

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ В.А. Кратасюк

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.02 – Биология**

Обогащенная среда как модулятор поведенческих реакций  
у мышей самок и самцов линии C57BL/6

Руководитель

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

проф., д.б.н. О.Л. Лопатина

Выпускник

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

М. В. Безручко

Красноярск 2021

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Обогащенная среда как модулятор поведенческих реакций у мышей самок и самцов линии C57BL/6» содержит 36 страниц текстового документа, 24 использованных источников, 10 листов графического материала.

ПОВЕДЕНИЕ, СОЦИАЛИЗАЦИЯ, ОБОГАЩЁННАЯ СРЕДА, C57BL/6, ТРЕВОЖНОСТЬ, САМКИ.

Цель работы: оценить влияние обогащённой среды на поведение самок и самцов мышей линии C57BL/6.

Актуальность исследования обусловлена факторами влияния обогащённой среды на животных. Обогащённая среда – это увеличенная по масштабам клетка, в которой находятся дополнительные социальные и не социальные стимулы. В настоящее время недостаточно исследований с самками мышей, так же существует потребность в изучении обоих полов, чтобы исключить дискриминацию по гендерному признаку.

Были выявлены нейроповеденческие особенности самок и самцов мышей C57BL/6 в стандартной среде и в обогащённой среде.

В итоге было обнаружено, что длительное содержание в обогащённой среде мышей линии C57BL/6 повышает тревожность животных, снижает исследовательскую и социальную активность.

## СОДЕРЖАНИЕ

Актуальность .....	5
Цели и задачи .....	6
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
Обзор литературы .....	8
<b>Глава 1. Влияние среды на животных</b> .....	8
<b>Глава 2. Влияние эстрального цикла</b> .....	14
<b>Материалы и методы</b> .....	15
<b>1. Объект исследования</b> .....	15
<b>2. Оборудование</b> .....	15
<b>3. Реактивы</b> .....	16
<b>4. Поведенческие тесты</b> .....	16
<b>4.1 Тест «открытое поле»</b> .....	16
<b>4.2 Трёхкамерный социальный тест</b> .....	16
<b>4.3 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»</b> .....	17
<b>4.4 Тест «чёрно-белая камера»</b> .....	17
<b>4.5 Социальный пятипопыточный тест</b> .....	18
<b>4.6 Тест «подвешивание за хвост»</b> .....	18
<b>5. Взятие эстральных мазков</b> .....	18
<b>6. Взятие образцов</b> .....	18
<b>7. Статистический анализ</b> .....	19
<b>Результаты</b> .....	20
<b>1. Поведенческое тестирование</b> .....	20
<b>1.1 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт</b> .....	20
<b>1.2 Тест «чёрно-белая камера»</b> .....	22
<b>1.3 Тест «открытое поле»</b> .....	23
<b>1.4 Тест «подвешивание за хвост»</b> .....	27
<b>1.5 Социальный пятипопыточный тест</b> .....	28
<b>1.6 Трёхкамерный социальный тест</b> .....	29
<b>2. Эстральный цикл</b> .....	30
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	32

<b>Выводы</b> .....	33
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b> .....	34

### **Актуальность**

В последнее время увеличивается интерес к изучению самок мышей и влиянию обогащённой среды на развитие животных. Накоплено множество исследований о том, что поведение самок мышей отличается от поведения самцов, в частности из-за наличия эстрального цикла, и что обогащённая среда положительно влияет на животных. Однако существует мало исследований о влиянии обогащённой среды на поведение с участием самок мышей. Так же существует потребность в изучении обоих полов, чтобы исключить дискриминацию по гендерному признаку.

## **Цели и задачи**

Цель работы: Оценить влияние обогащённой среды на поведение самок и самцов мышей линии C57BL/6.

Задачи:

1. определить исследовательскую активность у мышей линии C57BL/6 после содержания в условиях обогащённой среды;
2. оценить влияние обогащённой среды на уровень тревожности и беспокойства у мышей линии C57BL/6 обоего пола;
3. определить уровень социализации мышей линии C57BL/6 после содержания в условиях обогащённой среды.

## ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях поведения животных исторически изначально изучались мыши самцы. Накоплено много данных с участием самцов грызунов различных генотипов и условий содержания. На данный момент недостаточно исследований связанных с поведением самок грызунов.

Влияние пола на структуры и функции мозга доказано: самцы и самки реагируют на различные тестовые условия по-разному, давая соответственно разный результат в пределах генотипа и среды содержания [1, 2, 3]. Научное понимание мира побуждает изучать особей обоих полов, чтобы давать более полное представление о наблюдаемых явлениях.

В исследованиях с использованием мышей применяется стандарт, оптимизированный для содержания данного вида грызунов: размер клетки 369 x 156 x 132 мм с погрешностью 10 мм по каждому измерению, 4-6 животных в клетке, свободный доступ к еде и воде, цикл дня и ночи 12/12 ч.

Обогащённая среда (ОС) – это увеличенная по размерам клетка (в сравнении со стандартом в несколько раз), содержащая ряд дополнительных стимулов: несоциальных объектов, социальных объектов, физической активности, сложности среды [3, 4, 5, 6]. Влияние ОС на животных велико. ОС вызывает изменения физиологических параметров: стрессоустойчивость [7, 6], нейрогенез в гиппокампе [4, 5, 7, 8], физическая и социальная активность [2,7].

Известно, что животные, которые содержатся в социальной изоляции без дополнительных стимулов, проявляют повышенную тревожность и пониженную чувствительность к тестам [9].

Существует мало информации о поведении самок мышей в условиях ОС. Особенностью работы с самками мышей является наличие эстрального цикла, от которого может зависеть их физическая и социальная активность.

## Обзор литературы

### Глава 1. Влияние среды на животных

Возникает вопрос: каковы оптимальные сроки содержания в условиях ОС? Первые двадцать четыре часа нахождения в условиях ОС улучшают память, животные начинают лучше распознавать объекты. К первой недели увеличивается пролиферация клеток в мозге. К третьей недели содержания в ОС достигаются наиболее значимые поведенческие эффекты в типичных тестах на: двигательную активность, распознавание объектов и тревожность - возвращается в норму пролиферация клеток в мозге. Однако содержание более длительное – пяти недельное - начинает нивелировать большинство поведенческих эффектов. Животные начинают привыкать к условиям содержания. Постоянным эффектом условий ОС остаётся разница в количестве нейронов в гиппокампе у животных в ОС по сравнению с животными, которые содержатся в обычных средах. Данный эффект достигается благодаря тому, что большее число нейронов у животных из ОС выживает, и происходит увеличенная пролиферация нейронов [7].

Также содержание в обогащённой среде усиливает парвальбумин-позитивные специфические нейроны в базолатеральной миндалине, что вызывает поведенческую пластичность, которая отражается в снижении тревожного поведения, и этот эффект постоянен [10].

В работе Lorens-Martín M. et al (2011) авторы описывают влияние ОС как антидепрессанта, который способен либо снизить прошлые негативные воздействия стресса, либо уменьшить количество стресса в будущих событиях. Были использованы четыре группы самок мышей линии C57/BL6J: 1 – стандартное содержание + вынужденный стресс; 2 – стандартное содержание, 3 – содержание в ОС, 4 – вынужденный стресс + содержание в ОС. Мыши из первой, второй и четвёртой группы показали высокое время бездействия, хотя вторая группа статистически больше была активна по сравнению с первой. Однако третья группа проявляла повышенную



активность по сравнению с другими. Авторы делают вывод о влиянии обогащённой среды как превентивного антидепрессанта по отношению к вынужденным стрессам. Также в гиппокампе в гранулярном клеточном слое, супрапиримидальной лопасти зубчатой извилины у мышей при содержании в ОС наблюдалось большее количество субпопуляций незрелых нейронов, по сравнению с мышами контрольной группы. Это свидетельствует о том, что большее число незрелых нейронов в гиппокампе у мышей из ОС было не затронуто, тогда как у мышей контрольной группы незрелые нейроны погибали [11].

В обзорной статье Gelfo F. (2019) о влиянии обогащенной среды обсуждалось влияние опыта на структурные изменения в головном мозге и когнитивную пластичность. Выделяют три основных фактора, которые вызывают нейропротекторный эффект в головном мозге: социальный фактор, который охватывает обязательства и все виды деятельности на высшем уровне; когнитивный фактор, который включает психически сложные виды деятельности (к примеру образование, досуг и т.д.); физический фактор, который охватывает привычки здорового образа жизни (правильное питание, воздержание от алкоголя, сигарет, мышечная активность и т.д.). Наличие трех этих факторов позволяет понизить уязвимость к патологиям умственной деятельности и повысить когнитивную пластичность в возрасте [2].

Моделирование ОС для животных: клетка большего размера чем стандартная с дополнительными стимулами: различные не социальные объекты, большее число социальных контактов, физические упражнения (беговое колесо), разнообразный рацион питания. Обогащённая среда усиливает положительные эффекты: позволяет эффективно реагировать на сложные ситуации, увеличивает количество стратегий в дизайнах теста, улучшает обучаемость и память, усиливает нейрогенез, глиогенез, и синапсogenesis [2].

Однако существуют противоречивые данные относительно положительных эффектов обогащённой среды у патологических моделей на

животных. Авторы говорят о том, что необходимо больше исследований, так как данная научная область полна новизны и существует много не до конца изученных проблем [2].

Обогащённая среда способствует улучшению краткосрочной и долгосрочной памяти [2], что сопровождается также увеличением количества астроцитов и микроглии в гиппокампе в областях ответственных за обучение и память. В областях гиппокампа: зубчатой извилины, CA1, CA2, CA3 зонах – новые нейроны появляются неравномерно. Также обогащённая среда влияет на Т-клетки в лимфоузлах. У мышей линии C57BL/6 измерялось количество различных Т-клеток в лимфоузлах. Результаты показали, что у мышей пребывающие длительно в условиях обогащённой среде, меняется пропорция количества клеток иммунитета в лимфоузлах, так количество Т-клеток CD8 (клеток цитотоксического ответа) становится больше [12].

Грызуны, находящиеся в условиях ОС, отличаются устойчивым нейрогенезом и сниженным повреждением нейронов в клеточном микроокружении зубчатой извилины. Также было высказано предположение, что нейротрансмиттеры, такие как дофамин, серотонин и ГАМК (гамма-аминомасляная кислота) опосредуют связь между иммунной системой и их уровни влияния изменяются в разных областях гиппокампа и префронтальной коры. Внеклеточные уровни нейромедиаторов ГАМК и глутамата показывают увеличение площади CA3 зоны гиппокампа, а также увеличение уровней нейротрофинов и факторов роста нейронов BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Это объясняет улучшение когнитивных функций и снижение тревожного поведения [8].

Так как ОС у грызунов повышает физическую активность (исследование объектов, наличие бегового колеса), то после тренировки усиливаются как в системном кровообращении, так и в мозге, продуцирование и проявление противовоспалительных факторов, особенно противовоспалительных цитокинов (например, IL-6, IL-10). Это впоследствии уменьшает уровень провоспалительных факторов, таких как

цитокины TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , хемокины, TLRs и CRP, помогает облегчить как системное воспаление, так и нейровоспаление, которое ассоциировано с большинством психических расстройств. Увеличение количества Т-лимфоцитов и NK-клеток после физической активности укрепляет адаптивный иммунитет [8].

Большое количество социальных связей в обогащённой среде влияет на построение иерархии животных. Результаты экспериментов по обогащённой среде рознятся, это может быть связано с тем, что не всегда удаётся точно определить социальную иерархию животных. Заметные изменения в гуморальных и клеточных иммунных реакциях наблюдается у социально подчинённых животных, это показано снижением пролиферации спленоцитов и продукции цитокинов IL-4 и IL-10 [8]. Уменьшается пролиферация Т-клеток и продукция IL-2, снижается активность Т-клеток и NK-клеток. Очевидно иммуноподавление у подчинённых животных [8].

Также была исследована теория о том, что ОС влияет на нейроинвазию вируса в ЦНС или лучшее проникновение Т-клеток в ЦНС. Самкам мышам вводили назально вирус Пири, и когда их отклонение поведения становилось очевидным, мозг фиксировали и окрашивали. У мышей содержащихся в обогащённой среде наблюдалась более высокая инфильтрация Т-клеток в мозге, меньшее инфицирование клеток в ЦНС, меньший микроглиоз и меньшее повреждение внеклеточного матрикса по сравнению с контрольной группой. Мыши в условиях ОС быстрее восстанавливались по сравнению с контролем. Естественное поведение копания у мышей в условиях ОС не было нарушено, по сравнению с мышами из контрольной группы [13].

Социальное поражение, когда исследуемое животное помещают к другому животному резиденту превосходящим по массе в два и более раза и в процессе животное резидент доминирует над исследуемым, вызывает сильное тревожно-депрессивное состояние у исследуемого животного [14, 15].

Социальное поражение вызывает активацию ERK-1/2 в гиппокампе, который отвечает за пролиферацию, выживание и подвижность клеток, в ответ на повышение воспалительного цитокина IL-6 в коре и гиппокампе. Также социальное поражение значительно понижает синтез белка CAMKIV, CREB и BDNF в гиппокампе, но остаются в норме в префронтальной коре и миндалине. Большое депрессивное поведение животного соответствовало меньшему количеству GLO-1, Mn SOD и Cu/Zn SOD, ответственных за подавление окислительного стресса. Была проведена корреляция между тревожностью и параметрами окислительного стресса, где зависимость была прямой. Так же было замечено ухудшение долговременной памяти в связи с поражением нейронов АФК. Уменьшается обучаемость [14].

В исследовании Lehmann M. L. et al (2011) подходят к тому, что комбинируют такие параметры как социальное поражение и обогащённая среда. Обогащённая среда гасила стресс от социального поражения и повышала устойчивость к нему, и была повышена экспрессия иммуноокрашивания FosB/ $\Delta$ FosB в областях головного мозга, связанных с эмоциональной регуляцией и выработкой вознаграждения. Но у мышей содержащихся в условиях стандартных и «обеднённых» сред (подстил из древесной стружки менялся не раз в 7 дней, как в стандартной, а раз в 21 день, чтобы избежать сенсорных стимуляций) дезадаптивное поведение увеличивалось и уменьшалось иммуноокрашивание переднем мозге. Нейронная активность в префронтальной коре мозга является необходимой для устойчивости к стрессу, поэтому дополнительно проводили повреждения в префронтальной коре мозга и выявили, что дискретные поражения инфраламбической (но не предлимбической или поясной коры) отменяли поведенческую устойчивость к стрессу обеспечиваемой ОС [15].

К ОС попытались подойти, изучив влияние всех факторов отдельно: стресса, беговой активности, социального взаимодействия, сложности окружающей среды. Исследовались самцы CD1. Было показано что разные факторы вместе влияют на целую картину обогащённой среды, тогда как

отдельные улучшают лишь части общей картины. Таким образом, было выявлено, что конкретно социальная среда стимулирует увеличение только нейробластов, экспрессирующих NeuroD, то есть имеет ограниченную пронейрогенную активность [4].

Наличие колеса в клетке (беговая активность), а конкретно прерывистый произвольный бег по сравнению с непрерывным произвольным бегом увеличивает все четыре стадии нейрогенеза (пролиферация, дифференцировка, интеграция и миграция) [4, 5], однако это краткосрочный эффект, пик его приходится на 3-10 день и возвращается в норму через 32 дня. После четырёх недель бега неожиданно уменьшалось общее количество клеток, экспрессирующих c-fos (маркер нейрональной активности), в зубчатой извилине гиппокампа. Возможно, это уменьшение явилось побочным продуктом увеличенной пролиферации транзит-амплифицирующих предшественников и нейробластов, временно задерживая выработку зрелых нейронов. Сложность окружающей среды никак не влияет на четыре стадии нейрогенеза [4, 16], однако было замечено, что сложность окружающей среды увеличивает экспрессию c-fos в 2–3 раза. Повышенная регуляция c-fos экспрессии было обнаружена как на внутренней, так и на внешней части гранулярного клеточного слоя гиппокампа. В дополнение к этому сложность ОС сильно снижала концентрацию кортикостерона в плазме крови. Также было высказано, что присутствие хронически увеличенного кортикостерона в плазме крови вряд ли опосредует долговременное анксиогенное воздействие на нейрогенез в гиппокампе [4].

Физическая тренировка самок мышей с помощью бегового колеса значительно увеличивает уровень окситоцина в мозге и в сыворотке крови, что способствует проявлению эмпатии, снижает уровень тревожности [6].

В исследовании Lin E. J. D. et al. (2011) сравнивалось состояние тревоги у самцов и самок мышей после 4 недельного содержания в условиях ОС. Они пришли к выводу, что ОС снижает беспокойство у самцов и повышает у самок линии C57BL/6J. У самцов снижалось количество мРНК

глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, тогда как у самок оно не менялось, однако у самок уменьшалось количество мРНК минералглюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе. Так же авторы ставят под вопрос большинство позитивных эффектов от ОС. ОС может оказывать ингибирующее действие на локомоцию как самцов так и самок, и возможно это связано с привыканием к ОС. Авторы приводят различные доводы к тому, что тревожность самок может быть связана с различным временем содержания в ОС, разным количеством особей в ОС и разным возрастом животных [3].

При социальной изоляции у самок мышей снижается тревожность и увеличивается двигательная активность, ухудшается контекстуальная память и способность к обучению. Отсутствие гнездового материала повышает тревожность и негативно сказывается на обучаемости и памяти [9].

## **Глава 2. Влияние эстрального цикла**

Влияние эстрального цикла на поведение самок мышей очевидно, но существует мало исследований, которые бы учитывали его влияние на тестовые задачи. У самок мышей постоянно меняются уровни прогестерона и эстрогена в различных фазах цикла, при беременности и лактации. Из-за этого логичнее предположить, что самцы мышей более стабильны в плане мужских гормонов – тестостерона, но в этом кроется ошибка. Социальные факторы могут изменять уровни тестостерона [1], так же было доказано что тестостерон проявляет антидепрессантные свойства у обоих полов, тестостерон увеличивает частоту случаев борьбы между мышами [17]. Уровень тестостерона может изменяться в 10 раз, это больше чем колебания эстрогена и прогестерона во время эстрального цикла. Так же у самок мышей в пределах одной клетки циклы могут синхронизироваться [1]

Влияние эстрального цикла вызывает научный интерес и привлекает все больше внимания ученых [18]

## **Материалы и методы**

### **1. Объект исследования**

Контрольная группа (контроль, стандартные условия содержания) – мыши самки линии C57BL/6 (n=6), в возрасте 3-6 месяцев, содержащиеся в стандартной клетке (SEALSAFE IVC, 369 x 156 x 132 мм, S=435 см<sup>2</sup>) без дополнительных неодушевленных и социальных стимулов со средним пространством на одну мышь 72,5 см<sup>2</sup>. Количество особей в клетке = 6 шт.

Экспериментальная группа (условия содержания - ОС) - мыши самки линии C57BL/6 (n=11), возраст 6-9 месяцев, рассажённые предварительно в возрасте в 3-4 месяцев и содержащиеся в большой клетке (SEALSAFE IVC, 425 x 266 x 185 мм, S=800 см<sup>2</sup>) с дополнительными стимулами: неодушевленные - прозрачная пластмассовая труба, дом (9x9x6 см), гамак для крыс, который был перевернут и служил в качестве дома (Savic Sputnik XL, 14,5 x 13 x 9,5 см), беговое колесо (Ferplast L28, 20,5x24x13x25 см); социальные – количество животных в одной клетке = 11 Среднее пространство на одну мышь 72,72 см<sup>2</sup>.

Животных содержали в клетках со свободным доступом к еде и воде при постоянной температуре 21±1°C и световом цикле дня и ночи 12/12ч.

Исследования проводились в соответствии с принципами гуманности, которые были изложены в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей.

### **2. Оборудование**

Оборудование для поведенческого тестирования мышей: приподнятый крестообразный лабиринт, тёмно-светлая камера, открытое поле, трёхкамерный социальный тест, подвешивание за хвост, пяти-попыточный социальный тест. Микроскоп Levenhuk Rainbow 2L для микрокопирования мазков и определения эстрального цикла, стекла предметные и покровные,

пластмассовая пипетка на 1 мл. Аналитические весы. Хирургические ножницы, скальпели, катетер-бабочка, скотч, бумага, канцелярские ножницы, салфетки, спирт.

### **3. Реактивы**

Спирт (70%), раствор NaCl 3%, антикоагулянт (ЭДТА), раствор параформальдегида 4%, метиленовый синий, хлоргидрат 150мг/мл, натрий фосфатный буфер – PBS.

### **4. Поведенческие тесты**

#### **4.1 Тест «открытое поле»**

Тест позволяет оценить тревожность, исследовательскую активность, социальное предпочтение. Представляет собой круглую арену серого цвета (63х63х32 см<sup>2</sup>) разделённую на три кольцевые зоны: центральную, среднюю, внешнюю.

Первая стадия теста оценивает тревожность и исследовательскую активность, по мере того как животное знакомится с тестом [19].

Вторая – оценка интереса и распознавания нового неодушевленного предмета. В центре поля – неодушевленный объект – новый объект [20].

В третьей стадии в центре поля - незнакомая самка мышь линии CD1 – стадия социализации [20].

На каждом этапе регистрируют: количество посещений зон, пройденная дистанция в зонах, время пребывания в зонах, время движения по направлению к центральной зоне; во второй и третьей стадии измеряют также время пребывания у объекта.

Продолжительность стадий 10 минут.

#### **4.2 Трёхкамерный социальный тест**



Тест представляет собой лабиринт с тремя отсеками: центральный (7,5x15x20 см) и два боковых (30x15x20 см).

Первая стадия оценивает тревожность и исследовательское поведение, пока животное знакомится с лабиринтом [20].

Во второй стадии в одну из камер (левую или правую) помещали самку мыши линии CD1 – социальный объект, позволяя оценить предпочтение исследуемых мышей к социальному объекту [20].

Во всех стадиях регистрируют: количество посещений зон, пройденная дистанция в зонах, время пребывания в зонах, время движения по направлению к объектам, время пребывания у объекта.

Продолжительность каждой стадии по 10 минут.

#### **4.3 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»**

Тест позволяет оценить степень тревожности животного при помещении его в лабиринт (30x5x15 см), который представляет собой по два открытых и два закрытых перпендикулярно расположенных рукавов и находящимся на высоте 1 метра. В ходе теста регистрируют параметры: время, посещения, дистанция; в закрытых, открытых рукавах и в центре.

Продолжительность теста 10 минут [21].

#### **4.4 Тест «чёрно-белая камера»**

Тест позволяет оценить тревожность и депрессивно-подобное поведение у мышей. Чёрно-белая камера состоит из двух отсеков (20x20x20 см) – светлого и тёмного, которые разделены перегородкой с проходом в другой отсек.

В ходе теста регистрируют параметры: время в тёмном и светлом отсеке, количество выходов из тёмного отсека и число выглядываний из тёмного отсека. Продолжительность 10 минут [22].

#### **4.5 Социальный пятипопыточный тест**

Тест позволяет оценить социальную память и способность к социальному распознаванию.

Состоит из пяти сессий, с первой по четвертую происходит подсадка исследуемых мышей к самке мыши-резидента линии CD1 (без подстила, 30 минут освоения клетки, 36,9x15,6x13,2 см). Пятая сессия – подсадка к новой самке мыши-резиденту. Регистрируют время социальных контактов – следование «голова-хвост».

Продолжительность сессии 1 минута, интервал между сессиями 3 минуты [23].

#### **4.6 Тест «подвешивание за хвост»**

Тест заключается в подвешивании мыши за хвост в метре от пола. Регистрируют: время до первого состояния неактивности, время неактивности с 2 по 6 минуту [24].

#### **5. Взятие эстральных мазков**

Взятие и анализ мазков проводилось согласно методике Cora M. C. [25]. Мышь фиксировалась, влагалище смачивали раствором NaCl 3%, после во влагалище не далее 5 мм вводилась 1 мл пластиковая пипетка, влагалище промывалось раствором NaCl 3%. Мышь помещалась обратно в клетку, мазок наносился на предметное стекло. Окраску проводили с помощью метиленового синего и микроскопировали. [18].

#### **6. Взятие образцов**

Были забраны образцы крови, спинномозговой жидкости и регионов головного мозга (гиппокампа, гипоталамуса, миндалевидного тела) после введения анестезии (хлоргидрат 150мг/мл).

Фиксирование головного мозга было произведено с предварительным введением анестезии животному (0,2 мл хлоргидрата с концентрацией 150мг/мл), промыванием кровеносной системы физиологическим раствором PBS и с последующим введением в кровеносную систему свежеприготовленного 4%-ого раствора параформальдегида. Мозг извлекали и помещали в 4%-ый раствор параформальдегида. Через 24 часа образцы помещали в 20%-й раствор сахарозы для хранения.

## **7. Статистический анализ**

Обработка полученных результатов проводилась с помощью статистической программы GraphPad Prism 8, методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применялся критерий Манна-Уитни. Различия принимали значимыми при  $p \leq 0,05$ . Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – ошибка среднего,  $p$  – уровень значимости.

## Результаты

### 1. Поведенческое тестирование

#### 1.1 Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

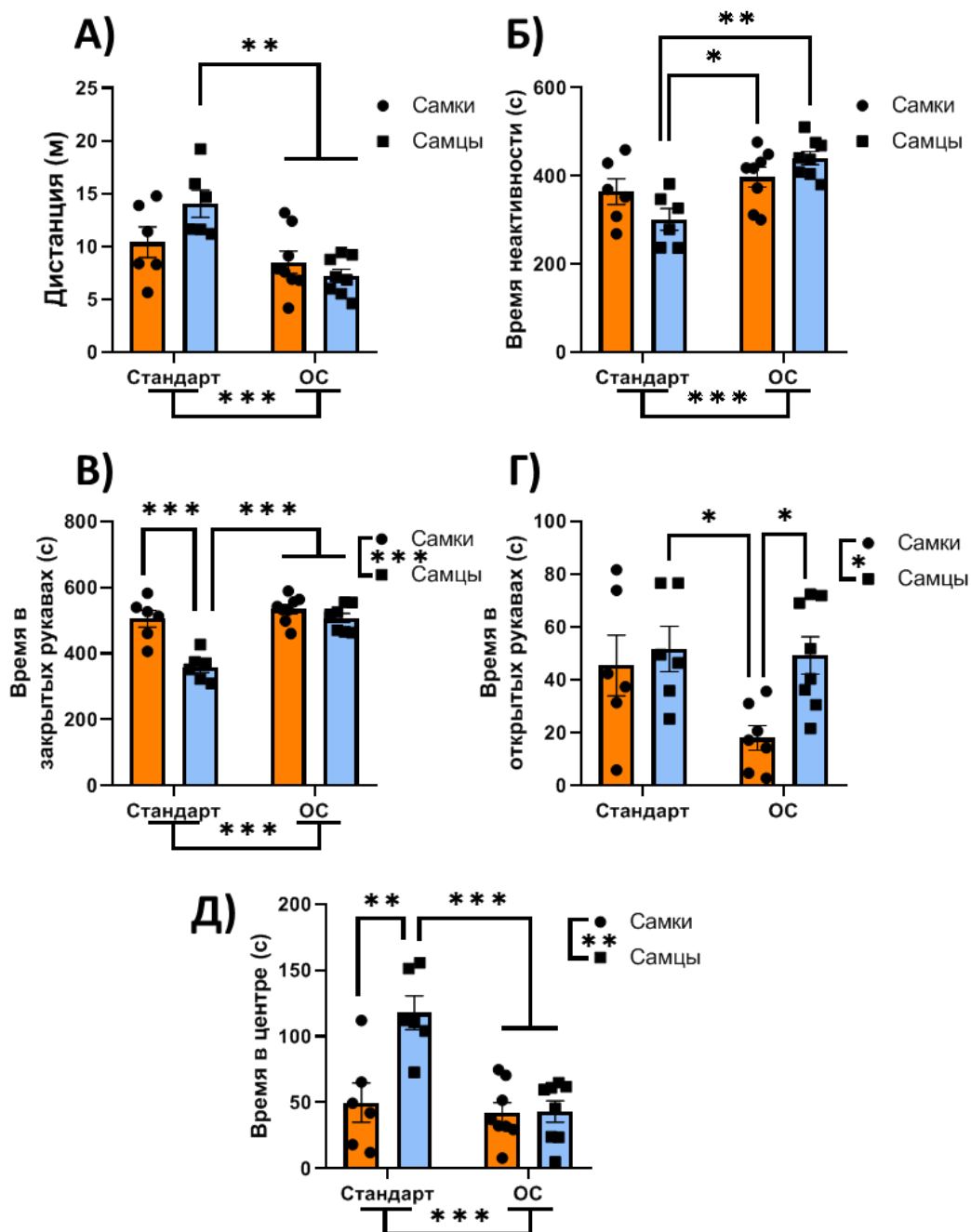


Рисунок 1. Оценка тревожно-депрессивного поведения в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». А) дистанция пройденного пути; Б) время неактивности в тесте; В) время пребывания в закрытых рукавах; Г) время пребывания в открытых рукавах; Д) время пребывания в центре. Данные проставлены как среднее значение ±

стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» фактор среды статистически значимо ( $p < 0,001$ ) влияет на такие параметры как: дистанция пройденного пути; время неактивности в тесте; время пребывания в закрытых рукавах; время пребывания в центре. Гендерный признак статистически значимо ( $p < 0,05$ ) влияет на время пребывания в открытых рукавах, статистически значимо ( $p < 0,01$ ) на время пребывания в центре и статистически значимо ( $p < 0,001$ ) на время пребывания в закрытых рукавах. Самцы мышей из стандартной клетки демонстрируют значительно сниженную тревожность, в то время как другие группы не демонстрируют подобного поведения.

## 1.2 Тест «чёрно-белая камера»

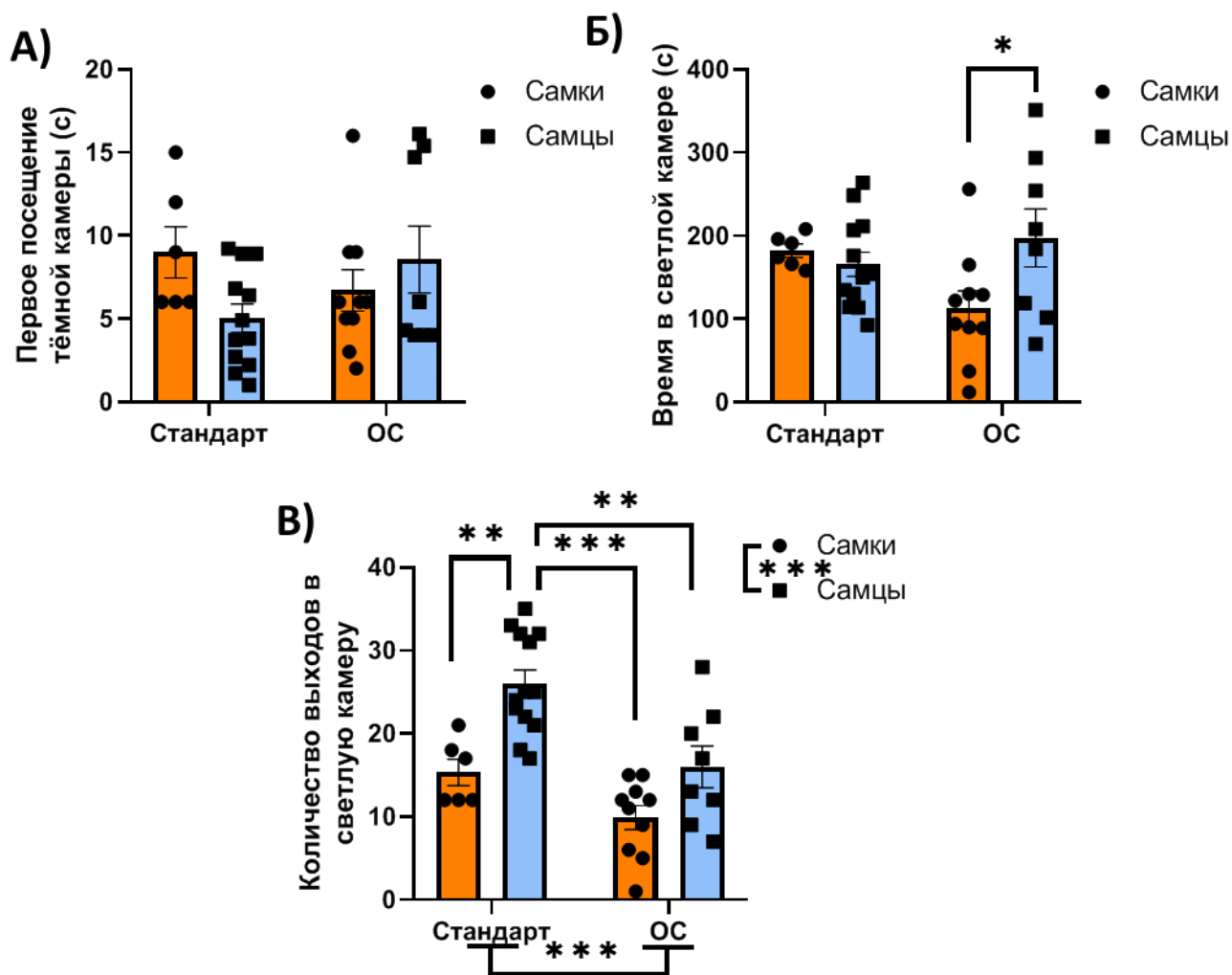


Рисунок 2. Оценка тревожно-депрессивного поведения в тесте «чёрно-белая камера». А) первое посещение темной камеры; Б) время пребывания в светлой камере; В) количество выходов в светлую камеру. Данные проставлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

В тесте «чёрно-белая камера» статистически значительно сильно ( $p < 0,001$ ) влияют факторы среды и пола на количество выходов в светлую камеру. Самцы мышей из стандартной клетки статистически значимо чаще выходили в светлую камеру по сравнению с остальными группами. Самки мышей из ОС пребывали в светлой камере статистически меньше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с самцами мышей из ОС.

### 1.3 Тест «открытое поле»

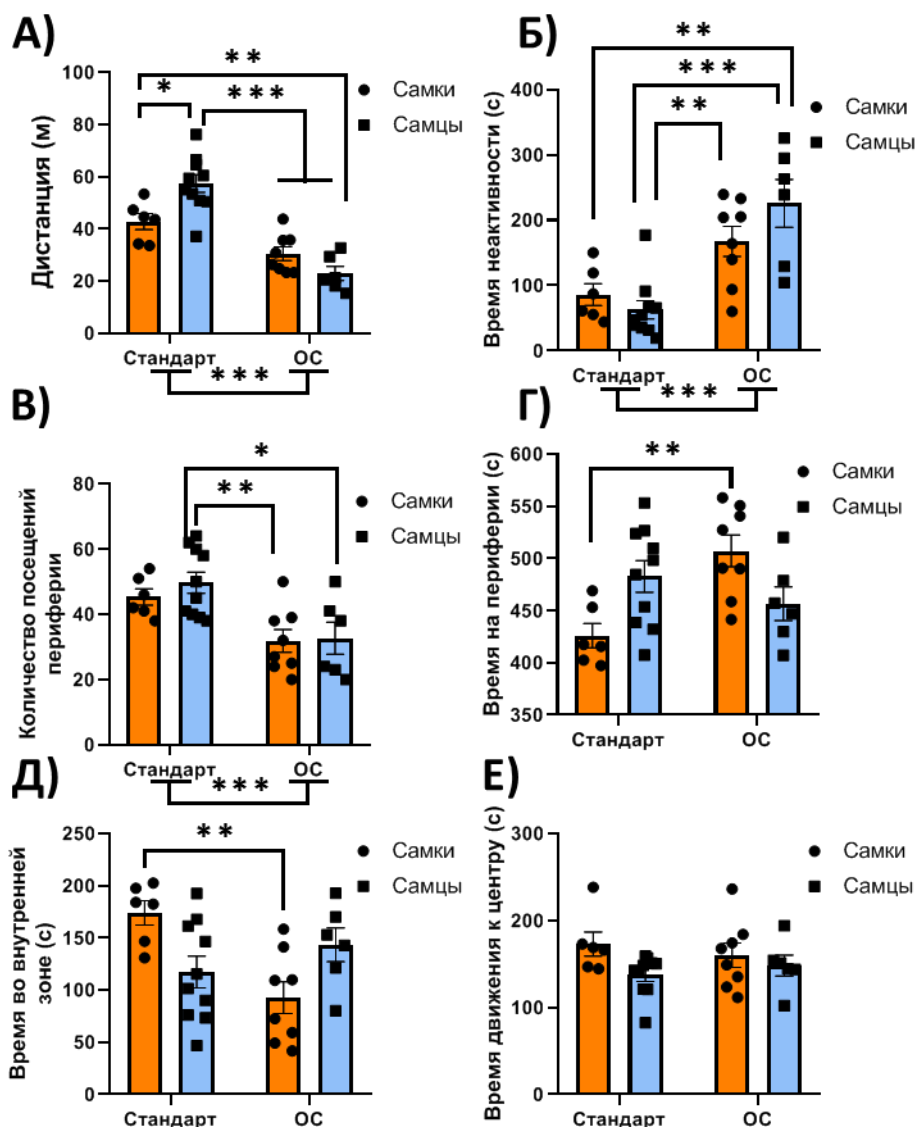


Рисунок 3. Оценка депрессивно-подобного поведения в тесте «открытое поле» (исследовательская активность). А) дистанция пройденного пути; Б) время неактивности в тесте; В) количество посещений периферии; Г) время пребывания на периферии; Д) время пребывания во внутренней зоне; Е) время движения по направлению к центру. Данные проставлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

При оценке депрессивно-подобного поведения в тесте «открытое поле» (исследовательская активность) выявлено, что фактор среды статистически значимо ( $p < 0,001$ ) влияет на такие параметры как: дистанция пройденного пути, время неактивности в тесте и количество посещений периферии.

Самцы мышей из стандартной клетки демонстрируют повышенную исследовательскую активность. Мыши из ОС чаще пребывают в неактивности ( $p < 0,001$ ), так же самки мышей из ОС больше пребывают на периферии и меньше во внутренней зоне по сравнению с самками из стандартной среды.

Это свидетельствует о сниженной исследовательской активности мышей из ОС.

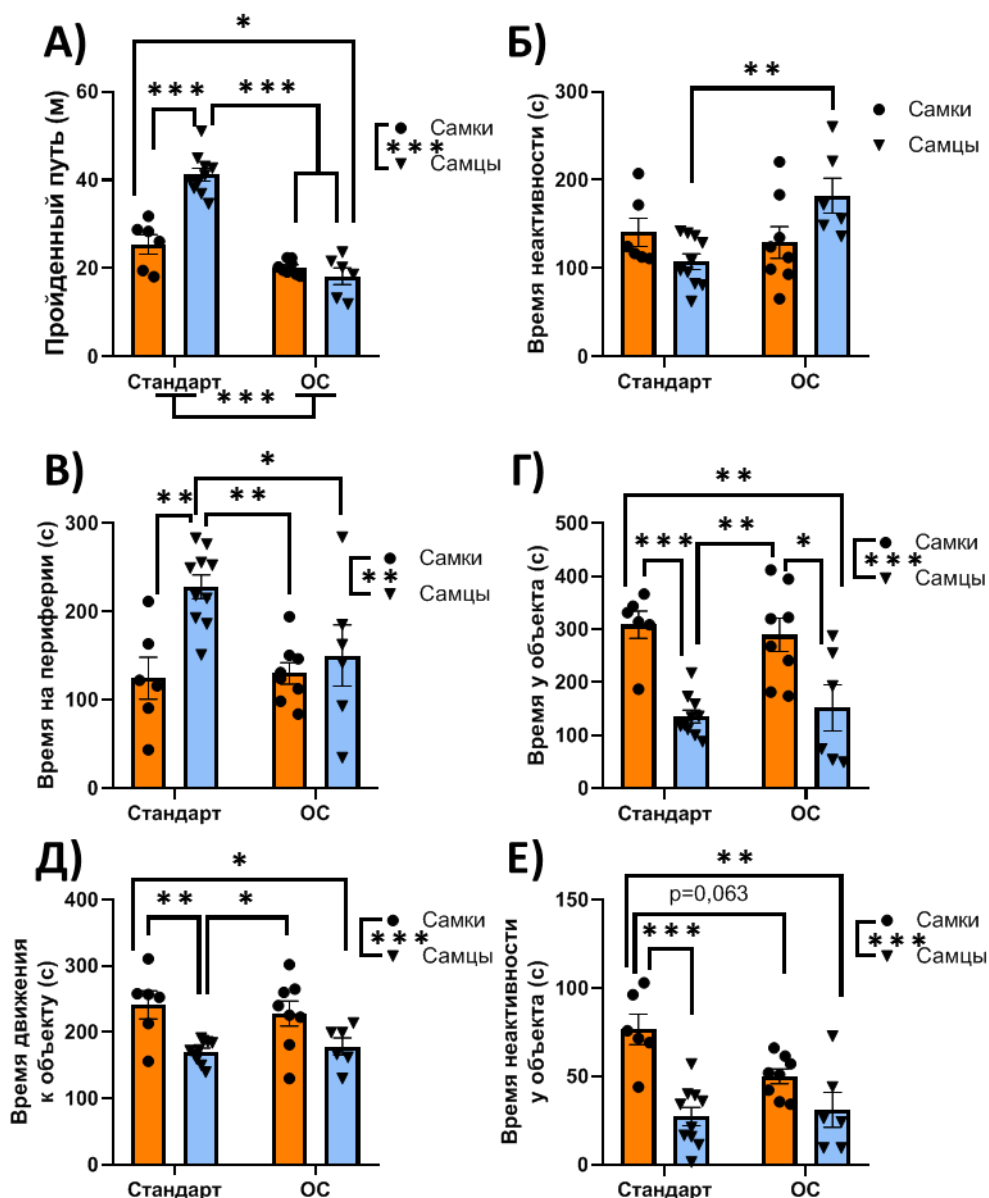


Рисунок 4. Оценка тревожного состояния в тесте «открытое поле» (интерес к неодушевленному предмету). А) дистанция пройденного пути; Б) время неактивности в



тесте; В) время пребывания на периферии; Г) время пребывания у объекта; Д) время движения по направлению к объекту; Е) время неактивности у объекта. Данные проставлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

При оценке тревожного состояния в тесте «открытое поле» (интерес к неодушевленному предмету) было выявлено, что фактор пола статистически значимо ( $p < 0,001$ ) влияет на такие параметры как: пройденный путь, время пребывания у объекта, время движения по направлению к объекту и время неактивности у объекта; статистически значимо ( $p < 0,01$ ) влияет на время пребывания на периферии. Самцы мышей из стандартной клетки активно исследуют пространство и периферию. Самцы мышей меньше интересуются новым объектом по сравнению с самками мышей.

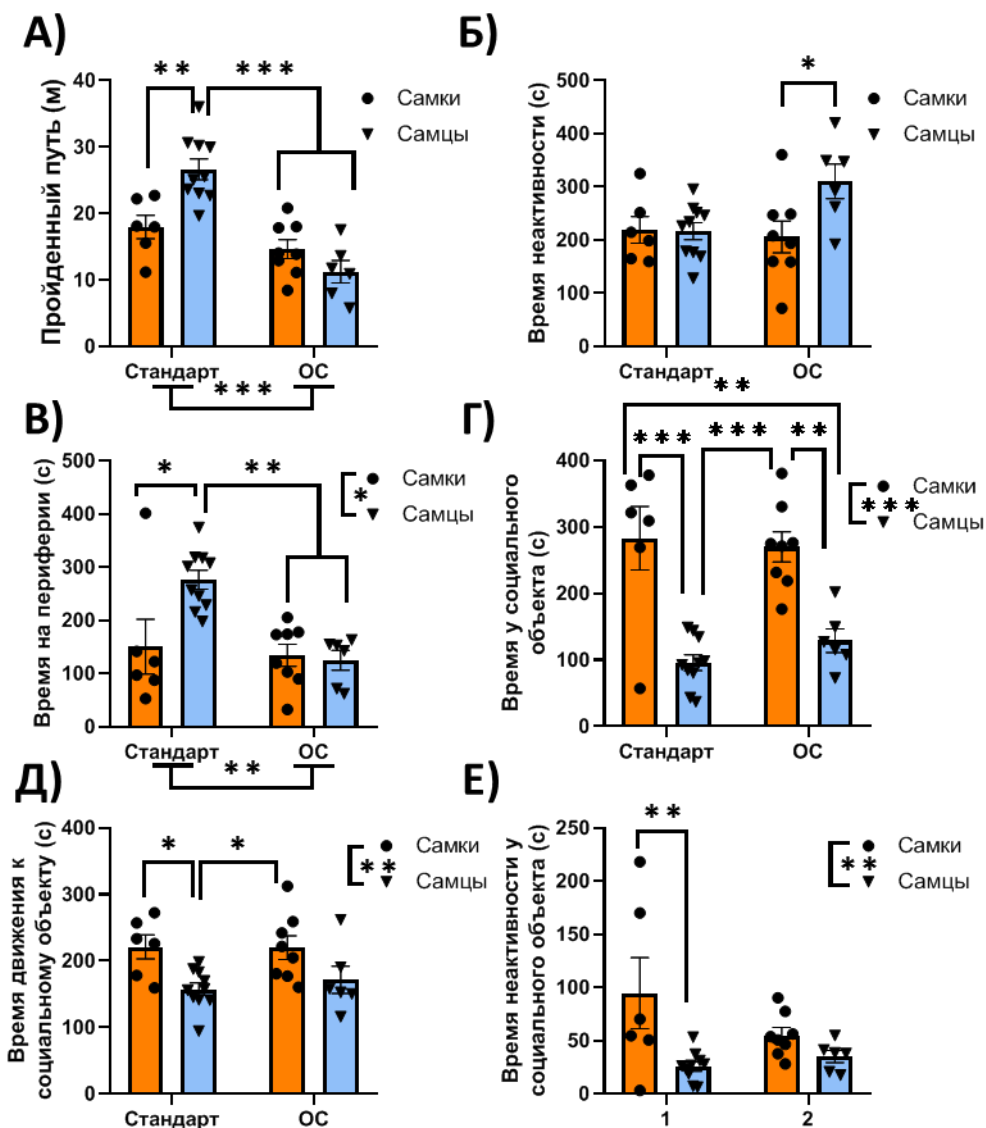


Рисунок 5. Оценка уровня социализации в тесте «открытое поле» (социализация) А) дистанция пройденного пути; Б) время неактивности в тесте; В) время пребывания на периферии; Г) время пребывания у социального объекта; Д) время движения по направлению к социальному объекту; Е) время неактивности у социального объекта. Данные проставлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

При оценке уровня социализации в тесте «открытое поле» (социализация) было выявлено, что фактор пола статистически значимо ( $p < 0,001$ ) влияет на время у социального объекта; статистически значимо ( $p < 0,01$ ) влияет на время неактивности у социального объекта и на время движения по направлению к социальному объекту; статистически значимо

( $p < 0,05$ ) влияет на время на периферии. Самцы мышей из стандартной клетки продолжают исследовать периферию и тест. Самцы мышей демонстрируют сниженный интерес к новому социальному объекту по сравнению с самками мышей.

#### 1.4 Тест «подвешивание за хвост»

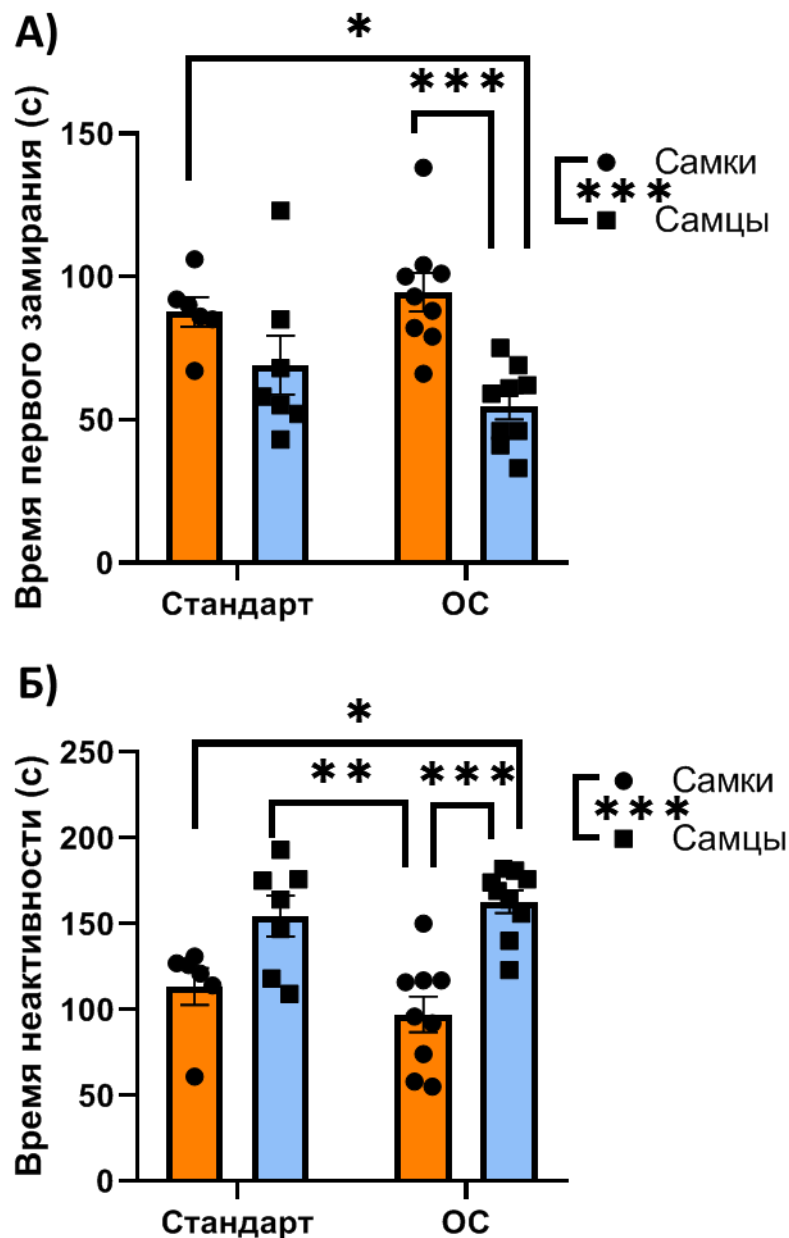


Рисунок 6. Оценка эмоционального статуса, депрессивно-подобного и мотивационного поведения в тесте «подвешивание за хвост». А) время первого замирания; Б) время бездействия с 2 по 6 минуту. Данные проставлены как среднее

значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

При оценке эмоционального статуса, депрессивно-подобного и мотивационного поведения в тесте «подвешивание за хвост» было выявлено, что фактор пола статистически значимо ( $p < 0,001$ ) влияет на время первого замирания и на время неактивности с 2 по 6 минуту. Самцы мышей демонстрируют сниженное мотивационное поведение по сравнению с самками мышей.

### 1.5 Социальный пятипопыточный тест

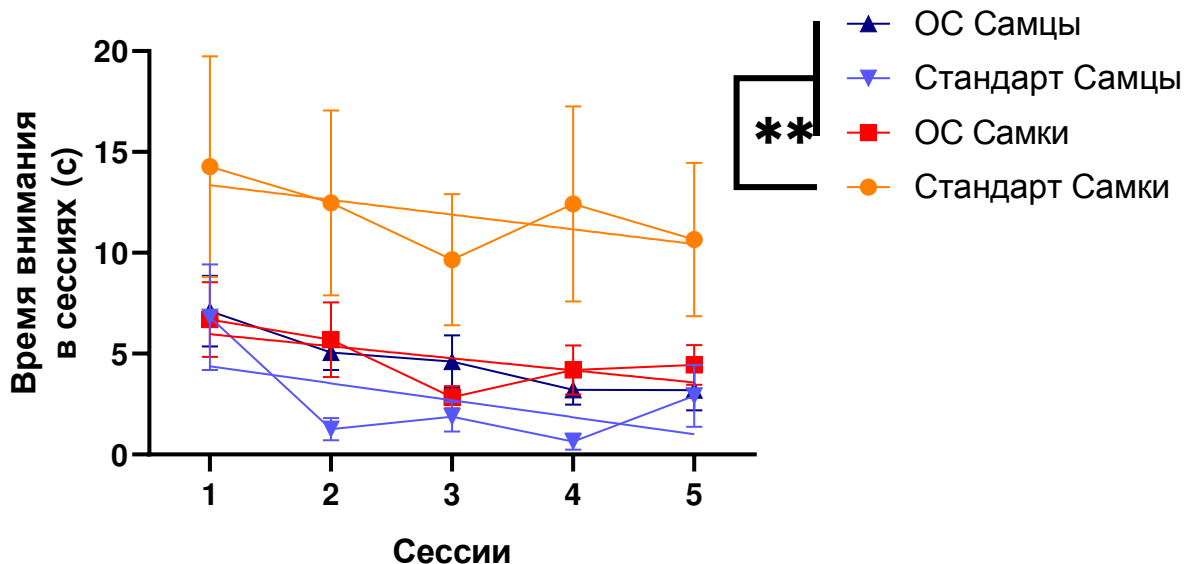


Рисунок 7. Оценка социальной памяти в «пятипопыточном социальном тесте». Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*\* $p < 0,01$ .

При оценке социальной памяти в «пятипопыточном тесте» было выявлено, что самки мышей из стандартной среды социально активнее остальных групп ( $p \leq 0,01$ ).

Это свидетельствует о их повышенном интересе к социальным объектам.

## 1.6 Трёхкамерный социальный тест

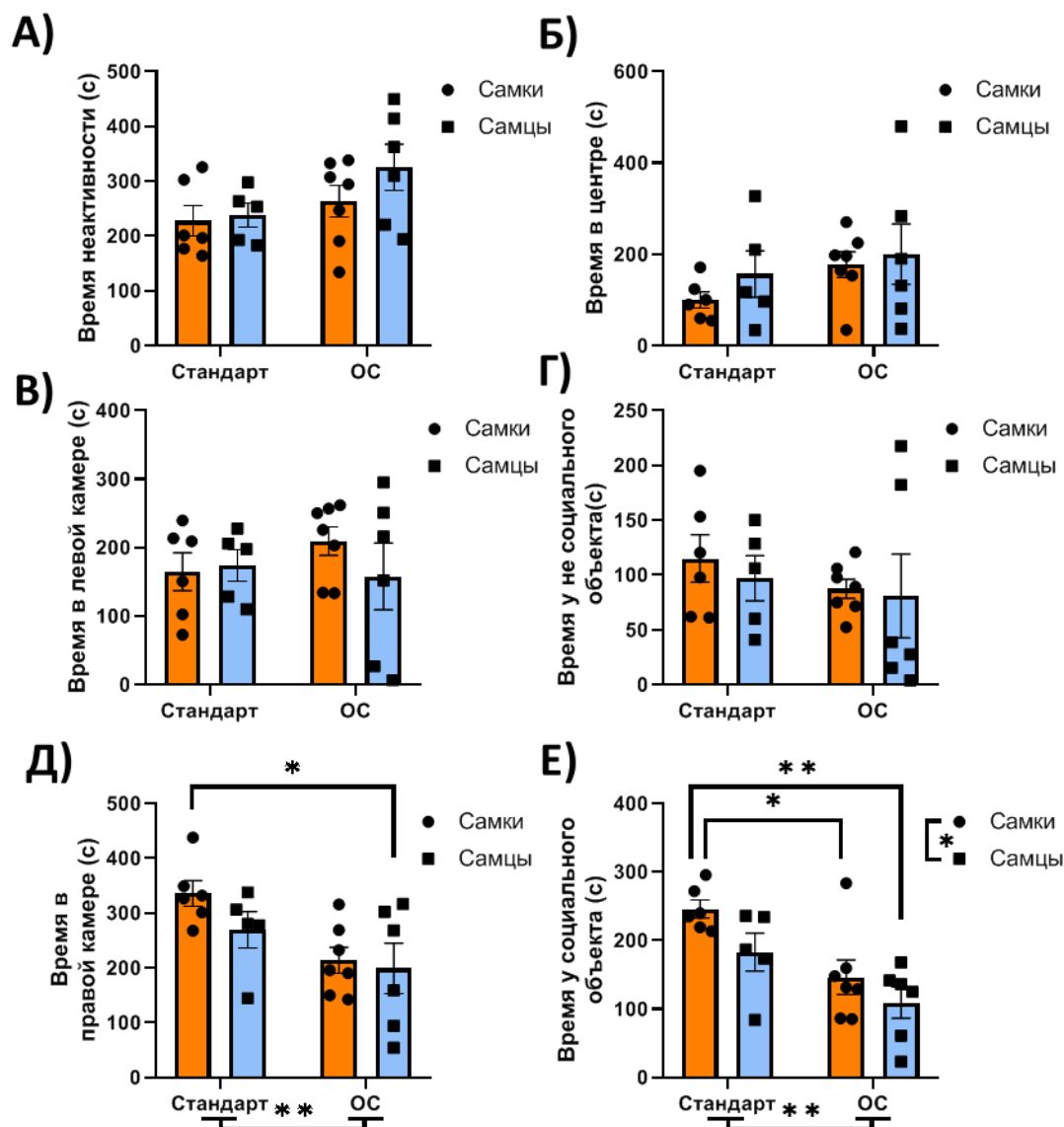


Рисунок 8. Оценка уровня социализации в «трехкамерном социальном тесте» (социализация). А) время неактивности в тесте; Б) время в центральной камере; В) время пребывания в левой камере; Г) время у не социального объекта; Д) время пребывания в правой камере; Е) время у социального объекта. Данные проставлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего  $M \pm SE$ . U-критерий Манна-Уитни. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

При оценке уровня социализации в «трехкамерном социальном тесте» (социализация) было выявлено, что фактор среды статистически значимо ( $p < 0,01$ ) влияет на время нахождения в правой камере и на время у

социального объекта. У мышей из ОС снижен интерес к социальному объекту по сравнению с мышами из стандартной среды.

## 2. Эстральный цикл

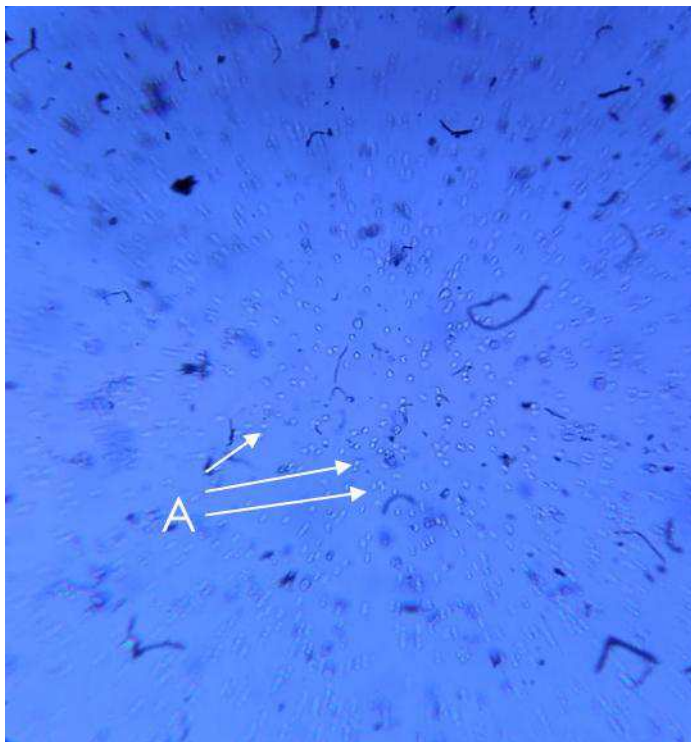


Рисунок 11. Эстральный цикл - диэструс. А) нейтрофилы

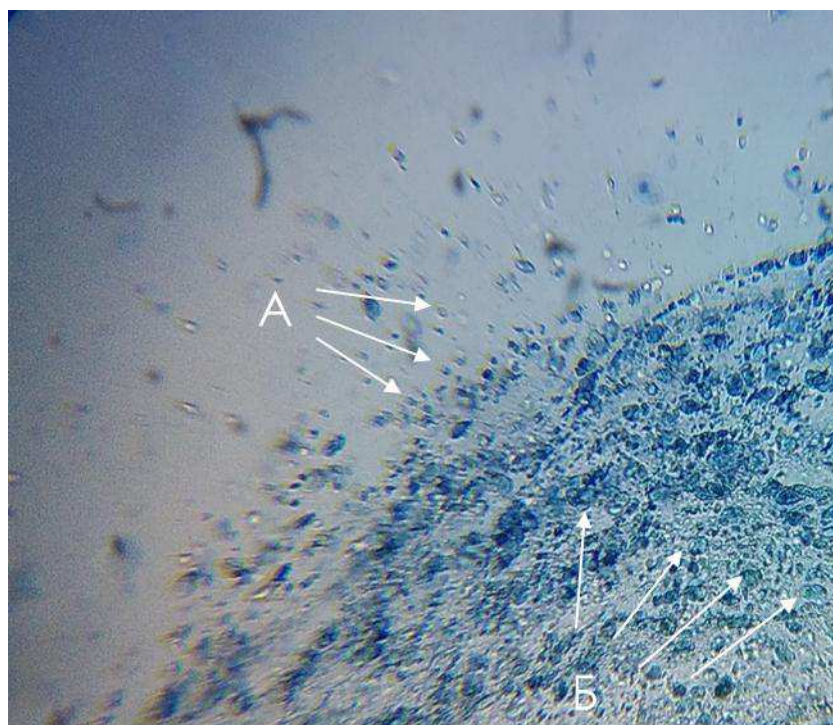


Рисунок 12. Эстральный цикл - проэструс. А) нейтрофилы; Б) малые ядерные клетки

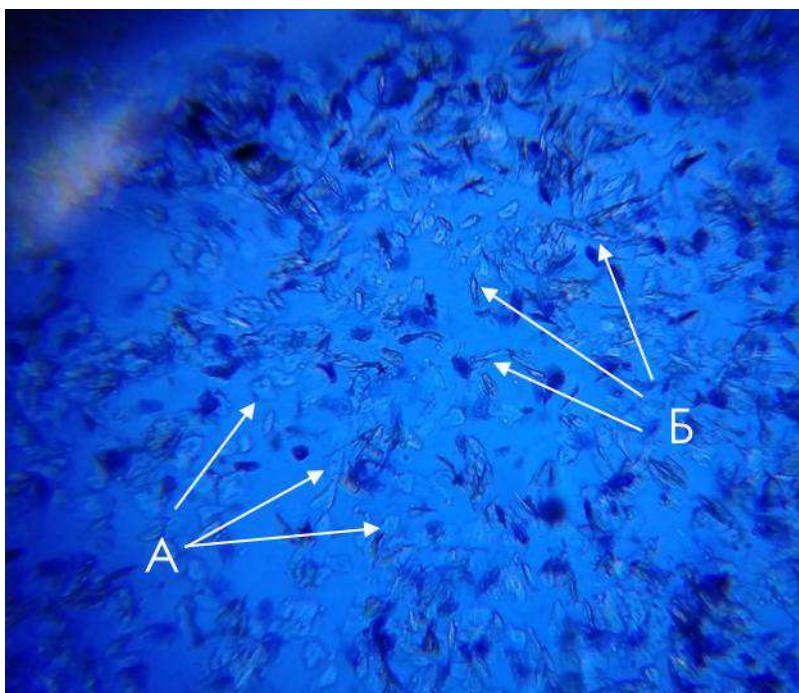


Рисунок 13. Эстральный цикл – диэструс. А) большие ядерные клетки; Б) кератинизированные клетки.

После каждого теста у мышей были взяты мазки и установлены эстральные циклы для дальнейшего анализа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведённых поведенческих тестов выявлены особенности поведения у самок и самцов мышей, содержащихся в условиях ОС и стандартных условиях (таблица 1).

Таблица 1. Особенности поведенческих реакций у мышей в зависимости от гендерного признака и условий содержания.

Тип поведения	Факторы оценки	Стандарт Самки	ОС Самки	Стандарт Самцы	ОС Самцы
Исследовательская активность	Двигательная активность	++	+	+++	+
	Интерес к неодушевлённому объекту	++	++	+	+
Тревожность и беспокойство	Предпочтение периферии и закрытых пространств в лабиринтах	++	+++	+	++
Социализация	Интерес к социальному объекту	+++	++	+	+
Мотивационное поведение	Инстинкт самосохранения	++	++	+	+

Данные результаты противоречат тому, что физическая активность и ОС уменьшает тревожность и повышает социализацию [4, 6, 8], но подтверждает повышенную тревожность у самок в ОС [3]. Возможно, эта гендерная особенность характерна для мышей данного вида. Обычно используется не столь долгое содержание мышей в ОС, а от 24 часов до 5 недель [7, 12] В данном случае длительность ОС была больше 5 недель. Возможно, у экспериментальной группы произошло «насыщение» обогащённой средой.

Сниженная двигательная активность у экспериментальной группы, может быть вызвана свободным доступом к беговому колесу в домашней клетке и они не рассматривают пространство в тесте как потенциал для проявления своей двигательной активности, нежели контрольная группа.



Повышенное предпочтение периферии и закрытых пространств, возможно, вызвано тем, что в домашней клетке с ОС предоставлено много закрытых пространств: туннель, два домика – и мало открытого пространства, по сравнению с другими исследованиями [2, 4, 8, 11, 13], и в таком случае для них это является нормой, а не склонностью к повышенной тревожности и беспокойству. Снижение социализации у самок мышей возможно вызвано тем, что мышей в экспериментальной группе в одной клетке содержалось в два раза больше, чем в контрольной, отчего у них лучше развилась память на социальные контакты, ранее отмечалось что увеличивается обучаемость и память [2, 8, 12]. «Насыщение» социальными контактами в условиях ОС, возможно, приводит к потере интереса к новым социальным объектам.

Дальнейший анализ эстральных циклов и анализ взятых образцов поможет уточнить полученные результаты в поведенческих тестах.

## **Выводы**

1. Самки мышей линии C57BL/6 содержащиеся в обогащённой среде демонстрируют сниженную исследовательскую активность; у самцов мышей содержащихся в обогащённой среде выявлен менее выраженный интерес к открытым пространствам и предпочтение закрытых;

2. Самки и самцы мышей линии C57BL/6 содержащиеся в обогащённой среде демонстрируют повышение уровня тревожности;

3. У самок мышей линии C57BL/6 содержащихся в обогащённой среде выявлено снижение уровня социального распознавания и запоминания; самцы мышей линии C57BL/6 сохранили своё поведение, социальное поведение не отличается от контроля.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

---

- 1) Joel D., Yankelevitch-Yahav R. Reconceptualizing sex, brain and psychopathology: interaction, interaction, interaction // *British journal of pharmacology*. – 2014. – Т. 171. – №. 20. – С. 4620-4635.
- 2) Gelfo F. Does experience enhance cognitive flexibility? An overview of the evidence provided by the environmental enrichment studies // *Frontiers in behavioral neuroscience*. – 2019. – Т. 13. – С. 150.
- 3) Lin E. J. D. et al. Environmental enrichment exerts sex-specific effects on emotionality in C57BL/6J mice // *Behavioural brain research*. – 2011. – Т. 216. – №. 1. – С. 349-357.
- 4) Grégoire C. A. et al. Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis // *PloS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 1.
- 5) Kobil T. et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment // *Learning & memory*. – 2011. – Т. 18. – №. 9. – С. 605-609.
- 6) Yüksel O. et al. Regular aerobic voluntary exercise increased oxytocin in female mice: the cause of decreased anxiety and increased empathy-like behaviors // *Balkan medical journal*. – 2019. – Т. 36. – №. 5. – С. 257.
- 7) Leger M. et al. Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice // *Cerebral cortex*. – 2015. – Т. 25. – №. 11. – С. 4048-4061.
- 8) Singhal G. et al. Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2014. – Т. 8. – С. 97.
- 9) Kuleshkaya N., Rauvala H., Voikar V. Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice // *PloS one*. – 2011. – Т. 6. – №. 9.

- 
- 10) Urakawa S. et al. Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats // *BMC neuroscience*. – 2013. – T. 14. – №. 1. – C. 13.
  - 11) Llorens-Martín M., Tejeda G. S., Trejo J. L. Antidepressant and proneurogenic influence of environmental enrichment in mice: protective effects vs recovery // *Neuropsychopharmacology*. – 2011. – T. 36. – №. 12. – C. 2460-2468.
  - 12) Singhal G. et al. Duration of Environmental Enrichment Determines Astrocyte Number and Cervical Lymph Node T Lymphocyte Proportions but Not the Microglial Number in Middle-Aged C57BL/6 Mice // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2020. – T. 14. – C. 57.
  - 13) De Sousa A. A. et al. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice // *PloS one*. – 2011. – T. 6. – №. 1.
  - 14) Patki G. et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress // *Brain research*. – 2013. – T. 1539. – C. 73-86.
  - 15) Lehmann M. L., Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway // *Journal of Neuroscience*. – 2011. – T. 31. – №. 16. – C. 6159-6173.
  - 16) Mustroph M. L. et al. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice // *Neuroscience*. – 2012. – T. 219. – C. 62-71.
  - 17) Frye C. A., Walf A. A. Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites // *Physiology & behavior*. – 2009. – T. 97. – №. 2. – C. 266-269.
  - 18) Cora M. C., Kooistra L., Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears // *Toxicologic pathology*. – 2015. – T. 43. – №. 6. – C. 776-793.

- 
- 19) Sestakova N. et al. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide // *Interdisciplinary toxicology*. – 2013. – T. 6. – №. 3. – C. 126-135.
- 20) Yang M., Silverman J. L., Crawley J. N. Automated three-chambered social approach task for mice // *Current protocols in neuroscience*. – 2011. – T. 56. – №. 1. – C. 8.26. 1-8.26. 16.
- 21) Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents // *Nature protocols*. – 2007. – T. 2. – №. 2. – C. 322-328.
- 22) Bourin M., Hascoët M. The mouse light/dark box test // *European journal of pharmacology*. – 2003. – T. 463. – №. 1-3. – C. 55-65.
- 23) Jin D. et al. CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion // *Nature*. – 2007. – T. 446. – №. 7131. – C. 41-45.
- 24) Can A. et al. The tail suspension test // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2012. – №. 59. – C. e3769.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк В.А. Кратасюк

« 17 » июня 2021 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

**06.03.01 – Биология**

Обогащенная среда как модулятор поведенческих реакций  
у мышей самок и самцов линии C57BL/6

Руководитель

Лопатина 17.06.2021  
подпись, дата

проф., д.б.н. О.Л. Лопатина

Выпускник

Безручко 17.06.2021  
подпись, дата

М. В. Безручко

Красноярск 2021