https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-34-46

CC BY 4.0

АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ МИРОВЫХ ТРЕНДОВ В ОБЪЕКТИВИЗАЦИИ ПРОТОКОЛОВ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.Б. Салмина[1,2], Я.В. Горина[1,*], А.В. Большакова[3], О.Л. Власова[3]

[1] НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России 660022, Российская Федерация, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

[2] Институт мозга, ФГБНУ «Научный центр неврологии» 105064, Российская Федерация, Москва, ул. Воронцово поле, 14

[3] ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» 194021, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 11

Поведенческое фенотипирование грызунов с моделями нейродегенерации привлекает большое внимание учёных в течение последних трёх десятилетий. Тем не менее, по-прежнему существуют определённые сложности в понимании изменчивости поведения, вызванной генетическими, экологическими и биологическими факторами, вмешательством человека и плохо стандартизированными экспериментальными протоколами, что может отрицательно отразиться на интерпретации полученных результатов. В этой статье мы представляем факторы, оказывающие негативное влияние на качество выполнения поведенческого тестирования лабораторных животных, современные подходы по их преодолению, а также новые технологии, такие как визуализация активности нейронов с помощью ионно-зависимых флуоресцентных индикаторов (оптогенетика), которые расширяют границы изучения нейронных сетей, ответственных за поведение, путём оценки функции нейронов как на клеточном, так и на популяционном уровнях, что, в итоге, позволит повысить надёжность полученных результатов и даст возможность по-новому взглянуть на этологические парадигмы конкретной трансгенной мышиной модели.

Ключевые слова: поведение, нейроповеденческие тесты, факторы, оптогенетика, нейродегенерация
Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) (проект № 20-65-46004).
Для цитирования: Салмина А.Б., Горина Я.В., Большакова А.В., Власова О.Л. Анализ основных мировых трендов в объективизации протоколов поведенческого тестирования лабораторных животных с патологией головного мозга. *Биомедицина*. 2023;19(1):34–46. https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-34-46

Поступила 27.07.2022
Принята после доработки 12.12.2022
Опубликована 10.03.2023

ANALYSIS OF MAIN WORLD TRENDS IN OBJECTIVIZATION OF PROTOCOLS FOR BEHAVIORAL TESTING OF LABORATORY ANIMALS WITH BRAIN PATHOLOGY

Alla B. Salmina[1,2], Yana V. Gorina[1,*], Anastasia V. Bolshakova[3], Olga L. Vlasova[3]

[1] *Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of Russia*
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka Str., 1

[2] *Brain Institute, Research Center of Neurology*
105064, Russian Federation, Moscow, Vorontsovo Pole Str., 14

[3] *St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great*
194021, Russian Federation, St. Petersburg, Khlopina Str., 11

Behavioral phenotyping of rodents using neurodegeneration models has received much research attention over the past three decades. However, some difficulties still exist in understanding the variability of behavior caused by genetic, environmental, and biological factors, human intervention and poorly standardized experimental protocols, which can negatively affect the interpretation of the results obtained. In this article, we discuss factors that have a negative impact on the performance of behavioral testing of laboratory animals, modern approaches to overcome them, as well as new technologies, such as visualization of neuronal activity using ion-dependent fluorescent indicators (optogenetics), which expand the boundaries of the study of neuronal networks responsible for behavior by evaluating neuronal function at both the cellular and population levels. Ultimately, this will increase the reliability of the results obtained and provide an opportunity to take a fresh look at the ethological paradigms of a particular transgenic mouse model.

Keywords: behavior, neurobehavioral tests, factors, optogenetics, neurodegeneration
Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.
Funding: this work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (RSF) (project No. 20-65-46004).
For citation: Salmina A.B., Gorina Ya.V., Bolshakova A.V., Vlasova O.L. Analysis of Main World Trends in Objectivization of Protocols for Behavioral Testing of Laboratory Animals with Brain Pathology. *Journal Biomed.* 2023;19(1):34–46. https://doi.org/10.33647/2074-5982-19-1-34-46

Submitted 27.07.2022
Revised 12.12.2022
Published 10.03.2023

Введение

Поведенческое тестирование является неотъемлемым компонентом современных протоколов изучения механизмов развития хронической нейродегенерации с использованием экспериментальных моделей на лабораторных животных. Разработанные к настоящему времени подходы к моделированию хронической нейродегенерации позволяют с той или иной степенью достоверности воспроизвести ключевые патофизиологические процессы, составляющие основу патогенеза этой группы заболеваний: повреждение и гибель клеток нейрональной природы, аккумуляцию аберрантных белков в клетках и межклеточном пространстве, нарушение синаптической пластичности и нейрогенеза, развитие дисметаболических изменений в ткани, нейровоспаления и патологической проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Несмотря на существование лимитирующих факторов при использовании тех или иных моделей *in vivo*, в большинстве случаев удаётся зарегистрировать характерные для развития хронической нейродегенерации неврологические дефициты, в частности, когнитивную дисфункцию, нарушение процессов обучения и запоминания, развитие тревожности, изменение социального поведения и интереса к другим объектам, нарушение механизмов принятия решений.

Поведенческое фенотипирование животных с экспериментальной нейродегенерацией, как правило, включает в себя использование «батареи» тестов для оценки когнитивных функций и интереса к новому

(водный лабиринт Морриса, тест Барнеса, Т-образный лабиринт, тест распознавания новых объектов, тест «Открытое поле» и др.), обучения и памяти (тест условнорефлекторного замирания, тест условнорефлекторного пассивного избегания, радиальный восьмирукавный лабиринт и др.), эмоционального статуса (форсированное плавание, тест подвешивания за хвост, тест предпочтения сахарозы, тест предпочтения кондиционированного места и др.), социального поведения (трёхкамерный тест, пятипопыточный тест и др.).

В настоящем обзоре мы не ставим перед собой задачу охарактеризовать достоинства и недостатки каждого из перечисленных методических подходов, а фокусируемся на оценке общих для разных протоколов факторов, влияющих на качество выполнения поведенческого тестирования, а также на современных подходах к преодолению этих методологических проблем (автоматизация и цифровизация тестирования) и к идентификации клеток и клеточных ансамблей, ответственных за реализацию тех или иных поведенческих механизмов (оптогенетическая стимуляция) в норме и при нейродегенерации.

Объективные и субъективные факторы, определяющие качество выполнения поведенческого тестирования лабораторных животных

При выполнении широкого спектра нейроповеденческих тестов, которые используются для оценки когнитивного статуса, тревожности, сложных форм поведения экспериментальных животных, всё большую значимость приобретает грамотная интерпретация полученных данных. В целом, выполнение любого вида нейроповеденческого тестирования в нейронауках подразумевает наличие некоторых допущений, связанных с интерпретацией поведенческих актов. Это обусловлено несколькими причинами: 1) недостаточная расшифровка данных о механизмах реализации поведенческих реакций у животных разных видов и с разной степенью развития центральной нервной системы; 2) отсутствие некоторых свойственных человеку или высшим приматам сложных форм поведения у экспериментальных животных (грызунов).

В связи с этим при выборе «батареи» поведенческих тестов следует ориентироваться на те из них, которые, с одной стороны, позволяют получить максимально однозначные выводы, с другой стороны, могут быть корректно экстраполированы на аналогичные поведенческие события или когнитивные функции, свойственные человеку или высшим приматам [12, 13, 42, 44].

К числу наиболее значимых условий, которые должны быть соблюдены при проведении поведенческого фенотипирования животных, относятся: 1) соблюдение этических норм и принципа 3R при выборе способов тестирования и подборе экспериментальных животных; 2) обеспечение условий комфортного, контролируемого и легко воспроизводимого микроокружения, минимизирующего влияние «отвлекающих» или «возмущающих» внешних факторов на поведение животных; 3) разработка скрупулёзного и детального дизайна эксперимента, учитывающего влияние различных экспериментальных процедур на результаты поведенческого тестирования; 4) проведение поведенческого тестирования специально обученным и высококвалифицированным персоналом [28, 40].

Handling stress (стресс вследствие взятия животного человеком) относится к числу значимых факторов, искажающих результаты поведенческого тестирования. В частности, недавно было показано, что процедура изъятия животного из клетки и переноса его к лабораторному стенду, используемому для тестирования, влияет на результаты оценки сложных форм поведения: перенос животного в специальном приспособлении (туннель) оказался более благоприятным, по сравнению с переносом путём захвата

за хвост, в частности, по результатам анализа исследовательского интереса [15, 19], причём такие преимущества сохраняются и после дополнительных инвазивных процедур (инъекции, анестезия) [20].

Любой другой вид стрессового фактора значимо меняет поведенческий ответ экспериментальных животных, что очевидно и в классических моделях, например, стресс раннего периода жизни, приводящий к развитию депрессии или повышению риска возникновения нейродегенерации в отдалённые периоды онтогенеза [29, 37], и при анализе поведенческого фенотипа животных, подвергающихся действию стресса социальной изоляции или иммобилизационном стрессе в более позднем периоде развития [27].

Помимо стресса различной природы, следующие факторы определяют ответ животных на действие стимулов, провоцирующих тот или иной вид поведения или способствующих реализации феномена нейропластичности: 1) особенности организации сенсорных систем у грызунов с доминирующим влиянием ольфакторной стимуляции на индукцию механизмов пластичности головного мозга; 2) трудность задачи, поставленной в рамках теста; 3) корректность подбора экспериментальных групп; 4) особенности соотношения индивидуального и социального начала в поведении грызунов; 5) частота повторения тестов и их последовательность; 6) наличие или отсутствие взаимодействий с другими животными в процессе выполнения задания в рамках теста [17].

Кроме того, следует учитывать следующие аспекты реализации когнитивных и поведенческих функций: 1) генетически обусловленная вариабельность; 2) индивидуальный онтогенез; 3) сезон, время суток, состояние здоровья, фазы физиологических циклов у тестируемых животных; 4) состояние рабочей зоны (освещённость, наличие запахов, характер поверхности и т. п.) [13, 36, 43].

Каким образом осуществляется выбор совокупности тестов для оценки нейроповеденческого статуса экспериментальных животных? Для этого следует учитывать следующие позиции: 1) задачи эксперимента по идентификации конкретных поведенческих проявлений тех или иных (пато) физиологических процессов в центральной нервной системе; 2) технические и организационные возможности лаборатории; 3) наличие или отсутствие современных систем регистрации и анализа данных; 4) количество, пол, возраст животных; 5) сложность совокупного дизайна эксперимента; 6) возможность получения результатов с применением минимально допустимого количества животных с минимизированным стрессом при проведении экспериментов.

Вместе с тем, очевидно, что разнообразие имеющихся в распоряжении исследователя тестов сейчас настолько большое, что можно использовать взаимозаменяющие и/или взаимодополняющие протоколы для оценки функциональной активности того или иного региона головного мозга. Например, функция гиппокампа может быть оценена в следующих видах нейроповеденческого тестирования: открытое поле, водный лабиринт Морриса, контекстный тест на условно-рефлекторный страх, Т-образный лабиринт, тестирование принятия решений (память, тревожность, пространственное обучение), а различные виды памяти могут быть проанализированы с использованием следующих протоколов: водный лабиринт Морриса и тест Барнса (пространственная память, некоторые элементы рабочей памяти), тест распознавания нового объекта (ассоциативная память, декларативная память, рабочая память), контекстный тест на условно-рефлекторный страх (ассоциативная память), Y-образный лабиринт (рабочая краткосрочная память) [45].

В целом, интерпретация полученных при проведении поведенческого тестиро-

вания данных представляет собой весьма нетривиальную задачу для исследователя. Следующие аспекты оказывают влияние на результаты анализа: 1) мотивация (мотивировано ли животное к выполнению поставленной в тесте задачи, и насколько наличие такой мотивации соотносится с механизмами развития изучаемой патологии); 2) взаимодействие исследователя и животного (насколько удалось избежать handling stress); 3) трудность задания (насколько задание выполнимо, например, для животных с моторной или когнитивной дисфункцией, нет ли артефактов, возникающих в результате невозможности выполнения в силу иных причин, не учитываемых исследователем); 4) взаимодействие разных протоколов (не может ли результат одного теста влиять на другой, не слишком ли сопряжены по времени разные тесты); 5) уровень общей активности животных (не влияет ли общий уровень активности, например, в результате наличия динамических его изменений в течение суток или в разные сезоны, на результаты поведенческого тестирования); 6) вариабельность (влияют ли естественные физиологические причины, например, циклические физиологические изменения, на особенности поведения, выявляемые в тестах); 7) дизайн эксперимента (используется ли метод рандомизации, «слепого» анализа при отборе групп и анализе данных); 8) этологическое соответствие (есть ли соответствие между тестируемым — стимулированным — поведением и естественным поведением животных); 9) воспроизводимость результатов (возможно ли получить аналогичные тенденции и закономерности при увеличении выборки животных, а также в других линиях или с использованием животных другого возраста и пола); 10) организация тестирования (могут ли животные тестироваться последовательно или параллельно) [17].

Учёт всех перечисленных аспектов, влияющих на результаты нейроповеденческого тестирования, должен вестись в рамках каждого эксперимента, иначе ин-

Рис. *Факторы, влияющие на результаты экспериментальных исследований на животных.*
Fig. *Factors affecting the results of experimental animal studies.*

терпретация полученных данных, особенно при сравнении разных групп животных, будет затруднена (рис.).

Повышение качества экспериментов, ориентированных на оценку сложных событий в живых системах (например, анализ межклеточных взаимодействий в системах *in vitro* или анализ поведенческих реакций животных *in vivo*), возможно за счёт автоматизации процессов и использования современных методов регистрации и анализа данных. Для *in vivo* исследований в настоящее время применяют различные способы трекинга животных, автоматизации экспериментальной процедуры, анализа полученных данных, причём применение таких протоколов позволяет решить не только технические, но и этические проблемы [35]. Для *in vitro* исследований используют методы анализа изображений и межклеточных коммуникаций, а также предиктивные модели для оценки эффектов физических, химических и биологических факторов на живые системы [9].

Современные технологии для унификации и повышения качества выполнения поведенческих тестов в экспериментальной нейробиологии

В поведенческих тестах применение цифровых технологий позволяет достичь автоматизации протокола, что, в свою очередь, актуально для объективизации результатов, минимизации неблагоприятных эффектов взаимодействия «исследователь — животное», оптимизации продолжительности тестирования и снижения трудозатрат на его проведение. Например, автоматические системы могут практически аннулировать эффекты handling stress за счёт роботизированных платформ для забора и переноса животных из клеток к лабораторным стендам и обратно, а новые способы мечения животных позволяют проводить тестирование с использованием нескольких животных одновременно, что, например, важно при оценке социального поведения. Вместе с тем зарегистрированы и определённые ограничения в применении автоматизированных протоколов, например вследствие накопления ошибок, в т. ч. ложноположительных результатов, при многократных повторах поведенческих тестов, что требует применения рациональных методов статистического анализа данных [17].

Примером удачного дополнения стандартных протоколов нейроповеденческого тестирования современными технологическими решениями является разработка беспроводной системы анализа движений головы животного при проведении контекстного теста на условно-рефлекторный страх: зафиксированная на голове животного система позволяет анализировать время замирания, которое характеризует наличие ассоциативной памяти, регистрируемой в этом тесте, что повышает пространственное разрешение в контексте детекции freezing time [33]. Не менее интересным является решение, связанное с разработкой усовершенствованной камеры для проведения контекстного теста на условно-рефлекторный страх с прецизионной установкой параметров электрического шока, звука и света, что повышает воспроизводимость результатов тестирования животных [1].

Другим примером использования современных технологических решений при оценке поведения животных является разработка аппаратно-программного комплекса, позволяющего проанализировать социальное поведение путём 3D-видеотрекинга, машинного видения (для идентификации положения тела животного в динамике социального взаимодействия) и машинного обучения для категоризации типа социальных взаимодействий, в т. ч. между животными разных линий [21]. Такая автоматизированная система во многом снижает ресурсозатратность при проведении поведенческих тестов и поэтому может быть использована, например,

при скрининге лекарств-кандидатов, влияющих на сложные формы поведения.

Фактически, такие новые разработки в области цифровизации и автоматизации поведенческого фенотипирования экспериментальных животных относят нас к самым первым работам, посвящённым применению вычислительных методов для анализа поведенческих реакций у лабораторных животных, и эта эволюция соответствует переходу от сугубо описательного характера поведенческих экспериментов к трансляции результатов поведенческого теста в однозначные заключения, базирующиеся на соответствии строго определённым критериям оценки поведенческого акта. В этом контексте особенно актуальным становится сочетание новых подходов к анализу поведенческих реакций с современными технологиями таргетной стимуляции тех или иных клеток головного мозга, что достигается методами оптогенетики, термогенетики, соногенетики, хемогенетики [2, 10, 14, 22, 31].

При проведении экспериментальных исследований *in vitro* оценка межклеточных взаимодействий, процессов пролиферации, дифференцировки, клеточной миграции и гибели является основным инструментом анализа поведения клеток в культуре, в т. ч. в составе мультиклеточных ансамблей. С этой точки зрения, вычислительные методы и цифровые технологии дают возможность не только корректно оценить множественные события в культуре клеток, но и спрогнозировать поведение клеток при действии иных внешних факторов. Например, это актуально для анализа кинетики клеточных популяций, оптимизации микроокружения для роста и развития клеток, интерпретации результатов клеточной визуализации, оценки результатов применения высокопроизводительных аналитических методов (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и др.). В этом контексте особого внимания заслуживают технологии создания «цифровых двойников» для рационального дизайна экспериментов и моделирования ключевых событий в клеточных культурах, что изначально нашло своё применение в биотехнологии в плане оптимизации состава питательной среды для роста клеток [25]. Другой подход базируется на использовании машинного обучения для оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера (*in vitro* модель), что актуально для выбора лекарств-кандидатов, проникающих через барьер в ткань головного мозга для эффективного взаимодействия с молекулами-мишенями [41]. Наиболее часто для решения подобных задач используются такие методы машинного обучения, как Support vector machine (SVM), Random forest (RF), k-nearest neighbors (kNN), Multidimensional Linear Regression (MLR), Linear discriminant analysis (LDA) и Naïve Bayesian classifiers (NBC). В работе [41] был проведён детальный анализ основных технологий машинного обучения, применимых для оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера для скрининга лекарств-кандидатов в системах *in vitro*, на основании чего был сделан вывод о предиктивной точности некоторых алгоритмов более 80%.

Интересной сферой приложения для современных цифровых технологий в экспериментальной нейробиологии является разработка микрофизиологических систем с использованием микрофлюидных камер, воспроизводящих условия для функционирования и взаимодействия клеток нейрональной и ненейрональной природы [7, 8, 38, 39]. В частности, при моделировании ткани в формате «орган-на-чипе» существует высокая потребность в онлайн-оценке и интерпретации большого количества данных, характеризующих выживаемость клеток, их функциональную активность, межклеточные взаимодействия, реакцию клеток на изменение состава микроокружения. Технологии машинного обучения, применяемые для этих целей, уже зарекомендо-

вали себя в качестве релевантного подхода к распознаванию общих и частных паттернов поведения клеток, классификации ответов в клеточной популяции, прогнозирования ответа ткани на внешние воздействия. Фактически, речь идёт о создании моделей в формате «орган-на-чипе», сопряжённых с алгоритмами искусственного интеллекта и нейронных сетей, и, вероятно, с *in silico* аналитическими компонентами для воспроизведения максимального соответствия системы *in vitro* реальным условиям функционирования ткани или органа в условиях *in vivo* [30, 46].

В этом контексте актуальны работы, касающиеся анализа популяции индуцированных плюрипотентных клеток (iPSCs), которые используются для тканевой инженерии в нейронауках. В частности, было показано, что алгоритмы машинного обучения хорошо подходят для категоризации клеток-потомков iPSCs, отличающихся по некоторым ключевым признакам и участвующим в процессе эмбриогенеза [16]. Авторы показали, что преимуществом применённой платформы машинного обучения является то, что после настройки и проверки протоколов машинного обучения модули в каждом протоколе могут быть смешаны и сопоставлены для осуществления сравнительного и количественного анализа высокоэффективным способом. Это позволяет получить статистически значимые результаты, например, при идентификации наиболее важных (с регуляторной точки зрения) гуморальных факторов в микроокружении эмбрионов. Очевидно, что аналогичный подход может быть реализован, например, для церебральных органоидов и других мультиклеточных кластеров, воспроизводящих события, происходящие на ранних этапах развития центральной нервной системы, либо в микрофизиологических системах в формате «мозг-на-чипе».

Не менее интересным подходом является применение алгоритмов машинного обучения для рационального дизайна экспериментов с применением протоколов оптогенетики. Примечательно, что применение этих алгоритмов может быть полезным для разработки новых оптогенетических инструментов с минимальной инвазивностью (отсутствие потребности в интракраниальной доставке вектора). Так, представленная в работе [6] модель обладает способностью весьма точно предсказывать свойства каналородопсинов (ChR) и конструировать новые варианты ChR с высокой фоточувствительностью и восприимчивых к свету разной длины волны, генерирующими фототоки с различными кинетическими характеристиками, экспрессирующимися при минимально инвазивной трансфекции. Это открывает новые возможности для использования проникающего в ткани инфракрасного излучения как стимулятора активности ChR. Более того, такая системная доставка вектора важна для целенаправленной экспрессии ChR в тех регионах мозга, которые трудно достижимы при хирургических манипуляциях, например, глубокие отделы мозга или ганглии. Причём такие свойства были подтверждены в поведенческих тестах на экспериментальных животных, экспрессирующих соответствующие варианты ChR в нейронах. Таким образом, алгоритмы машинного обучения оказались полезными для оптимизации структуры и свойств ChR, повышения качества, а также редуцирования побочных эффектов вектор-опосредованной экспрессии ChR в клетках центральной нервной системы.

В недавнем исследовании [26] было убедительно продемонстрировано, что объединение поведенческого тестирования с прямым высокочувствительным мониторингом уровня дофамина в *nucleus accumbens* мышей, машинным обучением, компьютерным моделированием и оптогенетическими манипуляциями является адекватным подходом для анализа поведенческих реакций,

вызванных изменением процессов секреции дофамина в центральной нервной системе. В частности, было показано, что алгоритмы машинного обучения выявляют соответствие паттерна центральной секреции дофамина и поведенческой реакции у экспериментальных животных.

Не менее интересными являются данные [32] о том, как можно комбинировать оптогенетическую стимуляцию нейрональных популяций с применением алгоритмов машинного обучения применительно к идентификации функциональных связей между медиальной перегородкой и гиппокампальными нейронами. Иными словами, построение регрессионной модели для описания взаимосвязи между параметрами стимуляции медиальной перегородки и электрофизиологическими характеристиками гиппокампальных нейронов позволило найти оптимальные параметры для оптогенетической стимуляции.

Другой подход был реализован в работе [47], в которой был разработан протокол т. н. функциональной селломики (finctional cellomics), который может аннотировать функцию нейрональных сетей с высокой пропускной способностью и разрешением на уровне одной клетки. Этот подход базируется на применении биоинженерных технологий, сопряжённых с алгоритмами малинного обучения (Cre-Lox-рекомбинация и подбор вариантов её использования для получения оптимального результата в оптогенетическом протоколе).

С учётом результатов анализа способов оценки и повышения качества нейроповеденческого тестирования, изложенных выше, закономерен вопрос о том, насколько вообще возможно использовать поведенческое тестирование в качестве маркера тех или иных вмешательств в функционирование клеток центральной нервной системы, в т. ч. при таргетном воздействии, достигаемом, например, при применении протоколов оптогенетики, хемогенетики, соногенетики, термогенетики и т. д. [4, 11, 24].

Оптогенетические протоколы в идентификации молекулярных механизмов регуляции поведения

Методология применения оптогенетического контроля поведения животных является достаточно хорошо отработанной. Оптогенетика обладает рядом ключевых преимуществ, таких как адресная активация клеток, экспрессирующих фоточувствительные белки, высокое пространственное и временное разрешение при фотостимуляции ткани, отсутствие побочных эффектов, связанных с эндогенной экспрессией аналогичных фоточувствительных белков в клетках центральной нервной системы. Указанные возможности метода позволили ему стать «золотым стандартом» в исследованиях *in vivo*, ориентированных на изучение вклада отдельных клеточных популяций в сложные поведенческие акты [3, 11, 24, 48].

Например, фотостимуляция ChR2-экспресиирующих нейронов префронтальной коры у мышей (свет длиной волны 473 нм, 5 мсек, 1 мВт, 20 Гц) приводила к достоверному увеличению тревожности за счёт изменения баланса возбуждения и торможения (E/I balance) в префронтальной коре. Примечательно, что в этом исследовании все поведенческие тесты выполнялись в тёмную фазу суточного ритма (12 ч света, 12 ч темноты), что соответствует фазе активности у грызунов. Другим важным аспектом выполнения батареи поведенческих тестов явилось то, что авторы предусмотрели особенности моторных функций у мышей с Cre-Lox-рекомбинацией, использованной при генерации соответствующего фенотипа (Nex-Cre-мыши), что привело к необходимости адаптировать приподнятый крестообразный лабиринт (дополнить его низкими бортиками) для предотвращения спонтанного падения животных из открытых «рукавов» лабиринта. Авторы

также рекомендуют не пользоваться одним тестом для регистрации определённого вида поведения, а всегда дополнять его каким-либо иным тестом, ориентированным на детекцию аналогичного варианта поведения, что существенно повышает достоверность полученных данных. Кроме того, следует учитывать, какая линия животных максимально подходит для учёта конкретного вида поведения: C57Bl/6 мыши имеют низкий базовый уровень тревожности, тогда как BALB/cByJ мыши всегда демонстрируют большую тревожность и высокую чувствительность к действию анксиолитиков. Более того, трансгенные варианты обеих линий могут также отличаться по базальному уровню поведения, что затрудняет интерпретацию полученных результатов [5]. Этот пример демонстрирует, что интерпретация данных поведенческого тестирования может быть дополнена процедурами, составляющими основу оптогенетического протокола.

Не менее интересным является методический подход, сформулированный в недавней работе [18]: авторы применили комбинацию автоматизированного тренинга грызунов в тех же клетках, в которых они содержались ранее (с исключением вмешательства в ход обучения или эксперимента человека), с оптогенетическим протоколом (без использования оптоволокна) для стимуляции различных регионов головного мозга (средний мозг, стриатум), для регистрации такой сложной формы поведения, как принятие решения (decision-making behavior). Примечательно, что такой подход не только обеспечивает обучение животных с не меньшей эффективностью, чем это достигалось при манипуляциях, проводимых человеком, но и даст возможность эффективного картирования регионов головного мозга, вовлечённых в принятие решений. Ограничения к использованию такого подхода связаны с особенностями реализации феномена фотостимуляции или фотоингибирования в контексте целого региона головного мозга, что трудно достижимо.

Существенным преимуществом применения оптогенетического протокола для оценки сложных поведенческих паттернов является возможность использования фотостимуляции или фотоингибирования активности клеток головного мозга в конкретном регионе в различные периоды до и после тестирования, например, для идентификации значимости связей между нейронами различных регионов в динамике кодирования и сохранения памяти [23]. Кроме того, в результате оптогенетической стимуляции клеток, чья вовлечённость в конкретный поведенческий акт или процесс запоминания доказывается в процессе нейроповеденческого тестирования, происходит интенсификация соответствующего механизма нейрональной активности, что, например, было продемонстрировано в улучшении параметров запоминания у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера [34].

Заключение

В целом, сочетание современных протоколов поведенческого тестирования с анализом факторов, влияющих на результаты, методов таргетной активации или ингибирования клеток головного мозга, а также технологий машинного обучения или автоматизации экспериментов, является эффективным инструментом поиска новых механизмов пластичности головного мозга в норме и при хронической нейродегенерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Amaral-Júnior P.A., Mourão F.A.G., Amancio M.C.L., Pinto H.P.P., Carvalho V.R., Guarnieri L.d.O., Magalhães H.A., Moraes M.F.D. A custom microcontrolled and wireless-operated chamber for auditory fear conditioning. *Front. Neurosci.* 2019;13:1193. DOI: 10.3389/fnins.2019.01193.
2. Anderson David J., Perona P. Toward a science of computational ethology. *Neuron.* 2014;84(1):18–31. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.09.005.
3. Anpilov S., Shemesh Y., Eren N., Harony-Nicolas H., Benjamin A., Dine J., Oliveira V.E.M., Forkosh O., Karamihalev S., Hüttl R.-E., Feldman N., Berger R., Dagan A., Chen G., Neumann I.D., Wagner S., Yizhar O., Chen A. Wireless optogenetic stimulation of oxytocin neurons in a semi-natural setup dynamically elevates both pro-social and agonistic behaviors. *Neuron.* 2020;107(4):644e7–655.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.05.028.
4. Aravanis A., Wang L., Zhang F., Meltzer L., Mogri M., Schneider B., Deisseroth K. An optical neural interface: In vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J. Neural Eng.* 2007;4(3):S143–S156. DOI: 10.1088/1741-2560/4/3/S02.
5. Berg L., Gerdey J., Masseck O.A. Optogenetic manipulation of neuronal activity to modulate behavior in freely moving mice. *J. Vis. Exp.* 2020;164. DOI: 10.3791/61023.
6. Bedbrook C.N., Yang K.K., Robinson J.E., Mackey E.D., Gradinaru V., Arnold F.H. Machine learning-guided channelrhodopsin engineering enables minimally invasive optogenetics. *Nature Methods.* 2019;16(11):1176–1184. DOI: 10.1038/s41592-019-0583-8.
7. Berger E., Magliaro C., Paczia N., Monzel A.S., Antony P., Linster C.L., Bolognin S., Ahluwalia A., Schwamborn J.C. Millifluidic culture improves human midbrain organoid vitality and differentiation. *Lab. Chip.* 2018;18(20):3172–3183. DOI: 10.1039/c8lc00206a.
8. Buchroithner B., Mayr S., Hauser F., Priglinger E., Stangl H., Santa-Maria A.R., Deli M.A., Der A., Klar T.A., Axmann M., Sivun D., Mairhofer M., Jacak J. Dual channel microfluidics for mimicking the blood-brain barrier. *ACS Nano*. 2021;15(2):2984–2993. DOI: 10.1021/acsnano.0c09263.
9. Coghlan S., Webber S., Carter M. Improving ethical attitudes to animals with digital technologies: The case of apes and zoos. *Ethics Inf. Technol*. 2021;23(4):825–839. DOI: 10.1007/s10676-021-09618-7.
10. de Chaumont F., Coura R.D.-S., Serreau P., Cressant A., Chabout J., Granon S., Olivo-Marin J.-C. Computerized video analysis of social interactions in mice. Nat. Methods. 2012;9(4):410–417. DOI: 10.1038/nmeth.1924.
11. Deng C., Yuan H., Dai J. Behavioral manipulation by optogenetics in the nonhuman primate. *Neuroscientist.* 2017;24(5):526–539. DOI: 10.1177/1073858417728459.
12. Donnarumma F., Prevete R., Maisto D., Fuscone S., Irvine E.M., van der Meer M.A.A., Kemere C., Pezzulo G. A framework to identify structured behavioral patterns within rodent spatial trajectories. *Sci. Rep.* 2021;11(1):468. DOI: 10.1038/s41598-020-79744-7.
13. Fan S., Dal Monte O., Chang S.W.C. Levels of naturalism in social neuroscience research. *iScience.* 2021;24(7):102702. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102702.
14. Gomez-Marin A., Paton J.J., Kampff A.R., Costa R.M., Mainen Z.F. Big behavioral data: Psychology, ethology and the foundations of neuroscience. *Nat. Neurosci.* 2014;17(11):1455–1462. DOI: 10.1038/nn.3812.
15. Gouveia K., Hurst J.L. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: The major role of non-aversive handling. *Sci. Rep.* 2017;7:44999. DOI: 10.1038/srep44999.
16. Guo J., Wang P., Sozen B., Qiu H., Zhu Y., Zhang X., Ming J., Zernicka-Goetz M., Na J. Machine learning-assisted high-content analysis of pluripotent stem cell-derived embryos in v*itro. Stem Cell Reports.* 2021;16(5):1331–1346. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.03.018.
17. Hånell A., Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front. Behav. Neurosci*. 2014;8:252. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00252.
18. Hao Y., Thomas A.M., Li N. Fully autonomous mouse behavioral and optogenetic experiments in home-cage. *eLife.* 2021;10:e66112. DOI: 10.7554/eLife.66112.
19. Henderson L.J., Dani B., Serrano E.M.N., Smulders T.V., Roughan J.V. Benefits of tunnel handling persist after repeated restraint, injection and anaesthesia. *Sci. Rep.* 2020;10(1):14562. DOI: 10.1038/s41598-020-71476-y.
20. Henderson L.J., Smulders T.V., Roughan J.V. Identifying obstacles preventing the uptake of tunnel handling methods for laboratory mice: An international thematic survey. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231454. DOI: 10.1371/journal.pone.0231454.
21. Hong W., Kennedy A., Burgos-Artizzu X.P., Zelikowsky M., Navonne S.G., Perona P., Anderson D.J. Automated measurement of mouse social behaviors using depth sensing, video tracking, and machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015;112(38):E5351–E5360. DOI: 10.1073/pnas.1515982112.
22. Kabra M., Robie A.A., Rivera-Alba M., Branson S., Branson K. JAABA: Interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nat. Methods.* 2013;10(1):64–67. DOI: 10.1038/nmeth.2281.
23. Kang M.S., Han J.-H. Optogenetic inhibition of medial entorhinal cortex inputs to the hippocampus during a short period of time right after learning disrupts contextual fear memory formation. Mol. Brain. 2021;14(1):2. DOI: 10.1186/s13041-020-00719-w.

24. Kim S., Kyung T., Chung J.-H., Kim N., Keum S., Lee J., Park H., Kim H.M., Lee S., Shin H.-S., Do Heo W. Non-invasive optical control of endogenous Ca2+ channels in awake mice. *Nat. Commun.* 2020;11(1):210. DOI: 10.1038/s41467-019-14005-4.
25. Kuchemüller K.B., Pörtner R., Möller J. Digital twins and their role in model-assisted design of experiments. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2021;177:29–61. DOI: 10.1007/10_2020_136.
26. Kutlu M.G., Zachry J.E., Melugin P.R., Cajigas S.A., Chevee M.F., Kelly S.J., Kutlu B., Tian L., Siciliano C.A., Calipari E.S. Dopamine release in the nucleus accumbens core signals perceived saliency. *Curr. Biol.* 2021;31(21):4748e8–4761.e8. DOI: 10.1016/j.cub.2021.08.052.
27. Lee J.-E., Kwon H.-J., Choi J., Seo J.-S., Han P.-L. Aging increases vulnerability to stress-induced depression via upregulation of NADPH oxidase in mice. *Commun. Biol.* 2020;3(1):292. DOI: 10.1038/s42003-020-1010-5.
28. Lewejohann L., Reinhard C., Schrewe A., Brandewiede J., Haemisch A., Görtz N., Schachner M., Sachser N. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav.* 2006;5(1):64–72. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2005.00140.x.
29. Lopatina O.L., Panina Y.A., Malinovskaya N.A., Salmina A.B. Early life stress and brain plasticity: From molecular alterations to aberrant memory and behavior. *Rev. Neurosci*. 2021;32(2):131–142. DOI: 10.1515/revneuro-2020-0077.
30. Mencattini A., Mattei F., Schiavoni G., Gerardino A., Businaro L., Di Natale C., Martinelli E. From Petri dishes to organ on chip platform: The increasing importance of machine learning and image analysis. *Front. Pharmacol*. 2019;10:100. DOI: 10.3389/fphar.2019.00100.
31. Noldus L.P.J.J., Spink A.J., Tegelenbosch R.A.J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput*. 2001;33(3):398–414. DOI: 10.3758/bf03195394.
32. Park S.-E., Laxpati N.G., Gutekunst C.-A., Connolly M.J., Tung J., Berglund K., Mahmoudi B., Gross R.E. A machine learning approach to characterize the modulation of the hippocampal rhythms via optogenetic stimulation of the medial septum. *Int. J. Neural Syst.* 2019;29(10):1950020. DOI: 10.1142/S0129065719500205.
33. Pasquet M.O., Tihy M., Gourgeon A., Pompili M.N., Godsil B.P., Léna C., Dugué G.P. Wireless inertial measurement of head kinematics in freely-moving rats. *Sci. Rep.* 2016;6:35689. DOI: 10.1038/srep35689.
34. Perusini J.N., Cajigas S.A., Cohensedgh O., Lim S.C., Pavlova I.P., Donaldson Z.R., Denny C.A. Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in Alzheimer's disease mice. *Hippocampus*. 2017;27(10):1110–1122. DOI: 10.1002/hipo.22756.
35. Richter S.H. Automated home-cage testing as a tool to improve reproducibility of behavioral research? *Front. Neurosci*. 2020;14:383. DOI: 10.3389/fnins.2020.00383.
36. Richter S.H., Garner J.P., Zipser B., Lewejohann L., Sachser N., Touma C., Schindler B., Chourbaji S., Brandwein C., Gass P., van Stipdonk N., van der Harst J., Spruijt B., Võikar V., Wolfer D.P., Würbel H. Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behavior: A multi-laboratory study. *PLoS One*. 2011;6(1):e16461. DOI: 10.1371/journal.pone.0016461.
37. Salmina A.B., Gorina Y.V., Komleva Y.K., Panina Y.A., Malinovskaya N.A., Lopatina O.L. Early life stress and metabolic plasticity of brain cells: Impact on neurogenesis and angiogenesis. *Biomedicines*. 2021;9(9):1092. DOI: 10.3390/biomedicines9091092.
38. Salmina A.B., Kharitonova E.V., Gorina Y.V., Teplyashina E.A., Malinovskaya N.A., Khilazheva E.D., Mosyagina A.I., Morgun A.V., Shuvaev A.N., Salmin V.V., Lopatina O.L., Komleva Y.K. Blood-brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(9):4661. DOI: 10.3390/ijms22094661.
39. Salmina A.B., Komleva Y.K., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Teplyashina E.A., Lopatina O.L., Gorina Y.V., Kharitonova E.V., Khilazheva E.D., Shuvaev A.N. Blood-Brain barrier breakdown in stress and neurodegeneration: Biochemical mechanisms and new models for translational research. *Biochemistry* (Mosc.). 2021;86(6):746–760. DOI: 10.1134/S0006297921060122.
40. Saré R.M., Lemons A., Smith C.B. Behavior testing in rodents: Highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. *Brain Sci*. 2021;11(4):522. DOI: 10.3390/brainsci11040522.
41. Saxena D., Sharma A., Siddiqui H.M., Kumar R. Blood brain barrier permeability prediction using machine learning techniques: An update. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2019;20(14):1163–1171. DOI: 10.2174/1389201020666190821145346.
42. Smith J.D., Beran M.J., Couchman J.J., Coutinho M.V.C., Boomer J.B. Animal metacognition: Problems and prospects. *Comp. Cogn. Behav. Rev*. 2009;4:40–53. DOI: 10.3819/ccbr.2009.40004.
43. Sousa N., Almeida O.F.X., Wotjak C.T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.* 2006;5(Suppl 2):5–24. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x.
44. von Ziegler L., Sturman O., Bohacek J. Big behavior: Challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling. *Neuropsychopharmacology.* 2021;46(1):33–44. DOI: 10.1038/s41386-020-0751-7.
45. Wahl D., Coogan S.C., Solon-Biet S.M., de Cabo R., Haran J.B., Raubenheimer D., Cogger V.C.,

Mattson M.P., Simpson S.J., Le Couteur D.G. Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clin. Interv. Aging.* 2017;12:1419–1428. DOI: 10.2147/CIA.S145247.

46. Wang M.F.Z., Fernandez-Gonzalez R. (Machine-) Learning to analyze in vivo microscopy: Support vector machines. Biochim. Biophys. *Acta Proteins Proteom*. 2017;1865(11 Pt B):1719–1727. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.09.013.
47. Yamauchi Y., Matsukura H., Ueda M., Aoki W. Development of a novel sparse labeling method by machine learning-guided engineering of Cre-lox recombination. *FASEB J.* 2021;35(S1). DOI: 10.1096/fasebj.2021.35.S1.01974.
48. Yang Y., Wu M., Vázquez-Guardado A., Wegener A.J., Grajales-Reyes J.G., Deng Y., Wang T., Avila R., Moreno J.A., Minkowicz S., Dumrongprechachan V., Lee J., Zhang S., Legaria A.A., Ma Y., Mehta S., Franklin D., Hartman L., Bai W., Han M., Zhao H., Lu W., Yu Y., Sheng X., Banks A., Yu X., Donaldson Z.R., Gereau R.W., Good C.H., Xie Z., Huang Y., Kozorovitskiy Y., Rogers J.A. Wireless multilateral devices for optogenetic studies of individual and social behaviors. *Nat. Neurosci.* 2021;24(7):1035–1045. DOI: 10.1038/s41593-021-00849-x.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Салмина Алла Борисовна, д.м.н., проф., НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Институт мозга, ФГБНУ «Научный центр неврологии»;
e-mail: allasalmina@mail.ru

Alla B. Salmina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of Russia; Brain Institute, Research Center of Neurology;
e-mail: allasalmina@mail.ru

Горина Яна Валерьевна*, к.фарм.н., доц., НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России;
e-mail: yana_20@bk.ru

Yana V. Gorina*, Cand. Sci. (Pharm.), Assoc. Prof., Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: yana_20@bk.ru

Большакова Анастасия Викторовна, к.б.н., ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»;
e-mail: bolshakova.av@spbstu.ru

Anastasia V. Bolshakova, Cand. Sci. (Biol.), St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great;
e-mail: bolshakova.av@spbstu.ru

Власова Ольга Леонардовна, д.ф-м.н., доц., ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»;
e-mail: vlasova.ol@spbstu.ru

Olga L. Vlasova, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Assoc. Prof., St. Petersburg Polytechnic University of Peter the Great;
e-mail: vlasova.ol@spbstu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author