

Поведенческий фенотипический анализ животных с генетической моделью болезни Альцгеймера

Я.В. Горина¹, Ю.К. Комлева¹, О.Л. Лопатина¹, А.И. Черных²,
А.Б. Салмина¹

¹ – ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

² – Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона, Красноярск

Контактная информация: к.ф.н. Горина Яна Валерьевна, уапа_20@bk.ru

Цель исследования – изучение развития социальных и когнитивных нарушений в процессе онтогенеза у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера.

Объект исследования – генетическая модель болезни Альцгеймера – мыши линии B6SLJ-Tg(APP SwF10n,PSEN1*M146L*L286V)6799Vas, самцы в возрасте 4 мес. Контрольная группа – мыши линии C57BL/6 x SJL, самцы в возрасте 4 мес. Нейроповеденческое тестирование включало в себя тест «Открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт, тест «Черно-белая камера», трехкамерный социальный тест, социальный пятипопыточный тест, тест «Fear conditioning».

В результате проведения нейроповеденческого тестирования у животных линии Tg6799 по мере развития болезни Альцгеймера выявлены повышение уровня тревожности и заторможенности, нарушение социальных контактов и взаимодействий, а также пространственного, социального и ассоциативного обучения и запоминания. В совокупности это указывает на расстройство эмоционального поведения, а также долговременной, социальной, пространственной и эмоциональной памяти.

Ключевые слова: генетическая модель на животных, болезнь Альцгеймера, память, поведение.

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным типом нейродегенеративных заболеваний, клинически характеризующимся необратимым прогрессирующим снижением когнитивных функций и потерей памяти [13].

Нейропатологические признаки нейродегенерации, такие как отложение нейрофибрилярных клубков и гибель нейронов, обнаружены в медиальной височной доле, в т.ч. гиппокампе, энторинальной коре и миндалине, еще на ранних стадиях развития заболевания до появления характерных симптомов [16]. При этом нейропатологические изменения в гиппокампе, вероятно связан-

ные с нарушением декларативной памяти [3], что является одним из первых симптомов БА, присутствуют на стадии умеренных когнитивных нарушений [11]. Стоит отметить и тот факт, что постепенно прогрессирующее нарушение взаимосвязи гиппокампа с другими областями мозга при БА находится в фокусе исследования многих зарубежных ученых [5, 8], тогда как взаимосвязь гиппокампа с миндалиной, которая участвует в формировании эмоциональных поведенческих реакций [10], мало изучена.

Кроме того, несмотря на десятилетние исследования, этиология БА неизвестна, и многие фундаментальные вопросы остаются без ответа. В связи

с этим решающее значение имеет использование животных с генетической моделью БА в качестве ключевого инструмента исследования как с целью определения патологических путей заболевания, так и выявления новых терапевтических подходов [2, 12].

Поскольку наиболее значимыми изменениями, к которым приводит БА, являются прогрессирующая потеря памяти и нарушение когнитивных функций, что вызвано массовой гибелью нейронов и синапсов, необходимо сконцентрировать внимание на изучении поведенческого фенотипа животных с генетической моделью БА с использованием батареи нейроповеденческих тестов для оценки когнитивных функций и различных видов памяти как гиппокамп-, так и миндалина зависящих.

Цель исследования – изучение развития социальных и когнитивных нарушений в процессе онтогенеза у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера.

Материалы и методы

Экспериментальные группы

Генетическая модель болезни Альцгеймера – мыши линии B6SLJ-Tg (APP^{SweFlon}, PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799Vas, самцы в возрасте 4 мес. массой 39-41 г (n=10). Контрольная группа – мыши линии C57BL/6 x SJL, самцы в возрасте 4 мес. массой 40-41 г (n=10). Данные линии мышей получены из The Jackson Laboratory.

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

Соответствие нормам законодательства

Исследования на животных проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/EC).

Нейроповеденческое тестирование

Для фенотипического исследования животных применялись следующие поведенческие тесты: тест «Открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт, тест «Черно-белая камера», трехкамерный социальный тест, социальный пятипопыточный тест и тест «Fear conditioning».

Открытое поле – тест оценивает как двигательную активность, так и эмоциональную реактивность в условиях стресса, которые создаются за счет помещения животного в специальную установку – круглую арену диаметром 63 см с высотой стенок 32 см [14]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [1]. На каждом этапе тестирования оценивали двигательную активность по пройденному расстоянию (в метрах), время в наружной зоне «открытого поля», время во внутренней зоне «открытого поля», количество входов во внутреннюю зону «открытого поля».

Приподнятый крестообразный лабиринт – позволяет оценить степень тревожности, эмоциональное состояние, исследовательскую и двигательную активность животных, помещенных в лабиринт [6], состоящий из перпендикулярно расположенных друг относительно друга на высоте 1 м двух открытых и двух закрытых рукавов. Для оценки поведения животных использовали следующие показатели: время пребывания в закрытых

и открытых «рукавах», количество входов в закрытые и открытые «рукава», длительность нахождения в центре.

Черно-белая камера – тест использовали для изучения эмоциональной реактивности животного (склонности к тревоге, страху, депрессии [15]) при помещении в специальную установку – ящик, состоящий из светлого и темного отсеков, разделенных перегородкой. В ходе сессии регистрировали следующие показатели: латентное время первого входа в темный отсек, время нахождения в светлом и темном отсеке, число входов в темный отсек.

Трехкамерный социальный тест – использовали для оценки социального взаимодействия и социальной памяти у животных [9]. Устройство представляет собой прямоугольный ящик из жесткого поливинилхлорида серого цвета, имеет две боковые и одну центральную камеру с квадратными переходами между отсеками. Тестирование выполняли в три этапа с перерывом в 10 мин: на первом этапе в две боковые камеры устанавливали несоциальный объект (цилиндр), животное помещали в центральную камеру и проводили видеорегистрацию в течение 10 мин; на втором этапе в левую камеру помещали социальный объект 1 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 мес., находящаяся в цилиндре) и проводили тестирование животного в течение 10 мин; на третьем этапе в правую камеру помещали новый социальный объект 2 (мышь линии CD1, самка в возрасте 4 мес., находящаяся в цилиндре), оставляя в левой камере ранее помещенный социальный объект 1, и проводили тестирование животного в течение 10 мин. В каждой сессии оценивали двигательную активность по пройденному расстоянию (в метрах),

время нахождения в правой, левой и центральной камерах, количество входов в левую и правую камеры, время нахождения около социального объекта 1 и 2, количество входов в зону нахождения социального объекта 1 и 2.

Социальный пятипопыточный тест – позволяет оценить социальное распознавание новой особи: в результате повторных взаимодействий грызуны привыкают друг к другу и, как следствие, теряют исследовательский интерес, что проявляется в снижении времени контакта. Однако последующее появление незнакомой особи (самки в возрасте 8 недель) увеличивает социальный интерес и время социального контакта [4]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [1]. Оценивали социальное взаимодействие по принципу фиксации времени (в сек) следования «голова-хвост».

Fear conditioning – тест использовали для исследования консолидации памяти страха и способности животных к ассоциативному обучению [7]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [1]. В каждой сессии оценивали количество эпизодов замирания.

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Для сравнения показателей в независимых выборках применяли критерий Манна-Уитни, сравнение зависимых выборок осуществляли с помощью критерия Уилкоксона. 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 и их обсуждение

При изучении тревожности в тесте «Открытое поле» на первом этапе отмечено, что животные с генетической моделью БА (линия Tg6799) в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,001$) меньше времени (здесь и далее время представлено в сек) проводили в наружной части поля (на периферии) – $279,14 \pm 16,52$ по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) в аналогичном возрасте – $361,32 \pm 10,65$.

Однако с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 количество времени, проведенного в наружной части поля, статистически значимо ($p \leq 0,001$) возрастало по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ($433,98 \pm 32,94$ и $279,14 \pm 16,52$ соответственно) (рис. 1А). Это свидетельствовало о проявлении повышенной тревожности в группе животных с генетической моделью БА на последней стадии развития заболевания.

Выявлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени про-

водили в центре поля при появлении несоциального объекта (цилиндра) по сравнению с животными контрольной группы ($306,52 \pm 44,30$ и $180,27 \pm 15,35$ соответственно). При этом количество входов в центральную зону у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. составляло $71,14 \pm 3,92$, тогда как у животных линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. – $57,38 \pm 3,16$, при $p \leq 0,05$.

Таким образом, животные линии Tg6799 чаще заходили в центральную зону с несоциальным объектом, контактируя с ним коротким промежутком времени, и выбегали из центральной зоны. В совокупности это указывало на проявление тревоги у животных с генетической моделью БА на начальных стадиях развития заболевания при появлении несоциального объекта.

Однако с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 статистически значимо ($p \leq 0,05$) снижалось время нахождения в центре поля при появлении цилиндра – как по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ($93,88 \pm 11,47$ и $306,52 \pm 44,30$ соответственно), так и с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ($135,71 \pm 12,19$ соответственно) (рис. 1Б). Данный факт указывает на проявление

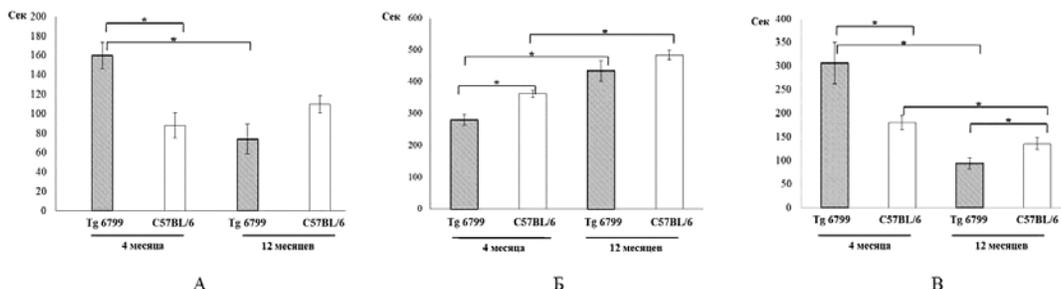


Рис. 1. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Открытое поле»: А – время в наружном круге (первый этап), Б – время в зоне с несоциальным объектом (второй этап), В – время в зоне с социальным объектом (третий этап); * – $p \leq 0,05$.

тревоги (боязни) по отношению к несоциальному объекту у животных с генетической моделью БА на последней стадии заболевания.

На третьем этапе тестирования установлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в центре поля при появлении социального объекта (самца) по сравнению с животными линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. ($159,90 \pm 13,59$ и $87,86 \pm 13,24$ соответственно). Тогда как с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 статистически значимо ($p \leq 0,05$) снижалось время нахождения в центре поля при появлении самца по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ($73,73 \pm 11,85$ и $159,90 \pm 13,59$ соответственно) (рис. 1B). Это свидетельствовало о проявлении тревоги по отношению к социальному объекту у животных с генетической моделью БА в процессе развития заболевания.

При изучении тревожности с помощью теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. наблюдалась тенденция ($p = 0,069$) к уменьшению времени проведения в закрытых «рука-

вах» ($362,80 \pm 47,46$ сек) по сравнению с животными линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. ($473,68 \pm 24,56$ сек). Также выявлено, что с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 статистически значимо ($p \leq 0,05$) снижалось время нахождения в закрытых «рукавах» – как по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ($245,7 \pm 31,25$ и $362,80 \pm 47,46$ соответственно), так и с животными линии C57BL/6 в возрасте 12 мес. ($245,7 \pm 31,25$ и $491,22 \pm 20,88$ соответственно). Это обусловлено тем, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,001$) больше времени замирали, находясь в открытых «рукавах» ($75,38 \pm 14,62$), по сравнению с животными линии C57BL/6 в возрасте 4 мес. ($12,47 \pm 1,19$) (рис. 2). Аналогичная ситуация (увеличение времени замирания в открытых «рукавах») наблюдалась с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 – как по сравнению с животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ($98,17 \pm 29,09$ и $73,10 \pm 14,54$ соответственно, при $p \leq 0,05$), так и с животными линии C57BL/6 в возрасте 12 мес. ($98,17 \pm 29,09$ и $6,92 \pm 2,40$ соответственно, при $p \leq 0,001$) (рис. 2).

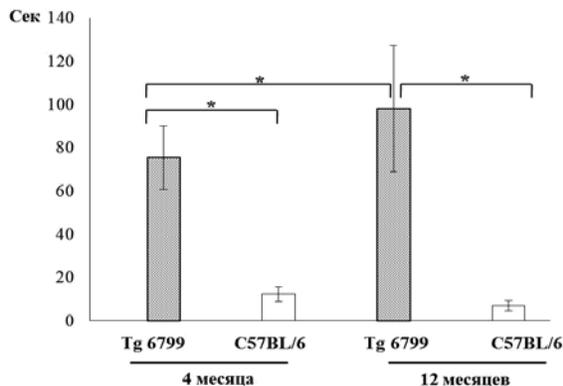


Рис. 2. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: время замирания в открытых «рукавах»; * – $p \leq 0,05$.

Увеличение времени замирания, являющегося одним из показательных элементов поведения и вызванного страхом, беспокойством, тревогой, может свидетельствовать об увеличении уровня тревожности у животных линии Tg6799 по мере развития заболевания.

В ходе исследования тревожности в тесте «Черно-белая камера» у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. наблюдалась тенденция ($p=0,333$) больше времени проводить в черной камере – $457,45 \pm 34,76$ сек – по сравнению с животными контрольной группы – $417,73 \pm 19,63$ сек. Аналогичная ситуация наблюдалась и в возрасте 12 мес. у животных линии Tg6799: количество времени, проведенного в черной камере, изменилось незначительно ($p=0,287$) и составило $392,35 \pm 22,55$ по сравнению с животными линии Tg 6799 в возрасте 4 мес. – $457,45 \pm 34,76$ (рис. 3).

Также выявлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) быстрее забегали в черную камеру ($6,04 \pm 2,36$) по сравнению с животными контрольной группы ($14,04 \pm 3,17$). Однако с возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция к увеличению латентного времени до входа в черную камеру – как по сравнению с

животными линии Tg6799 в возрасте 4 мес. ($8,17 \pm 1,29$ и $6,04 \pm 2,36$ соответственно, при $p=0,556$), так и с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ($8,17 \pm 1,29$ и $4,89 \pm 0,95$ соответственно, при $p=0,08$).

В совокупности это указывало на проявление тревоги и заторможенности у животных линии Tg6799 по мере развития заболевания.

В результате проведения трехкамерного социального теста выявлено, что на первом этапе тестирования у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. время, проведенное как в правой ($219,51 \pm 16,82$), так и левой камерах ($265,97 \pm 17,98$), статистически значимо не отличалось ($p=0,084$). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы сходного возраста: время, проведенное в правой ($207,77 \pm 10,63$) и левой ($225,76 \pm 7,41$) камерах, статистически значимо не отличалось ($p=0,182$). В дополнение к этому, у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. время, проведенное в зоне с не-социальным объектом в правой камере, статистически значимо не отличалось ($p=0,861$) по сравнению с животными контрольной группы ($121,66 \pm 13,42$ и $118,79 \pm 9,66$ соответственно). Подобное выявлено и по времени, проведенном в

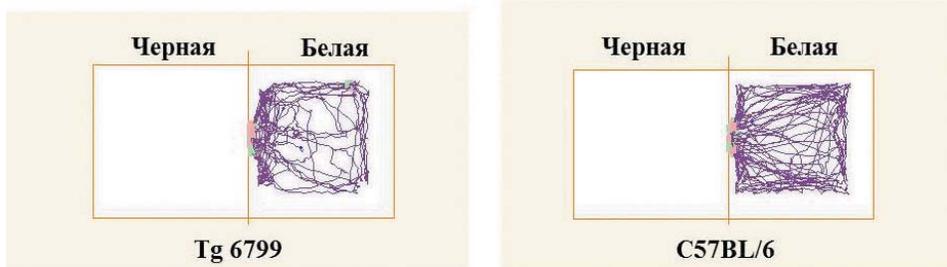


Рис. 3. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Черно-белая камера»: образцы треков животных.

зоне с несоциальным объектом в левой камере – как у опытной, так и у контрольной группы ($173,44 \pm 21,11$ и $130,79 \pm 9,49$ соответственно, при $p=0,059$). Это свидетельствовало об отсутствии боязни (тревоги) по отношению к несоциальному объекту у животных линии Tg 6799 в возрасте 4 мес.

На втором этапе тестирования, когда в левую камеру помещали социальный объект 1, животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,001$) больше времени проводили в левой ($296,54 \pm 16,43$), чем в правой камере ($138,83 \pm 24,25$). Тогда как у животных контрольной группы в возрасте 4 мес. время, проведенное в правой ($179,09 \pm 21,56$) и левой ($225,93 \pm 14,54$) камере, статистически значимо не отличалось ($p=0,116$). К тому же животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в зоне с социальным объектом 1 в левой камере по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 4 мес. ($211,64 \pm 24,79$ и $111,41 \pm 12,98$ соответственно). Это свидетельствовало о распознавании и проявлении интереса к появившемуся социальному объекту у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес.

Однако на третьем этапе тестирования, когда в правую камеру помещали новый социальный объект 2, оставляя в левой камере ранее помещенный социальный объект 1, животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в левой камере ($239,93 \pm 19,12$), чем в правой ($133,41 \pm 29,49$). Тогда как животные контрольной группы в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в правой,

чем в левой камере ($249,37 \pm 15,57$ и $168,66 \pm 17,84$ соответственно). Следует подчеркнуть, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в зоне с социальным объектом 1 в левой камере ($137,60 \pm 16,44$), чем в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ($62,35 \pm 16,95$). При этом животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) меньше времени проводили в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ($62,35 \pm 16,95$) по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 4 мес. ($124,31 \pm 12,19$).

Таким образом, животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. предпочитали взаимодействовать с уже знакомым, а не с новым социальным объектом. Это указывало на нарушение социальной памяти и, как следствие, на затруднение в распознавании нового социального объекта, проявляющееся на начальных стадиях развития БА.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 на первом этапе тестирования время, проведенное как в правой ($207,90 \pm 75,34$), так и в левой камере ($219,98 \pm 65,11$), статистически значимо не отличалось ($p=0,803$). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы в возрасте 12 мес.: время, проведенное в правой ($183,51 \pm 24,59$) и левой ($188,26 \pm 51,85$) камере, статистически значимо не отличалось ($p=0,829$). Кроме того, у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. время, проведенное в зоне с несоциальным объектом в правой камере, статистически значимо не отличалось ($p=0,289$) по сравнению с животными контрольной группы ($79,73 \pm 25,00$ и $95,13 \pm 18,26$ со-

ответственно). Подобный эффект выявлен и в отношении времени, проведенного в зоне с несоциальным объектом в левой камере – как у опытной, так и у контрольной группы в возрасте 12 мес. ($84,58 \pm 26,44$ и $107,28 \pm 23,17$ соответственно, при $p=0,163$). Это указывало на отсутствие боязни (тревоги) по отношению к несоциальному объекту у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес.

На втором этапе тестирования животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в левой ($328,53 \pm 84,00$), чем в правой камере ($179,90 \pm 50,85$). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы в возрасте 12 мес.: время, проведенное в левой ($230,48 \pm 36,67$) камере, статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени, проведенного в правой камере ($166,10 \pm 55,26$). В дополнение к этому, у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. время, проведенное в зоне с социальным объектом 1 в левой камере, по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. статистически значимо не отличалось ($119,02 \pm 35,23$ и $99,33 \pm 42,57$ соответственно, при $p=0,398$). Однако у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. наблюдалось более длительное время замирания ($62,68 \pm 21,33$) (статистически значимо, при $p \leq 0,05$), находясь в зоне с социальным объектом 1, по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ($35,44 \pm 16,26$). Это свидетельствовало о распознавании появившегося социального объекта с одновременным проявлением тревоги (боязни).

На третьем этапе тестирования животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$)

больше времени проводили в левой камере ($252,68 \pm 33,42$), чем в правой ($177,58 \pm 73,52$). Тогда как животные контрольной группы в возрасте 12 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше времени проводили в правой камере, куда был помещен новый социальный объект 2, чем в левой камере ($242,05 \pm 76,79$ и $158,04 \pm 43,41$ соответственно). Важно отметить, что у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. наблюдалась тенденция ($p=0,250$) больше времени проводить в зоне с социальным объектом 1 в левой камере ($71,57 \pm 18,84$), чем в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ($62,08 \pm 21,57$). При этом у животных линии Tg6799 в возрасте 12 мес. отмечалось статистически значимо ($p \leq 0,05$) более длительное время замирания ($41,18 \pm 9,53$), находясь в зоне с социальным объектом 1, по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ($21,06 \pm 5,77$). Кроме того, животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. статистически значимо ($p \leq 0,05$) меньше времени проводили в зоне с новым социальным объектом 2 в правой камере ($62,08 \pm 21,57$) по сравнению с животными контрольной группы в возрасте 12 мес. ($113,14 \pm 35,65$).

Таким образом, животные линии Tg6799 в возрасте 12 мес. охотнее взаимодействовали с уже знакомым, чем с новым социальным объектом, проявляя при этом повышенную тревожность (страх). Данный факт указывал на нарушение социальной памяти и, как следствие, на затруднение в распознавании нового социального объекта, проявляющееся по мере развития заболевания.

Анализ результатов социального пятипопыточного теста показал, что у животных линии Tg6799 в возрасте

4 мес. происходило статистически значимое снижение времени взаимодействия по принципу «голова-хвост» при сравнении первой (33,00±4,14) и четвертой попыток (2,20±1,03). Аналогичная ситуация наблюдалась и в контрольной группе (рис. 4А). Стоит отметить, что у животных линии Tg6799 уже ко второй попытке наблюдалось статистически значимое ($p \leq 0,001$) уменьшение времени взаимодействия (8,10±2,40) по сравнению с первой попыткой (33,00±4,14), что свидетельствовало о быстром снижении заинтересованности особью противоположного пола (рис. 4А).

При подсадке новой самки в пятой попытке у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция к меньшей заинтересованности (23,40±3,73), чем у животных контрольной группы (28,50±1,30) ($p=0,097$).

Таким образом, у животных линии Tg6799 в возрасте 4 мес. и контрольной группы наблюдался процесс запоминания и, как следствие, распознавания новой особи, однако у животных линии Tg6799 выявлена быстрая потеря интереса к знакомому социальному объекту.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 наблюдалось статистически значимое ($p \leq 0,05$) снижение времени взаимодействия при сравнении первой (37,17±3,38) и четвертой попыток (17,17±4,37) (рис. 4Б). Сходная ситуация наблюдалась и в контрольной группе в возрасте 12 мес.: статистически значимое ($p \leq 0,001$) снижение времени при сравнении первой (41,80±2,52) и четвертой попыток (8,80±1,74). Однако у животных линии Tg6799 в четвертой попытке теста время взаимодействия с уже знакомой особью противоположного пола статистически значимо ($p \leq 0,05$) больше (17,17±4,37) по сравнению с животными контрольной группы аналогичного возраста (8,80±1,74), что указывало на нарушение процесса запоминания у животных линии Tg6799.

При подсадке новой самки в пятой попытке у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция ($p=0,096$) к большей заинтересованности (29,50±4,56) по сравнению с четвертой попыткой (17,17±4,37). Тогда как у животных контрольной группы в возрасте 12 мес.

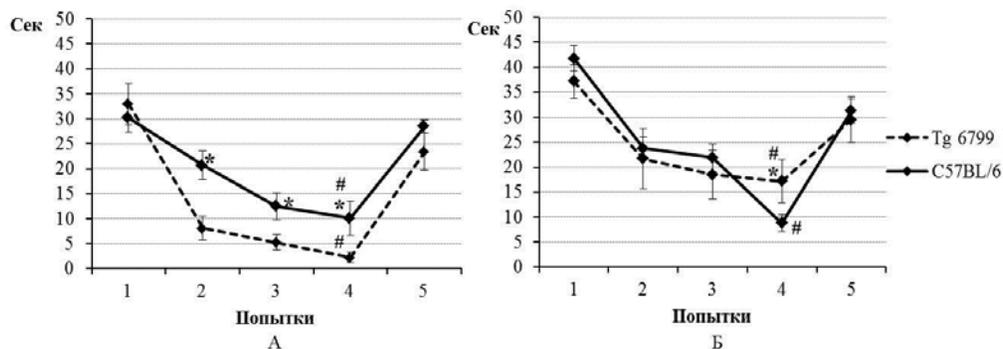


Рис. 4. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Социальный пятипопыточный»: А – время взаимодействия по принципу «голова-хвост» в возрасте 4 мес., Б – время взаимодействия по принципу «голова-хвост» в возрасте 12 мес.; * – $p \leq 0,05$; # – сравнение группы в 1-й и 4-й попытках ($p \leq 0,05$).

при подсадке новой самки в пятой попытке выявлено статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение заинтересованности ($31,30 \pm 2,38$) по сравнению с четвертой попыткой ($8,80 \pm 1,74$).

Таким образом, в опытной группе по мере развития БА отмечалась тенденция к нарушению процесса запоминания и, как следствие, распознавания новой особи, что указывало на расстройство социальной памяти.

В результате проведения теста «Fear conditioning» выявлено, что животные линии Tg6799 в возрасте 4 мес. демонстрировали меньше эпизодов замиранья по сравнению с животными контрольной группы аналогичного возраста (рис. 5А). При этом на протяжении периода тестирования у животных линии Tg6799 наблюдалось формирование условного рефлекса: в частности, количество эпизодов замиранья от 1-го дня ($66,14 \pm 4,65$) (подавался белый шум в сочетании с электрическим сигналом) к 7-му дню ($48,11 \pm 5,30$) (отсутствовал звуковой и электрический сигнал) статистически значимо снизилось ($p \leq 0,05$). В дополнение к этому, на 8-й день тестирования, когда мышь помещали в другую испытательную камеру с черным полом, черно-белыми стенами и освещенностью 30 люкс с подачей звукового, но отсутствующим электрического сигнала, у животных линии Tg6799 наблюдалась тенденция ($p = 0,136$) к увеличению количества эпизодов замиранья ($58,13 \pm 5,30$) в ответ на смену обстановки и присутствие звукового стимула по сравнению с 7-м днем ($48,11 \pm 5,30$). Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных контрольной группы (рис. 5А).

Таким образом, у животных линии Tg6799 формировался условный рефлекс в ответ на неприятный (условный) стимул, что свидетельствовало об отсутствии видимых нарушений ассоциативного обучения и запоминания на начальной стадии развития БА.

С возрастом (в 12 мес.) у животных линии Tg6799 на протяжении периода тестирования количество эпизодов замиранья от 1-го дня ($95,80 \pm 9,62$) к 7-му дню ($56,33 \pm 10,57$) статистически значимо снизилось ($p \leq 0,05$). Подобный эффект наблюдался и у животных контрольной группы (рис. 5Б). Однако на 8-й день тестирования у животных линии Tg6799 количество эпизодов

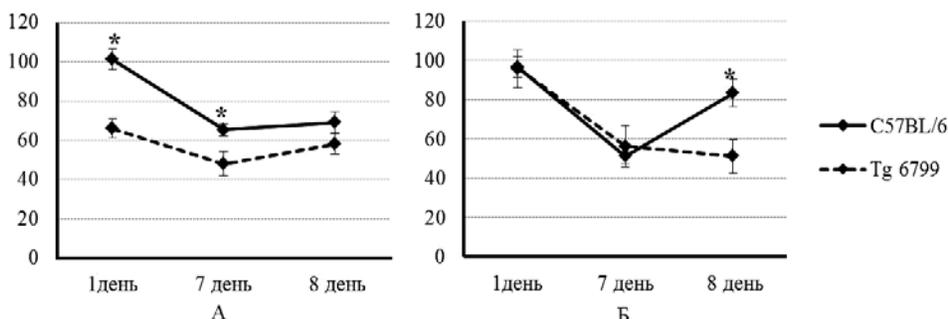


Рис. 5. Результаты нейроповеденческого тестирования животных с генетической моделью БА в тесте «Fear conditioning»: А – эпизоды замиранья в возрасте 4 мес., Б – эпизоды замиранья в возрасте 12 мес.; * – $p \leq 0,05$.

замирания ($51,00 \pm 8,50$) статистически значимо не изменилось ($p=0,758$) по сравнению с 7-м днем тестирования ($56,33 \pm 10,57$) (рис. 5Б). Противоположная ситуация наблюдалась у животных контрольной группы. Так, количество эпизодов замирания в ответ на смену обстановки и присутствие звукового стимула статистически значимо увеличилось ($p \leq 0,001$) при сравнении 8-го и 7-го дня тестирования ($83,00 \pm 6,87$ и $51,00 \pm 3,93$ соответственно) (рис. 5Б).

Показано, что у животных линии Tg6799 по мере развития заболевания наблюдалось нарушение ассоциативного обучения и запоминания (в частности, существенно подавлялся процесс консолидации памяти страха).

Выводы

На основании проведенной батареи нейроповеденческих тестирований можно заключить, что у животных линии Tg6799 по мере развития БА выявлены такие векторы поведения, как: повышение уровня тревожности и заторможенности, нарушение социальных контактов и взаимодействий, а также социального и ассоциативного обучения и запоминания. Все это указывает на расстройство эмоционального поведения, а также долговременной, социальной и эмоциональной памяти. В совокупности полученные данные свидетельствуют о нарушении механизмов, связанных с активностью гиппокампа и миндалины головного мозга, при экспериментальной БА.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

Список литературы

1. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчиков А.А., Оловяникова Р.Я., Салмина А.Б. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте // Успехи геронтологии. 2017. Т. 1. С. 49-56.
2. Cubinková V., Valachová B., Brezovaková V., Szabó R., Zimová I., Kostecká Z., Jadhav S. Next generation tau models in Alzheimer's disease research - virus based gene delivery systems // Acta Virol. 2017. No. 61(1). doi: 10.4149/av.2017.01.13. [Epub ahead of print].
3. Guillozet A.L., Weintraub S., Mash D.C., Mesulam M.M. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment // Arch Neurol. 2003. No. 60(5). P. 729-736. doi:10.1001/archneur.60.5.729.
4. Jacobs S.A., Huang F., Tsien J.Z., Wei W. Social Recognition Memory Test in Rodents // Neuroscience. 2016. No. 6(9). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1804.
5. Leal S.L., Landau S.M., Bell R.K., Jagust W.J. Hippocampal activation is associated with longitudinal amyloid accumulation and cognitive decline // Elife. 2017. No. 6. pii: e22978. doi: 10.7554/eLife.22978. [Epub ahead of print].
6. Leo L.M., Pamplona F.A. Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse // Neuroscience. 2014. No. 4(16). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1211.
7. Lugo J.N., Smith G.D., Holley A.J. Trace fear conditioning in mice // J. Vis. Exp. 2014. No. 85. doi: 10.3791/51180.
8. Mak E., Gabel S., Su L., Williams G.B., Arnold R., Passamonti L., Vazquez Rodríguez P., Surendranathan A., Bevan-Jones W.R., Rowe J.B., O'Brien J.T. Multi-modal MRI investigation of volumetric and microstructural changes in the hippocampus and its subfields in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and dementia with Lewy bodies // Int. Psychogeriatr. 2017. P. 1-11. doi: 10.1017/s1041610216002143. [Epub ahead of print].
9. Martin L., Iceberg E. Quantifying social motivation in mice using operant conditioning // J. Vis. Exp. 2015. No. 102. e53009. doi: 10.3791/53009.
10. Morland R.H., Novejarque A., Spicer C., Pheby T., Rice A.S. Enhanced c-Fos expression in the central amygdala correlates with increased

- thigmotaxis in rats with peripheral nerve injury // *Eur. J. Pain* (Lond. Engl.). 2016. No. 20(7). P. 1140-1154. doi: 10.1002/ejp.839.
11. **Nesteruk M., Nesteruk T., Styczyńska M., Mandecka M., Barczak A., Barcikowska M.** Combined use of biochemical and volumetric biomarkers to assess the risk of conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease // *Folia Neuropathol.* 2016. No. 54(4). P. 369-374. doi: 10.5114/fn.2016.64815.
 12. **Prieto G.A., Trieu B.H., Dang C.T., Bilousova T., Gyls K.H., Berchtold N.C., Lynch G., Cotman C.W.** Pharmacological rescue of long-term potentiation in Alzheimer diseased synapses // *J. Neurosci.* 2017. No. 37(5). P. 1197-1212. doi: 10.1523/jneurosci.2774-16.2016.
 13. **Robinson M., Lee B.Y., Hane F.T.** Recent progress in Alzheimer's disease research, Part 2: Genetics and Epidemiology // *J. Alzheimers Dis.* 2017. doi: 10.3233/jad-161149. [Epub ahead of print].
 14. **Seibenhener M.L., Wooten M.C.** Use of the Open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice // *J. Vis. Exp.* 2015. No. 96. e52434. doi:10.3791/52434.
 15. **Takao K., Miyakawa T.** Light/dark transition test for mice // *J. Vis. Exp.* 2006. No. 1. e104. doi:10.3791/104.
 16. **Thangavel R., Van Hoesen G.W., Zaheer A.** Posterior parahippocampal gyrus pathology in Alzheimer's disease // *Neuroscience.* 2008. No. 154(2). P. 667-676. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.077.
 4. **Jacobs S.A., Huang F., Tsien J.Z., Wei W.** Social Recognition Memory Test in Rodents // *Neuroscience.* 2016. No. 6(9). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1804.
 5. **Leal S.L., Landau S.M., Bell R.K., Jagust W.J.** Hippocampal activation is associated with longitudinal amyloid accumulation and cognitive decline // *Elife.* 2017. No. 6. pii: e22978. doi: 10.7554/eLife.22978. [Epub ahead of print].
 6. **Leo L.M., Pamplona F.A.** Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse // *Neuroscience.* 2014. No. 4(16). doi: https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1211.
 7. **Lugo J.N., Smith G.D., Holley A.J.** Trace fear conditioning in mice // *J. Vis. Exp.* 2014. No. 85. doi: 10.3791/51180.
 8. **Mak E., Gabel S., Su L., Williams G.B., Arnold R., Passamonti L., Vazquez Rodríguez P., Surendranathan A., Bevan-Jones W.R., Rowe J.B., O'Brien J.T.** Multi-modal MRI investigation of volumetric and microstructural changes in the hippocampus and its subfields in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and dementia with Lewy bodies // *Int. Psychogeriatr.* 2017. P. 1-11. doi: 10.1017/s1041610216002143. [Epub ahead of print].
 9. **Martin L., Iceberg E.** Quantifying social motivation in mice using operant conditioning // *J. Vis. Exp.* 2015. No. 102. e53009. doi: 10.3791/53009.
 10. **Morland R.H., Novejarque A., Spicer C., Pheby T., Rice A.S.** Enhanced c-Fos expression in the central amygdala correlates with increased thigmotaxis in rats with peripheral nerve injury // *Eur. J. Pain* (Lond. Engl.). 2016. No. 20(7). P. 1140-1154. doi: 10.1002/ejp.839.
 11. **Nesteruk M., Nesteruk T., Styczyńska M., Mandecka M., Barczak A., Barcikowska M.** Combined use of biochemical and volumetric biomarkers to assess the risk of conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease // *Folia Neuropathol.* 2016. No. 54(4). P. 369-374. doi: 10.5114/fn.2016.64815.
 12. **Prieto G.A., Trieu B.H., Dang C.T., Bilousova T., Gyls K.H., Berchtold N.C., Lynch G., Cotman C.W.** Pharmacological rescue of long-term potentiation in Alzheimer diseased synapses // *J. Neurosci.* 2017. No. 37(5). P. 1197-1212. doi: 10.1523/jneurosci.2774-16.2016.
 13. **Robinson M., Lee B.Y., Hane F.T.** Recent progress in Alzheimer's disease research, Part 2: Genetics and Epidemiology // *J. Alzheimers Dis.* 2017. doi: 10.3233/jad-161149. [Epub ahead of print].

References

1. **Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Volkova V.V., Chernyh A.I., Shabalova A.A., Semenchukov A.A., Olovyannikova R.Ya., Salmina A.B.** Batareya testov dlya povedencheskogo fenotipirovaniya stareyushchih zhivotnyh v ehksperimente // *Uspekhi gerontologii.* 2017. T. 1. S. 49-56.
2. **Cubinková V., Valachová B., Brezovaková V., Szabó R., Zimová I., Kostecká Z., Jadhav S.** Next generation tau models in Alzheimer's disease research - virus based gene delivery systems // *Acta Virol.* 2017. No. 61(1). doi: 10.4149/av. 2017. 01. 13. [Epub ahead of print].
3. **Guillozet A.L., Weintraub S., Mash D.C., Mesulam M.M.** Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment // *Arch Neurol.* 2003. No. 60(5). P. 729-736. doi:10.1001/archneur.60.5.729.

14. *Seibenhener M.L., Wooten M.C.* Use of the Open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice // *J. Vis. Exp.* 2015. No. 96. e52434. doi:10.3791/52434.
15. *Takao K., Miyakawa T.* Light/dark transition test for mice // *J. Vis. Exp.* 2006. No. 1. e104. doi:10.3791/104.
16. *Thangavel R., Van Hoesen G.W., Zaheer A.* Posterior parahippocampal gyrus pathology in Alzheimer's disease // *Neuroscience.* 2008. No. 154(2). P. 667-676. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.03.077.

Behavioral phenotypic analysis of animals with a genetic model of Alzheimer's disease

Ya.V. Gorina, Yu.K. Komleva, O.L. Lopatina, A.I. Chernykh, A.B. Salmina

The aim of the study was to research the development of social and cognitive impairments in the process of ontogenesis in animals with a genetic model of Alzheimer's disease.

The object of the study is a genetic model of Alzheimer's disease is the B6SLJ-Tg line mice (APP^{SweF10n}, PSEN1 * M146L * L286V) 6799Vas, males aged 4 months. Control group – C57BL/6 x SJL mice, males aged 4 months. Neurobehavioral testing included the test «Open field», elevated plus maze, Light/dark transition test, a Three-chamber social test, Social recognition memory test in rodents, test «Fear conditioning».

We identified features of behavioral in animals Tg6799 line with the development of Alzheimer's disease. It increased the level of anxiety and lethargy, impaired social contacts and interactions, as well as spatial, social and associative learning and memory. Together, this indicates a disorder of emotional behavior, as well as long-term, social, spatial and emotional memory.

Key words: genetic animal model, Alzheimer's disease, memory, behavior.