

ПОВЕДЕНЧЕСКОЕ ФЕНОТИПИРОВАНИЕ: СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

А.В. Амикишиева

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: amik@bionet.nsc.ru

Поведенческое фенотипирование – процедура комплексной оценки поведенческих характеристик лабораторных животных – разработана в целях стандартизации сбора и интерпретации поведенческих данных для выявления нарушений функционирования центральной нервной системы у нокаутных и трансгенных генотипов начиная с элементарных моторно-двигательных реакций и заканчивая особенностями эмоционально-психической сферы. В статье даются комплексный анализ арсенала современных методов поведенческой физиологии и описание специализированного оборудования ведущих производителей. Приводится ряд экспериментальных моделей на животных – аналогов расстройств человеческой психики. Демонстрируются результаты исследований, поясняющие механизмы функционирования нервной системы.

Ключевые слова: поведение, фенотипирование, SHIRPA, мыши, лабораторные животные, экспериментальные модели.

Введение

Специфику современного поведенческого фенотипирования экспериментальных животных определяет, прежде всего, наличие высокопрофессионального оборудования, опирающегося на цифровые технологии. Автоматическая одновременная фиксация множества физиологических и поведенческих параметров, возможность сопоставления их, поиска корреляций и т. п. – все это создало принципиально новые возможности для поведенческих исследований.

В то же время более комплексными стали требования к исследованиям. В последнее десятилетие была разработана батарея стандартных тестов для поведенческого фенотипирования мутантных и нокаутных линий мышей – так называемый SHIRPA-протокол (Brown *et al.*, 2000; Masuya *et al.*, 2005; Crawley, 2008). Он включает более 40 пунктов (см. первые два блока тестов из табл. 1) и позволяет проводить универсальный скрининг с выявлением морфологических дефектов и нарушений в нервно-мышечной, сенсорной и вегетативной системах организма. Последний блок тестов, представленный в

табл. 1, оценивает более тонкие функциональные особенности нервной системы, связанные с индивидуальным и социальным поведением животных, их интеллектом и психикой. Преследуя единую цель всесторонней проверки функционирования нервной системы, разные лаборатории используют вариативные наборы поведенческих тестов.

Разделение поведения на моторные и сенсорные, эмоциональные, социальные и «интеллектуальные» компоненты является во многом условным, но необходимым для дифференцировки их друг от друга. Реально эти поведенческие паттерны представляют пересекающиеся множества, где в каждом присутствуют компоненты всех остальных (рис. 1). В эксперименте предварительное тестирование моторных и сенсорных функций позволяет избежать фальшивых положительных и отрицательных результатов при предъявлении более сложных поведенческих задач, например, с обучением, при котором используются сенсорные стимулы и в ходе выполнения участвует моторика.

Ряд зарубежных компаний специализируются на производстве оборудования и программного обеспечения для поведенческого феноти-

пирования, среди них «Columbus Instruments», «Noldus, San Diego Instrument», «Mouse Specifics Inc.», «Med Associates» и др.

Методы и оборудование для оценки индивидуальной (моторной) активности

Нарушения двигательной активности лабораторных животных могут представлять исследовательский интерес; они имеют место

у линий мышей, моделирующих болезни Паркинсона (непроизвольное подрагивание конечностей), Хантингтона (нейродегенеративное заболевание), латерального склероза, атаксии, дистонии и пр.

Open field. Разработка методов экспериментального изучения поведения животных началась в 1930-х гг. Американский исследователь Холл разработал тест «Open field» («Открытое поле») для оценки общей (локомоторной) и

Таблица 1

Вариант батареи тестов для фенотипирования животных

№	Блоки поведенческого и физиологического скрининга
I	Общее здоровье, внешний вид, индивидуальные характеристики: Вес, длина и форма тела, ушей, головы; наличие шерсти, усов и пр.; Ряд физиологических параметров организма, в том числе температура тела; анализ крови, мочи; сердечный и дыхательный ритмы; Мышечный и брюшной тонус, тонус конечностей, передача нервно-мышечного возбуждения; Раздражимость, агрессивность, вокализация, страх; Особенности уринации, дефекации, слюнотечения, слезотечения; Потребление пищи и воды
II	Оценка сенсорных и моторных функций животного: Слуховая, зрительная, ольфакторная и болевая чувствительность; Особенности позы, походки, поддержание равновесия, наличие причудливого поведения; Спонтанная локомоторная активность; Циркадные ритмы
III	Анализ высшей нервной деятельности животного: Социальное и эмоциональное поведение Обучение и память

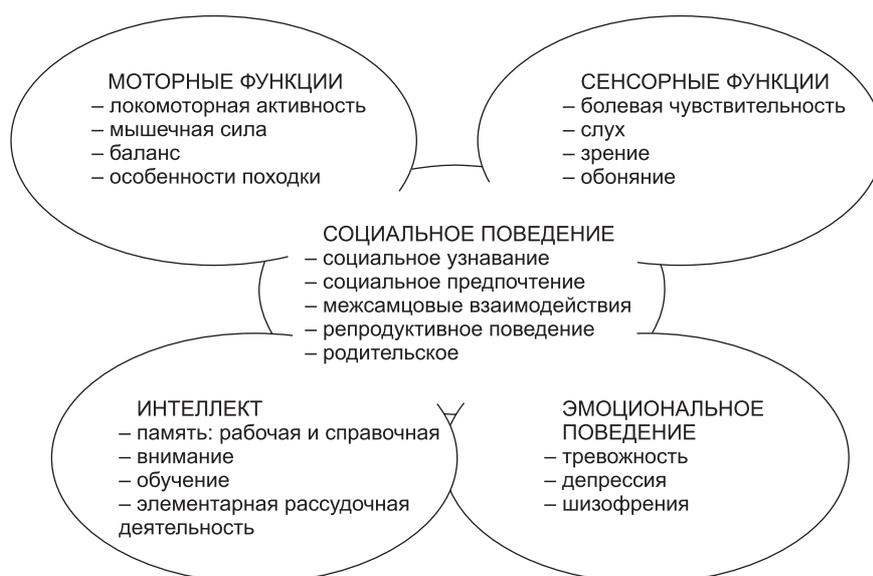


Рис. 1. Изображение составляющих компонентов поведения в виде системы пересекающихся множеств.

исследовательской активности (Hall, 1934). Установка представляла арену, поделенную на равные квадраты. В центр помещали животное, регистрировали число пересеченных квадратов и, таким образом, пройденное за определенное время (4–10 мин) расстояние. Этот тест активно используется и в настоящее время, в том числе для изучения тревожности, памяти, начального скрининга фармакологических препаратов.

Современная установка снабжена фотоэлементами, что позволяет автоматически регистрировать исследовательскую и базовую активность животного, груминг (поведение, направленное на прихорашивание – облизывание, почесывание и т. п.), вертикальную активность, снижение активности в процессе освоения территории, редкие или стереотипные движения (индикатор нарушений ЦНС); подсчитывать пропорцию нахождения животного на периферии или в центре арены (как показатель тревожности); демонстрировать траекторию движения и пр. (http://www.sandiegoinstruments.com/prod_flexopen.htm). Данные записываются в цифровом формате, совместимом с Microsoft Word и Microsoft Excel.

Home cage activity. Система используется для исследования поведения животных в домашней клетке. Дополняет данные наблюдений в тестах, фокусирующихся на конкретных поведенческих ответах. Этологический репертуар животных в домашних клетках более комплексный, не зависит от оперативного вмешательства человека и позволяет проследить поведение с учетом взаимодействий между конкурирующими мотивациями и в течение ряда циркадных циклов.

Современное оборудование снабжено фотоэлементами и/или видеокамерой, позволяющими снимать и автоматически регистрировать активность животного, трекинг (траектория движения), среднюю скорость передвижений, время нахождения в пластиковом укрытии, процент времени неподвижности животного, время приема пищи и воды и пр. Система способна снимать данные одновременно с 24–48 клеток (<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/solutions/research-small-lab-animals/home-cage-monitoring-system>).

Rotometr. Ротометр – прибор, подсчитывающий число вращений животного за опре-

деленный интервал времени (<http://www.med-associates.com/activity/rotometr.htm>). Используется для оценки этого параметра после хирургических вмешательств на спинном и головном мозге, при исследованиях паркинсонизма в моделях на животных.

Rotarod. Ротарод – прибор, оценивающий чувство равновесия, способность животного балансировать на вращающемся барабане, разработан в 1950-х гг. (Dunham, Miya, 1957). Увеличение скорости вращения провоцирует более быстрое падение с установки. Регистрируется либо максимальная скорость, когда животное еще удерживается на ротароде в течение заданного времени (~ 30 сек), либо время падения с ротарода при разных скоростях вращения барабана. Тест используется в исследованиях трансгенных животных и при изучении возрастных изменений, поскольку с возрастом выполнение данного теста нарушается (<http://www.med-associates.com/activity/rotarod.htm>).

Raised-beam walking. Тест называется «прогулка по приподнятой перекладине». Используется для оценки равновесия, в тестах на обучение или возрастные изменения. Животное учится путешествовать по перекладине (разной конфигурации и толщины), достигая закрытой (безопасной) платформы. Регистрируются время ходьбы, соскальзывание лап, падения. При нарушенном равновесии животное цепко держится за перекладину, боясь падения, что удлиняет латентный период перехода (Goldstein, Davis, 1990).

Gait analysis system. Анализ походки по следам (отпечаткам лап) – тест, используемый, в частности, в исследованиях на животных с хирургическими вмешательствами на спинном мозге, при скрининге фармакологических препаратов. Установка представляет коридор, по которому животное предварительно обучают проходить. Результаты теста сравнивают до и после оперативного вмешательства, на фоне медикаментозной терапии.

Современные установки позволяют автоматически регистрировать время и скорость прохождения коридора, продолжительность касания частей тела животного пола (отдельно каждой ногой, хвостом, брюхом, носом) (<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/solutions/research-small-lab-animals/gait-analysis-sys->

tem-spinal-cord-injur). Оценивается степень координации животного. Так, в случае нормальной локомоции центр следа задней лапы падает на центр предшествующего следа передней лапы. При нарушениях походки постановка задней лапы становится вариабельной и дистанция между следами передней и задней лап увеличивается тем больше, чем больше нарушения.

Tremor monitor. Установка для оценки тремора животных; используется при фенотипировании трансгенных животных, анализе нарушений ЦНС, возрастных изменений, в фармакологических исследованиях; отличает тремор от стереотипных движений. Оборудована программным обеспечением, представляет результаты в графическом и цифровом форматах, совместимых с ПК (http://www.sandiegoinstrument.com/prod_tremormon.htm).

Grip strength system. Прибор для оценки мышечной силы сжатия передних или задних лап. Градуально измеряет усилия, которые надо приложить, чтобы животное разжало лапы. Автоматическая цифровая запись результатов (<http://www.sandiegoinstrument.com/Docs/Data-sheets/gripstrength.pdf>).

Методы и оборудование для оценки сенсорных функций

Болевая чувствительность

В опыте различают острую и постоянную боль, и эти типы боли опосредуются разными нервными сетями и нейромедиаторами. Наиболее распространенной моделью постоянной боли является подкожная инъекция формалина в подошву лапы животного. Острую боль провоцируют высокой или низкой температурой в следующих установках.

Hot plate. Прибор «горячая площадка» оценивает пороговую чувствительность острой боли. Животное помещают на нагретую поверхность (55 °С для мышей и 52,5 °С для крыс). Измеряется латентный период, когда животное начинает облизывать одну из лап. Современные установки автоматически отслеживают температуру площадки, окружающего воздуха и ректальную; регистрируют время реакции животного на боль. Тест используют

для оценки анальгезирующих эффектов фармакологических препаратов (<http://www.panlab.com/panlabWeb/Hardware/php/displayHard.php?nameHard=HOT-PLATE>).

Tail flick. Тест «отдергивания хвоста». Прибор фокусирует обжигающий луч света на хвосте животного (мыши или крысы, у каждого вида в разные зоны хвоста). Замеряется латентный период отдергивания хвоста. Современные приборы позволяют регулировать силу луча, чтобы предотвратить ожоги, автоматически регистрируют время отдергивания (http://www.sandiegoinstrument.com/prod_tailflick.htm).

Слуховая чувствительность

Мыши слышат в другом диапазоне частот (80Гц–100кГц), чем человек, и более чувствительны к внезапным звукам, шумам. Наиболее точно порог слуха определяют электрофизиологическим методом – по регистрации ответов ствола мозга на аудиосигналы. Хорошее разрешение при оценке порога слуха имеет метод, основанный на рефлекторном вздрагивании животного при неожиданном звуке.

Startle reflex system. Установка «стартл-рефлекс» создает любые комбинации звуков, шумов, белого шума, струи воздуха, света и электрических ударов разной интенсивности. Используется для изучения многих свойств ЦНС, в том числе привыкания (габитуация) к звуку, преимпульсного ингибирования (снижение амплитуды вздрагивания после предварительного подпорогового стимула, что отражает функцию фильтрации сенсорных входов в ЦНС; данный параметр нарушается при шизофреноподобных состояниях), обусловленного страхом стартл-рефлекса, исследований по токсикологии (<http://www.tse-systems.com/behavior/startle-response.htm>).

Прибор «стартл-рефлекс» входит в пятерку наиболее используемых в мире приборов для изучения функционирования ЦНС. В современных установках стартл-ответ воспринимается пьезоэлектрическими датчиками; аппарат снабжен программным обеспечением, совместимым с Microsoft; возможно одновременное тестирование до 16 животных, находящихся в разных клетках с изоляцией от ультразвуковой вокализации соседей, феромонов страха и т. п.

Зрительная чувствительность

Грызуны являются ночными животными, имеют хорошее зрение. Мыши инстинктивно избегают яркого света, и интенсивность света (как тревогогенный фактор) может оказывать существенное влияние на развитие того или иного поведения. Существуют линейные различия в остроте зрения. Альбиносы более чувствительны к яркому свету, у них снижена острота зрения. У некоторых линий зрение снижено из-за мутаций, которые приводят к дегенерации сетчатки (Voïkar, 2006). Изучение клеточных и молекулярных механизмов зрения актуально для поиска и оценки потенциальных лекарственных средств при болезнях глаз.

В настоящее время нет единого протокола по поводу тестирования зрения у животных. Наиболее точными методами считаются неведенческие: исследование гистологии сетчатки, электроретинограмма и метод вызванных корковых потенциалов. Между тем существует ряд поведенческих тестов для оценки зрения, хорошо себя зарекомендовавших.

Visual cliff apparatus. Используется для оценки остроты зрения у животных и человека. Двухуровневая установка имеет высокий уступ, на который помещается животное. Обрыв закрыт прозрачным оргстеклом. Особи с нормальным зрением затормаживают перед краем и исследуют его перед тем, как двинуться вперед. Слепые и слабовидящие животные пересекают уступ без задержки (Crawley, 1999).

Virtual optomotor system. Метод основан на оптомоторном рефлексе животного следить (т. е. поворачивать голову и шею) за движущимся предметом; в тесте это бегущие серо-белые волны на мониторе компьютера, контрастность которых в процессе тестирования снижается (Prusky *et al.*, 2004), что позволяет дифференцировать остроту зрения животных (рис. 2).

Startle Reflex System. Установка для оценки стартл-рефлекса используется для оценки зрения. Животное обучают ситуации с обусловленным страхом, в которой стимулом является свет или предмет (и то и другое градуируется так, чтобы оценить отсутствие или наличие восприятия стимула). Если животное не способно его воспринять, то реакция страха не разовьется.

Обонятельная чувствительность

Оценка функционального состояния обонятельного анализатора важна при тестировании фармакологических препаратов, при изучении мотиваций и эмоциональной регуляции поведения, поведенческом фенотипировании мутантных линий мышей (рис. 3).

Исследование обонятельной перцепции не требует специального оборудования. Тесты основаны на поиске и/или обнюхивании пищевой или другой аттрактивной (например, феромоны) приманки, помещаемой в домашнюю клетку. Регистрируется латентный период обнаружения приманки, время исследования запаха (Ferkin, Li, 2005; Amikishieva, Semendyaeva, 2007).

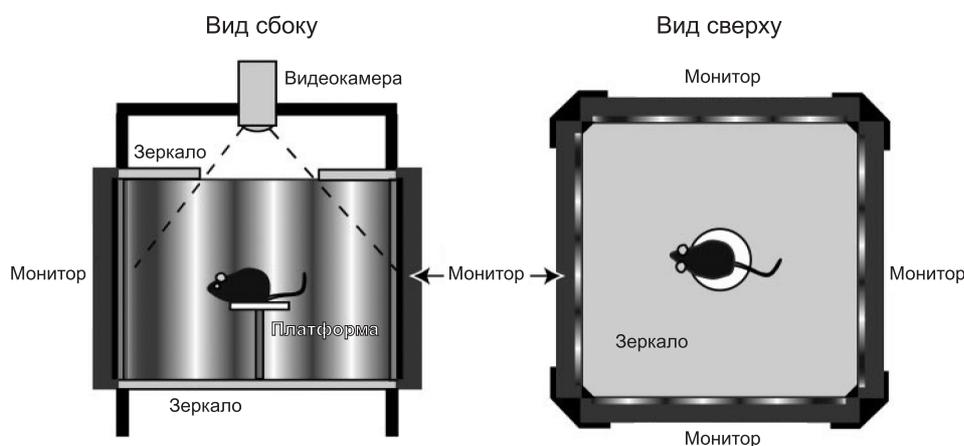


Рис. 2. Оборудование для оценки остроты зрения. Оптомоторный аппарат (по: Prusky, 2004).

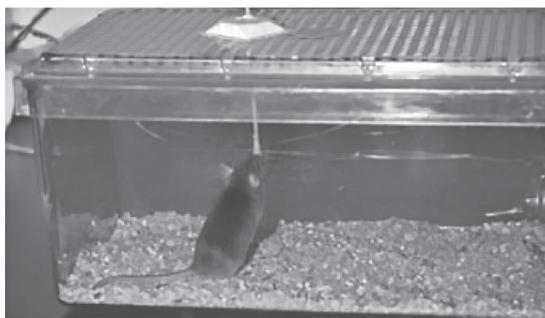


Рис. 3. Экспозиция мыши запахового сигнала от другой особи.

Методы и оборудование для оценки эмоционального поведения

Эмоциональное поведение животных исследуется в разнообразных тестах, наиболее старинным из которых является тест «открытого поля», где этот параметр оценивается по числу фекальных болюсов, оставленных животным на арене. Чем более эмоционально животное, тем более активно работает эвакуаторная функция кишечника.

Современные исследования эмоционального поведения и его нарушений фокусируются на изучении феноменов повышенной тревожности, депрессии и маниакально-депрессивного психоза, шизофрении (является суперпозицией эмоциональных и когнитивных нарушений). Мыши являются адекватным модельным объектом для изучения этих нарушений, поскольку нейрохимические и молекулярные механизмы, лежащие в их основе, аналогичны таковым у человека (Paigen, Eppig, 2000; Fisch, 2007; Hayes, Delgado, 2007). В целом, чтобы конкретная поведенческая модель на животных была обоснованным аналогом соответствующей болезни человека, она должна удовлетворять следующим критериям:

- face validity – соответствие «внешнего вида», т. е. симптоматике, поведенческим особенностям, характерным для этого вида расстройства;

- predictive validity – предсказательная сила модели, что подразумевает сходное действие фармакологических воздействий в модельной ситуации на животных и нарушениях психики у человека;

- construct validity – конструктивное соответствие – одинаковые или близкие нейро-

химические и/или молекулярные механизмы, лежащие в основе моделируемой патологии.

Кроме того, модель должна быть воспроизводима другими исследователями.

Тревожность

Под тревожностью этологи понимают защитный ответ организма на потенциальное присутствие угрозы (в отличие от страха, вызванного реальным угрожающим стимулом). Нейральные субстраты страха и тревожности во многом разные. Страх является адаптивной реакцией, в то время как повышенная тревожность дезадаптирует организм. Тревожность традиционно разделяют на конститутивную, во многом генетически закрепленную, и ситуативную, спровоцированную условиями теста.

Инбредные линии мышей сильно различаются по своему тревожному поведению, которое оценивается по уровню неофобии (боязнь новизны) в ситуации свободного исследования. Исследования ситуативной тревожности можно разделить на две большие группы: без обучения (необусловленные) и с обучением (обусловленные модели) (Voikar, 2006). В табл. 2 представлены основные поведенческие тесты, используемые для анализа уровня тревожности животных.

Модели без обусловливания, или этологические, основаны на исследовательской активности животных при наличии природных стимулов, вызывающих чувство страха или тревоги. Например конфликт между желанием животного остаться в безопасном месте или исследовать новое, но потенциально опасное пространство (ярко освещенное или открытое). Исследовательский ответ животного состоит в осмотре, обнюхивании, подъемах на задние лапы, прыжках, рытье, заглядывании вниз, перемещении доступных объектов. Тревожный ответ – в замирании, поиске убежища, обильной дефекации и уринации.

Elevated Plus Maze. Приподнятый крестообразный лабиринт состоит из двух закрытых (аналог норы) и двух открытых (потенциально опасных) рукавов. В тесте измеряют число входов и время, проведенное в открытых и закрытых рукавах; акты заглядывания вниз, вытягивания-принюхивания, задний ход. Более тревожные

Таблица 2

Тесты для изучения конститутивной и ситуативной тревожности

Конститутивная тревожность	Ситуативная тревожность	
	Модели без обусловливания	Модели с обусловливанием
Высоко- и низко-тревожные линии; Межиндивидуальные различия; Генетические модели	Открытое поле; Приподнятый крестообразный лабиринт; Светло-темная камера; Острый ответ на аверсивный стимул (замирание, вокализация, стартл-рефлекс); Защитная реакция на угрожающий стимул	Тест Вогеля (питье под ударами электрического тока); Тест Геллера-Шейтера (потребление пищи под ударами электрического тока); Обусловленная контекстом тревога и др.

мыши предпочитают закрытые рукава (<http://www.tse-systems.com/behavior/maze.htm>).

Light-dark exploration box. Тест «темно-светлая камера». Установка поделена на две части – темную, занимающую 1/3 пространства, и светлую. Животное помещают в светлый отсек. Измеряют латентный период первого захода в темный отсек, число перемещений туда–обратно, время, проведенное в светлом и темном отсеках, вылаживание из темного в светлый и число вставаний на задние лапы (<http://www.tse-systems.com/behavior/anxiety.htm>).

Анксиолитики (вещества, снижающие уровень тревоги) увеличивают число переходов между темным и светлым отсеками камеры и другие параметры.

Методы оценки тревожности с предварительным тренингом (обусловливанием) являются разновидностями классических условных рефлексов, по Павлову, с отрицательным подкреплением, где вначале нейтральный стимул при повторении становится условным для реализации определенного поведенческого ответа. Например, создают временное сочетание условного стимула (свет, звук) с безусловным (электрический ток). В результате животное при безобидном со стороны стимуле демонстрирует поведение, как будто его ударили током. Выполнение тестов зависит от памяти; они используются для скрининга анксиолитической или анксиогенной активности фармакологических препаратов, для изучения нейробиологии тревожности, или, например, для оценки опыта раннего детства.

Fear conditioning equipment – оборудование для формирования обусловленного контекстом страха состоит из звукоизолирующей камеры с

полом из металлических прутьев, соединенных с генератором электрического тока, звукогенератора для условных сигналов (ими могут быть и другие стимулы, например один из часто используемых ольфакторных стимулов – запах апельсинового сока). После обучения в камере у животного имеют место долговременные поведенческие изменения, которые можно изучать генетическими и фармакологическими методами. Модель обусловленного страха используется при изучении памяти и процессов обучения. Подобное состояние может быть вызвано у человека; в клинике нарушение миндалины (небольшой симметричный отдел эмоциональной зоны мозга) предотвращает обусловленный страх, т. е. это структура, которая участвует в его возникновении (<http://www.med-associates.com/startle/startle.htm>).

В тесте регистрируют при наличии или отсутствии условного сигнала замирание или его отсутствие; тест имеет много разновидностей, например распознавание животным двух экспериментальных ситуаций – когда оно получает ток и когда не получает его.

Active or passive avoidance system. Поведенческая модель для исследования активного и пассивного избегания напоминает обусловленный контекстом страх. Животное помещают в клетку (shuttle-box), где после условного сигнала по полу подается электрический ток. В ситуации пассивного избегания (закрытая дверь в безопасный отсек) регистрируют время замирания, в ситуации активного избегания (при открытой двери в безопасный отсек) – латентный период побежки (<http://www.tse-systems.com/behavior/conditioning.htm>).

Коммерческий вариант установки может тестировать одновременно 8 животных. Регистрация поведения автоматическая, результаты записываются в виде, совместимом с Microsoft.

Депрессия

Это психическое состояние с пониженным настроением, сниженной жизнеспособностью, отсутствием стремления к удовольствию (ангедония). Некоторые виды депрессии провоцируются стрессорными жизненными обстоятельствами. Имеет место генетическая предрасположенность к заболеванию депрессией. В 1970–1980-х гг. причину депрессии видели в истощении моноаминовых депо нейронов, в настоящее время исследования молекулярных механизмов депрессии сконцентрированы на выяснении роли ряда транскрипционных факторов (Hashimoto *et al.*, 2004).

Депрессивноподобное состояние животных в эксперименте провоцируется длительными стрессорными воздействиями или селекцией. Проверка формирования депрессивноподобного статуса осуществляется в стандартных тестах «принудительного плавания» (Forced swimming test, он же Porsolt test, http://www.noldus.com/webfm_send/9) или «защемления хвоста» (Tail suspension test, <http://www.panlab.com/panlabWeb/Hardware/php/displayHard.php?campo=Behaviour&nameHard=TAIL%20SUSPENSION%20TEST>). В обоих случаях оценивается время, когда животное от активных попыток освободиться из неприятного положения (погружение в воду или подвешивание за хвост), переходит к неподвижности, зависанию, которое исследователи ассоциируют с потерей животным надежды и поведением отчаяния. Клинически активные антидепрессанты увеличивают время наступления неподвижности.

Ангедония оценивается в тесте на потребление сахара (Sucrose consumption): животным в домашнюю клетку помещают две бутылки – с водой и 5–10 %-м раствором сахарозы. В состоянии депрессии объем выпитого раствора сахарозы в процентном отношении снижен.

Learned helplessness model. Одна из моделей формирования у животных депрессивного состояния называется «обученная беспомощ-

ность» (Learned helplessness). Разработана около 30 лет назад. Животные сидят в трех одинаковых клетках с прикрепленными к лапам электродами. Контрольному животному ток не подается. В две другие клетки ток подается, однако в первой клетке животное может отключить ток, выполнив инструментальное действие (например нажав на педаль), т. е. оно находится в состоянии избегаемого стресса. Во второй клетке данное действие не приводит к отключению тока (ток отключается только одновременно с 1-й клеткой), т. е. создается ситуация неизбегаемого стресса. Именно последний тип стресса оказывает наиболее разрушительное влияние на психику, приводя к депрессии (<http://www.med-associates.com/activity/triadic.htm>).

Модель позволяет оценить профилактический эффект фармакологических препаратов (до стрессорных воздействий) и терапевтический эффект (после возникновения поведенческих нарушений). В первом случае эффективными оказываются препараты анксиолитического ряда, во втором – антидепрессивного.

Шизофрения

Психическое расстройство, как правило, хроническое, поражает до 1 % популяции. Найдены межэтнические отличия в предрасположенности к заболеванию (Пашутин, 2005). Некоторые поведенческие паттерны шизофрении доступны для моделирования и анализа на животных.

Кататония и каталепсия – долгое замирание или восковая гибкость. Изучается в тесте на брусках – Bar-test (<http://www.med-associates.com/activity/catalepsy.htm>). Животному производят щипок загривка, вводя тем самым в состояние каталепсии, и замершего помещают на брусья, приподнятые над полом и находящиеся на расстоянии друг от друга. Измеряют латентное время начала движений. Есть генотипы мышей с повышенной предрасположенностью к каталепсии (Kulikov *et al.*, 2008).

Стереотипные движения (облизывание, фырканье, мотание головой, вытягивание в одном местоположении, упорное грызение прутьев клетки). Наоборот, более сложные паттерны поведения (еда, питье, уход за собой и социальное поведение) исчезают. Стереотипии автоматически регистрируются приборами «Open field

system», «Home cage activity system». Большинство движений при стереотипии можно вызвать большими дозами психостимуляторов (кокаин, амфетамин). Эта модель используется для скрининга потенциальных антипсихотических веществ. Исследование стереотипии имеет длинную историю, ранее фокус внимания был сосредоточен на дофаминэргической системе стриатума. Современные исследования связаны с поиском внутриклеточных белков-посредников, участвующих в клеточном метаболизме (Clapcote *et al.*, 2007).

Нарушение преимпульсного ингибирования (Prepulse inhibition), т. е. отсутствие снижения амплитуды основного стартл-рефлекса при предварительном предъявлении подпорогового стимула. Является показателем нарушения пластичности сенсо-моторного входа в нервную систему на уровне простейших процессов габитуации и сенситизации. Тестируется в системе «Startle reflex system».

Методы и оборудование для оценки когнитивных функций (память, обучение)

Процессы памяти и способности к обучению тесно связаны; считается, что память обуславливает от 1/3 до 1/2 коэффициента интеллекта (IQ) человека, определяя объем информации, которым одновременно может оперировать индивид (Conway *et al.*, 2003). Существует несколько классификаций типов памяти. Одна из наиболее используемых и валидных – это разделение памяти на две большие группы: эксплицитную (декларативная, память на со-

бытия) и имплицитную (процедурная, память на действия). Эти типы памяти отражают анатомически разные нейронные сети, механизмы кодирования, хранения, консолидации и воспроизведения информации (табл. 3).

Декларативная память человека имеет параллели с пространственной памятью грызунов (и именно это делает возможным ее моделирование на животных). Они имеют представительство в гиппокампе и ассоциированы с таким нейтральным процессом, как долговременная потенция (Voikar, 2006). Болезнь Альцгеймера, поражающая людей в преклонные годы, связана с нарушением этого типа памяти. У грызунов гиппокамп участвует в кодировании пространственной информации, которую изучают в различных лабиринтах (непространственная память отражена в разделе «Социальное поведение»).

Radial maze. В радиальном лабиринте задача состоит в выборе животным оптимальной стратегии исследования и нахождения пищи (наград) с минимумом усилий. Тест используется для поведенческого фенотипирования трансгенных и нокаутных мышей, исследований по фармакологии и влиянию возраста (<http://www.tse-systems.com/behavior/maze.htm>).

Протокол позволяет отличить рабочую и долговременную память. Рабочая память – это информация, которая используется в течение текущего эксперимента, долговременная память – это информация, используемая в любой день тестирования.

T-maze. В T-лабиринте задача состоит в поиске приманки. Учитываются число правильных входов в рукав с приманкой, число

Таблица 3

Типы памяти и модели для ее исследования на животных

Эксплицитная		Имплицитная			
Гиппокамп-зависимая		Неассоциативная		Ассоциативная	
Пространственная	Непространственная	Габитуация, сенситизация	Приобретенные навыки, умения	Классическое обусловливание	Оперантное обусловливание
Радиальный лабиринт; Водный лабиринт; У/Ти другие лабиринты	Социальное узнавание; Узнавание объекта; Обусловленный страх	Стартл-рефлекс; Габитуация исследовательской активности	Ротарод; Прогулка по перекладине	Модели с обусловленным страхом; Обусловленная вкусовая аверсия	Пассивное избегание; Активное избегание; Ящички Скиннера

возвращений из рукавов без приманки, повторные посещения неправильного рукава. У здоровых крыс ошибки памяти составляют меньше 15 %. Тест чувствителен к возрасту, фармакологическим препаратам, повреждению гиппокампа (там же).

Morris water maze. Тест в водном лабиринте Морриса основан на поиске оптимальной стратегии для избегания воды с минимумом усилий – поиске кратчайшей дистанции до спрятанной под водой платформы на основании предыдущей памяти об ее местонахождении (<http://www.vplsi.com/content.php?content.65>).

Barnes Maze. В лабиринте Барнеса исследуют процессы обучения и памяти, используя пространственную навигацию. Животные обучаются избегать яркого освещения в маленькой темной камере («целевом ящике»), расположенной под одной из 20 дырок платформы. Лабиринт может быть как с ложными ящиками (слишком маленькими), так и без них. Ведется автоматическая запись латентного времени и отверстий, которые посетили животные (<http://www.med-associates.com/mazes/barnes.htm>).

Hole-board System. Установка для исследования памяти и обучения напоминает «Open field», но имеет отверстия и приманку, которую нужно найти (http://www.sandiegoinstruments.com/prod_holeboard.htm).

Кроме памяти и обучения к когнитивным процессам относят феномен внимания как селекцию сенсорной информации из среды для последующего стимулсвязанного процессинга. Внимание состоит из нескольких субкомпонентов, включая ориентирование, селективное внимание, длительное внимание (бдительность) и рассредоточенное внимание. Этот феномен также доступен для моделирования на животных.

Методы и оборудование для исследования социального поведения

По определению, социальное поведение – это поведение, требующее для своей реализации по крайней мере еще одного представителя своего вида. Сюда относят все варианты межсамцовых взаимодействий, репродуктивное (половое) и родительское поведение.

Социальные межсамцовые взаимодействия

Социальные межсамцовые взаимодействия (парные или групповые) можно разделить на следующие категории:

- социальный интерес – следование, принюхивание к партнеру, генитальный груминг;
- защитное поведение – побежки (как активное избегание партнера), замирание (пассивная реакция затаивания, страха);
- агрессивное поведение – угрозы, биение хвостом, нападения, толчки-отпихивания, погоня, агрессивный груминг, ходьба «шариком» и пр.;
- сопровождающее взаимодействие несоциальное поведение – автогруминг, исследование клетки, рытье подстилки.

Как правило, встреча с новым партнером начинается с реакции социального интереса, далее перерастает в агрессивные взаимодействия, когда животные выясняют свой ранг, после чего интенсивность их социальных контактов снижается и носит во многом ритуализированный характер. На инициацию, продолжительность и интенсивность социальных взаимодействий влияет уровень тревожности животных: чем он выше, тем меньше эти параметры. В целом тестовые ситуации можно варьировать, изменяя освещенность тестового поля (яркая–неяркая), территорию (знакомая–незнакомая), партнеров (знакомых–незнакомых). Тесты чувствительны к анксиолитическим (противотревожным) и анксиогенным (тревогогенным) веществам, причем разные классы анксиолитиков эффективны в разных тестовых ситуациях.

Основной инструментарий – оборудование, регистрирующее моторное поведение: «Open field system», «Home cage system», «Ethostudio system» и др.

Наиболее употребимые тесты – социальные взаимодействия на нейтральной арене; тест «резидент-интродер», где самцу, предварительно сидящему в изоляции и вследствие этого агрессивному, подсаживают партнера, после чего регистрируют весь спектр межсамцовых взаимодействий; тест «перегородка», где самцы находятся по разные стороны перфорированной прозрачной перегородки, и социальный интерес (мотивация) измеряется по времени, проведенному у преграды.

Перечисленные поведенческие методы используют для изучения генетики и молекулярных механизмов агрессии и тревожности, доминантно-субординантных отношений, социального стресса и др.

Репродуктивное (половое) поведение

Исследование полового поведения дифференцируют на изучение половой мотивации и непосредственного взаимодействия самца и самки. Анализ репродуктивного поведения применяется при тестировании трансгенных мышей, фармакологических исследованиях, изучении возрастной физиологии.

Уровень половой мотивации самцов оценивается по поведению «рвения» к рецептивной самке. На основе этой парадигмы разработаны тесты с обучением и оперантным поведением, преодолением препятствий различной сложности, в том числе с наказанием электрическим током, бегом самца по движущейся в противоположном направлении беговой дорожке (с током и без), тест «перегородка» (аналогичный межсамцовым взаимодействиям) и множество других. Основной инструментарий – оборудование, фиксирующее передвижение животных, и более специальное – для экспериментов с предварительным обучением.

Традиционный тест на половую мотивацию самок заключается в регистрации позы лордоза, выраженность которой градуирована. С точки зрения сексуального взаимодействия любая особь может быть оценена по критериям:

– аттрактивности (привлекательности), оцениваемой в тестах по времени, проводимому около нее или ее запаха особью противоположного пола;

– рецептивности (восприимчивости к сигналам сексуальной направленности), оцениваемой по соответствующему поведению в ответ на стимулы данного репертуара;

– процептивности (характерному поведению тестерного животного, стимулирующему половую активность особей противоположного пола) (Steel, 1983).

Непосредственно половое поведение самцов – это набор и последовательность осуществления генетически запрограммированных инстинк-

тивных поведенческих актов, заканчивающихся в случае успеха эякуляцией. Репертуар и исполнение поведенческих актов репродуктивного поведения видоспецифичны даже в пределах одного рода (существенно разные у мышей и крыс) (Дьюсбери, 1981).

Фармакологические вещества считаются активными, если снижают латентный период эякуляции и/или снижают число садок и интродукций до достижения эякуляции. В целом репродуктивная система организма устроена так, что одно и то же вещество (например анксиолитик буспирон) может усиливать половую мотивацию, но нарушать копуляторный акт (Rehman *et al.*, 1999).

Социальная память (узнавание и предпочтение)

Понятие «социальное узнавание» как феномен и экспериментальная парадигма было введено в употребление в 1980-е гг. (Thor, Holloway, 1982). Основано на безусловном поведенческом ответе (интересе) животного при подсадке незнакомого партнера. Ольфакторное исследование подсаженной особи истощается со временем, тогда как подсадка нового партнера сопровождается возобновлением интереса со стороны тестерной особи.

В первой сессии животных ссаживают для знакомства, потом рассаживают и вновь ссаживают вместе или с другим партнером. Узнавание определяется как значительное снижение времени ольфакторного исследования при повторном ссаживании со знакомым партнером, а забывание – как одинаковое исследование обоих. Память на индивидуальный запах у мышей длится порядка 1,5–3 часов.

В других вариантах протокола исследуют процессы социального привыкания и социального предпочтения. Например, сживаются вместе знакомый и новый партнер. В целом на поведение в тесте могут оказывать влияние различные характеристики стимулируемых животных (их социальный ранг, сексуальная аттрактивность, ольфакторные особенности). Развитие предпочтения в подобных экспериментах может отражать следствия предыдущих опытов (например сексуальных контактов или контактов на фоне фармакологических вмешательств).

Процессы социального узнавания, привыкания и предпочтения в ряду млекопитающих одинаковы, что свидетельствует о наличии конкретной нейронной сети, ответственной за экспрессию этого типа поведения и его пластичность (Hlinak, 1993; Dantzer, 1998). Наиболее яркие работы выполнены на прерийной полевке, образующей моногамные «супружеские пары» (пример долговременного селективного социального предпочтения) (Hammock, 2007). Исследования социальной памяти – активно развивающаяся область поведенческой физиологии.

Родительское поведение

Родительское поведение, характерное для многих видов млекопитающих, – комплексная стратегия активности по заботе, вскармливанию и в ряде случаев обучению молодняка. Родительское поведение делят на две категории: активное и пассивное. У лабораторных грызунов активное родительское поведение включает гнездостроительство, перенос детенышей из одного места в другое (как вариант – возврат в гнездо), вылизывание молодняка. Пассивное поведение подразумевает принятие лактирующей самкой позы, подходящей для кормления детенышей (Fleming *et al.*, 1994).

Для оценки родительского поведения разработаны многочисленные тесты. Самые простые включают видеонаблюдение и регистрацию конкретных параметров родительского поведения в течение определенного интервала времени или его наблюдение после периода депривации (например удаление детеныша(ей) на срок до 3–4 часов).

Более усложненные варианты оценки родительского поведения могут включать предварительное обучение матери (оперантное поведение), или использование лабиринтов (Y- и T-типов), Hole-board system. Помещая в один из рукавов лабиринта или отверстие арены запаховую метку детеныша(ей), оценивают аттрактивность (привлекательность) детского запаха для матери. Другой способ оценки эмоциональной значимости ребенка для матери исследуют в установке «Place preference system».

Place Preference System. Тест на «место предпочтения» широко используется для оценки разных видов поведения, как правило, с выражен-

ной эмоциональной составляющей. Установка состоит из двух или трех камер. Автоматически регистрируются моменты перехода между частями, общее время нахождения в каждом отсеке, двигательная активность и пройденный путь.

Вариант протокола для исследования родительского поведения: предварительное содержание в четные дни матери с детенышем в левом отсеке, в нечетные дни – одной матери в правом отсеке прибора. Далее оценивается предпочтительное место нахождения самки в отсутствие детеныша (<http://www.panlab.com/panlabWeb/Hardware/php/displayHard.php?campro=Behaviour&nameHard=SPATIAL%20PLACE%20PREFERENCE%20BOX>).

Использование современных методологических и инструментальных возможностей поведенческого фенотипирования позволяет исследовать практически весь этологический репертуар лабораторных грызунов. В сочетании с универсальностью многих генетико-молекулярных механизмов и нейронных сетей, регулирующих поведение млекопитающих, это дает уникальную возможность моделирования на животных многих аспектов поведения человека в норме, при стрессе, при врожденных и приобретенных расстройствах ЦНС, тем самым проливая свет на функционирование наиболее сложного объекта вселенной – человеческого мозга.

Литература

- Дьюсбери Д.А. Поведение животных. Сравнительные аспекты. М.: Мир, 1981. 480 с.
- Пашутин С.Б. Этнические болезни и этнические лекарства. 2005. available at <http://bio.1september.ru/article.php?ID=200500607>
- Amikishieva A.V., Semendyaeva S.N. Effects of baclofen on anxiety, sexual motivation, and olfactory perception in male mice in different psychoemotional states // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2007. V. 37. № 9. P. 929–937.
- Anisman H., Suissa A., Sklar L.S. Escape deficits induced by uncontrollable stress: Antagonism by dopamine and norepinephrine agonists // *Behav. Neural Biol.* 1980. V. 28. P. 34–47.
- Brown R.E., Stanford L., Schellinck H.M. Developing standardized behavioral tests for knockout and mutant mice // *ILAR J.* 2000. V. 41. P. 163–174.
- Carter R.J., Lione L.A., Humby T. *et al.* Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. P. 3248–3257.

- Clapcote S.J., Lipina T.V., Millar J.K. *et al.* Behavioral phenotypes of *Disc1* missense mutations in mice // *Neuron*. 2007. V. 54. P. 1–16.
- Conway A.R., Kane M.J., Engle R.W. Working memory capacity and its relation to general intelligence // *Trends Cogn. Sci.* 2003. V. 7. P. 547–552.
- Crawley J.N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests // *Brain Res.* 1999. V. 835. P. 18–26.
- Crawley J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice // *Neuron*. 2008. V. 57. P. 809–818.
- Dalvi A., Lucki I. Murine models of depression // *Psychopharmacology*. 1999. V. 147. P. 14–16.
- Dantzer R. Vasopressin, gonadal steroids and social recognition // *Progr. Brain Res.* 1998. V. 119. P. 409–414.
- Dunham N.W., Miya T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice // *J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 1957. V. 46. P. 208–209.
- Ferkin M.H., Li H.Z. A battery of olfactory-based screens for phenotyping the social and sexual behaviors of mice // *Physiol. Behav.* 2005. V. 85. P. 489–499.
- Fisch G.S. Animal models and human neuropsychiatric disorders // *Behav. Genet.* 2007. V. 37. P. 1–10.
- Fleming A.S., Korsmit M., Deller M. Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: Effects of experience, parity, hormones and dopamine function // *Psychobiology*. 1994. V. 22. P. 44–53.
- Gheusi G., Bluth R.M., Goodall G., Dantzer R. Social and individual recognition in rodents: Methodological aspects and neurobiological bases // *Behav. Processes*. 1994. V. 33. P. 59–88.
- Goldstein L.B., Davis J.N. Beam-walking in rats: Studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury // *J. Neurosci. Methods*. 1990. V. 31. P. 101–107.
- Hall C.S. Emotional behaviour in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // *J. Comp. Psychol.* 1934. V. 18. P. 385–403.
- Hammock E.A. Gene regulation as a modulator of social preference in voles // *Adv. Genet.* 2007. V. 59. P. 107–127.
- Hashimoto K., Shimizu E., Ivo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders // *Brain Res. Rev.* 2004. V. 45. P. 104–114.
- Hayes L.J., Delgado D. Invited commentary on animal models in psychiatry: animal models of non-conventional human behavior // *Behav. Genet.* 2007. V. 37. P. 11–17.
- Hickey M.A., Gallant K., Gross G.G. *et al.* Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing // *Neurobiol. Dis.* 2005. V. 20. P. 1–11.
- Hlinak Z. Social recognition in ovariectomized and estradiol-treated female rats // *Horm. Behav.* 1993. V. 27. P. 159–166.
- Karlsson R.M., Choe J.S., Cameron H.A. *et al.* The neuropeptide YY1 receptor subtype is necessary for the anxiolytic-like effects of neuropeptide Y, but not the antidepressant-like effects of fluoxetine, in mice // *Psychopharmacology*. 2008. V. 195. P. 547–557.
- Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice // *Genes Brain Behav.* 2008. V. 7. P. 506–512.
- Masuya H., Inoue M., Wada Yu., Shimizu A. Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program // *Mammalian Genome*. 2005. V. 16. P. 829–837.
- Mogil J.S., Kest B., Sadowski B., Belknap J.K. Differential genetic mediation of sensitivity to morphine in genetic models of opiate antinociception: Influence of nociceptive assay // *J. Pharm. Exptl. Ther.* 1996. V. 276. P. 532–544.
- Mombereau C., Kaupmann K., Froestl W. *et al.* Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior // *Neuropsychopharmacology*. 2004. V. 29. P. 1050–1062.
- Paigen K., Eppig J.T. A mouse phenome project // *Mammal. Genome*. 2000. V. 11. P. 715–717.
- Prusky G.T., Alam N.M., Beekman S., Douglas R.M. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system // *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45. № 12. P. 4611–4616.
- Rehman J., Kaynan A., Christ G. *et al.* Modification of sexual behavior of Long-Evans male rats by drugs acting on the 5-HT1A receptor // *Brain Res.* 1999. V. 821. P. 414–425.
- Steel E. Female sexual behavior: roles of gonadal hormones in the Syrian hamster // *Physiol. Behav.* 1983. V. 4. P. 453–459.
- Thor D.H., Holloway W.R. Social memory of the male laboratory rat // *J. Comp. Psychol.* 1982. V. 96. P. 1000–1006.
- Tjolsen A., Lund A., Berge O.-G., Hole K. An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail-skin-temperature // *J. Neurosci. Methods*. 1989. V. 26. P. 259–265.
- Voikar V. Evaluation of methods and applications for behavioral profiling of transgenic mice. Academic dissertation. Faculty of Biosciences, University of Helsinki. 2006. 73 p.

BEHAVIORAL PHENOTYPING: UP-TO-DATE METHODS AND EQUIPMENT

A.V. Amikishieva

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: amik@bionet.nsc.ru

Behavioral phenotyping is a comprehensive assessment procedure of the laboratory rodent behavior. The strategy intends for standardization and replicability of behavioral data and analysis methods in behavioral genetics. The complex protocol estimates as elementary motor acts and reflexes, as emotional and cognitive animal's features. The paper represents the analysis of up-to-date methods set of behavioral physiology and specialized equipment of the leading manufacturers. There are experimental models of few human psychoemotional pathologies and data, explaining the mechanisms of nervous system functioning.

Key words: behaviour, phenotyping, SHIRPA, mice, laboratory animals, experimental models.