brain of hereditary predisposed to catalepsy rats. / AV Kulikov, EY Kozlachkova, NK Popova // *Pharmacol Biochem Behav.* — 1992 — Vol.43 — N4 — p.999-1003.
88. Kulikov AV. Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains. / AV Kulikov, DV Osipova, VS Naumenko, NK Popova. // *Genes Brain Behav.* — 2005 — Vol.4 — N8 — p.482-485.
89. Kulikov AV. Association between tryptophan hydroxylase-2 genotype and the antidepressant effect of citalopram and paroxetine on immobility time in the forced swim test in mice. / AV Kulikov, MA Tikhonova, DV Osipova, VA Kulikov, NK Popova // *Pharmacol Biochem Behav.* — 2011 — Vol.99 — N4 — p.683-687.

90. Kulikov AV. Association of glycoprotein gp130 with hereditary catalepsy in mice. / AV Kulikov, NA Sinyakova, VS Naumenko, DV Bazovkina, NK Popova. // *Genes Brain Behav* — 2010b — Vol.9 — p.997–1003.
91. Kulikov AV. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test. / AV Kulikov, MV Morozova, VA Kulikov, VS Kirichuk, NK Popova. // *Neurosci Methods*. — 2010a — Vol.15 — Vol.191 — N1 — p.26-31.
92. Kulikov AV. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting. / AV Kulikov, MA Tikhonova, VA Kulikov // *J Neurosci Methods*. — 2008b — Vol.30 — Vol.170 — N2 — p.345-51.
93. Kulikov AV. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice. / AV Kulikov, DV Bazovkina, EM Kondaurova, NK Popova // *Genes Brain Behav* — 2008a — Vol.7 — p.506–512.
94. Kulikov AV. Inheritance of predisposition to catalepsy in mice. / AV Kulikov, EY Kozlachkova, GB Maslova, NK Popova // *Behav Genet*. — 1993 — Vol.23 — N4 — p.379-384.
95. Kulikov AV. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. / AV Kulikov, VS Naumenko, IP Voronova, MA Tikhonova, NK Popova. // *J Neurosci Methods*. — 2005 — Vol.141 — N1 — p.97-101.
96. Kulikov AV. 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. / AV Kulikov, DV Fursenko, NV Khotskin, DV Bazovkina, VA Kulikov, VS Naumenko, EY Bazhenova, NK Popova // *Pharmacol Biochem Behav*. — 2014 — Vol.122 — p.266-272.
97. Kulikov AV. The C1473G polymorphism in gene *tph2* is the main factor mediating the genetically defined variability of tryptophan hydroxylase-2

- activity in the mouse brain. / AV Kulikov, DV Osipova, NK Popova. // *Genetika*. — 2007 — Vol.43 — N12 — p.1676-1681.
98. Kulikov AV. The genetic cataleptic (GC) rat strain as a model of depressive disorders / AV Kulikov, VG Kolpakov, NK Popova // *In Animal Models in Biological Psychiatry* / Kaluev A. (ed.) — 2006 — p.59-73.
99. Kulikov AV. The mapping of the gene of susceptibility to catalepsy in mice using polymorphic microsatellite markers. / AV Kulikov, DV Bazovkina, MP Moisan, P Mormede. // *Dokl Biol Sci* — 2003 — N393 — 531–534.
100. Lee JW. Catatonic variants, hyperthermic extrapyramidal reactions, and subtypes of neuroleptic malignant syndrome. / JW Lee // *Ann Clin Psychiatry* — 2007 — Vol.19 — N1 — P.9-16.
101. Lee JW. Neuroleptic-induced catatonia: clinical presentation, response to benzodiazepines, and relationship to neuroleptic malignant syndrome. / JW Lee // *J Clin Psychopharmacol*. — 2010 — Vol.30 — N1 — p.3-10.
102. Lester BM, Ian Behavioral epigenetics/ BM Lester, E Tronick, E Nestler, T Abel, B Kosofsky, CW Kuzawa, CJ Marsit, // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2011 — Vol.1226 — p.14–33
103. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. / J Lisman, H Schulman, H Cline // *Nat Rev Neurosci*. — 2002 — Vol.3 — N3 — p. 175-190.
104. Liu QR. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. / QR Liu, L Lu, XG Zhu, JP Gong, Y Shaham, GR Uhl // *Brain Res*. — 2006 — Vol.1067 — N1 — p.1-12.
105. Lu Y. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? / Y Lu, K Christian, B Lu // *Neurobiol Learn Mem*. — 2008 — Vol.89 — N3 — p.312-323.
106. Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. / I Lucki // *Biol Psychiatry*. — 1998 — Vol.44 — N3 — p.151-62.

107. Lüscher C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). / C Lüscher, RC Malenka. // Cold Spring Harb Perspect Biol. — 2012 — Vol.4 — N6.
108. Markus CR. Dietary amino acids and brain serotonin function; implications for stress-related affective changes. / CR Markus // Neuromolecular Med. — 2008 — Vol.10 — N4 — p.247-258
109. McAllister AK. Neurotrophins and synaptic plasticity. / AK McAllister, LC Katz, DC Lo // Annu Rev Neurosci — 1999 — Vol.22 — p.295–318.
110. Meiri N. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. / N Meiri, K Rosenblum // Brain Res. — 1998 — Vol.789 — N1 — p.48-55.
111. Méndez-Couz M. Spatial memory extinction: a c-Fos protein mapping study. / M Méndez-Couz, NM Conejo, G Vallejo, JL Arias // Behav Brain Res. — 2014 — Vol.260 — p.101-110
112. Morris R., Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. / R Morris // J. Neurosci. Methods — 1984 — Vol.11 — p.47–60.
113. Moser E. Mapping your every move. / E Moser, MB Moser // Cerebrum. — 2014 — Vol.2014 — p.4.
114. Moser MB. Place cells, grid cells, and memory. / MB Moser, DC Rowland, EI Moser // Cold Spring Harb Perspect Med. — 2015 — Vol.7 — N2
115. Naghdi N. The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. / N Naghdi, N Majlessi, T Bozorgmehr // Behav Brain Res. — 2003 — Vol. 139 — N1-2 — p.69-73.
116. Naumenko VS. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically

- predisposed to behavioral disorders mouse strains. / VS Naumenko, EM Kondaurova, DV Bazovkina, AS Tsybko, MA Tikhonova, AV Kulikov // *Neuroscience* — 2012 — Vol.214 — p.59–67.
117. Naumenko VS. 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. / VS Naumenko, EM Kondaurova, DV Bazovkina, AS Tsybko, TV Ilchibaeva, NV Khotskin, AA Semenova, NK Popova // *Behav Brain Res.* — 2014 — Vol.274C — p.1-9.
118. Naumenko VS. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. / VS Naumenko, DV Osipova, EV Kostina, AV Kulikov // *J Neurosci Methods.* — 2008 — Vol. 170 — N2 — p.197-203.
119. Oitzl MS. Interleukin-1 beta, but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. / MS Oitzl, H van Oers, B Schobitz, ER de Kloet // *Brain Res* — 1993 — Vol.613 — p.160–163.
120. Okuno H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. / H Okuno // *Neurosci Res.* — 2011 — Vol.69 — N3 — p.175-186.
121. Ornstein K. Pinch-induced catalepsy in mice. / K Ornstein, S Amir // *J Comp Physiol Psychol.* — 1981 — Vol.95 — N5 — p.827-835.
122. Osipova DV. C1473G polymorphism in mouse *tph2* gene is linked to tryptophan hydroxylase-2 activity in the brain, intermale aggression, and depressive-like behavior in the forced swim test. / DV Osipova, AV Kulikov, NK Popova // *J Neurosci Res.* — 2009 — Vol.87 — N5 — p.1168-1174.
123. Osipova DV. Distribution of the C1473G polymorphism in tryptophan hydroxylase 2 gene in laboratory and wild mice. / DV Osipova, AV Kulikov, K Mekada, A Yoshiki, MP Moshkin, EV Kotenkova, NK Popova. // *Genes Brain Behav.* — 2010 — Vol.9 — N5 — p. 537-543

124. Paparrigopoulos T. Catatonia as a risk factor for the development of neuroleptic malignant syndrome: report of a case following treatment with clozapine. / T Paparrigopoulos, E Tzavellas, P Ferentinos, I Mourikis, J Liappas // *World J Biol Psychiatry*. — 2009 — Vol.10 — N1 — p.70-73
125. Patapoutian A. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. / A Patapoutian, LF Reichardt // *Curr Opin Neurobiol*. — 2001 — Vol.11 — N3 — p.272-280.
126. Plath N. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. / N Plath, O Ohana, B Dammermann, ML Errington, D Schmitz, C Gross, X Mao, A Engelsberg, C Mahlke, H Welzl, U Kobalz, A Stawrakakis, E Fernandez, R Waltereit, A Bick-Sander, E Therstappen, SF Cooke, V Blanquet, W Wurst, B Salmen, MR Bösl, HP Lipp, SG Grant, TV Bliss, DP Wolfer, D Kuhl // *Neuron*. — 2006 — Vol. 52 — N3 — p.437-444.
127. Popova NK. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. / NK Popova // *Bioessays* — 2006 — Vol.28 — N5 — p.495-503.
128. Popova, NK. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptors differentially modulate mouse sexual arousal and the hypothalamo-pituitary-testicular response to the presence of a female / N.K. Popova, T.G. Amstislavskaya // *Neuroendocrinol*. — 2002a. — Vol. 76. — N1. — p.28- 34. 181.
129. Popova, NK. Involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> serotonergic receptor subtypes in sexual arousal in male mice / N.K. Popova, T.G. Amstislavskaya // *Psychoneuroendocrinol*. — 2002b. — Vol. 27. — N5. — p.609-618.
130. Post RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. / RM Post // *J Psychiatr Res*. — 2007 — Vol.41 — N12 — p.979-990.

131. Rummel C. Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. / C Rummel, K Matsumura, GN Luheshi // *Brain Res Bull.* — 2011 — Vol.86 — N5-6 — p.319-325
132. Russo CD. Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1 $\beta$  production. / CD Russo, AI Boullerne, V Gavrilyuk, DL Feinstein // *J Neuroinflammation* — 2004 — Vol.1 — p.9
133. Sakowski SA. Mouse tryptophan hydroxylase isoform 2 and the role of proline 447 in enzyme function. / SA Sakowski, TJ Geddes, DM Kuhn // *J Neurochem.* — 2006 — Vol.96 — N3 — p.758-765.
134. Sanchez AL. BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. / AL Sanchez, BJ Matthews, MM Meynard, B Hu, S Javed, S Cohen Cory // *Development.* — 2006 — Vol.133 — N13 — p.2477-2486.
135. Chesnokova V. Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. / V Chesnokova, S Melmed // *Endocrinology.* — 2002 — Vol.143 — N5 — p.1571-1574.
136. Saudou F. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. / F Saudou, R Hen // *Neurochem Int.* — 1994a — Vol.25 — N6 — p.503-532.
137. Saudou F. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular and functional diversity. / F Saudou, R Hen // *Adv Pharmacol.* — 1994b — Vol.30 — p.327-80.
138. Schulman H. Intracellular signaling, / H Schulman, JL Roberts.// *Fundamental neuroscience; Third edition;* — 2008 — p.205-226
139. Schwartz PM. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF $^{-/-}$  mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. /PM

- Schwartz, PR Borghesani, RL Levy, SL Pomeroy, RA Segal // *Neuron*. — 1997 — Vol.19 — N2 — p.269-281.
140. Shirayama Y. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. / Y Shirayama, AC Chen, S Nakagawa, DS Russell, RS Duman // *J Neurosci*. — 2002 — Vol.22 — N8 — p.3251-3261.
141. Shires KL. Mapping immediate-early gene activity in the rat after place learning in a water-maze: the importance of matched control conditions. / KL Shires, JP Aggleton // *Eur J Neurosci*. — 2008 — Vol.28 — N5 — p.982-996
142. Sparkman NL. Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. / NL Sparkman, RA Kohman, VJ Scott, GW Boehm // *Physiol Behav* — 2005a — Vol.86 — p.244–251.
143. Sparkman NL. Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice. / NL Sparkman, LA Martin, WS Calvert, GW Boehm // *Behav Brain Res* — 2005b — Vol.159 — p.145–151.
144. Sparkman NL. Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. / NL Sparkman, JB Buchanan, JRR Heyen, J Chen, JL Beverly, RW Johnson // *J Neurosci* — 2006 — Vol.26 — p.10709–10716.
145. Tapia-Arancibia L. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. / L Tapia-Arancibia, F Rage, L Givalois, S Arancibia // *Front Neuroendocrinol*. — 2004 — Vol.25 — N2 — p.77-107.
146. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. / H Thoenen // *Science* — 1995 — Vol.270 — p.593–598.
147. Tikhonova M. Antidepressant-Like Effects of Central BDNF Administration in Mice of Antidepressant Sensitive Catalepsy (ASC) Strain.

- / M Tikhonova, AV Kulikov // Chin J Physiol. — 2012 — Vol.31 — N55(4) — p.284-293.
148. Tikhonova MA. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response. / MA Tikhonova, AV Kulikov, DV Bazovkina, EA Kulikova, AS Tsybko, EY Bazhenova // Behav Brain Res — 2013— Vol.243 — p.53–60.
149. Vander-Wende C. Antagonism by dopa of morphine analgesia. A hypothesis for morphine tolerance. / C Vander-Wende, MT Spoerlein // Res Commun Chem Pathol Pharmacol. —1972 — Vol.3 — N1 — p.37-45.
150. Walther DJ. A unique central tryptophan hydroxylase isoform / D Walther, M Bader // Bioche. Pharmacol. — 2003 — Vol.66. — N9 — p.1673-1680.
151. Walther DJ. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. / DJ Walther, M Bader // Biochem Pharmacol. — 2003 — Zhang Vol.66 — N9 — p.1673-1680.
152. Walther, DJ. Synthesis of serotonin by a second thryptophan hydroxylase isoform / D.J. Walther, J.-U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink, M. Bader // Science. — 2003 — Vol.299. — N5603. — p.76.
153. Waterhouse EG. New insites into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. / EG Waterhouse, B Xu // Mol Cell Neurosci — 2009 — Vol.42 — p.81–89.
154. Weder ND. Catatonia: a review. / ND Weder, S Muralee, H Penland, RR Tampi // Ann Clin Psychiatry — 2008 — Vol.20 — p.97–107.
155. Wei H. Brain Il-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. / H Wei, KK Chadman, DP McCloskey, AM Sheikh, M Malik, WT Brown // Biochim Biophys Acta — 2012 — Vol.1822 — p.831–842.

156. Wei H. Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. / H Wei, KK Chadman, DP McCloskey, AM Sheikh, M Malik, WT Brown, X Li.// *Biochim Biophys Acta*. — 2012 — Vol.1822 — N6 — p.831-842.
157. Yang G. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories./ G Yang, F Pan, WB Gan // *Nature*. — 2009 — Vol.462 — N7275 — p.920-924.
158. Yang YJ. Small-molecule TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone reverses cognitive and synaptic plasticity deficits in a rat model of schizophrenia / YJ Yang, YK Li, W Wang, JG Wan, B Yua, MZ Wang, B Hu // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* — 2014 — Vol.122 — p.30–36
159. Young LT. Postreceptor pathways for signal transduction in depression and bipolar disorder. / LT Young // *J Psychiatry Neurosci*. — 2001 — Vol.26 — p.17-22.
160. Zhang J. Hippocampal expression of c-fos is not essential for spatial learning. / J Zhang, JM McQuade, CV Vorhees, M Xu // *Synapse*. — 2002 — Vol.46 — 2 — p.91-99.
161. Zhang X. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. / X Zhang, JM Beaulieu, TD Sotnikova, RR Gainetdinov, MG Caron // *Science*. — 2004 — Vol.9 — Vol.305 — N5681 — p.217.
162. Zhu B. Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus. / B Zhu, Z-G Wang, J Ding, N Liu, D-M Wang, L-C Ding // *Exp Ther* — 2014 — Vol.7 — p.750–754.
163. Zifa E. 5-Hydroxytryptamine receptors. / E Zifa, G Fillion // *Pharmacol Rev*. — 1992 — Vol.44 — N3 — p.401-458.