

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ, ДВИГАТЕЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 575.167+612.8.04

**ВЛИЯНИЕ С1473G ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНЕ
ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ 2 И ДЛИНЫ СВЕТООВОГО ДНЯ
НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ**

© 2019 г. Н. В. Хоцкин^{1,*}, Е. Ю. Баженова¹, Е. А. Куликова¹, И. Е. Сорокин¹, А. В. Куликов¹

¹ Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия

* e-mail: Shverter@mail.ru

Поступила в редакцию 08.09.2017 г.

После доработки 29.03.2018 г.

Принята к публикации 14.05.2018 г.

Сезонные депрессивные расстройства возникают при сезонном сокращении продолжительности дня и представляют значительную медицинскую, социальную и экономическую проблему. Риск сезонных депрессивных расстройств связывают с нарушениями серотониновой системы мозга. Триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) является ключевым ферментом синтеза серотонина в головном мозге. Полиморфизм С1473G в гене, кодирующем ТПГ2 мыши, приводит к двукратному снижению активности фермента в мозге мышей. Целью работы было изучение влияния длины светового дня на поведение половозрелых самцов конгенных линий В6-1473С и В6-1473G с высокой и низкой активностью ТПГ2. Половозрелых самцов этих линий содержали в течение месяца при длинной (14 ч) и короткой (4 ч) продолжительности дня. У мышей обоих генотипов содержание при коротком световом дне не влияло на среднесуточную двигательную активность, потребление пищи и воды, тревожность в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт”, но снижало среднюю продолжительность сна ($p < 0.002$) и активное сопротивление в тесте “принудительное плавание” ($p < 0.01$) сходным образом у обеих линий. Таким образом, полиморфизм С1473G не влиял на вызванные коротким световым днем изменения в поведении мышей.

Ключевые слова: мыши, поведение, триптофангидроксилаза 2, длина светового дня, принудительное плавание, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт

DOI: 10.1134/S0044467719010040

Сезонные депрессивные расстройства – это комплекс депрессивно-подобных нарушений настроения, которые предсказуемо наблюдаются у ряда пациентов осенью и зимой. Они характеризуются тягой к сладкому, гиперфагией и, как следствие, увеличением веса, сниженным либидо, увеличенными сонливостью и утомляемостью. В менее выраженной форме так называемые субсиндромальные сезонные депрессивные расстройства наблюдаются у многих здоровых индивидуумов осенью и зимой [Levitan, 2007]. Клиническая и субсиндромальная формы сезонных депрессивных расстройств встречаются у 11–21% жителей высоких широт [Miller, 2005] и представляют значительную социальную и экономическую проблему. Поэтому

выяснение механизмов, а также поиск молекулярных маркеров сезонных депрессивных расстройств являются ключевыми проблемами медицины, физиологии и генетики.

Имеются доказательства участия серотониновой (5-НТ) медиаторной системы головного мозга в механизме сезонных депрессивных расстройств [Kulikov, Popova, 2015]. Ключевым ферментом синтеза 5-НТ в головном мозге является триптофангидроксилаза 2 (ТПГ2) [Walther et al., 2003]. Ген, кодирующий ТПГ2, рассматривается как вероятный ген-кандидат, мутации в котором могут увеличивать риск депрессивных расстройств [Waider et al., 2011; Zhang et al., 2011; Lesch et al., 2012; Kulikov, Popova, 2015]. Удобным объектом для изучения участия ТПГ2 в механизме

сезонных депрессивных расстройств являются мыши линии C57BL/6. С одной стороны, содержание в течение месяца при коротком световом дне вызывает у молодых мышей этой линии ряд эндокринных и поведенческих изменений, напоминающих некоторые симптомы сезонных депрессивных расстройств [Otsuka et al., 2014]. С другой стороны, G аллель полиморфизма C1473G в гене, кодирующем ТПГ2, вдвое снижает активность фермента в головном мозге мышей [Zhang et al., 2004; Kulikov et al., 2005]. Этот аллель был перенесен в геном линии C57BL/6 и две конгенные линии B6-1473G и B6-1473C, гомозиготные по G или C аллелям и соответственно с низкой и высокой активностями ТПГ2 были получены [Vazovkina et al., 2015].

Целью настоящей работы было изучение влияния содержания в условиях короткого (4 ч) и длинного (14 ч) светового периода на двигательную и исследовательскую активность, тревожность и депрессивно-подобное поведение у мышей B6-1473G и B6-1473C с низкой и высокой активностями ТПГ2.

МЕТОДИКА

Исследования проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН” (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010) на половозрелых самцах мышей линий B6-1473G (GG, $n = 16$) и B6-1473C (CC, $n = 16$). Все животные были в возрасте 11 нед. и весили 26 ± 1 г. С момента отсадки от матерей мышей содержали в группах по 4 особи в индивидуально вентилируемых пластиковых клетках (Optimise) при регулируемом 14-часовом освещении, температуре 23°C и влажности 60%. Полноценный стерильный корм (Sniff) и воду они получали без ограничения. Содержание мышей и все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Директива 2010/63/EU Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г.) и одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН.

Все мыши были разделены на 4 выровненные по весу экспериментальные группы по 8 особей в каждой: B6-1473C 14 ч день, B6-1473C 4 ч день, B6-1473G 14 ч день и B6-1473G 4 ч день. В течение всего эксперимента животные каждой группы содержались при соот-

ветствующем для группы световом дне. В начале животные в течение 28 дней каждой группы содержались в клетках по 4 особи при соответствующем для группы световом дне. Это необходимо для развития изменений поведения, вызванных коротким световым периодом. Затем на 29-й день животных в течение трех дней изолировали в индивидуальные клетки (Phenomaster, TSE, Германия) для измерения суточной динамики двигательной активности, сна, потребления пищи и воды. После измерения суточной активности на 33-й день животных переносили в индивидуальные клетки Optimise для дальнейшего изучения поведения. На 34, 35 и 36-й день мышей последовательно тестировали в тестах “открытое поле” (ОП), “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) и “принудительное плавание” (ПП).

Измерение двигательной активности, длительности сна, потребления воды и корма в домашней клетке. Суточную активность и потребление пищи в домашней клетке исследовали с помощью программно-аппаратного комплекса Phenomaster (TSE Systems) согласно инструкциям от производителя. Установка состоит из 8 индивидуальных клеток с инфракрасными датчиками, фиксирующими перемещение животного. Поилка и кормушка так же подсоединены к датчикам для учета потребляемой пищи и воды. Информация с датчиков поступает на компьютер каждую минуту, где обрабатывается программным обеспечением, поставляемым фирмой-производителем. Самцов помещали по одному в клетки на 48 ч. Первые 24 ч считались адаптационными и не учитывались при последующем обсчете. Таким образом, в конечном анализе использовались только последние 24 ч для оценки базовой активности животных. Измерения пройденного пути, продолжительности сна, потребления воды и корма проводились каждую минуту и затем вычисляли суммарный пройденный путь (м), суммарную продолжительность сна (мин) за час, а также количество выпитой воды (мл) и съеденного корма (г) за сутки. Согласно инструкции от производителя, программа определяет состояние сна как отсутствие подвижности животного в течение 40 с и более. Электрофизиологические исследования выявили высокую статистическую корреляцию между временем замирания более 40 с и эпизодами сна, диагностируемыми по ЭЭГ [Pack et al., 2007; Fisher et al., 2012; Vains et al., 2017].

Для тестирования поведения в тестах ОП, ПКЛ и ПП использовали программно-аппаратный комплекс EthoStudio, разработанный в ФГБУН “Институт автоматизации и электрометрии СО РАН”. Комплекс включал в себя стенд для установки арен, освещение и цифровой 3D сенсор Kinect (Microsoft), присоединенный к компьютеру через USB-интерфейс. Этот сенсор позволяет одновременно получать обычные 2D и 3D изображения животного [Kulikov et al., 2014]. Тестирование проводили в темную фазу между 15:00 и 17:00, когда животные наиболее активны. Это время было принято в качестве стандарта для нашего SPF-вивария.

Тест “открытое поле” (ОП). Тестирование проводили на круглой арене диаметром 55 см со стенками высотой 30 см. Яркость арены была 300 лкс. Животное помещали у стенки арены и давали свободно исследовать пространство в течение 5 мин. Автоматически оценивали пройденный путь (м), время (%) нахождения животного в центральной части арены (27.5 см в диаметре) и исследованное животным пространство арены (%). Последний показатель оценивается по проценту площади арены, где появлялось животное (т.е. где были обнаружены пиксели, ассоциированные с мышью) от общей площади арены. Количество вертикальных стоек и число актов умывания оценивались визуально [Kulikov et al., 2014]. После каждого теста арену очищали влажной и сухой салфетками.

Тест “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ). Тестирование проводили в установке, состоящей из четырех пересекающихся по центру под прямым углом рукавов длиной 30 см и шириной 6 см, находящихся на высоте 60 см над уровнем пола. Одна пара рукавов имела стенки высотой 20 см (закрытые рукава, безопасные), а другая пара была без стенок (открытые рукава, потенциально опасные). Установка была тускло освещена. Животное помещали в центр мордой к одному из закрытых рукавов и автоматически фиксировали перемещение в течение 5 мин. Автоматически оценивали пройденный путь (м), время (%), проведенное в центре, в открытых и закрытых рукавах, а также процент площади открытых и закрытых рукавов, посещаемой животным. Последние показатели оценивались аналогично исследованной площади в тесте ОП. Количество “выглядываний” из закрытых рукавов и “заглядываний” вниз (под лабиринт) оценивались визу-

ально опытным экспериментатором. После каждого теста установку очищали влажной и сухой салфетками.

Тест “принудительное плавание” (ПП). Тестирование проводили в стеклянном резервуаре высотой 30 см и диаметром 15 см, наполовину заполненном водой (25°C). В воду помещали мышь и в течение 6 мин автоматически измеряли изменение контура животного, которое определяли как число ассоциированных с животным пикселей, измененных между двумя соседними кадрами. В настоящем эксперименте мы использовали в качестве основного показателя подвижность, измеренную как сумму измененных пикселей для всех кадров за последние 4 мин теста. Этот показатель негативно коррелирует с неподвижностью, но оценивается автоматически и поэтому является более объективным, чем традиционное время неподвижности, оценка которого зависит от наблюдателя.

Статистическая обработка. Результаты измерения представляли как средние значения \pm ошибка средней и анализировали с помощью одно- (различия между экспериментальными группами) и двухфакторного (факторы “генотип” и “продолжительность дня”) ANOVA для характеристик в тестах ОП, ПКЛ, ПП, а также количество выпитой воды и съеденного корма в Phenomaster. Анализ динамики двигательной активности и сна проводили с помощью однофакторного (различия между экспериментальными группами) и двухфакторного ANOVA (факторы “генотип” и “продолжительность дня”) для повторных измерений (фактор “время суток”). Мы использовали следующую стратегию статистического анализа: (1) вначале исследовали наличие различий между экспериментальными группами с помощью однофакторного анализа; (2) при наличии различий между экспериментальными группами проводили двухфакторный анализ для определения влияния факторов “генотип”, “продолжительность дня” и их взаимодействия, а также проводили апостериорные сравнения по Фишеру. Достоверными считались различия с $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выявлено влияние фактора “генотип” ($F_{1,28} = 6.47, p < 0.02$), но не фактора “продолжительность дня” ($F_{1,28} = 1.66, p > 0.05$) или взаимодействия данных факторов ($F_{1,28} < 1$) на двигательную активность. Мыши линии



Рис. 1. Суточная динамика двигательной активности (м/час) у самцов мышей линий В6-1473С и В6-1473G в условиях домашней клетки при разной продолжительности светового дня. * – $p < 0.05$ по сравнению с животными, содержащимися при длинном дне.

Fig. 1. Daily dynamics of motor activity (m/hour) in male mice of B6-1473C and B6-1473G strains in response to home cage conditions at different duration of the daylight period. * – $p < 0.05$ compared to animals kept at a long day.

В6-1473G (68.63 ± 2.99 м/час) в среднем больше двигаются по сравнению с животными линии В6-1473С (57.85 ± 2.99 м/час, $p < 0.05$). Отмечено влияние фактора “время суток” на двигательную активность ($F_{23,644} = 22.8$, $p < 0.000001$): последняя была выше в темное время суток (рис. 1). У мышей обоих генотипов суточная динамика двигательной активности не различалась, о чем свидетельствует отсутствие влияния взаимодействия факторов “время суток” \times “генотип” ($F_{23,644} < 1$). Однако выявлено существенное влияние взаимодействия факторов “время суток” \times “продолжительность дня” ($F_{23,644} = 4.46$, $p < 0.0001$): у мышей обоих генотипов, содержащихся при коротком световом дне, пик активности начинался примерно на 2 ч позже после включения света по сравнению с мышами, содержащимися при длинном световом дне (рис. 1).

При анализе динамики продолжительности сна выявлен эффект фактора “продолжительность дня” ($F_{1,28} = 11.76$, $p < 0.002$), но не фактора “генотип” ($F_{1,28} < 1$) или взаимодействия данных факторов ($F_{1,28} = 1$, $p > 0.05$). Мыши обоих генотипов, содержащиеся при коротком световом дне, в среднем меньше времени проводили во сне (25.08 ± 0.62 мин/час) по



Рис. 2. Суточная динамика сна (мин/час) у самцов мышей линий В6-1473С и В6-1473G в условиях домашней клетки при разной продолжительности светового дня. * – $p < 0.05$ по сравнению с животными, содержащимися при длинном дне.

Fig. 2. Daily dynamics of sleep (min/hour) in male mice of B6-1473C and B6-1473G strains in response to home cage conditions at different duration of the daylight period. * – $p < 0.05$ compared to animals kept at a long day.

сравнению с животными, содержащимися при длинном световом дне (28.09 ± 0.60 мин/час, $p < 0.01$). Наблюдается выраженный эффект фактора “время суток” на длительность сна ($F_{23,644} = 31.4$, $p < 0.000001$): мыши обоих генотипов больше времени проводили во сне в светлое время суток (рис. 2). Однако не выявлено взаимодействие факторов “время суток” \times “генотип” ($F_{23,644} < 1$). В то же время выявлено существенное влияние взаимодействия факторов “время суток” \times “продолжительность дня” ($F_{23,644} = 3.15$, $p < 0.0001$): у мышей обоих генотипов увеличение времени сна наблюдалось за несколько часов до начала световой фазы. Поэтому у животных, содержащихся при коротком световом дне, увеличение времени сна наступает существенно позже, чем у мышей, содержащихся при длинном световом дне (рис. 2).

Не выявлено влияния факторов “генотип” ($F_{1,24} = 1.01$, $p > 0.05$ для воды и $F_{1,28} = 1.59$, $p > 0.05$ для пищи), “продолжительность дня” ($F_{1,24} < 1$ для воды и $F_{1,28} < 1$ для пищи) и их взаимодействия ($F_{1,24} < 1$ для воды и $F_{1,28} < 1$ для пищи) на суточное потребление воды и пищи (рис. 3).

В тесте ОП мыши четырех исследуемых групп (двух генотипов \times два световых режима) не различались ни по одному из измеряемых показателей и, следовательно, не было влияния факторов “генотип” и “продолжительность дня” на эти показатели (табл. 1).

В тесте ПКЛ мыши четырех исследуемых групп не различались по времени, проведенном в центре, закрытых и открытых рукавах, а также по числу “заглядываний” вниз лабиринта (табл. 1). В то же время выявлены значимые межгрупповые различия по следующим показателям: пройденный путь, величина исследованной площади в закрытых и открытых рукавах и число “выглядываний” из закрытых рукавов (табл. 1). Это позволило провести двухфакторный дисперсионный анализ и исследовать влияние факторов “генотип”, “продолжительность дня” и их взаимодействия на изменчивость данных параметров.

Не обнаружено влияния факторов “генотип” ($F_{1,28} < 1$) и “продолжительность дня” ($F_{1,28} < 1$) на величину пройденного пути в ПКЛ. В то же время, выявлено существенное влияние взаимодействия этих факторов на данный показатель ($F_{1,28} = 9.0, p < 0.01$). Содержание при коротком световом дне уменьшало величину пройденного пути у мышей B6-1473G, но не влияло на этот показатель у животных B6-1473C (табл. 1).

Выявлено влияние факторов “генотип” ($F_{1,28} = 9.9, p < 0.01$), “продолжительность дня” ($F_{1,28} = 36.9, p < 0.0001$), но не их взаимодействия ($F_{1,28} < 1$) на величину исследованной площади в закрытых рукавах. Мыши линии B6-1473C, содержащиеся при длинном световом дне, обследовали большую площадь закрытых рукавов по сравнению с животными той же группы генотипа B6-1473G. Содержание при коротком световом дне снижало величину исследованной площади в закрытых рукавах у обеих линий (табл. 1).

Выявлено влияние фактора “генотип” ($F_{1,28} = 16.7, p < 0.0001$), но не фактора “продолжительность дня” ($F_{1,28} < 1$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,28} = 1.2, p > 0.05$) на величину обследованной площади в открытых рукавах. Мыши линии B6-1473G вне зависимости от длины светового периода исследовали меньшую площадь открытых рукавов по сравнению с животными B6-1473C (табл. 1).

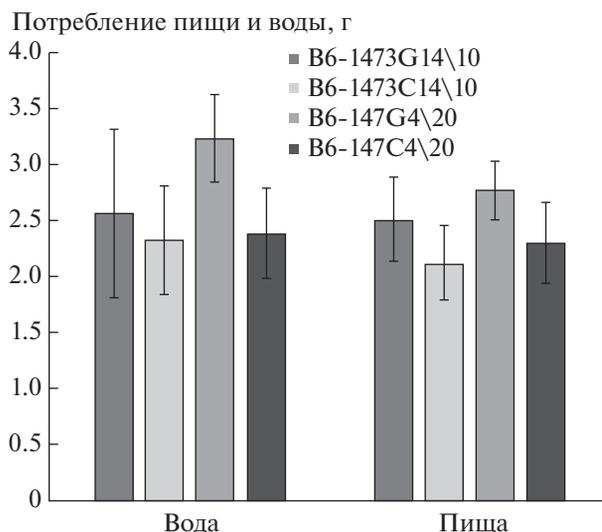


Рис. 3. Влияние фотопериода на суточное потребление воды и пищи у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G в условиях домашней клетки.

Fig. 3. Influence of the photoperiod on daily intake of water and food in male mice of B6-1473C and B6-1473G strains in response to home cage conditions.

Фактор “продолжительность дня” ($F_{1,28} = 9.5, p < 0.01$), но не фактор “генотип” ($F_{1,28} < 1$) или взаимодействие этих факторов ($F_{1,28} = 1.46, p > 0.05$), влияло на число “выглядываний” из закрытых рукавов. Содержание при коротком дне снижало этот показатель у мышей обоих генотипов (табл. 1).

В тесте ПП выявлены значимые межгрупповые различия по величине подвижности ($F_{3,26} = 4.63, p < 0.01$). Это позволило провести двухфакторный дисперсионный анализ и исследовать влияние факторов “генотип”, “продолжительность дня” и их взаимодействия на изменчивость этого показателя. Выявлен эффект фактора “продолжительность дня” ($F_{1,26} = 13.2; p < 0.001$), но не фактора “генотип” ($F_{1,26} < 1$) и их взаимодействия ($F_{1,26} < 1$) на величину подвижности. Этот показатель был достоверно снижен у животных обоих генотипов, содержащихся при коротком световом дне, по сравнению с содержащимися при длинном световом дне (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полиморфизм S1473G заменяет пролин на аргинин в позиции 447 молекулы ТПГ2 и вдвое снижает активность фермента в мозге мыши [Zhang et al., 2004; Kulikov et al., 2005].

Таблица 1. Средние значения характеристик поведения в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” у самцов мышей линий В6-1473С и В6-1473G**Table 1.** The average number of behavioral characteristics in “open field” and “elevated Plus-Maze” tests in male mice of В6-1473С and В6-1473G stains

Показатель	В6-1473С		В6-1473G		P
	14:10	4:20	14:10	4:20	
“Открытое поле”					
Пройденный путь (м)	18.3 ± 1.8	19.5 ± 2.1	22.5 ± 0.5	18.2 ± 1.3	$F_{3,28} = 1.76, p > 0.05$
Время в центре (%)	11.4 ± 1.8	8.3 ± 1.7	8.2 ± 0.6	6.9 ± 0.8	$F_{3,28} = 1.98 p > 0.05$
Исследованная площадь (%)	88.9 ± 2.1	84.2 ± 4.4	91.3 ± 0.6	84.7 ± 2.0	$F_{3,28} = 1.68 p > 0.05$
Число стоек	41.6 ± 6.2	50.0 ± 8.0	63.4 ± 1.7	46.1 ± 4.5	$F_{3,28} = 2.8 p > 0.05$
Число актов умывания	8.4 ± 1.6	7.6 ± 1.2	9.5 ± 1.2	8.3 ± 1.3	$F_{3,28} < 1$
“Приподнятый крестообразный лабиринт”					
Пройденный путь (м)	5.7 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.3	5.0 ± 0.2**	$F_{3,28} = 4.24 p < 0.05$
Время в центре (%)	14.4 ± 1.1	12.9 ± 2.0	10.3 ± 0.4	10.4 ± 1.5	$F_{3,28} = 2.05 p > 0.05$
Время в закрытых (%)	72.2 ± 3.0	72.0 ± 3.9	81.3 ± 1.0	80.4 ± 3.7	$F_{3,28} = 2.6 p > 0.05$
Исследованная площадь в закрытых (%)	94.1 ± 0.4	90.0 ± 0.3**	91.6 ± 0.8 ⁺⁺	89.1 ± 0.6**	$F_{3,28} = 16.3 p < 0.0001$
Время в открытых (%)	13.3 ± 2.1	15.1 ± 2.1	8.3 ± 0.7	9.2 ± 2.3	$F_{3,28} = 2.9 p > 0.05$
Исследованная площадь в открытых (%)	51.9 ± 6.9	63.4 ± 7.5	35.5 ± 2.1 ⁺	34.8 ± 3.4	$F_{3,28} = 6.28 p < 0.01$
Число “выглядываний”	20.5 ± 1.4	17.5 ± 1.5	21.0 ± 1.6	14.1 ± 1.8**	$F_{3,28} = 3.93 p < 0.05$
Число “заглядываний” вниз	21.6 ± 2.5	27.0 ± 4.0	16.9 ± 1.7	17.0 ± 3.5	$F_{3,28} = 2.6 p > 0.05$

Примечание. ** – $p < 0.01$ по сравнению с мышами того же генотипа, содержащимися при длинном световом дне, ++ – $p < 0.01$ по сравнению с мышами В6-1473С, содержащимися при длинном световом дне.

Note. ** – $p < 0.01$ compared to mice of the same genotype, contained at a long light day, ++ – $p < 0.01$ compared to mice В6-1473С, contained at a long daylight period.

Мы установили, что он является основным генетическим фактором, определяющим изменчивость активности ТПП2 в мозге лабораторных мышей [Kulikov et al., 2005]. Поскольку серотонин участвует в регуляции разных форм поведения, а ТПП2 является ключевым фактором синтеза названного медиатора в головном мозге [Walther et al., 2003], можно было бы ожидать существенное влияние полиморфизма на уровень серотонина в мозге. Однако исследования на рекомбинантных мышах, различающихся только по полиморфизму С1473G, не выявили эффекта этого полиморфизма на уровень и метаболизм серотонина в мозге [Seisser et al., 2010; Bazhenova et al., 2017].

Результаты настоящего исследования не обнаружили воздействие полиморфизма на двигательную активность (величина пройденного пути), исследовательскую активность (доля исследованной площади арены и число вертикальных стоек), смещенную ак-

тивность (число актов умывания) и тревожность (время в центре арены) в тесте ОП. Эти результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными [Bazhenova et al., 2017].

В исследовании впервые были изучены влияние полиморфизма С1473G на поведение мышей в тесте ПКЛ и суточная активность в домашней клетке. Мы не выявили влияния на двигательную активность (пройденный путь), время в центре, в закрытых и открытых рукавах, а также на число “выглядываний” из открытых рукавов и число “заглядываний” вниз под лабиринт. Последние два параметра можно рассматривать в связи с исследовательским поведением, а также в связи с оценкой возможных рисков падения. ПКЛ является основным тестом на тревожность. Лабораторные мыши боятся высоты и предпочитают находиться внутри защищенных закрытых рукавов, в то время как их выход в открытые рукава объясняют исследовательской мотивацией [Treit et al., 2010; Bourin,

2015; Ennaceur, Chazot, 2016]. Полагают, что время в открытых рукавах негативно коррелирует с тревожностью (чем выше тревожность, тем меньше время в открытых рукавах). В настоящем эксперименте наблюдается недостоверная ($p = 0.052$) тенденция к снижению времени в открытых рукавах у мышей B6-1473G по сравнению с животными B6-1473C.

Однако время в открытых рукавах — довольно капризный показатель тревожности. Животное может случайно выскочить и застыть в открытом рукаве. Очевидно, что в таком случае увеличение времени в открытом рукаве не будет соответствовать снижению тревожности. Поэтому в настоящей работе мы впервые использовали более объективный параметр оценки тревожности — доля исследованной площади открытых рукавов. Интуитивно ясно, что интенсивное исследование открытых рукавов является индикатором превышения исследовательской мотивации над страхом падения. В нашем исследовании показано существенное снижение исследованной площади открытых рукавов мышами B6-1473G по сравнению с животными B6-1473C. Это вместе с тенденцией к снижению времени в открытых рукавах можно было бы рассматривать как доказательство повышенной тревожности мышей B6-1473G в тесте ПКЛ. Однако это может быть вызвано также общим снижением исследовательской мотивации. Действительно, мыши B6-1473G достоверно меньше исследуют закрытые (безопасные) рукава, что нельзя объяснить повышенной тревожностью.

Большинство тестов оценивают кратковременную реакцию на внешние стимулы или угрозы. В то же время длительные наблюдения поведения в домашней клетке при отсутствии угроз предоставляют значительно больше информации о повседневном поведении животного и позволяют выявить аномалии. Мы впервые установили увеличение суточной двигательной активности в домашней клетке у мышей B6-1473G по сравнению с животными B6-1473C. Несмотря на участие 5-HT в регуляции сна [Monti, 2011], мы не обнаружили связь полиморфизма C1473G с продолжительностью сна.

Основной целью работы было изучение влияния длины светового дня и, главное, взаимодействия длины светового дня и полиморфизма C1473G на поведение мышей. Ранее было показано, что содержание в течение

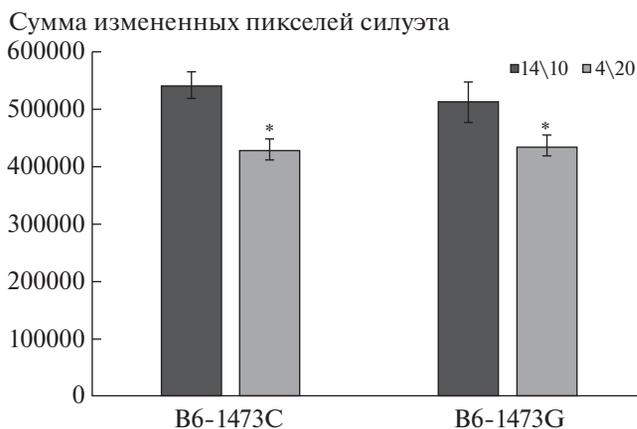


Рис. 4. Влияние фотопериода на степень подвижности в тесте “принудительное плавание” у самцов мышей линий B6-1473C и B6-1473G. * — $p < 0.001$ — по сравнению с животными того же генотипа, содержащимися при длинном дне.

Fig. 4. Influence of the photoperiod on the degree of mobility in the “forced swim” test in male mice of B6-1473C and B6-1473G strains/lines. * — $p < 0.001$ — in comparison to animals of the same genotype kept at a long day.

месяца молодых (1 мес в начале эксперимента) мышей C57BL/6 при укороченном восьмичасовом световом дне не влияло на двигательную активность в тесте ОП, тревожность в тестах ОП (время в центре) и ПКЛ (число заходов и время в открытых рукавах), но значительно увеличивало депрессивно-подобное время неподвижности в тесте ПП. Следует подчеркнуть, что увеличение времени неподвижности в ПП наблюдалось, когда животные тестировались в светлое, но не темное время суток [Otsuka et al., 2014].

В настоящей работе мы проводили исследования на взрослых животных (2–3 мес к началу эксперимента), которые более устойчивы к смене режима освещенности. Более того, животные тестировались в темное время, когда их активность максимальна. Однако вместо восьмичасового мы использовали более короткий световой четырехчасовой режим освещения. Кроме того, мы проводили эксперименты на двух конгенных линиях мышей, различающихся по активности ТПГ2 в мозге, и в условиях SPF вивария при максимальном контроле условий содержания и известных патогенов. Как и наши японские коллеги, мы не обнаружили влияния содержания при коротком световом дне на поведение в тесте ОП у мышей обоих генотипов.

В тесте ПКЛ содержание при коротком световом дне не влияло на тревожность (время и исследованная площадь в открытых рукавах) у мышей обоих генотипов. В то же время короткий день вызывал снижение исследованной площади в закрытых рукавах у мышей B6-1473C и B6-1473G, а также двигательной активности и числа “выглядываний” у животных B6-1473G. Это можно интерпретировать как влияние короткого светового дня на исследовательскую активность.

Содержание при коротком световом дне не влияет на двигательную активность, потребление пищи и воды в домашней клетке, но достоверно снижает среднюю продолжительность сна. Более того, существенный вклад взаимодействия факторов “продолжительность дня” × “время суток” на двигательную активность и продолжительность сна свидетельствует о значительном влиянии длины светового периода на динамику этих показателей. У мышей, содержащихся при коротком световом дне, пик активности наступает позже, а пик длительности сна раньше, чем у животных при длинном световом дне.

ПП является основным преκληическим тестом на антидепрессантную активность различных соединений с наивысшим значением *predictive validity* [Willner, 1990]. Лабораторные крысы или мыши, помещенные в сосуд с водой, через некоторое время прекращают безуспешные попытки выбраться и снижают активность до минимума, необходимого для поддержания головы над водой. Подавляющее большинство клинически эффективных антидепрессантов уменьшают время неподвижности и увеличивают время активных попыток выбраться из сосуда [Overstreet, 2012; Barkus, 2013; Ramaker, Dulawa, 2017]. Более того, Otsuka и соавт. использовали индекс для обоснования предлагаемой ими модели сезонной депрессии [Otsuka et al., 2014].

Однако оценка времени неподвижности в значительной степени зависит от индивидуальности экспериментатора и редко совпадает у двух экспериментаторов. В нашем исследовании мы используем интенсивность активного поиска выхода, оцененную суммой изменений силуэта мыши, как меру депрессивно-подобного поведения. Такой подход не является новым, и его механический вариант уже ранее использовался в тесте ПП [Nikulina et al., 1991]. Мы просто разработали

компьютерный вариант этого подхода. В отличие от классического времени замирания, сумма изменений силуэта мыши является объективным критерием, не зависимым от способностей экспериментатора, и позволяет автоматизировать тест ПП.

Основным результатом настоящей работы является демонстрация того, что содержание при коротком световом дне снижало подвижность мышей обоих генотипов в тесте “принудительное плавание”, что, очевидно, соответствует увеличению времени неподвижности и можно интерпретировать как депрессивно-подобный эффект. В отличие от японских коллег [Otsuka et al., 2014], которые наблюдали депрессивно-подобный эффект короткого светового периода только на молодых животных и при тестировании в светлое время суток, мы наблюдали данный эффект на взрослых мышах и при тестировании в темное время суток. Важно отметить отсутствие влияния взаимодействия факторов “генотип” × “продолжительность дня” на выраженность депрессивно-подобного эффекта. Этот результат свидетельствует об отсутствии влияния полиморфизма C1473G на чувствительность к короткому световому дню.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы подтвердили результаты Otsuka et al. [2014], что содержание при коротком световом дне увеличивает время депрессивно-подобного замирания в тесте ПП у мышей с генотипом C57BL/6. Таким образом, предложенная Otsuka et al. [2014] модель депрессивно-подобных изменений, вызванных короткой продолжительностью светового периода, прошла независимую проверку и может быть использована для моделирования механизмов депрессивных расстройств и поиска эффективных антидепрессантов.

В то же время полученные нами данные позволяют отрицательно ответить на вопрос о влиянии наследственного умеренного снижения активности ТПП2 в мозге на риск возникновения депрессивно-подобных изменений поведения при коротком световом дне. По-видимому, сниженная активность ТПП2 в мозге у мышей гомозиготных по G аллелю достаточна для поддержания функциональной активности серотониновой системы мозга на необходимом для эффективной регуляции поведения уровне.

Результат может иметь эпидемиологическое приложение. В настоящее время известны несколько редких мутаций в гене TRH2 человека, которые драматически снижают активность фермента и ассоциированы с тяжелыми депрессивными расстройствами [Zhang et al., 2005; Kulikov, Popova, 2015]. Однако больший интерес представляют распространенные мутации, вызывающие умеренное снижение активности фермента, как, например, полиморфизм G6493A (SNP rs1389493) в гене, кодирующем ТПГ2 человека, с частотой А аллеля, снижающего активность фермента, около 20% [Zhang et al., 2011]. В силу его массовости этот полиморфизм мог бы быть существенным фактором риска сезонных депрессивных расстройств [Kulikov, Popova, 2015]. Наше исследование показало, что умеренного снижения активности ТПГ2 не достаточно для увеличения чувствительности к короткому световому дню.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Получение и содержание животных поддержаны бюджетным проектом 0324-2018-0016.

Проведение эксперимента и тестирование поведения были поддержаны грантом РФФИ № 17-04-00266.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bains R.S., Wells S, Sillito R.R., Armstrong J.D., Carter H.L., Banks G., Nolan P.M.* Assessing mouse behaviour throughout the light/dark cycle using automated in-cage analysis tools. *J Neurosci Methods*. 2017 pii: S0165-0270(17)30113-9. doi 10.1016/j.jneumeth.2017.04.014
- Barkus C.* Genetic mouse models of depression. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013. 14: 55–78.
- Bazhenova E.Y., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Lichman D.V., Kulikov A.V.* C1473G polymorphism in mouse tryptophan hydroxylase-2 gene in the regulation of the reaction to emotional stress. *Neurosci Lett*. 2017. 640: 105–110.
- Bazovkina D.V., Lichman D.V., Kulikov A.V.* The C1473G polymorphism in the Tryptophan hydroxylase-2 gene: involvement in ethanol-related behavior in mice. *Neurosci Lett*. 2015. 589: 79–82.
- Bourin M.* Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues Clin Neurosci*. 2015. 17: 295–303.
- Ennaceur A., Chazot P.L.* Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. *Pharmacol Res Perspect*. 2016. 4: e00223.
- Fisher S.P., Godinho S.I., Potheary C.A., Hankins M.W., Foster R.G., Peirson S.N.* Rapid assessment of sleep-wake behavior in mice. *J Biol Rhythms*. 2012. 27: 48–58.
- Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova N.K.* Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains. *Genes Brain Behav*. 2005.4 (8): 482–5.
- Kulikov A.V., Popova N.K.* Tryptophan hydroxylase 2 in seasonal affective disorder: underestimated perspectives? *Rev Neurosci*. 2015. 26 (6): 679–90.
- Kulikov V.A., Khotskin N.V., Nikitin S.V., Lankin V.S., Kulikov A.V., Trapezev O.V.* Application of 3-D imaging sensor for tracking minipigs in the open field test. *J Neurosci Methods*. 2014. 30. 235: 219–25.
- Lesch K.P., Araragi N., Waider J., et al.* Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behavior. *Philos Trans R Soc Lond B Biol. Sci*. 2012. 367: 2426–43.
- Levitan R.D.* The chronobiology and neurobiology of winter seasonal affective disorder. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007. 9 (3): 315–24.
- Miller A.L.* Epidemiology, etiology, and natural treatment of seasonal affective disorder. *Altern Med Rev*. 2005. 10 (1): 5–13.
- Monti J.M.* Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev* 2011. 15: 269–81.
- Nikulina E.M., Skrinskaya J.A., Popova N.K.* Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology (Berlin)*. 1991. 105 (4): 525–9.
- Otsuka T., Kawai M., Togo Y., Goda R., Kawase T., Matsuo H., Iwamoto A., Nagasawa M., Furuse M., Yasuo S.* Photoperiodic responses of depression-like behavior, the brain serotonergic system, and peripheral metabolism in laboratory mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014. 40: 37–47.
- Overstreet D.H.* Modeling depression in animal models. *Methods Mol. Biol*. 2012. 829: 125–44.
- Pack A.I., Galante R.J., Maislin G., Cater J., Metaxas D., Lu S., Zhang L., Von Smith R., Kay T., Lian J., Svenson K., Peters L.L.* Novel method for high-throughput phenotyping of sleep in mice. *Physiol Genomics*. 2007. 28: 232–8.
- Ramaker M.J., Dulawa S.C.* Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. *Mol Psychiatry*. 2017. 22: 656–665.

- Siesser W.B., Zhang X., Jacobsen J.P.R., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase 2 genotype determines brain serotonin synthesis but not tissue content in C57Bl/6J and BALB/cJ congenic mice. *Neurosci Lett*. 2010. 481: 6–11.
- Treit D., Engin E., McEown K. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010. 2: 121–60.
- Waider J., Araragi N., Gutknecht L., Lesch K.P. Tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) in disorders of cognitive control and emotion regulation: a perspective. *Psychoneuroendocrinology* 2011. 36: 393–405.
- Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*. 2003. 299: 76.
- Willner P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther*. 1990. 45: 425–455.
- Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*. 2004. 305: 217.
- Zhang X., Gainetdinov R.R., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Burch L.H., Williams R.B., Schwartz D.A., Krishnan K.R., Caron M.G. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*. 2005. 45: 11–16.
- Zhang X., Nicholls P.J., Laje G., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Albert P.R., Rajkowska G., Stockmeier C.A., Speer M.C., Steffens D.C., Austin M.C., McMahon F.J., Krishnan K.R., Garcia-Blanco M.A., Caron M.G. A functional alternative splicing mutation in human tryptophan hydroxylase-2. *Mol Psychiatry*. 2011. 16: 1169–1176.

THE EFFECT OF THE C1473G POLYMORPHISM IN THE TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 GENE AS WELL AS OF THE DAYLIGHT PERIOD ON MICE BEHAVIOR

N. V. Khotskin^{a, #}, E. Y. Bajenova^a, E. A. Kulikova^a, I. E. Sorokin^a, and A. V. Kulikov^a

^a Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

e-mail: Shverter@mail.ru

Seasonal depressive disorders occur due to the seasonal reduction in the duration of daylight and represent a significant medical, social and economic problem. The risk of seasonal depressive disorders is associated with the brain serotonin system dysfunction. Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) is a key enzyme in the serotonin synthesis in the brain. The C1473G polymorphism in the mouse *Tph2* gene leads to a twofold decrease in the enzyme activity in the brains of mice. The aim of the study was to study the influence of daylight length on behavior of adult males of congenital lines B6-1473C and B6-1473G with high and low TPH2 activity. Adult males of these lines were kept for a month at long (14 h) and short (4 h) duration of daylight. In mice of both genotypes, the keeping of mice at short daylight did not affect the daily average motor activity, food and water intake, anxiety in the “open field” and the “elevated plus-maze” tests, but affected the mean duration of sleep ($p < 0.002$) and had a depressive-like effect (decreased the active resistance in the “forced swim” test) ($p < 0.01$) in similar way in both lines. Thus, the polymorphism of C1473G does not seem to influence the changes in the behavior of mice caused by short daylight.

Keywords: mice, behavior, tryptophan hydroxylase 2, day length, forced swim test, open field test, elevated plus maze test.