

На правах рукописи



ЧЕКМАРЕВА НАТАЛЬЯ ЮРЬЕВНА

**ФЕНОТИП ПОТОМКОВ МЫШЕЙ С ПРОТИВОПОЛОЖНЫМ
ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ
ТРЕВОЖНОПОДОБНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИЯХ
СРЕДЫ**

03.03.01 — Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, доцент
Умрюхин Алексей Евгеньевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор,
заведующая лабораторией
психофармакологии ФГБНУ «НИИ
фармакологии им. В.В. Закусова»
Воронина Татьяна Александровна

доктор биологических наук, профессор,
заведующий отделом биологических
испытаний ФГБУН «Институт
биоорганической химии им. акад. М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН
Мурашев Аркадий Николаевич

Ведущая организация: Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Научный центр психического здоровья»

Защита диссертации состоится «26» мая 2020 года в 11⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д.001.008.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» по адресу: 125009 Москва, ул. Моховая, д.11, стр. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» и на официальном сайте <http://nphys.ru/>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью учреждения, просьба направлять по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

Автореферат разослан «__» марта 2020 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д.001.008.01,
кандидат медицинских наук



А.Ю. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Современные условия жизни людей характеризуются интенсивными информационными нагрузками, ускорением темпа жизни, изменением структуры социальных потребностей человека, высокими требованиями, предъявляемыми к результатам деятельности человека. В подобных условиях человек часто оказывается в ситуации, когда его доминирующая потребность не может быть удовлетворена своевременно (Судаков К.В., 1998). Формирующаяся при этом конфликтная ситуация сопровождается усилением тех механизмов, которые могли бы способствовать наиболее быстрому удовлетворению ведущей потребности (Юматов Е.А., 1986; Симонов П.В., 1984; Chrousos G.P. et al., 1992). Однако в случае, когда такая ситуация пролонгируется, активация стрессорных механизмов может приводить к долговременным изменениям в функционировании организма человека (Анохин П.К. 1965, Галямина А.Г. и др., 2016; Chen J. et al. 2012; Chrousos G. et al., 1992; Claessens S. et al., 2011; McEwen et al., 1993). При стрессорных воздействиях изменяются психоэмоциональные, поведенческие, нейроэндокринные показатели, и в первую очередь церебральные механизмы (Судаков К.В., 1992; Muigg P. et al., 2009, Nugent N.R. et al., 2011). Происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при стимуляции кортикотропин-рилизинг фактором (КРФ) рецепторов первого типа (КРФР1) клеток гипофиза с последующим выделением адренокортикотропного гормона и стимуляцией коры надпочечников и выработки глюкокортикоидов (Кахана М.С. и др., 1976; Engelmann M. et al., 2004; Herman J.P. et al. 2003; Keeney A. et al., 2006; Pertsov S.S. et al., 2003). Формирование поведенческих и нейроэндокринных характеристик тревожноподобного фенотипа включает также и активацию КРФ механизмов в других областях головного мозга, включая область базолатеральной миндалины (Savarese A. et al, 2018, Bhatnagar S. et al., 2006). В настоящее время эпидемиологические исследования признают расстройства, связанные с психоэмоциональным стрессом, одними из наиболее распространенных (Ferrari A.J. et al, 2013; Bandelow B. et al., 2015) и вызывающих нарушение трудоспособности у взрослого населения (Baxter A.J. et al, 2013). Важным аспектом формирования стресс-ассоциированных состояний и тревожно-депрессивных расстройств является участие в патогенезе как факторов внешней среды, так и индивидуальной

предрасположенности организма к формированию патологических реакций в ответ на стрессорные воздействия (Коплик Е.В. и др., 1995; Середенин С.Б. и др., 2001; Судаков К.В., 1998; Bakshi V.P. et al, 2000; Benaroya-Milshtein N. et al, 2004). Так, например, активные и пассивные в тесте Открытое поле крысы характеризуются различными реакциями при однотипных стрессорных нагрузках (Коплик Е.В. и др., 1995).

Ранний постнатальный опыт оказывает выраженное влияние на формирование фенотипа и реактивности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) системы у взрослых особей (Буренкова О.В. и др., 2012; Володина М.А. и др., 2010; Vallee M. et al., 1997; Bredy T.W. et al., 2004). Аверсивный опыт раннего детства сопровождается в последующие этапы жизни более выраженной активацией ГГН оси (Caldji C. et al., 2000; Francis D. et al., 2002; Kalinichev M. et al., 2002; Heim C. et al., 2008). В то же время такие влияния среды, как обогащенные условия обитания у грызунов, сопровождаются снижением выраженности тревожноподобных параметров поведения и реакций на стрессорные воздействия (Benaroya-Milshtein N. et al., 2004; Meshi D. et al., 2006; Olsson I. et al., 2002). Материнское поведение является одним из наиболее значимых параметров окружающей среды и на ранних этапах постнатального онтогенеза оказывает выраженное влияние на развитие потомства, в том числе на формирование индивидуальных особенностей реагирования в условиях эмоционального стресса (Caldji C. et al., 2000). Показано, что чем выше качество материнской заботы, тем менее потомство подвержено патологическим последствиям воздействия эмоционального стресса (Champagne F.A. et al., 2003).

Известно, что генетическая предрасположенность оказывает значительное влияние на формирование тревожноподобных фенотипических характеристик (Francis S. et al., 2010). Тревно-депрессивные расстройства у людей сопряжены с семейным анамнезом, что отражено в близнецовых исследованиях (Eley T.C. et al., 2003). Изучаемые гены кандидаты кодируют нейротрансмиттерные (Августинович Д.Ф. и др., 2004; Segman R.H. et al. 2002; Smoller J.W. et al. 2001; Umriukhin A.E., 2002) и нейропептидные (Rotzinger S. et al., 2010; Shelton R.C., 2007; Wigger A. et al., 2004) системы. Существуют различные подходы к созданию моделей стресс-индуцированных расстройств на лабораторных животных. Одним из наиболее информативных является селекция животных на основании их генетически детерминированных характеристик, что позволяет выделять наиболее важные генетические факторы, участвующие в формировании

того или иного фенотипического признака. Животные одной инбредной линии имеют ограниченную степень вариабельности в пределах линии и поэтому позволяют оценивать эффекты окружающей среды на формирование фенотипа в условиях данного генотипа. Роль генетических факторов в формировании фенотипа была показана в экспериментах на потомках перекрестного скрещивания животных разных генетических линий (Kalueff A.V., 2007). Существует ряд моделей животных, селекционированных по параметрам, отражающим устойчивость к патологическим последствиям стрессорных нагрузок и характеризующим тревожноподобные реакции. К ним относятся модель “стресс-реактивности” мышей по степени подъема уровня кортикостерона в ответ на стрессорное воздействие (Touma C. et al., 2008; Pillai A.G. et al., 2012), линии крыс с противоположными характеристиками защитно-оборонительной агрессии (Ilchibaeva T.V. et al., 2015), крысы с высокой и низкой выраженностью поведения избегания High- и Low-avoidance Roman rats (Steimer T. et al., 2003) и другие.

Данная работа проводилась на потомках перекрестного скрещивания мышей линии с высоким уровнем тревожноподобного поведения НАВ (high anxiety-related behavior) и с низким уровнем тревожноподобного поведения LAB (low anxiety-related behavior). Родительские линии мышей были получены в результате близкородственного скрещивания животных с крайними показателями процента времени, проведенного на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт (Bunck M. et al., 2009; Yen Y-C et al., 2013) и представляют собой пример прочной генетической предрасположенности к высокому и низкому уровню параметров тревожноподобного поведения. Потомки перекрестного скрещивания обладают одновременно генетическими факторами, характерными для НАВ и для LAB линий. Оба аллеля генов, участвующих в формировании тревожноподобного фенотипа, находятся в идентичных условиях внутриклеточного окружения, и внешние по отношению к этим генам факторы однотипно влияют на оба аллеля гена.

Цель исследования заключалась в изучении поведенческих и нейроэндокринных показателей у потомков перекрестного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением при различных модификациях условий среды.

Задачи исследования:

1. Изучить поведенческие и нейроэндокринные показатели у потомков перекрестного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением в возрасте 6-8 недель.

2. Изучить вклад материнского воспитания в формирование поведенческих и нейроэндокринных показателей у потомков перекрестного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением.

3. Оценить формирование поведенческих и нейроэндокринных показателей у потомков перекрестного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением при модификациях условий жизни с 15 по 42 день жизни: содержании животных в улучшенных условиях и в условиях хронических стрессорных нагрузок.

4. Исследовать экспрессию гена рецептора кортикотропин-рилизинг-фактора первого типа в области базолатеральной миндалины при модификациях условий окружающей среды у потомков перекрестного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением.

Научная новизна.

Результаты проведенного исследования раскрывают новые аспекты взаимодействия генетических факторов и влияний окружающей среды на формирование тревожноподобного фенотипа. Показано, что потомки перекрестного скрещивания самок с высокотревожным поведением и самцов с низкотревожным поведением ♀HAB♂LAB характеризуются более выраженным тревожноподобным фенотипом и более чувствительны к воздействию факторов окружающей среды по сравнению с потомками скрещивания низкотревожной самки и высокотревожного самца ♀LAB♂HAB.

Показано, что воспитание потомков скрещивания родительских пар ♀HAB♂LAB самкой менее тревожной LAB линии сопровождается снижением выраженности параметров тревожноподобного поведения, а также увеличением концентрации кортикостерона в крови спустя 30 минут после стрессорной нагрузки.

Впервые показано, что содержание животных при различных

воздействиях среды сопровождается различиями в аллель-специфической экспрессии гена *Krfr1* в области базолатеральной миндалины. У потомков родительских пар ♀HAB♂LAB преобладает экспрессия LAB аллеля. Снижение выраженности тревожноподобных параметров поведения мышей после содержания животных в улучшенных условиях сопровождается снижением относительного уровня экспрессии HAB аллеля и увеличением LAB аллеля гена *Krfr1* в базолатеральной миндалине, в то время как усиление тревожноподобных проявлений после воздействия хронических стрессорных нагрузок сопровождается увеличением экспрессии HAB аллеля и соответствующим снижением LAB аллеля. Увеличение уровня экспрессии специфичного для HAB мышей аллеля на фоне общего преобладания LAB аллеля сопровождается усилением показателей тревожноподобного поведения после хронических стрессорных нагрузок.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты данного исследования расширяют теоретические представления о механизмах формирования тревожноподобного поведенческого фенотипа. Исследование биологических механизмов, лежащих в основе формирования тревожноподобного фенотипа с учетом генетических факторов и воздействий среды, позволяет раскрыть новые аспекты взаимодействия эндогенных и экзогенных факторов в формировании фенотипа. Воспитание потомков скрещивания родительских пар ♀HAB♂LAB самкой с менее выраженным тревожноподобным поведением сопровождается формированием у потомков менее тревожного поведенческого фенотипа. После содержания потомков перекрестного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением в улучшенных условиях выраженность показателей тревожноподобного фенотипа в поведенческих тестах у них снижается, а после хронических стрессорных нагрузок у животных отмечается усиление тревожноподобных реакций, а также изменение стратегии преодоления стрессорной ситуации в тестах Принудительное плавание и Подвешивание за хвост с увеличением времени иммобильности и укорочением латентного периода первого эпизода иммобильности.

Полученные в данной работе результаты о взаимодействии генетических, нейроэндокринных факторов и воздействий окружающей среды используются в учебных курсах и на практических занятиях по физиологии, могут быть использованы для формирования принципов

выстраивания детско-родительских взаимоотношений.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У потомков перекрёстного скрещивания мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным фенотипом преобладают поведенческие и нейроэндокринные проявления высокотревожного фенотипа.
2. Потомки высокотревожной самки и низкотревожного самца ♀HAB♂LAB имеют более выраженное тревожноподобное поведение и характеризуются большей чувствительностью к воздействиям среды по сравнению с потомками низкотревожной самки и высокотревожного самца ♀LAB♂HAB.
3. Воспитание самкой низкотревожной линии сопровождается снижением выраженности параметров тревожноподобного поведения у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB.
4. Экспрессия мРНК гена *Krfrp1* в области базолатеральной миндалины потомков родительских пар ♀HAB♂LAB характеризуется неравномерной экспрессией HAB и LAB аллелей с преобладанием LAB аллеля.
5. Усиление проявления поведенческих показателей тревожноподобного фенотипа после содержания животных в условиях хронических стрессорных нагрузок сопровождается увеличением экспрессии высокотревожного HAB аллеля гена *Krfrp1* в области базолатеральной миндалины. Ослабление проявлений поведенческих показателей тревожноподобного поведения после содержания животных в улучшенных условиях сопровождается увеличением содержания низкотревожного LAB аллеля гена *Krfrp1*.

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Симпозиуме Института Психиатрии Макса Планка (Мюнхен, 2012), на XXII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013), на XVII Школе-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии в институте ВНД (Москва, 2013), на III и IV Конференциях молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология» НИИНФ им. П.К. Анохина (Москва, 2012, 2013 гг.), на II Молодежном международном форуме

медицинских наук «MedWAYS» (Москва, 2013), на XLIV Итоговой научной сессии НИИНФ им. П.К. Анохина «Системная организация физиологических функций» (Москва, 2019).

Апробация работы проведена на объединенном заседании ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Московского отделения физиологического общества им. И.П. Павлова, 07 ноября 2019 года.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 9 научных работ (в том числе статьи в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки, — 4, тезисы докладов конференций — 5), в которых изложены основные результаты выполненного исследования.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методики экспериментов, изложения результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 193 страницах, содержит 42 рисунка и 3 таблицы. Библиографический указатель содержит 413 источников, из них 66 на русском и 347 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование проводилось на мышах потомках перекрестного скрещивания животных высокотревожной НАВ (high anxiety-related behavior) и низкотревожной LAB (low anxiety-related behavior) линий. Исходные чистые линии мышей были получены путем близкородственного скрещивания мышей исходной гетерогенной популяции CD-1 по результатам тестирования животных тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”. В качестве критерия для скрещивания использовался параметр процент времени, проведенного на открытых рукавах теста. Мыши, имевшие значение этого показателя менее 15%, скрещивались и в результате сформировали линию НАВ животных. Мыши, проводившие в открытых рукавах более 50% времени, сформировали LAB линию.

Перекрестное скрещивание заключалось в скрещивании самок и самцов разных генетически детерминированных профилей: НАВ самки с LAB самцом ♀НАВ♂LAB или LAB самки с НАВ самцом ♀LAB♂НАВ. Исследование проводилось на мышах первого поколения. Животные

содержались в условиях температуры $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ и влажности $50\pm 5\%$, суточный цикл 12:12, включение света в 8:00

Модификации условий окружающей среды

Перекрестное воспитание осуществлялось путем переноса мышат к самке с генетическим профилем, противоположным генетическому профилю биологической матери, в течение первых 12 часов после рождения.

Моделирование улучшенных условий проводилось в соответствии с протоколом, адаптированным и модифицированным от Arai J.A. et al. 2009. Улучшенные условия включали клетки большого размера ($55 \times 30 \times 20$ см), наполненные большим количеством подстилочного материала со слоем древесной стружки $6 \pm 0,5$ см, пластиковым навесом, тоннелем, деревянной лестницей и каркасной структурой, которые создавали условия для лазания. Модель улучшенных условий включала два периода (рис.1): первый - частичные улучшенные условия, когда в течение 14 дней (с ПНД 15 до ПНД 28) весь выводок вместе с самкой помещался в клетки с обогащенной средой на 6 часов в сутки. На 28 день жизни животные разлучались с матерью и размещались по 3 самца в клетке для постоянного пребывания (ПНД 28 - ПНД 42).

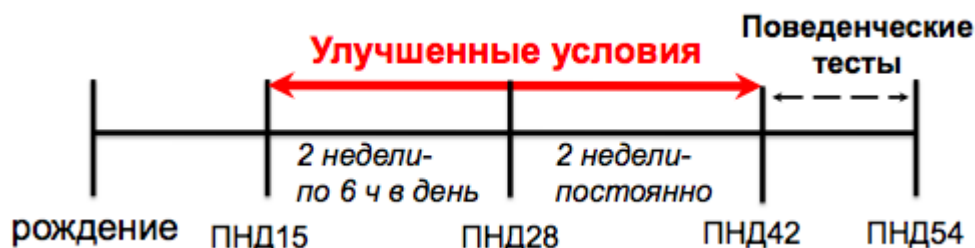


Рис. 1. Схема проведения эксперимента на примере мышей, содержащихся в улучшенных условиях.

Стрессорные воздействия проводились в те же сроки, что и улучшенные условия (ПНД 15 - ПНД 42). В настоящей работе была использована модель хронического стресса с использованием разных стрессорных воздействий (Ortiz J. et al., 1996). Животные получали не более двух стрессорных воздействий в течение дня. Применялись различные виды стрессорных воздействий: разлучение с матерью, иммобилизация, наклон клеток на 45° градусов, пребывание в условиях влажного подстилочного

материала, помещение в клетку без опилок, пребывание в клетке с водой комнатной температуры высотой водного столба 1 см от дна клетки, инверсия светлого и темного периода суток, перенаселение или помещение мышей по двое в клетке, белый шум (85 дБ на 3 часа), стробоскопический свет, электрокожное раздражение (0,7 мА).

Поведенческие тесты

Тестирование поведения проводилось в период с 42 по 54 день жизни и включало тесты Открытое поле, Приподнятый крестообразный лабиринт, Темно-светлая камера, Подвешивание за хвост и Принудительное плавание. Поведение мониторировалось с использованием видеокамеры, зафиксированной над тестовой установкой. Обработка поведенческих данных была проведена при помощи программы Any-Maze (Any-Maze v. 4.82, Stoelting, Wood Dale, IL, США). Локомоторная активность в домашней клетке исследовалась на протяжении трех суток при помощи автоматизированной системы (Inframot; TSE, Bad Homburg) после окончания других поведенческих тестов.

Исследование нейроэндокринных параметров

Концентрация кортикостерона в крови определялась при помощи радиоиммунного анализа (DRG Diagnostica). Исследовались образцы крови в покое и спустя 30 минут после тестирования в тесте Принудительное плавание.

Экспрессия мРНК гена *Krpp1* в области базолатеральной амигдалы определялась методом количественной полимеразной цепной реакции с использованием набора QuantiFast SYBR Green PCR Kit на приборе LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Анализ проводился методом сравнительного Ct анализа. Все пробы анализировались в повторах. После извлечения образцы мозга были быстро заморожены, порезаны на срезы толщиной 200 микрон и закреплены на стеклах (Superfrost microscope slides, Menzel) на криостате (Microm MH50, Microm, Walldorf). Базолатеральная амигдала была извлечена из замороженных срезов при использовании иглы-пробоотборника с внутренним диаметром 0,5 мм (Fine Science Tools) по методу, описанному Palkovits (1973). Для экстракции РНК из материала, полученного из замороженных срезов, был использован тризольный метод (Trizol, Invitrogen). Обратная транскрипция производилась при использовании протокола, предлагаемого

мануфактурным набором (High-Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) с добавлением рандомных праймеров. Для исследования общей экспрессии гена использовались праймеры *Krpp1* форвард: GCC CCA TGA TCC TGG TCC TGC и обратный: CCA TCG CCG CCA CCT CTT CC. Для аллель-специфической экспрессии использовались праймеры для гена *Krpp1*: форвард LAB-специфичный: AAG AGG TGG CGG CTG; HAB-специфичный: AAG AGG TGG CGG CTA и общий обратный: GAT GGG AAG GCT GCC.

Для статистического анализа данных была использована программа Статистика 18 (PASW Statistics 18, SPSS, Quarry Bay). Анализ поведения животных проводился с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA. Сравнение двух независимых групп проводилось с использованием непараметрической статистики и Манн-Уитни U теста. Локомоторная активность анализировалась при использовании дисперсионного анализа с повторными измерениями для зависимых выборок, где повторные измерения за каждый час принимались как зависимые величины. Различия в аллель-специфической экспрессии между группами оценивались при помощи Kruskal-Wallis test с последующим применением Mann-Whitney U-теста для сравнения двух групп. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Результат расценивался как достоверно значимый при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Показатели поведения и концентрация кортикостерона в крови у потомков скрещивания мышей с противоположными генетически детерминированными типами тревожноподобного поведения

Задачей данной серии экспериментов было изучение показателей поведения и концентрации кортикостерона у потомков скрещивания родительских пар с противоположными генетически детерминированными профилями: HAB самки и LAB самца ♀HAB♂LAB ($n=16$) или LAB самки и HAB самца ♀LAB♂HAB ($n=23$). Животные в этом эксперименте воспитывались биологическими матерями.

У потомков родительских пар ♀HAB♂LAB по сравнению с потомками родительских пар ♀LAB♂HAB (рис. 2) был достоверно меньше процент времени, проведенного на открытых рукавах теста Приподнятый

крестообразный лабиринт ($p < 0,05$), короче общая пройденная дистанция ($p < 0,05$) и меньше процент времени, проведенного в центральной зоне теста Открытое поле ($p < 0,05$). Не было обнаружено достоверных различий в локомоторной активности, измеренной на протяжении последовательных трех суток в домашней клетке, у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB и ♀LAB♂HAB ($p = 0,99$).

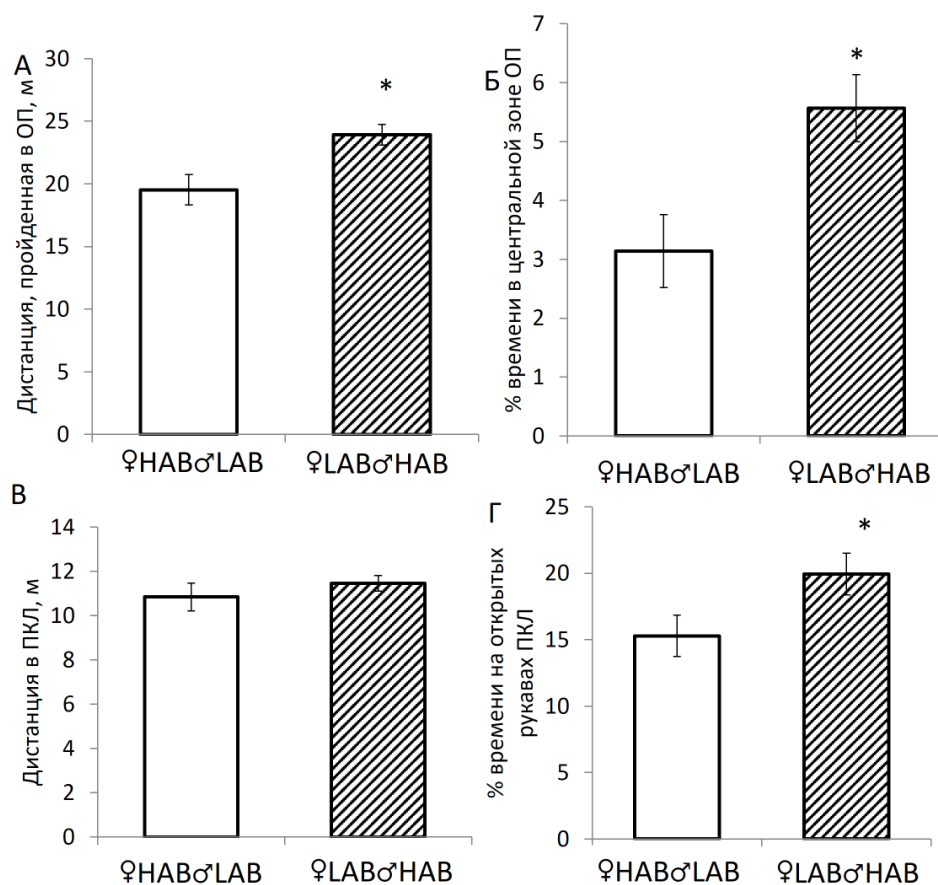


Рис. 2. Показатели поведения мышей потомков родительских пар ♀HAB♂LAB ($n=16$) и ♀LAB♂HAB ($n=23$). (А) Общая дистанция, пройденная в тесте Открытое поле; (Б) Процент времени, проведенного в центральной зоне теста Открытое поле; (В) Общая дистанция, пройденная в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт, м; (Г) Процент времени, проведенного на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$

Базальная концентрация кортикостерона в плазме крови у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB была достоверно выше ($p < 0,05$) по

сравнению с концентрацией у потомков родительских пар ♀LAB♂HAB (рис. 3). Стрессорная нагрузка в виде теста Принудительное плавание сопровождалась достоверным увеличением концентрации кортикостерона спустя 30 минут после окончания теста Принудительное плавание по сравнению с концентрацией в покое у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB ($p<0,001$) и ♀LAB♂HAB ($p<0,001$). Не было обнаружено различий в концентрации кортикостерона в крови после теста Принудительное плавание между потомками родительских пар ♀HAB♂LAB и ♀LAB♂HAB ($p=0,25$).

Таким образом, потомки родительских пар ♀HAB♂LAB по сравнению с потомками родительских пар ♀LAB♂HAB характеризовались более выраженным тревожноподобным фенотипом.

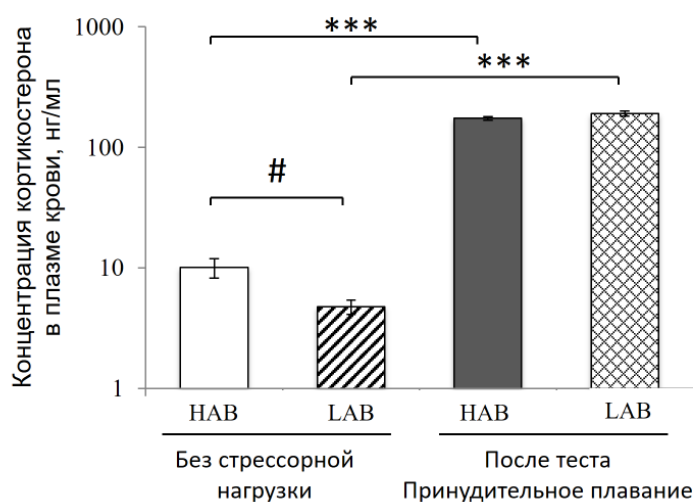


Рис. 3. Концентрация кортикостерона в плазме крови мышей без стрессорной нагрузки и спустя 30 минут после окончания теста Принудительное плавание, нг/мл. HAB – показатели потомков родительских пар ♀HAB♂LAB ($n=8$); LAB – показатели потомков родительских пар ♀LAB♂HAB ($n=8$). *** $\equiv p<0,001$ после теста Принудительное плавание по сравнению с концентрацией без стрессорной нагрузки, # — $p<0,05$ у мышей потомков родительских пар ♀LAB♂HAB по сравнению с концентрацией у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB без стрессорной нагрузки.

2. Показатели поведения и концентрация кортикостерона в крови у потомков скрещивания мышей с генетически детерминированным тревожноподобным поведением при перекрестном воспитании.

Данный этап нашей работы был направлен на исследование поведения и концентрации кортикостерона в плазме крови у мышей при воспитании самками с различными характеристиками тревожноподобного поведения. В работе (Kessler M. et al, 2011) показано, что НАВ самки проводят достоверно больше времени рядом с потомством, осуществляют более долгий груминг потомков по сравнению с самками LAB линии.

2.1 Показатели поведения и концентрация кортикостерона в плазме крови при перекрестном воспитании у мышей - потомков родительских пар ♀LAB♂НАВ

У потомков родительских пар ♀LAB♂НАВ при воспитании НАВ самкой (n=20) по сравнению с потомками родительских пар ♀LAB♂НАВ, воспитанными LAB самкой (n=23), наблюдались более короткий латентный период выхода на открытый рукав Приподнятого крестообразного лабиринта ($p<0,05$) и большая протяженность дистанции, пройденной за период тестирования в Открытом поле ($p<0,01$). При этом не было обнаружено различий в проценте времени, проведенного в аверсивных условиях: на центральной зоне теста Открытое поле, на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт, в светлом отсеке теста Темно-светлая камера.

В тесте Принудительное плавание не было обнаружено достоверных различий в длительности состояния иммобильности и в латентном периоде первого эпизода неподвижности между потомками родительских пар ♀LAB♂НАВ при воспитании самкой НАВ или LAB линии. Не было обнаружено различий в локомоторной активности в домашней клетке у мышей потомков родительских пар ♀LAB♂НАВ, воспитанных НАВ и LAB самками.

Концентрация кортикостерона не различалась у потомков родительских пар ♀LAB♂НАВ при воспитании самками НАВ и LAB линий как в базальном состоянии, так и через 30 минут после теста Принудительное плавание.

2.2. Показатели поведения и концентрация кортикостерона при перекрестном воспитании у мышей - потомков скрещивания родительских пар ♀HAB♂LAB

Эксперимент проводился на потомках родительских пар ♀HAB♂LAB, воспитанных HAB самкой (HAB/H, n=16) или самкой противоположной генетической LAB линии, (HAB/L, n=21). Результаты эксперимента представлены на рис. 4. Потомки родительских пар ♀HAB♂LAB при воспитании самкой LAB линии по сравнению с потомками, уход за которыми осуществляла HAB самка, проводили больше времени на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт ($p<0,05$), в центральной зоне теста Открытое поле ($p<0,01$), но меньше времени в светлом отсеке теста Темно-светлая камера ($p<0,05$).

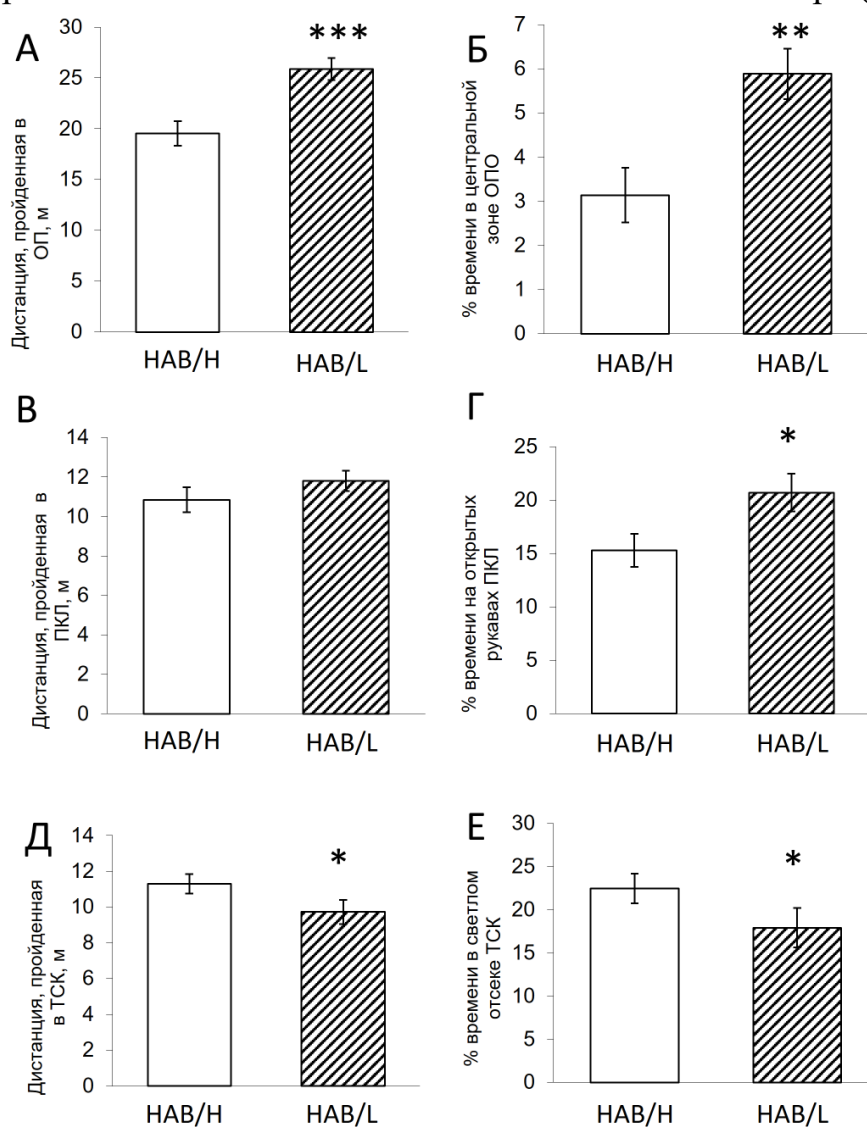


Рис. 4. Показатели поведения потомков скрещивания родительских пар ♀HAB♂LAB. HAB/H – показатели потомков ♀HAB♂LAB, воспитанных

НАВ самкой, $n=16$; НАВ/L – показатели потомков ♀НАВ♂LAB, воспитанных LAB самкой, $n=21$ (А) Общая дистанция, пройденная в тесте Открытое поле; (Б) Время, проведенное в центральной зоне теста Открытое поле; (В) Общая дистанция, пройденная в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт; (Г) Время, проведенное на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт; (Д) Общая дистанция, пройденная в тесте Темно-светлая камера; (Е) Время, проведенное в светлом отсеке теста Темно-светлая камера. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - $p<0.05$, ** - $p<0.01$, *** - $p<0.001$

Локомоторная активность в домашней клетке на протяжении трех последовательных суток не различалась. Концентрация кортикостерона в плазме крови у мышей потомков родительских пар ♀НАВ♂LAB, воспитанных НАВ или LAB самками, в базальном состоянии не имела достоверных различий, а спустя 30 минут после окончания теста Принудительное плавание была достоверно выше у потомков ♀НАВ♂LAB при перекрестном воспитании LAB самкой по сравнению с потомками родительских пар ♀НАВ♂LAB, воспитываемыми НАВ самкой ($p<0,001$).

Таким образом, потомки родительских пар ♀НАВ♂LAB оказались более чувствительными к такому параметру окружающей среды, как материнская забота, чем потомки родительских пар ♀LAB♂НАВ.

3. Показатели поведения в условиях модификации условий содержания у потомков мышей с генетически детерминированным тревожноподобным поведением

В данной серии экспериментов изучали показатели тревожноподобного поведения после модификаций условий окружающей среды. Модификации среды включали воздействие хронических стрессорных нагрузок или содержание мышей в улучшенных условиях в период с 15 по 42 день жизни.

3.1 Показатели поведения в условиях модификации условий содержания у потомков скрещивания родительских пар ♀LAB♂НАВ

В данном эксперименте было выделено 3 группы потомков родительских пар ♀LAB♂НАВ: мыши, содержащиеся в стандартных

условиях (n=7), в условиях хронического стресса (n=11), в улучшенных условиях (УУ, n=14).

У потомков родительских пар ♀LAB♂HAB, содержащихся в улучшенных условиях, по сравнению с мышами, содержащимися в условиях хронического стресса и в стандартных условиях, наблюдалось увеличение процента времени, проведенного в центральной зоне теста Открытое поле ($p<0,05$), снижение пройденной дистанции ($p<0,05$) и увеличение количества заходов на открытые рукава ($p<0,001$) в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт. Модификация окружающей среды в виде хронических стрессорных нагрузок сопровождалась увеличением длительности иммобильности по сравнению с животными, содержащимися в стандартных ($p<0,01$) и улучшенных условиях ($p<0,01$). При этом активная стратегия преодоления стрессорной ситуации сменялась пассивной раньше у мышей, содержащихся в условиях хронических стрессорных нагрузок, по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях, что отражено в более коротком латентном периоде иммобильности ($p<0,01$).

3.3.2. Показатели поведения и концентрация кортикостерона в крови у потомков скрещивания родительских пар ♀HAB♂LAB в условиях модификации условий содержания

В данном эксперименте было выделено 3 группы животных: мыши, содержащиеся в стандартных условиях (n=15), в условиях хронического стресса (стресс, n=20), в улучшенных условиях (УУ, n=16). Содержание потомков родительских пар ♀HAB♂LAB в улучшенных условиях сопровождалось менее выраженными проявлениями тревожноподобного поведения по сравнению с мышами, содержащимися в стандартных условиях и условиях хронических стрессорных нагрузок (рис. 5). Это отражено в более длинной пройденной дистанции в тестах Открытое поле ($p<0,01$) и Темно-светлая камера ($p<0,01$), большем проценте времени на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт ($p<0,05$) и в светлом отсеке теста Темно-светлая камера ($p<0,001$), большем количестве выходов на открытые рукава теста Приподнятый крестообразный лабиринт ($p<0,05$) и в светлый отсек теста Темно-светлая камера ($p<0,001$), большем количестве стоек в тестах Открытое поле ($p<0,05$) и Темно-светлая камера у мышей, содержащихся в улучшенных условиях ($p<0,05$).

Потомки родительских пар ♀НAB♂LAB, содержащиеся в условиях хронических стрессорных нагрузок, выполнили достоверно меньшее количество выходов на открытые рукава теста Приподнятый крестообразный лабиринт ($p<0,05$), меньше стойки к тесте Темно-светлая камера ($p<0,05$), имели более долгий латентный период первого выхода в светлый отсек теста Темно-светлая камера ($p<0,05$) и провели больше времени в состоянии иммобильности в тестах Принудительное плавание ($p<0,05$) и Подвешивание за хвост ($p<0,05$) по сравнению с животными, содержащимися в стандартных и улучшенных условиях.

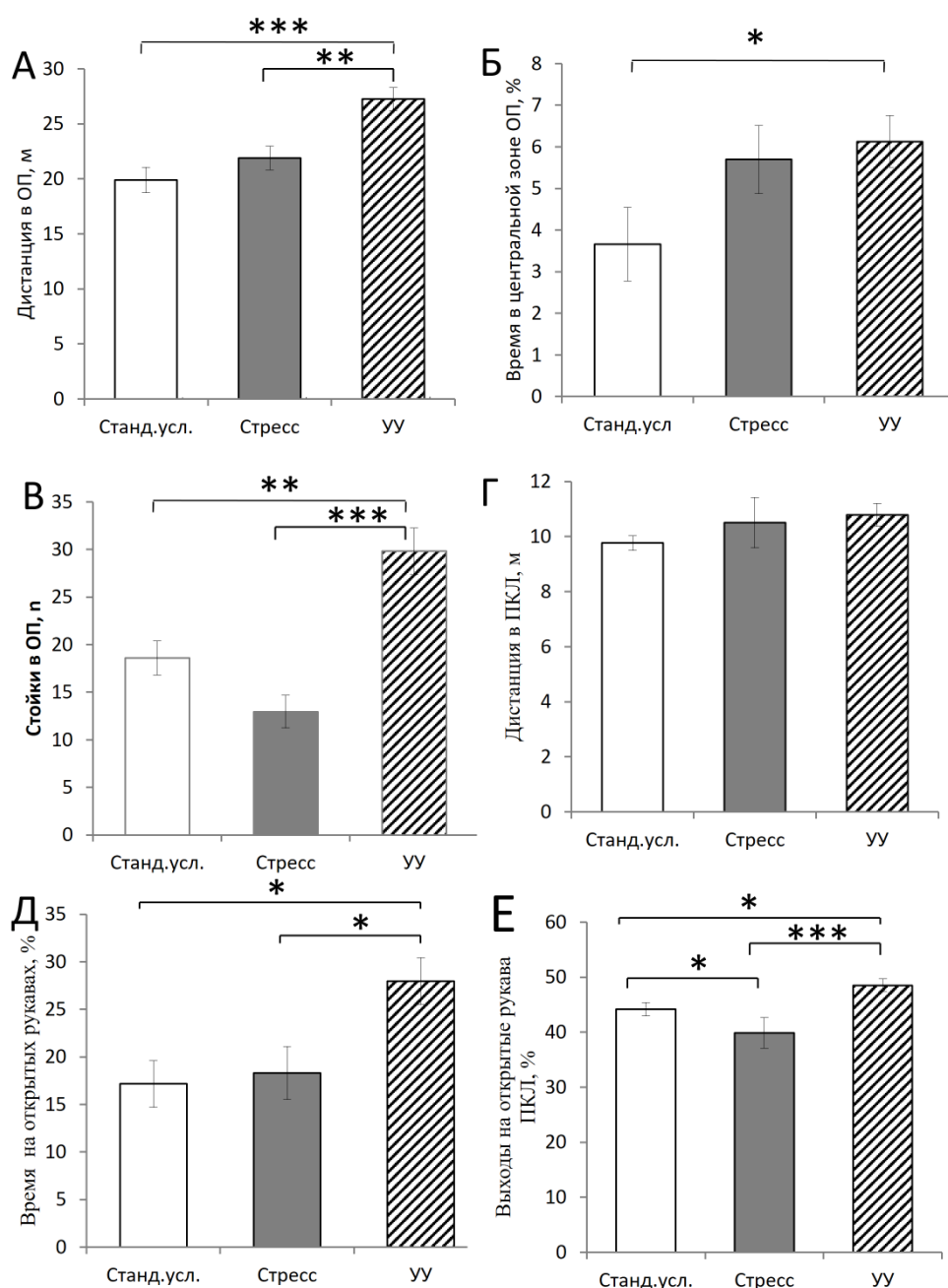


Рис. 5. Показатели поведения мышей потомков скрещивания родительских пар ♀НAB♂LAB. (А) Общая дистанция, пройденная за время тестирования

в тесте Открытое поле; (Б) Процент времени, проведенного в центральной зоне теста Открытое поле, по отношению к общему времени тестирования; (В) Стойки, общее количество за весь период тестирования в тесте Открытое поле; (Г) Общая дистанция, пройденная за время тестирования в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт; (Д) Процент времени, проведенного на открытых рукавах теста Приподнятый крестообразный лабиринт; (Е) Количество выходов на открытые рукава теста Приподнятый крестообразный лабиринт. Светлые столбики – показатели у мышей, содержащихся в стандартных условиях, (n=15). Закрашенные столбики – показатели у мышей, содержащихся в условиях хронических стрессорных нагрузок (n=20). Столбики с косой штриховкой – показатели у мышей, содержащихся в улучшенных условиях (n=16). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$.

Концентрация кортикостерона у животных, содержащихся в условиях хронических стрессорных нагрузок, была достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с животными, содержащимися в улучшенных условиях (рис. 6). Концентрация кортикостерона после теста Принудительное плавание не различалась между животными исследованных групп ($F(2,27)=0,834$, $p=0,45$).

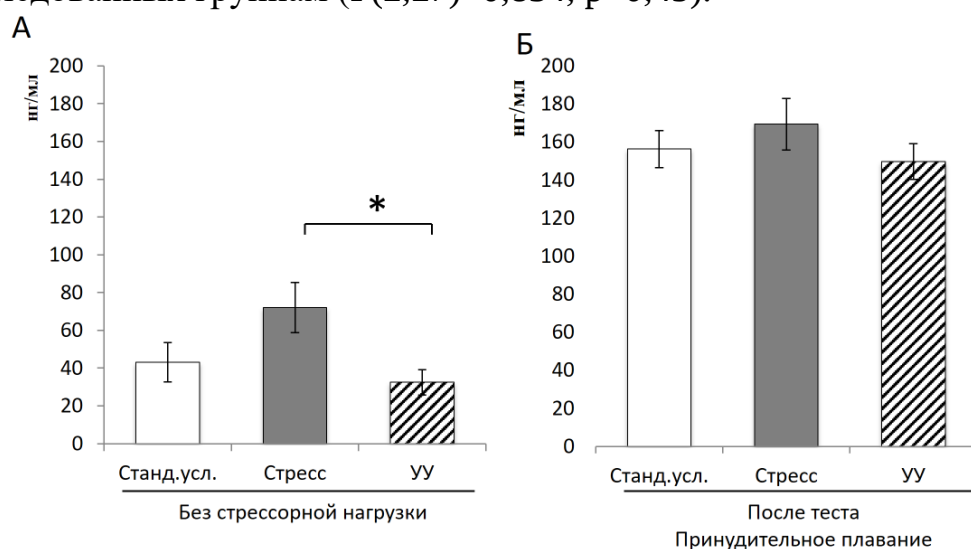


Рис. 6. Концентрация кортикостерона в плазме крови мышей потомков скрещивания родительских пар ♀НAB♂LAB (А) - Без стрессорной нагрузки; (Б) - Спустя 30 минут после окончания теста Принудительное плавание. Светлые столбики –показатели мышей, содержащихся в стандартных условиях (n=10). Закрашенные столбики – показатели мышей,

содержавшихся в условиях хронических стрессорных нагрузок (n=10). Столбики с косой штриховкой – показатели мышей, содержащихся в улучшенных условиях (n=10). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. * - $p < 0,05$

4. Экспрессия мРНК гена *Krfr1* в базолатеральной миндалине после воздействий среды у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB

У потомков родительских пар ♀HAB♂LAB при воспитании HAB или LAB самкой не было обнаружено достоверных различий ($p = 0,14$) в экспрессии мРНК гена *Krfr1* в базолатеральной миндалине (рис. 7).

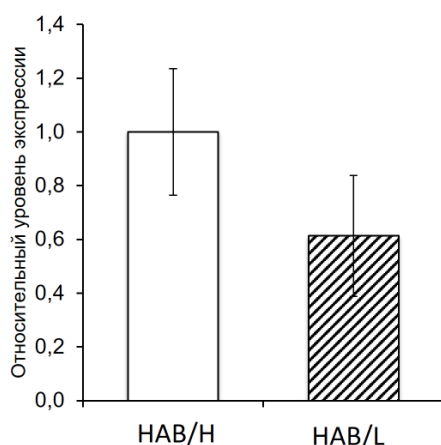


Рис. 7. Экспрессия мРНК гена *Krfr1* в области базолатеральной миндалины у потомков родительских пар ♀HAB♂LAB при воспитании HAB самкой (HAB/H, n=7) и при воспитании LAB самкой (HAB/L, n=7). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Аллель-специфическая экспрессия (рис. 8) LAB аллеля гена *Krfr1* в базолатеральной миндалине у животных, содержащихся в стандартных условиях, была выше по сравнению с HAB аллелем ($p < 0,001$). У животных, содержащихся в улучшенных условиях, относительный уровень экспрессии LAB аллеля был выше (стресс vs. УУ $p < 0,01$, станд.усл. vs. УУ $p < 0,01$), а HAB аллеля - ниже (стресс vs. УУ $p < 0,01$) по сравнению с экспрессией одноименных аллелей у мышей, содержащихся в стандартных условиях и условиях хронических стрессорных нагрузок. У животных, подвергавшихся хроническим стрессорным нагрузкам, относительный уровень экспрессии LAB аллеля был ниже по сравнению с экспрессией LAB аллеля у мышей, содержащихся в стандартных ($p < 0,01$)

и улучшенных условиях ($p<0,01$), а НАВ аллеля выше по сравнению с экспрессией НАВ аллеля у мышей, содержащихся в стандартных ($p<0,01$) и улучшенных условиях ($p<0,01$).

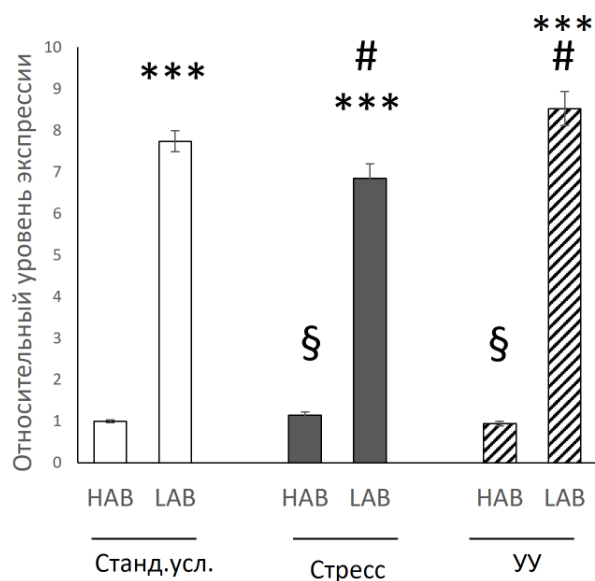


Рис. 8. Аллель-специфическая экспрессия мРНК НАВ и ЛАВ аллелей гена *Kcrfpl* в области базолатеральной миндалины у потомков родительских пар ♀НАВ♂ЛАВ. Белые столбики — экспрессия у животных, содержащихся в стандартных условиях ($n=7$). Темные столбики — у животных, содержащихся в условиях хронических стрессорных нагрузок ($n=7$). Заштрихованные столбики — у животных, содержащихся в улучшенных условиях ($n=7$). *** - $p<0,001$ экспрессия ЛАВ аллеля по сравнению с НАВ аллелем, # - $p<0,01$ экспрессия ЛАВ аллеля по сравнению с экспрессией ЛАВ аллеля у мышей, содержащихся в стандартных условиях, § - $p<0,01$ экспрессия НАВ аллеля по сравнению с экспрессией НАВ аллеля у мышей, содержащихся в стандартных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Фенотипические признаки потомков мышей с противоположным генетически детерминированным тревожноподобным поведением характеризуются выраженным преобладанием поведенческих и нейроэндокринных показателей высокотревожного фенотипа.
2. Потомки родительских пар ♀НАВ♂ЛАВ по сравнению с потомками родительских пар ♀ЛАВ♂НАВ обладают более выраженными тревожноподобными поведенческими и нейроэндокринными характеристиками.

3. Поведенческий и нейроэндокринный фенотип потомков родительских пар ♀HAB♂LAB по сравнению с потомками родительских пар ♀LAB♂HAB более чувствителен к изменениям материнского воспитания и условий обитания.
4. Материнское воспитание оказывает выраженное влияние на тревожноподобный фенотип потомков родительских пар ♀HAB♂LAB. Воспитание потомков родительских пар ♀HAB♂LAB самкой низкотревожной линии сопровождается снижением выраженности параметров тревожноподобного поведения и увеличением концентрации кортикостерона после стрессорного воздействия.
5. Содержание в улучшенных условиях ослабляет, а в условиях хронических стрессорных нагрузок усиливает поведенческие и нейроэндокринные показатели тревожноподобного фенотипа потомков родительских пар ♀HAB♂LAB, но не ♀LAB♂HAB.
6. У потомков родительских пар ♀HAB♂LAB преобладает экспрессия LAB аллеля гена рецептора кортикотропин-рилизинг фактора первого типа в области базолатеральной миндалины.
7. Характер воздействия среды определяет направленность изменений параметров тревожноподобного фенотипа и экспрессии высоко- и низкотревожного аллелей рецептора кортикотропин-рилизинг-фактора первого типа в области базолатеральной миндалины. Усиление проявлений тревожноподобных реакций после содержания мышей в условиях хронических стрессорных нагрузок сопровождается увеличением относительной экспрессии высокотревожного аллеля. Ослабление проявлений тревожноподобных реакций после содержания в улучшенных условиях сопровождается увеличением относительной экспрессии низкотревожного аллеля в области базолатеральной миндалины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Chekmareva NY**, Umriukhin AE, Landgraf R, Sotnikov SV. Inborn vs. acquired anxiety in cross-breeding and cross-fostering HAB/LAB mice bred for extremes in anxiety-related behavior // Behav Neurosci. — 2019.—133.— C.68–76.
2. Sotnikov S V, Markt P O, Malik V, **Chekmareva N Y**, Naik R R, Sah A, Singewald N, Holsboer F, Czibere L, Landgraf R. Bidirectional rescue of extreme genetic predispositions to anxiety: impact of CRH receptor 1 as epigenetic plasticity gene in the amygdala // Translational Psychiatry. — 2014. — 4, e359.
3. **Chekmareva N Y**, Sotnikov SV, Diepold RP, Naik RR, Landgraf R, Czibere L. Environmental manipulations generate bidirectional shifts in both behavior and gene regulation in a crossbred mouse model of extremes in trait anxiety // Front. Behav. Neurosci.— 2014.— 8:87.
4. Sotnikov S V, **Chekmareva N Y**, Schmid B., Harbich D., Malik V, Bauer S., Kuehne C., Markt P O, Deussing J.M., Schmidt M.V, Landgraf R. Enriched environment impacts trimethylthiazoline-induced anxiety-related behavior and immediate early gene expression: critical role of Crhr1 // European Journal of Neuroscience. — 2014.— pp. 1-10.
5. **Чекмарева Н.Ю.**, Сотников С.В., Умрюхин А.Е., Ландграф Р. Аллель-специфическая экспрессия гена КРГр1 и изменения поведения у мышей в различных условиях окружающей среды. Материалы XXII съезда Физиологического общества имени И. П. Павлова, Волгоград, 16-20 сентября 2013 г.— С. 574-575.
6. **Чекмарева Н.Ю.**, Сотников С.В., Умрюхин А.Е., Ландграф Р. Модификации генетически детерминированных форм поведения, отражающих тревожность: влияние окружающей среды и блокады рецептора КРФ 1 типа в базолатеральной амигдале. Материалы XVII Школы-конференции молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии в институте ВНД, 21-22 октября 2013.— С. 46.
7. **Chekmareva NY**, Sotnikov SV, Naik R, Markt PO, Landgraf R. Environmental modulation of allele-specific expression in HAB/LAB crossmates: focus on CRHR1. Материалы симпозиума Института

Психиатрии Макса Планка, Мюнхен, Германия. 24-25 июля 2012. — P2

8. Malik VA, **Chekmareva NY**, Sotnikov SV, Markt PO, Landgraf R. Decreasing inborn anxiety: environmental factors and pharmacological manipulations. Материалы симпозиума Института Психиатрии Макса Планка, Мюнхен, Германия. 24-25 июля 2012. — P12
9. Markt PO, Sotnikov SV, Malik VA, **Chekmareva NY**, Avtabos C, Landgraf R. Epigenetic rescue of inborn anxiety. Материалы симпозиума Института Психиатрии Макса Планка, Мюнхен, Германия. 24-25 июля 2012. — L7.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ	Адренокортикотропный гормон
ГГН	Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
КРФ	Кортикотропин-рилизинг фактор
КРФр1	Рецептор кортикотропин-рилизинг фактора первого типа
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
ОП	Тест Открытое поле
ПКЛ	Тест Приподнятый крестообразный лабиринт
ПНД	Постнатальный день
УУ	Улучшенные условия
♀НАВ♂LAB	Потомки первого поколения скрещивания самки линии НАВ с самцом линии LAB
♀LAB♂НАВ	Потомки первого поколения скрещивания самки линии LAB с самцом линии НАВ

ДЛЯ ЗАМЕТОК