

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 3, 2021

Специальный выпуск: Нейробиология развития.

Редакторы выпуска В. В. Раевский, И. С. Захаров

Обзоры и теоретические статьи

Моноамины как адаптивные регуляторы развития: феномен и механизмы действия <i>Е. Е. Воронежская, В. И. Мельникова, Е. Г. Ивашкин</i>	295
Серотониновая система в оогенезе млекопитающих <i>Ю. Б. Шмуклер, Н. М. Алешина, Л. А. Мальченко, Д. А. Никишин</i>	306
Высшие когнитивные способности птиц: сравнительно-эволюционный анализ <i>З. А. Зорина, Т. А. Обозова, А. А. Смирнова</i>	321
Развитие и строение нервной системы у форонид: эволюционная значимость <i>Е. Н. Темерева</i>	342

Физиологические механизмы поведения животных: восприятие внешних стимулов, двигательная активность, обучение и память

Тревожное поведение родителей в период формирования оборонительной реакции у потомства оказывает влияние на параметры ЭЭГ птенцов мухоловки-пеструшки <i>Е. В. Корнеева, Л. И. Александров, Т. Б. Голубева</i>	354
---	-----

Экспериментальная патология высшей нервной деятельности

Влияние ранней социальной изоляции на двигательную активность и способность к обучению в зрелом возрасте крыс WAG/Rij <i>А. Ю. Шишелова, В. В. Раевский</i>	359
Хронический стресс, вызванный содержанием в условиях дефицита гнездового материала в раннем постнатальном периоде, оказывает влияние на поведение и стресс-реактивность самцов крыс <i>М. Ю. Степаничев, О. А. Недогреева, М. А. Климанова, Ю. В. Моисеева, М. В. Онуфриев, Н. А. Лазарева, Н. В. Гуляева</i>	370
Зависимое от пола влияние стресса самцов крыс на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков <i>Н. Э. Ордян, О. В. Малышева, Г. И. Холова, В. К. Акулова, С. Г. Пивина</i>	387
Влияние умеренного хронического стресса самок крыс до и во время беременности на сенсомоторное развитие, уровень тревожности и когнитивные функции потомства <i>О. В. Яковлева, К. С. Богатова, В. В. Скрипникова, Г. Ф. Ситдикова</i>	400
Пренатальная гипоксия нарушает обонятельную функцию в постнатальном онтогенезе крыс <i>Н. М. Дубровская, Д. С. Васильев, Н. Л. Туманова, О. С. Алексеева, Н. Н. Наливаева</i>	415
Ассоциированные с возрастом изменения исследовательской активности в тесте “Открытое поле” у крыс, переживших пренатальную гипоксию <i>В. А. Стратиллов, О. В. Ветровой, Л. А. Ватаева, Е. И. Тюлькова</i>	428

Contents

Vol. 71, No. 3, 2021

Special Issue: Neurobiology of Development

V. V. Raevsky and I. S. Zakharov (Issue Editors)

Reviews and theoretical articles

- Monoamines as adaptive developmental regulators: phenomenon and mechanisms of action
E. E. Voronezhskaya, V. I. Melnikova, E. G. Ivashkin 295
- Serotonin system in oogenesis of mammals
Yu. B. Shmukler, N. M. Alyoshina, L. A. Malchenko, D. A. Nikishin 306
- Cognitive abilities of birds: comparative evolutionary analysis
Z. A. Zorina, T. A. Obozova, A. A. Smirnova 231
- Development and organization of the nervous system in phoronids: evolutionary significance
E. N. Temereva 342
-

Physiology of behavior: perception, locomotion, learning and memory

- Parents' anxiety level during the development of defense behavior in offspring affects EEG parameters in pied flycatcher nestlings
E. V. Korneeva, L. I. Alexandrov, T. B. Golubeva 354
-

Experimental pathology of higher nervous activity

- The influence of early social isolation on motor activity and learning ability in the mature age of WAG/Rij rats
A. Yu. Shishelova, V. V. Raevsky 359
- Chronic stress induced by housing under the limited bedding and nesting conditions during early postnatal ontogeny affects behavior and stress-responsiveness in male rats
M. Yu. Stepanichev, O. A. Nedogreeva, M. A. Klimanova, Yu. V. Moiseeva, M. V. Onufriev, N. A. Lazareva, N. V. Gulyaeva 370
- Sex-dependent influence of male rat stress on the memory and expression of the insulin-like growth factor 2 gene in the offspring brain
N. E. Ordyan, O. V. Malysheva, G. I. Holova, V. K. Akulova, S. G. Pivina 387
- Effects of mild chronic stress of female rats before and during pregnancy on sensomotor development, anxiety and cognitive functions of the offspring
O. V. Yakovleva, K. S. Bogatova, V. V. Skripnikova, G. F. Sitdikova 400
- Prenatal hypoxia impairs olfactory function in postnatal ontogenesis of rats
N. M. Dubrovskaya, D. S. Vasilev, N. L. Tumanova, O. S. Alekseeva, N. N. Nalivaeva 415
- The "open field" test reveals age-associated alterations in exploratory activity of rats exposed to prenatal hypoxia
V. A. Stratilov, O. V. Vetrovoy, L. A. Vataeva, E. I. Tyulkova 428
-
-

УДК 573.7, 575.87

МОНОАМИНЫ КАК АДАПТИВНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РАЗВИТИЯ: ФЕНОМЕН И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

© 2021 г. Е. Е. Воронежская^{1,*}, В. И. Мельникова¹, Е. Г. Ивашкин^{1,2,3}

¹ ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

³ Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA

*e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

Поступила в редакцию 10.12.2020 г.

После доработки 17.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Значительная часть интегративных функций в организме осуществляется через моноаминергические системы: комплекс из низкомолекулярного медиатора — биогенного амина (серотонина и дофамина), ферментов его метаболизма и рецепторов. Это делает моноамины важнейшим компонентом нервной и эндокринной системы в организме, определяющим адаптационные способности организма в непрерывно меняющихся условиях окружающей среды. На примере собственного экспериментального материала и существующей литературы дается представление о регуляторной роли моноаминов в процессе развития, начиная со стадии яйцеклетки и раннего дробления и до формирования нейронных сетей, лежащих в основе поведения. Рассмотрены классический лиганд-рецепторный механизм и механизм неканонической модификации внутриклеточных белков (моноаминирование) и их вклад в адаптивную регуляцию в разные периоды развития. Показана роль моноаминов и моноаминирования как консервативного фактора, связывающего сигналы окружающей среды и физиологию развивающегося организма.

Ключевые слова: моноамины, серотонин, онтогенез, серотонилирование белков, лиганд-рецепторные взаимодействия, материнский эффект

DOI: 10.31857/S0044467721030126

С момента открытия нейрональных моноаминов — серотонина и дофамина — в середине XX века ученые нашли огромное количество функций, в которых участвуют эти вещества. Пожалуй, трудно найти такой физиологический процесс во взрослом организме, в котором серотонин и дофамин не были бы задействованы в той или иной степени. У человека это такие жизненно важные функции, как регуляция сна и бодрствования, агрессия и тревожность, пищеварение, воспаление и многое другое. Исследованию механизмов, обеспечивающих многогранные регуляторные функции моноаминов, посвящено огромное количество работ. На сегодняшний день изучены на молекулярном уровне процессы синтеза и деградации серотонина и дофамина, мембранный транспорт, упаковка и выброс из везикул, особенности работы широкого спектра рецепторов. В последние десятиле-

тия было показано, что регулярные механизмы действия моноаминов также включают в себя сложные многокомпонентные системы, в которых важную роль играет баланс моноаминов внутри и снаружи клеток (Walther et al., 2003; Duerschmied, Vode, 2009). Такие системы могут существовать как в пределах единичных клеток, так и быть разнесены на тканевом, органном и даже организменном уровне (Paulmann et al., 2009), позволяя говорить о моноаминах как о системных интегративных модуляторах (Sakharov, 1990), в частности, для нейральных процессов (Сахаров, 1990; Сахаров, 2012). В данной работе мы не будем затрагивать собственно нейрональные адаптации (изменения на уровне отдельных нервных клеток или нервных сетей), в которых участвуют моноамины. Этой теме посвящено огромное количество работ. Мы же представляем моноамины как одно из зве-

ньев адаптаций на уровне формирующегося организма, позволяющее увеличить разнообразие физиологических реакций отдельных особей, происходящее на базе одной и той же генетической программы (без изменения базовой генетической основы). Увеличение пластичности в процессе развития приводит к расширению (или направленному сдвигу) границ реакции в пределах всей популяции и таким образом повышает устойчивость ее существования при меняющихся внешних условиях. Именно в контексте значения для формирования экологической приспособленности и будет рассмотрена роль моноаминов в период раннего развития эмбриона или зародыша.

В представленной работе будет дано представление о присутствии и роли моноаминов в раннем развитии, возможных механизмах долговременных моноамин-зависимых регуляций, являющихся основой адаптаций на уровне всего организма, рассмотрены перспективы подхода к моноаминам с точки зрения их отложенного действия при формировании паттернов развития и поведения.

ПРЕДПОСЫЛКИ УЧАСТИЯ МОНОАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИЯХ НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ

Еще в конце 50-х – начале 60-х годов XX века было впервые обнаружено, что некоторые моноамины и другие низкомолекулярные вещества, являющиеся во взрослом организме нейромедиаторами (нейротрансмиттерами), присутствуют на стадиях раннего развития задолго до появления нервной системы (Nutanoi, 1955; Бузников, Манухин, 1961). В дальнейшем было показано, что серотонин содержится в ооцитах и дробящихся эмбрионах животных самой разной систематической принадлежности: полихет (Emanuelsson, 1974), немертин, (Buznikov et al., 1964), головожаберных моллюсков (Buznikov et al., 2003), головохордовых (Candiani et al., 2001), иглокожих, костистых рыб (Buznikov et al., 1964), амфибий (Fukumoto et al., 2005; Beyer et al., 2012; Nikishin et al., 2012), птиц (Emanuelsson et al., 1988) и млекопитающих (Basu et al., 2008). В экспериментальных работах было продемонстрировано, что моноамины вовлечены в регуляцию широкого спектра процессов на донервных стадиях развития у самых разных животных (см. обзор Buznikov et al., 2001; Бузников, 2007). Показано, что на ран-

них стадиях развития серотонин и дофамин действуют как нейрогормоны, воспринимаемые клетками-мишенями зародыша (Ugrumov, 1997).

Больше всего данных в литературе имеется о ранней моноаминергической системе млекопитающих (Burden, Lawrence, 1973; Neilson et al., 2000; П'кова et al., 2004; Amireault, Dubé, 2005a,b; Hinckley et al., 2005; Basu et al., 2008; Никишин и др., 2018b). Известно, что сами ооциты не имеют фермента синтеза серотонина (триптофангидроксилазы), в то время как обкладочные клетки и клетки Граафова пузырька способны синтезировать и выделять серотонин, обеспечивая им расположенные вблизи ооциты и даже ранние эмбрионы (Amireault, Dubé, 2005a; Dubé, Amireault, 2007; Никишин и др., 2018a; Nikishin et al., 2019). Было показано наличие мРНК рецепторов к серотонину нескольких типов в развивающихся бластомерах, а также экспрессия практически всех компонентов серотонинергической системы в различных частях формирующегося зародыша (Amireault, Dube 2005a; Никишин и др., 2018b). Так, мембранный транспортер серотонина (SERT) присутствует в клетках фолликула мыши, а также в ооцитах и ранних эмбрионах. У беспозвоночных животных (моллюсков, морских ежей и полихет) в дробящихся бластомерах присутствуют и функционально активны ферменты синтеза серотонина и мембранные транспортеры (Buznikov et al., 2003; Ivashkin et al., 2012, 2015; Nikishin et al., 2016; Никишин и др., 2018b). Наличие рецепторов к моноаминам и мембранных транспортеров создает возможность для локальной регуляции процессов, происходящих в клетках зародыша во время развития. Причем такая система способна чутко реагировать на изменение уровня моноаминов как в организме родителя (непосредственно во время прохождения или нахождения зародыша в репродуктивных путях), так и во внешней среде (в случае развития зародыша вне материнского организма, например, в отложенном яйце). В свою очередь, уровень моноаминов в материнском организме отражает изменения в физиологии и функциональном состоянии конкретной особи. Так, уровень серотонина, например, зависит от сезона (Ivashkin et al., 2015), существенно меняется при состоянии сытости-голода, после активной физической нагрузки (Дьяконова, 2012; Aonuma et al.,

2020), при определенных стрессовых воздействиях (Fossat et al., 2014).

Таким образом, наличие полноценно функционирующих компонентов моноаминергической системы (наиболее полно изученной для серотонина), начиная с самых ранних стадий эмбрионального развития, динамическое изменение уровня моноаминов вокруг зародыша в процессе развития в ответ на модуляцию уровня моноаминов в материнском организме при воздействии внешних и внутренних стимулов, создает все предпосылки для участия серотонина и дофамина в долговременных регуляторных процессах в течение всего процесса развития, начиная с самых ранних донервных стадий.

РЕЦЕПТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИОННЫХ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ РЕГУЛЯЦИЙ

Одним из примеров регуляции эмбрионального развития через моноаминергическую систему является модуляция темпов эмбрионального развития и локомоторных программ зародыша у пресноводных брюхоногих моллюсков. У большинства гастропод оплодотворение происходит внутри материнского организма, после оплодотворения яйцо проходит достаточно длинный путь по каналам репродуктивной системы, где покрывается несколькими оболочками и упаковывается в яйцевой кокон, который моллюск и откладывает в виде кладки (Мещеряков, 1975; Коене, 2010). Однако, несмотря на кажущуюся простоту процесса размножения моллюсков, он включает в себя и систему регуляций, работающих после откладки яиц. В ответ на специфический фактор, выделяемый взрослыми в случае неблагоприятных условий (например, недостатка пищи или скученности в популяции), развивающиеся зародыши могут отвечать изменением темпов развития. При этом один и тот же выделяемый взрослыми животными фактор действует разнонаправленно на эмбрионы разного возраста: зародыши, находящиеся на ранних стадиях развития, замедляются, вплоть до полной остановки, в то время как особи, вступившие в метаморфоз, наоборот, ускоряют свое развитие (Воронежская, Хабарова, 2003; Voronezhskaya et al., 2004). Сигнальный фактор от взрослых действует не сам по себе, а через активацию моноаминергических хемосенсорных нейронов, которые, в свою очередь, начинают активно

синтезировать и выделять во внутреннюю среду зародыша серотонин (у зародышей катушки *Helisoma trivolvis*) или дофамин (у зародышей прудовика *Lymnaea stagnalis*).

В основе скоординированной реакции всего организма, который при этом еще и находится в процессе непрерывного развития, лежит баланс экспрессии рецепторов нейромедиаторов и связанных с ними G-белков (Voronezhskaya et al., 2012; Glebov et al., 2014). У *Helisoma* в процессе развития в клетках эмбриона экспрессированы как минимум четыре типа серотониновых рецепторов (5-НТ₁, 5-НТ₄, 5-НТ₅, 5-НТ₇). На ранних стадиях преобладают рецепторы 5-НТ_{4/7}, в то время как на поздних 5-НТ_{1/5} (и связанные с этими типами рецепторов G-белки: G_{os} и G_{oi}). Таким образом, направление ответа определяет пропорциональное изменение темпорального (зависимого от стадии развития) паттерна экспрессии рецепторов, активируемых одним и тем же лигандом — серотонином, выделяемым сенсорными нейронами зародыша в ответ на химический сигнал от взрослых особей. В результате преобладающей активации рецепторов 5-НТ_{4/7} и внутриклеточных сигнальных каскадов, опосредованных через G_{os} белки, происходит замедление темпов развития на ранних стадиях, в то время как активация 5-НТ_{1/5} и G_{oi}-опосредованных путей вызывает ускорения развития на стадиях после метаморфоза (Glebov et al., 2014).

Одновременно с темпами развития меняются и такие важнейшие поведенческие паттерны эмбриона, как локомоторная и жевательная активность (обеспечивающие прогрызание яйцевых оболочек и выход из яйца), а также ряд физиологических процессов, таких как частота сердечных сокращений (Воронежская и др., 2007; Khabarova, Voronezhskaya, 2012). То есть, через серотонинергическую систему, происходит интеграция скоординированного ответа развивающегося (находящегося в яйце) зародыша на внешний стимул, которая позволяет пластически подстроиться к имеющимся на момент выхода из яйца условиям. Такой механизм позволяет переждать неблагоприятные условия зародышам ранних стадий развития и поскорее завершить развитие зародышам поздних стадий, направленно сдвигая стандартную норму реакции (в случае моллюсков модулируя средний темп развития).

Моноаминергические нейроны, продуцирующие серотонин, дофамин и гистамин, являются одними из самых ранних нервных клеток, дифференцирующихся в зародышах и личинках многих беспозвоночных животных. В дальнейшем моноамины регулируют различные поведенческие паттерны личинки, участвуют в таких важных для жизненного цикла регуляторных процессах, как, например, метаморфоз (Schmidt-Rhaesa et al., 2016), или индивидуальная приспособленность в различные фазы жизненного цикла (Issa et al., 2020). Известны и примеры, когда нарушение в формировании определенных нейронов приводит к сбоям адаптивных регуляций, не позволяя, например, личинкам нематоды *Caenorhabditis elegans* перейти в ждущую “дауэровскую” форму (Sze et al., 2000).

Таким образом, регуляторные механизмы, в основе которых лежит баланс активности рецепторов разного типа, потенциально не ограничиваются моллюсками и темпами эмбрионального развития. Во многих случаях они обеспечивают индивидуальную пластичность в процессе развития, лежащую в основе разнообразия нормы реакции отдельных особей в популяции.

МОНОАМИНИЛИРОВАНИЕ КАК РЕГУЛЯТОРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССОВ РАЗВИТИЯ

Для серотонина, как и других моноаминов, характерно широкое вовлечение в гуморальные регуляторные механизмы. Однако разнообразие наблюдающихся при этом физиологических эффектов явно не укладывается в то, что мы наблюдаем при действии моноаминов как нейромедиаторов, осуществляющих передачу сигнала между клетками и меняющих ответ нейронов или работу нервных сетей (нейрональная адаптивность или пластичность). Ученые, работающие с данными системами, давно предполагали, что помимо лиганд-рецепторного регуляторного действия моноаминов, как правило, вовлеченного в быстрые по времени протекающие процессы, существуют и иные механизмы, более подходящие для растянутых во времени (отложенных и долговременных) вариантов ответа.

Еще в работах академика Х.С. Коштыянца были получены данные, указывающие на то, что моноамины действуют не только через мембранные рецепторы, но и имеют эффек-

ты, основанные на их вовлечении во внутриклеточные процессы. К настоящему моменту накоплен большой пул данных, подтверждающих, что различные лиганды, действующие G-белки (GPCR-coupled), связаны с внутриклеточными мембранами, где они активируют сигнальные системы, отличающиеся или даже уникальные по сравнению с действием тех же лигандов на рецепторы, находящиеся на поверхностной мембране клетки (Jong et al., 2018). Получены свидетельства и о присутствии таких явлений в развитии (Шмуклер, Никишин, 2018). Не так давно к каноническому рецепторному механизму, при котором связывание моноамина с рецептором является триггером разнообразных клеточных процессов, добавился неканонический механизм действия моноаминов – через посттрансляционную модификацию внутриклеточных белков (Watt et al., 2009; Bader, 2020).

Регуляции физиологических процессов, основанные на ковалентном связывании моноаминов с внутриклеточными белками посредством транслугутиминаз, широко распространены у млекопитающих и человека (Walther et al., 2011; Muma, Mi, 2015). В большинстве случаев в активацию таких процессов также вовлечены и классические рецепторные механизмы. Однако в качестве основного сигнального события внутри клетки выступают клеточный метаболизм и кинетика транспорта моноамина через клеточную мембрану (Pavone, Norris, 2013; Tanaka et al., 2014). Попадая внутрь клетки и накапливаясь в достаточном количестве, серотонин, дофамин, а также другие моноамины выступают как биохимический субстрат для реакции трансамидации. С помощью специфического фермента – транслугутиминазы – происходит ковалентное присоединение моноамина по остаткам глутамината в белке. В итоге происходит прямая модуляция эффекторных функций белков: изменяется связывание с другими белками, продолжительность их жизни в клетках, возможность к полимеризации и многое другое. Подобный процесс получил название моноаминилирования в целом. И, соответственно, серотонинилирования, дофаминилирования, гистаминилирования в зависимости от конкретного вовлеченного моноамина (Muma, Mi, 2015). Такой механизм действия, с одной стороны, происходит медленнее, чем активация внутриклеточных путей, опосредованных G-белками, а с другой стороны, приводит к появле-

нию модифицированных белковых молекул, действие которых сохраняется до момента их утилизации в клетке. Многие авторы высказывают предположение, что именно такой механизм включается в тех случаях, когда наблюдается долговременная и отсроченная регуляция какого-либо физиологического процесса со стороны моноаминов. Таким образом, например, происходит активация белков семейства малых ГТФаз (Walther et al., 2003; Mercado et al., 2011), модуляция агрегации белков внеклеточного матрикса, включая фибриноген и некоторые белки глиальных клеток (Hummerich et al., 2010; 2012; 2015), реорганизация цитоскелета и изменение матрикса клеток сердечных клапанов вследствие серотонилирования филамина А (Pavone, Norris, 2013). Есть данные, что такая модификация, как серотонилирование, способствует убиквитин-зависимой утилизации белков (Guilluy et al., 2007), определяя время жизни и функциональной активности белка в клетке.

Наконец, было обнаружено, что моноамилирование не является прерогативой млекопитающих и не ограничено физиологией клеток на финальных стадиях дифференцировки. В раннем развитии животных серотонилирование впервые было описано на модели развития брюхоногих моллюсков. Было обнаружено, что повышение уровня серотонина в дробящихся бластомерах приводит к отложенным и долговременным изменениям в развитии эмбрионов и поведении молодых особей (Ivashkin et al., 2015). В ответ на повышение серотонина как непосредственно в дробящихся бластомерах, так и в организме матери (на самых ранних, донервных стадиях развития), у зародышей прудовиков меняется динамика темпа развития — изменяется картина роста по стадиям. Позднее эффект проявляется и в поведении животных. Существенно повышается скорость вращения в яйце. Вылупившиеся ювенильные моллюски стремятся выползти из воды, начинают преимущественно использовать не ресничный, а мышечный тип локомоции. По достижении половой зрелости такие улитки демонстрируют повышенную яйценоскость. Все эти признаки являются значимыми компонентами программы расселения. В норме аналогичные комплексы поведения можно наблюдать у моллюсков, родившихся в весенне-летний период, в который происходит интенсивное расселение этого вида. С другой стороны, именно весной у половозрелых животных на-

блюдается максимальный уровень серотонина в определенных участках женской части репродуктивной системы. Оказалось, что именно в чувствительный к уровню серотонина период на ранних стадиях развития у зародышей активно происходит серотонилирование и выявляются характерные модифицированные белки, а ингибирование транскламиназ полностью снимает все эффекты повышения уровня серотонина у раннего зародыша. Таким образом, серотонилирование белков в клетках формирующегося зародыша выступает как звено, связывающее сезонные изменения уровня серотонина в материнском организме и подстройку поведенческих паттернов и физиологических параметров потомков к конкретным условиям среды. В данном случае моноамилирование выступает как механизм, интегрирующий физиологические и экологические аспекты жизни животного.

В приведенном выше случае серотонин выступает как медиатор целого ряда материнских эффектов — адаптационных изменений, носящих долговременный характер и проявляющихся в разнообразии фенотипа потомков при одном и том же исходном генотипе. Множество материнских эффектов было описано у самых разных животных (Mousseau, Fox, 1998; Räsänen, Kruuk, 2007). В этих явлениях участвуют как ряд прямых сигнальных механизмов (St-Pierre et al., 2016), так и эпигенетические процессы на основе метилирования—деметиляции ДНК (Cooney et al., 2002). Факторы внешней среды, такие, как разные уровни материнской заботы (Weaver et al., 2004), диета взрослой самки (Cooney et al., 2002; Waterland, Jirtle, 2003), травмирующие переживания у самцов, сочетанные с запахом (Dias, Ressler, 2014), вызывают комплексный ответ, определяющий фенотип потомков, в котором эпигенетические процессы являются конечным интегратором. Многообразие материнских и отцовских эффектов задействует множество связей между разными механизмами их реализации. Одним из таких недавно описанных механизмов является связь между метилированием, серотонилированием и дифференцировкой нейронов (Farrelli et al., 2019). В серотонинергических нейронах серотонилирование гистона H3 способствует связыванию транскрипционного фактора IID (TFIID) с соответствующими участками в молекуле ДНК, определяя уровень экспрессии TFIID-зависимых генов

регуляторной сети. Блокада серотонилирования гистона H3 нарушает процесс дифференцировки серотонинергических нейронов. В этой работе впервые было доказано, что серотонин может напрямую действовать на ядерные белки в клетках, регулируя экспрессию генов.

В эмбриональном развитии серотонилированные белки были обнаружены в ядрах клеток дробящихся зародышей морского ежа, моллюска и костистой рыбы. Паттерн распределения серотонилированных белков в ядрах клеток определялся уровнем серотонина в развивающихся зародышах (Ivashkin et al., 2019). Поскольку у зародышей серотонилирование ядерных белков происходит не только в специфических уже дифференцированных клетках (нейронах), но и в плюрипотентных клетках эмбриона, можно предположить, что такой механизм выступает потенциальным регулятором дифференцировки широкого спектра клеток и тканей.

ЗНАЧЕНИЕ МОНОАМИН-ОПОСРЕДОВАННЫХ РЕГУЛЯЦИЙ В РАЗВИТИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Проблема влияния моноаминов на процесс развития сохраняет свою актуальность также и для млекопитающих и человека. Моноаминергическая система является высококонсервативной, что дает возможность не только соотносить данные, полученные на далеко отстоящих в филогенетическом отношении организмах, но и проводить прямые параллели между экспериментами на модельных организмах и отклонениями в экспрессии компонентов моноаминергической системы у человека. Значение активности моноаминергической системы во время раннего развития изучено менее всего и часто не учитывается в разработке подходов к терапии взрослого организма.

Как уже упоминалось выше, на самых ранних этапах онтогенеза, подобно беспозвоночным животным с анцестральным типом развития, созревающий ооцит, зигота и ранний зародыш млекопитающих находятся под непосредственным влиянием моноаминов материнского организма. Серотонин в физиологических концентрациях определяется в гонадах и половых путях млекопитающих (Amireault, Dubé, 2005b; Dubé, Amireault, 2007). Созревающий ооцит и ранний зародыш способны захватывать серотонин из окружающей среды (Никишин и др., 2018a).

В дальнейшем (на постимплантационных стадиях развития) ведущим источником серотонина для плода становится плацента. Экспрессия обоих ферментов синтеза серотонина (триптофангидроксилазы 1 и декрбокксилазы ароматических аминокислот), а также синтез серотонина были подтверждены в плаценте с 10-го дня эмбрионального развития у мышей (Bonnin et al., 2011) и около 11-й гестационной недели у человека (Bonnin et al., 2011). В этот период материнский триптофан (и, возможно, 5-НТР, непосредственный биохимический предшественник синтеза серотонина) может служить источником серотонина у плода. Плацента непроницаема для серотонина матери, что было подтверждено экспериментами на животных с нокаутами SERT и прямой перфузией плаценты *ex vivo* (Bonnin, Levitt, 2011; St-Pierre et al., 2016), но сама способна синтезировать серотонин из поступающих из материнского организма биохимических предшественников. Ведущая роль плаценты в поддержании необходимого уровня серотонина у плода сохраняется у мышей в период с 10-го по 15-й день эмбрионального развития. Позднее возрастает синтез серотонина собственными тканями плода, в частности, клетками мозга и желудочно-кишечного тракта. Таким образом, в развитии млекопитающих происходит прогрессивное переключение источников серотонина с материнского на плацентарный и на эндогенные источники плода.

Существенно, что каждый из этих этапов по-разному чувствителен к внешним факторам: как сигналам, поступающим из организма матери, так и к сигналам из окружающей среды. Например, показано, что умеренный стресс или воспаление у матери приводит к повышению синтеза серотонина в плаценте и возрастанию его уровня в тканях плода (St-Pierre et al., 2016; Chen et al., 2020). При этом именно плацентарный серотонин, поступающий к формирующимся корковым структурам плода значительно раньше, чем серотонин, синтезируемый нервными клетками самого эмбриона, оказывает ключевое влияние на формирование нейрональных структур в коре (Vitalis et al., 2013). У человека описаны многочисленные мутации генов SERT и рецепторов серотонина, а также их связь с нарушениями процесса развития, приводящими к поведенческим расстройствам.

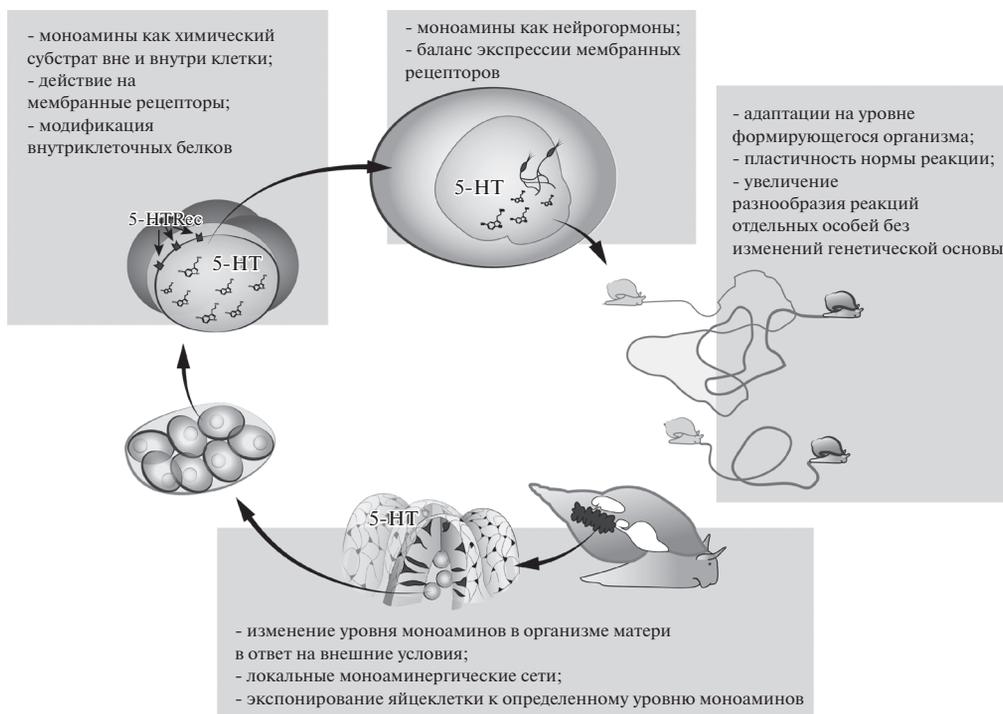


Рис. 1. Представление о регуляторной роли моноаминов и механизмах их действия на разных стадиях развития на примере жизненного цикла моллюска.

Fig. 1. Schematic representation of monoamines regulatory role and suggested mechanisms in the course of development (on the example of the molluscan life cycle).

ствам в постнатальном онтогенезе. Во многих исследованиях подчеркивается значение изменений уровня серотонина в организме матери, плаценте и тканях плода в критические периоды развития и связь этих изменений с возрастающими рисками таких психических заболеваний, как тревожность, депрессия, расстройства аутичного спектра. Авторы обзоров по данной тематике призывают к более глубокому исследованию всех компонентов серотонинергической системы как матери, так и плода, участвующих в таком перинатальном программировании, предлагают обращать больше внимания на модификации этой системы с целью выявления ранних биомаркеров психических расстройств (Sato, 2013; St-Pierre et al., 2016).

Предварительные результаты транскриптомного анализа, полученные в нашей лаборатории, показывают, что модуляция уровня материнского серотонина на самых ранних стадиях развития млекопитающих способна оказывать значимое влияние на уровень экспрессии большого количества генов в бластоцистах мышей, вовлеченных в процессы миграции, клеточной адгезии, ионного транс-

порта. Все перечисленные выше факты позволяют говорить о моноaminaх и в первую очередь о серотонине как о значимых эпигенетических факторах в процессе развития. При этом конкретный эффект действия определяется стадией развития эмбриона, моментом дифференцировки определенных структур и экспрессией рецепторов и транспортеров моноаминов на специфических клетках.

Несмотря на широкий спектр описанных физиологических эффектов серотонина в развитии млекопитающих и человека, до настоящего времени нет ясности, какие именно молекулярные механизмы лежат в основе обнаруженных эпигенетических эффектов. Долговременные трансклутаминаз-опосредованные модификации белков представляются нам одними из вероятных кандидатов на такую роль. Как видно из приведенной выше литературы, локальный уровень моноаминов и, в частности, серотонина как субстрата для трансклутаминаз является значимым модулятором формирования различных функциональных систем. Опять же подчеркнем, что на разных стадиях эмбрионального развития затрагиваются компоненты разных

функциональных систем, не ограниченных только нервной тканью. Кроме эффектов на собственно серотонинергические нейроны (Farrelly et al., 2019), показано, что серотонинирование задействовано в формировании иммунной системы (Ahern, 2011), развитии иммунного ответа (Abdala-Valencia et al., 2012), осуществлении связи нервной и иммунной систем (Baganz, Blakely, 2012), вовлечено в регуляцию привлечения остеокластов при росте и развитии костной ткани (Chabbi-Achengli et al., 2012). Эти данные позволяют говорить о целой аутокринно-паракринной сети на основе локальных серотонинергических систем, тесно скоординированных с нервной системой (Amireault et al., 2013).

ВЫВОДЫ

Таким образом, активация разных мембранных рецепторов, повышение внутриклеточного уровня серотонина (моноаминов) за счет работы транспортеров, моноамилирование структурных и регуляторных белков, зависимость уровня моноаминов матери и плода от внешних факторов — совокупность и взаимосвязь этих механизмов создают молекулярно-биохимическую основу для формирования адаптивной пластичности в процессе развития (рис. 1). Можно считать, что в настоящее время открывается новая страница в исследовании эффектов моноаминов. Становится понятным, в каком месте искать механизмы, лежащие в основе их отставленных долговременных эффектов, которые невозможно было объяснить, основываясь только на их классическом рецепторном действии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы обзора признательны всем соавторам, вместе с которыми проводились оригинальные исследования. А также благодарны Павлу Ерохову, Федору Шкилю, Андрею Чагину и Игорю Адамейко за плодотворные дискуссии по представленной тематике. Благодарим Ольгу Харченко за художественную иллюстрацию к статье.

Исследование осуществлялось в рамках реализации Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0020, работы на экспериментальной модели позвоночных животных проводились при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 17-14-01353). Оригинальные исследования авторов выполнены с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А., Манухин Б.Н. Серотонин-подобные вещества в эмбриогенезе некоторых брюхоногих моллюсков. Журн. общ биол. 1961. 22: 223–229.
- Бузников Г.А. Донервные транмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. Онтогенез. 2007. 38 (4): 262–270.
- Воронежская Е.Е., Хабарова М.Ю. Функция апикального органа в развитии беспозвоночных. ДАН. 2003. 390 (2): 272–275.
- Воронежская Е.Е., Хабарова М.Ю., Чабан А.К., Незлин Л.П. Влияние химической сигнализации на реализацию моторных программ в эмбриогенезе легочных моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Helisoma trivolvis*. Онтогенез. 2007. 38 (2): 94–104.
- Дьяконова В.Е. Нейротрансмиттерные механизмы контекст-зависимого поведения. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2012. 62 (6): 1–17.
- Мещеряков В.Н. Прудовик *Lymnaea stagnalis* L. Объекты биологии развития: справ.-метод. пособие. М. Наука. 1975. 53–94.
- Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развивающемся овариальном фолликуле мыши. ДАН. 2018а. 478 (1): 103–106.
- Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши. Онтогенез. 2018b. 49 (3): 208–216.
- Сахаров Д.А. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение Журн. эвол. биохим. физиол. 1990. 26: 733–740.
- Сахаров Д.А. Биологический субстрат генерации поведенческих актов. Ж. общ. биол. 2012. 73 (5) 334–348.
- Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. О внутриклеточной рецепции медиаторов. Нейрохимия. 2018. 35 (4): 289–293.
- Abdala-Valencia H., Berdnikovs S., McCary C.A., Urick D., Mahadevia R., Marchese M.E., Swartz K., Wright L., Mutlu G.M., Cook-Mills J.M. Inhibition of allergic inflammation by supplementation with 5-hydroxytryptophan. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2012. 303 (8): L642–60.
- Ahern G.P. 5-HT and the immune system. Curr Opin Pharmacol. 2011 11 (1): 29–33.
- Amireault P., Dubé F. Intracellular cAMP and Calcium Signaling by Serotonin in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes. Mol. Pharmacol. 2005a. 68 (6): 1678–1687.
- Amireault P., Dubé F. Serotonin and its Antidepressant-Sensitive Transport in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and Early Embryos. Biol. Reprod. 2005b. 73: 358–365.

- Amireault P., Sibon D., Côté F.* Life without Peripheral Serotonin: Insights from Tryptophan Hydroxylase 1 Knockout Mice Reveal the Existence of Paracrine/Autocrine Serotonergic Networks. *ACS Chem. Neurosci.* 2013. 4 (1): 64–71.
- Aonuma H., Mezheritskiy M., Boldyshev B., Totani Y., Vorontsov D., Zakharov I., Ito E., Dyakonova V.* The role of serotonin in the influence of intense locomotion on the behavior under uncertainty in the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Frontiers in Physiology.* 2020. 11. Art. 221.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00221>
- Bader M.* Serotonylation: Serotonin Signaling and Epigenetics. *Front. Mol. Neurosci.* 2020. 12: 288.
- Baganz N.L., Blakely R.D.* A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* 2013. 4 (1): 48–63.
- Basu B., Desai R., Balaji J., Chaerkady R., Sriram V., Maiti S., Panicker M. M.* Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction.* 2008. 135: 657–669.
- Beyer T., Danilchik M., Thumberger T., Vick P., Tisler M., Schneider I., Bogusch S., Andre P., Ulmer B., Walentek P., Niesler B., Blum M., Schweickert A.* Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 2012. 22 (1): 33–39.
- Bonnin A., Goeden N., Chen K., Wilson M.L., King J., Shih J.C., Blakely R.D., Deneris E.S., Levitt P. A.* transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature.* 2011. 472 (7343): 347–350.
- Bonnin A., Levitt P.* Fetal, maternal and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience* 2011. 197: 1–7.
- Burden H.W., Lawrence I.E. Jr.* Presence of biogenic amines in early rat development. *Am. J. Anat.* 1973. 136 (2): 251–257.
- Buznikov G.A., Chudakova I.V., Zvezdina N.D.* The role of neurohumours in early embryogenesis. i. serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1964. 12: 563–573.
- Buznikov G.A., Lambert H.W., Lauder J.M.* Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell and Tissue Res.* 2001. 305 (2): 177–186.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Willows A.D., Nezhlin L.P.* Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia). *Cell and Tissue Research.* 2003. 311: 259–266.
- Candiani S., Augello A., Oliveri D., Passalacqua M., Pennati R., De Bernardi F., Pestarino M.* Immunocytochemical localization of serotonin in embryos, larvae and adults of the lancelet. *Branchiostoma floridae*. *Histochem. J.* 2001. 33: 413–420.
- Chabbi-Achengli Y., Coudert A.E., Callebert J., Geoffroy V., Côté F., Collet C., de Vernejoul M.C.* Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2012. 109 (7): 2567–2572.
- Chen H.J., Antonson A.M., Rajasekera T.A., Patterson J.M., Bailey M.T., Gur T.L.* Prenatal stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term behavioral deficits through microbe- and CCL2-dependent mechanisms. *Transl. Psychiatry.* 2020. 10 (1): 191.
- Cooney C.A., Dave A.A., Wolff G.L.* Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* 2002. 132: 2393S–2400S.
- Dias B.G., Ressler K.J.* Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat. Neurosci.* 2014. 17 (1): 89–96.
- Dubé F., Amireault P.* Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci.* 2007. 81 (25–26): 1627–1637.
- Duerschmied D., Bode C.* The role of serotonin in haemostasis. *Hamostaseologie.* 2009. 29 (4): 356–359.
- Emanuelsson H.* Localization of serotonin in cleavage embryos of *Ophryotrocha labronica* La Greca and Bacci. 1974. *Dev. Genes Evol.* 175: 253–271.
- Emanuelsson H., Carlberg M., Lowkvist B.* Presence of serotonin in early chick embryos. *Cell. Differ.* 1988. 24: 191–199.
- Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S., Lepack A.E., Lyu Y., Bhanu N.V., Zhang B., Loh Y.-H.E., Ramakrishnan A., Vadodaria K.C., Heard K.J., Eriksson G., Nakadai T., Bastle R.M., Lukasak B.J., Zebroski H., Alenina N., Bader M., Berton O., Roeder R.G., Molina H., Gage F.H., Shen L., Garcia B.A., Li H., Muir T.W., Maze I.* Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature.* 2019. 567: 535–539.
- Fossat P., Bacqué-Cazenave J., De Deurwaerdère P., Delbecque J.P., Cattaert D.* Comparative behavior. Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science.* 2014. 344 (6189): 1293–1297.
- Fukumoto T., Kema I.P., Levin M.* Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Curr. Biol.* 2005. 15: 794–803.
- Glebov K., Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Y., Ivashkin E., Nezhlin L.P., Ponimaskin E.G.* Mechanisms underlying dual effects of serotonin during development of *Helisoma trivolvis* (Mollusca). 2014. *BMC Dev. Biol.* 14: 14.
- Guilluy C., Rolli-Derkinderen M., Tharaux P.L., Melino G., Pacaud P., Loirand G.* Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 2007. 282 (5): 2918–2928.

- Hummerich R., Schloss P.* Serotonin-more than a neurotransmitter: transglutaminase-mediated serotonylation of C6 glioma cells and fibronectin. *Neurochem. Int.* 2010. 57 (1): 67–75.
- Hummerich R., Thumfart J.O., Findeisen P., Bartsch D., Schloss P.* Transglutaminase-mediated transamidation of serotonin, dopamine and noradrenaline to fibronectin: evidence for a general mechanism of monoaminylation. *FEBS Lett.* 2012. 586 (19): 3421–3428.
- Hummerich R., Costina V., Findeisen P., Schloss P.* Monoaminylation of Fibrinogen and Glia-Derived Proteins: Indication for Similar Mechanisms in Posttranslational Protein Modification in Blood and Brain. *ACS Chem. Neurosci.* 2015. 6 (7): 1130–1136.
- Hinckley M., Vaccari S., Horner K., Chen R., Conti M.* The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev. Biol.* 2005. 287 (2): 249–261.
- Il'kova G., Rehak P., Vesela J., Cikos S., Fabian D., Czikkova S., Koppel J.* Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote.* 2004. 12 (3): 205–213.
- Issa T.B., Sagaama A., Issaoui N.* Computational study of 3-thiophene acetic acid: Molecular docking, electronic and intermolecular interactions investigations. *Comput. Biol. Chem.* 2020. 86: 107268.
- Ivashkin E., Khabarova M., Voronezhskaya E.* Serotonin transport and synthesis systems during early development of invertebrates: Functional analysis on a bivalve model. *Acta Biol. Hung.* 2012. 63: 217–220.
- Ivashkin E., Khabarova M., Melnikova V., Nezhlin L., Kharchenko O., Voronezhskaya, E., Adameyko I.* Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails. *Cell Rep.* 2015. 12: 1144–1158.
- Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N.R., Obukhova A., Khabarova M.Y., Voronezhskaya E.E.* Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates. *ACS Chem. Neurosci.* 2019. 10: 3888–3899.
- Jong Y.I., Harmon S.K., O'Malley K.L.* GPCR signaling from within the cell. *Br. J. Pharmacol.* 2018. 175 (21): 4026–4035.
- Khabarova M.Y., Voronezhskaya E.E.* Pharmacological analysis of locomotion and heart contraction during the development of *Helisoma* (Mollusca: Gastropoda). *Acta Biol. Hung.* 2012. 63 (2): 206–209.
- Koene J.M.* Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: mechanisms and evolution. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2010. 4: 167.
- Mercado C.P., Ziu E., Kilic F.* Communication between 5-HT and small GTPases. *Curr Opin Pharmacol.* 2011. 11 (1): 23–28.
- Mousseau T.A., Fox C.W.* The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol Evol.* 1998. 13 (10): 403–407.
- Muma N.A., Mi Z.* Serotonylation and transamidation of other monoamines. *ACS Chem. Neurosci.* 2015. 6: 961–969.
- Neilson L., Andalibi A., Kang D., Coutifaris C., Strauss J.F., Stanton J.A., Green D.P.* Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics.* 2000. 63 (1): 13–24.
- Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V., Shmukler Y.B.* Expression of serotonergic system components during early *Xenopus* embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 2012. 56 (5): 385–391.
- Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić L., Bezuglov V.V., Shmukler Y.B.* Expression and functional activity of neurotransmitter system components in sea urchins' early development. *Zygote.* 2016. 24 (2): 206–218.
- Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., Shmukler Y.B.* Analysis of Expression and Functional Activity of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (DDC) and Serotonin Transporter (SERT) as Potential Sources of Serotonin in Mouse Ovary. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20 (12): 3070.
- Numanoi N.* Studies on the fertilization substance. V. Distribution of acetylcholine esterase in egg particles of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. 1955. *Scient. Papers Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo.* 5: 37–41.
- Pavone L.M., Norris R.A.* Distinct signaling pathways activated by “extracellular” and “intracellular” serotonin in heart valve development and disease. *Cell. Biochem. Biophys.* 2013. 67 (3): 819–828.
- Paulmann N., Grohmann M., Voigt J.P., Bert B., Vowinkel J., Bader M., Skelin M., Jevsek M., Fink H., Rupnik M., Walther D.J.* Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* 2009. 7 (10): e1000229.
- Räsänen K., Kruuk L.E.B.* Maternal effects and evolution at ecological time-scales. *Functional Ecology.* 2007. 21 (3): 408–421.
- Sakharov D.A.* Integrative function of serotonin common to distantly related invertebrate animals. *Early Brain.* Ed. Gustafsson M., Reuter M. Abo: Abo Akademi Press. 1990. 73–88 pp.
- Sato K.* Placenta-derived hypo-serotonin situations in the developing forebrain cause autism. *Med. Hypotheses.* 2013. 80 (4): 368–372.
- Schmidt-Rhaesa A., Harzsch S., Purschke G.* Structure and Evolution of Invertebrate Nervous Systems. Oxford: Oxford University Press. 2016.

- St-Pierre J., Laurent L., King S., Vaillancourt C.* Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta*. 2016. 48(1): S66–S71.
- Sze J.Y., Victor M., Loer C., Shi Y., Ruvkun G.* Food and metabolic signaling defects in a serotonin-synthesis mutant. *Nature*. 2000. 403: 560–564.
- Tanaka T., Doe J.M., Horstmann S.A., Ahmad S., Ahmad A., Min S.J., Reynolds P.R., Suram S., Gaydos J., Burnham E.L., Vandivier R.W.* Neuroendocrine signaling via the serotonin transporter regulates clearance of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 2014.289 (15): 10466–10475. *Caenorhabditis elegans*
- Ugrumov M.V.* Hypothalamic monoaminergic systems in ontogenesis: development and functional significance. *Int. J. Dev. Biol.* 1997. 41 (6): 809–816.
- Vitalis T., Ansorge M.S., Dayer A.G.* Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT_{3A} and 5-HT₆ receptor subtypes. *Front. Cell. Neurosci.* 2013. 7: 93.
- Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Khabarova M.Yu.* Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails. *Development*. 2004. 131: 3671–3680.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Y., Nezlin L.P., Ivashkin E.G.* Delayed action of serotonin in molluscan development. *Acta Biol. Hung.* 2012. 63 (2): 210–216.
- Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Höltje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinckel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., Bader M.* Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*. 2003. 115: 851–862.
- Walther D.J., Stahlberg S., Vowinckel J.* Novel roles for biogenic monoamines: from monoamines in transglutaminase-mediated posttranslational protein modification to monoaminylation deregulation diseases. *FEBS J.* 2011. 278: 4740–4755.
- Waterland R.A., Jirtle R.L.* Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* 2003. 23 (15): 5293–5300.
- Watts S.W., Priestley J.R., Thompson J.M.* Serotonylation of vascular proteins important to contraction. *PLoS One*. 2009. 4: e5682.
- Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J.* Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004. 7 (8): 847–854.

MONOAMINES AS ADAPTIVE DEVELOPMENTAL REGULATORS: PHENOMENON AND MECHANISMS OF ACTION

E. E. Voronezhskaya^{a, #}, V. I. Melnikova^a, and E. G. Ivashkin^{a, b, c}

^a Koltsov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

^b A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russia

^c Marine Biological Laboratory, Woods Hole, USA

[#] e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

A large fraction of integrative mechanisms operates through the monoaminergic system that includes low molecular weight biogenic amine mediator molecules (serotonin or dopamine) together with the corresponding receptors, enzymes of their synthesis, and metabolism. Monoamines are the key components of the nervous and endocrine systems, rendering monoamines as molecules defining the adaptive capacities of the organisms in changing environments. Our own experimental materials as well as data obtained by other authors demonstrate the regulatory role of monoamines during development, starting from the oocyte and early cleavage stage till the formation of the neuronal networks underlying behavior. The classical ligand-receptor mechanism and non-canonical intracellular proteins modification (monoaminylation) mechanism and their contribution to adaptive regulation at different stages of development are reviewed. Monoamines and monoaminylation are considered as a conservative factor linking environmental signals and the physiology of the developing organism.

Keywords: monoamines, serotonin, ontogenesis, protein serotonylation, ligand-receptor interactions, maternal effect

УДК 591.3

СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМА В ООГЕНЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2021 г. Ю. Б. Шмуклер^{1,*}, Н. М. Алешина¹, Л. А. Мальченко¹, Д. А. Никишин¹

¹ ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

*e-mail: yurishmukler@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.12.2020 г.

После доработки 16.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Трансмиттеры, в частности серотонин, наряду с классической функцией передачи нервного импульса участвуют в целом ряде регуляторных процессов на протяжении всего онтогенеза, в том числе реализующихся задолго до формирования нервной системы. Рассмотрены структура и функции серотониновой системы в оогенезе млекопитающих, источники и механизмы аккумуляции трансмиттера в ооцитах, а также экспрессия компонентов серотониновой системы – рецепторов, ферментов синтеза и деградации, а также мембранного и везикулярного транспортеров в клетках женской репродуктивной системы млекопитающих. Приведены данные о влиянии блокаторов обратного захвата серотонина (SERT) на оогенез и эмбриогенез.

Ключевые слова: серотонин, оогенез, ооцит, гранулеза, кумулус, рецептор, транспортер, триптофангидроксилаза, декарбоксилаза ароматических аминокислот

DOI: 10.31857/S0044467721030084

СЕРОТОНИН В ОНТОГЕНЕЗЕ

Опыт Отто Леви (Loewi, 1921), поставленный столетие назад, открыл собой эпоху исследований химических механизмов передачи межклеточных сигналов. В силу огромного теоретического и практического значения эти работы невероятно размножились и привели не только к расцвету теории химической передачи нервных импульсов, но и к бесчисленным прикладным результатам в области нейрофизиологии. Тот факт, что функции многих трансмиттеров не ограничиваются нервной системой взрослых животных (см. Amireault et al., 2013), привел в начале 60-х годов XX столетия и к первым предположениям о смене функций этих веществ в ходе индивидуального развития, в том числе – в эмбриогенезе (Бузников, Манухин, 1960; Коштоянц, 1963; Бузников, 1967, 2007).

Идея об эмбриональных функциях трансмиттеров проделала эволюцию от смелого предположения, встретившего у многих физиологов непонимание и отторжение, к представлению о совершенно специфическом механизме, радикально отличающемся от имеющего место во взрослом организме, и, наконец, к постепенному пониманию прин-

ципального совпадения основных звеньев эмбрионального и дефинитивного трансмиттерных процессов.

К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о том, что моноаминергические трансмиттеры являются универсальными сигнальными молекулами, контролирующими многообразные процессы развития. Серотонин выполняет наибольшее число таких функций в течение всего онтогенеза – как на эмбриональных стадиях, так и вне нервной системы взрослых организмов.

В раннем развитии это, прежде всего, различные аспекты контроля серотониновой системой клеточного цикла в период делений дробления (термин “серотониновая” использован для отличия этой эмбриональной системы от серотонинергического процесса в нервных клетках взрослых организмов) – запуск клеточного цикла (Бузников, 1987; Vuznikov et al., 2005) и контроль состояния цитоскелета (Григорьев, 1988). Далее, серотонинергические препараты влияют на ряд процессов межбластомерных взаимодействий – адгезию бластомеров (Бузников, Шмуклер, 1978) и собственно обмен между бластомерами химическими сигналами (Шмуклер, 1981;

Shmukler, Nikishin, 2012). На основе этих данных было впервые выдвинуто представление о “протосинапсе” — механизме межбластомерного взаимодействия, представляющего собой симметричную структуру, в которой каждая из двух взаимодействующих эмбриональных клеток является как источником, так и акцептором химического сигнала (Shmukler, 1993; Shmukler, Nikishin, 2012). Эта концепция дает представление о возможной эволюции механизма межклеточных взаимодействий в развитии, поскольку демонстрирует первое в онтогенезе взаимодействие клеток с участием трансмиттеров, которое с дальнейшей специализацией клеток может преобразовываться в синаптическое.

В дальнейшем развитии трансмиттеры контролируют формирование ресничной моторики (Kato et al., 2007), морфогенетические процессы (Мартынова, 1981; Shuey et al., 1993), динамику развития и формирование программ поведения потомства (Voronezhskaya et al., 2004; Ivashkin et al., 2015), установление лево-правой асимметрии тела (Levin et al., 2006; Beyer et al., 2012), а также дифференцировку и пролиферацию клеток (Azmitia, 2001), вплоть до органо- (Lauder et al., 1994) и онкогенеза (Peters et al., 2014; Sarrouilhe, Mesnil, 2019). Функция же передачи нервного сигнала оказывается лишь одной из множества, возникающей к тому же в развитии далеко не первой.

Эмбриофизиологические исследования на методическом уровне 70–80-х годов XX столетия (без современных молекулярно-биологических данных об экспрессии трансмиттерных рецепторов и сведений о специфичности нейрофармакологических препаратов) показали, что эффекты трансмиттеров в раннем эмбриогенезе реализуются, вероятнее всего, путем их взаимодействия с соответствующими рецепторами или, как осторожно выразился основатель исследований эмбриональных функций трансмиттеров профессор Бузников (Бузников, 1987, 2007), их функциональными аналогами. Это, в свою очередь, приводит к активации цепей передачи внутриклеточных сигналов с участием аденилатциклазы и протеинкиназы С, подобно тому, как это происходит в клетках зрелого организма (Шмуклер и др., 1984; Ростомян и др., 1985; Capasso et al., 1988; Buznikov et al., 1998; Shmukler et al., 1999).

В последние десятилетия прогресс в изучении трансмиттерных механизмов наиболее

ранних стадий онтогенеза — оогенеза и раннего эмбриогенеза — связан с новыми возможностями, которые дают молекулярно-биологические методы исследования. Это привело к переходу от подхода, основанного на аналогиях фармакологических эффектов на разных объектах, к исследованию экспрессии трансмиттерных механизмов в развитии. В частности, была исчерпывающим образом исследована экспрессия компонентов серотониновой системы в раннем эмбриональном развитии амфибий (Nikishin et al., 2012; Никишин и др., 2012; Tan et al., 2013; Collart et al., 2014; Session et al., 2016; Owens et al., 2016) и птиц (Stępińska et al., 2015). Вопрос о наличии на этом этапе серотониновых рецепторов, идентичных таковым взрослых организмов, решен однозначно и положительно, по крайней мере, на уровне экспрессии соответствующих мРНК. Более того, результаты этих исследований дают основание предполагать, что у дробящихся зародышей могут одновременно экспрессироваться сразу несколько типов серотониновых рецепторов, а также, наряду с ними, соответствующие ферменты синтеза и деградации, а также транспортеры, в том числе SERT. Сходные данные об экспрессии набора компонентов серотониновой системы, в том числе рецепторов, были получены и на доимплантационных стадиях развития млекопитающих (Vesela et al., 2003; Iškova et al., 2004; Amireault, Dube, 2005a, b; Hinckley et al., 2005; Basu et al., 2008; Никишин и др., 2018б). Впрочем, большая часть этих данных ожидает подтверждения экспрессии в раннем эмбриогенезе соответствующих белков, а также подтверждения их функциональной активности.

СЕРОТОНИН И ЕГО СИНТЕЗ В ООГЕНЕЗЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Многие факторы, определяющие паттерн и параметры течения раннего развития большинства животных, закладываются в ходе предшествующего процесса оогенеза. Поэтому отдельным принципиально важным вопросом является то, насколько трансмиттерные системы активны в ходе созревания яйцеклеток и как это влияет на последующее развитие. Данные об участии серотониновой системы в оогенезе менее обильны и более разрозненны, чем об их функции в раннем эмбриогенезе. Тем не менее на целом ряде таксонов было показано, в основном — с по-

мощью фармакологических воздействий, участие различающихся между собой у разных видов серотониновых механизмов в созревании ооцитов у амфибий (Никитина и др., 1988, 1993; Buznikov et al., 1993; Sheng et al., 2005) и иглокожих (Бузников и др., 1990; Buznikov et al., 1993; Chaiyamoon et al., 2018). Затем сходные данные были получены на двустворчатых (Krantic et al., 1991; Masseur et al., 2002; Wang, He, 2014) и головоногих моллюсках (Zatylny et al., 2000), ракообразных (Tini-kul et al., 2008), немертинах (Stricker, Smythe, 2001), рыбах (Cerdà et al., 1998; Lister et al., 2009) и млекопитающих (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993; Sheng et al., 2005). Кроме того, серотонин влияет на функциональную активность фолликулярных клеток, которые не только играют важную роль в процессе созревания яйцеклеток, но также являются основным источником эстрогена в теле самки (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993; Korpan et al., 2004; Graveleau et al., 2000). На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на выброс половых продуктов (Masseur et al., 2002; Garnerot et al., 2006). Такая универсальность серотониновой регуляции процессов, связанных с созреванием яйцеклеток, у многочисленных и эволюционно далеко отстоящих друг от друга таксонов свидетельствует о ее фундаментальном значении для оогенеза.

Особая сложность анализа серотониновой системы в оогенезе млекопитающих обусловлена многокомпонентностью клеточного комплекса, обеспечивающего формирование фолликула, содержащего ооцит, а также динамичностью происходящих в нем процессов. Основным соматическим компонентом, опосредующим взаимодействие материнского организма с созревающим ооцитом, является гранулеза. Ее клеточная субпопуляция — кумулюс — непосредственно окружает ооцит, в том числе в ходе овуляции и при оплодотворении. Клетки кумулюса непосредственно взаимодействуют с ооцитом через щелевые контакты (Lawrence et al., 1978) и передают стимулы, обеспечивающие поддержание (Aktas et al., 1995) или устранение (Batta, Knudsen, 1980) блока мейоза. От них также зависит метаболизм глюкозы и пирувата в ооците (Gardner et al., 1996; Preis et al., 2005). На месте овулировавшего фолликула образуется желтое тело, которое является временной железой внутренней секреции. Конкретные

особенности серотониновых механизмов этих компонентов системы оогенеза различаются.

Серотонин в физиологических концентрациях выявлен в ооцит-кумулясных комплексах самок млекопитающих (Amireault, Dubé, 2005a,b; Dubé, Amireault, 2007). Концентрация серотонина в яичнике крысы меняется в ходе репродуктивного цикла (Clausell, Soliman, 1978), он также присутствует в фолликулярной жидкости человека (Bòdis et al., 1992, 1993), зрелых ооцитах и клетках кумулюса мышей (П'кова et al., 2004; Amireault and Dubé, 2005a; Dubé, Amireault, 2007).

Недавно иммуногистохимическим окрашиванием криосрезов яичника мыши антителами против серотонина было показано, что этот трансмиттер локализуется в овариальных фолликулах — как в ооцитах, так и в окружающих его клетках гранулезы и теки. Предварительное введение серотонина приводит к увеличению степени иммунореактивности, но при сохранении локализации реакции неизменной (Никишин и др., 2017а).

Вопрос о происхождении выявляемого в яичнике серотонина некоторое время был дискуссионным, тем более что он очень важен для понимания механизмов серотониновой регуляции репродуктивной функции. Первоначально предполагалось, что в яичнике может присутствовать собственная система синтеза серотонина, независимая в этом плане от остального организма. Действительно, в клетках кумулюса была показана экспрессия мРНК фермента биосинтеза серотонина — триптофангидроксилазы *Tph1* (Dube, Amireault, 2007), а в зрелых ооцитах, как и в доимплантационных эмбрионах (Basu et al., 2008), — *Tph2*. Таким образом, *TRH2*, которая долгое время считалась нейтральной формой фермента, может служить маркером половой линии в яичнике, так как не экспрессируется в окружающих ооцит фолликулярных клетках. Наличие мРНК триптофангидроксилаз в клетках гранулезы и ооцитах мыши подтверждается нашими данными (Nikishin et al., 2019).

Первая стадия биосинтеза серотонина — гидроксирование — лимитирует скорость процесса (Jequier et al., 1969), поэтому наличие триптофангидроксилазы может ошибочно рассматриваться как достаточное условие синтеза серотонина в ткани (Dubé, Amireault, 2007), так как второй фермент синтеза — де-

карбоксилаза ароматических L-аминокислот, DDC, часто считается вездесущим и экспрессирующимся постоянно. Тем не менее DDC экспрессируется не во всех типах клеток и, таким образом, лимитирующим звеном в системе синтеза серотонина может быть именно этот фермент (Никишин и др., 2018б).

В компонентах стромы яичника и в ооцитах примордиальных фолликулов DDC выявляется иммуногистохимически. В ходе постнатального развития ферменты синтеза серотонина в яичниках демонстрируют тенденцию к снижению уровня экспрессии. Максимальный уровень экспрессии DDC наблюдается у новорожденных мышат, когда завершается формирование пула примордиальных фолликулов (Niu et al., 2016), а минимальный — в возрасте 14 дней, когда происходит первая волна фолликулогенеза (Nikishin et al., 2019).

Согласно данным количественной ПЦР DDC экспрессируется в овариальных фолликулах на очень низком уровне, а эксперимент по инкубации фрагментов яичника с предшественником серотонина гидрокситриптофаном не выявил выраженной активности этого фермента в примордиальных или растущих овариальных фолликулах. Соответственно, можно заключить, что синтез не может быть существенным источником серотонина в клетках гранулезы и зрелых ооцитах млекопитающих в постнатальном яичнике (Nikishin et al., 2019). К аналогичному выводу об экзогенном происхождении серотонина, накапливающегося в яйцеклетках и функционально активного на ранних стадиях эмбрионального развития, пришли и другие авторы (Côté et al., 2007).

Исследование дальнейшей динамики экспрессии мРНК ферментов синтеза серотонина в ооцитах и доимплантационных эмбрионах показало, что триптофангидроксилаза Trh2, экспрессирующаяся в ооцитах, исчезает к стадии делений дробления, тогда как декрбоксилаза Ddc появляется в эмбриогенезе только на стадии бластоцисты. В желтом теле, в отличие от других компонентов яичника, синтез серотонина возможен, поскольку здесь выявляется экспрессия и Trh1, и Ddc, однако прямых данных, подтверждающих это, нет (Никишин и др., 2018б).

Поскольку возможность локального синтеза серотонина в яичнике предельно ограничена, напрашивается вывод, что он может накапливаться здесь из внешних источ-

ников, которыми могут служить тромбоциты кровяного русла, тучные клетки, локализующиеся в строме яичника, а также немногочисленные нервные волокна, сопровождающие крупные медулярные сосуды (Amenta et al., 1992). При этом накопление серотонина в ооцитах и окружающих его фолликулярных клетках, вероятнее всего, происходит за счет мембранного транспорта трансмиттера из внеклеточной среды.

РЕЦЕПТОРЫ К СЕРОТОНИНУ В ООГЕНЕЗЕ

Ключевое звено любого процесса с участием серотонина — это его рецепторы, которых насчитывается 7 типов, подразделенных на 15 подтипов (см., напр., Hoyer et al., 1994; Frazer, Hensler, 1999). За исключением 5HT₃-рецептора (канального), остальные являются семидоменными метаботропными рецепторами, связанными либо с аденилатциклазным, либо фосфатидил-инозитольным каскадом внутриклеточной сигнализации. Как уже говорилось выше, само по себе присутствие рецепторов к трансмиттерам в ооцитах и ранних эмбрионах (на донервных стадиях развития) было предметом больших сомнений и дискуссий, поскольку фармакологические эксперименты, в том числе по связыванию меченых лигандов рецепторов, давали результаты, существенно отличающиеся от получаемых на классических объектах (Shmukler et al., 1986; Шмуклер, 1992; см. Бузников, 1987).

Ситуация резко изменилась с применением в этой области молекулярно-биологических методов, которые, начиная с конца XX столетия, стали приносить сведения об экспрессии различных трансмиттерных рецепторов в ранних эмбрионах многих видов животных, в том числе млекопитающих. Со временем количество таких данных только нарастало, они систематизировались и ныне на многих видах дают исчерпывающую картину экспрессии рецепторных компонентов различных трансмиттеров, в частности — серотонина у птиц (Stepińska et al., 2015) и земноводных (Nikishin et al., 2012; см. также обзор Шмуклер, Никишин, 2018). Подробные исследования проведены и в оогенезе, и на ранних эмбрионах млекопитающих (Никишин и др., 2018б) (табл. 1).

Первые данные в этой области были получены десятилетием ранее с помощью ОТ-ПЦР:

Таблица 1. Первые публикации об экспрессии рецепторов к трансмиттерам в эмбрионах на стадиях делений дробления (по Nikishin et al., 2012 с исправлениями)**Table 1.** Initial publications on the expression of transmitters' receptors in cleaving embryos (after Nikishin et al., 2012 with corrections)

Вид	Тип рецептора	Источник
Мышь <i>Mus musculus</i>	HTR1D	Vesela et al., 2003
	HTR5	Hinckley et al., 2005
	HTR7	Amireault, Dube, 2005b
	β -AdR	Čikoš et al., 2005
Нематода <i>Caenorhabditis elegans</i>	HTR2C	Hamdan et al., 1999
Брюхоногий моллюск <i>Lymnaea stagnalis</i>	HTR2	Ivashkin et al., 2015
Рыба <i>Danio rerio</i>	HTR1A	Никишин и др., 2009
Морской еж <i>Paracentrotus lividus</i>	HTR4	Никишин и др., 2012
	nAChR $\alpha 6$ -субъединица	Aluigi et al., 2012
	nAChR $\alpha 10$ -субъединица	
	nAChR $\alpha 7$ -субъединица	
Шпорцевая лягушка <i>Xenopus laevis</i>	HTR2C	Nikishin et al., 2012
	HTR7	Devic et al., 1997
	β -AdR	

было показано, что 5-HT₇-рецептор экспрессируется не только в 4-клеточных эмбрионах, но и в клетках кумулюса и ооцитах, а мРНК 5-HT_{2A}- и 5-HT_{2B}-рецепторов – только в клетках кумулюса, тогда как экспрессия 5-HT_{2C}-, 5-HT₄- и 5-HT₆-рецепторов отсутствовала во всех этих объектах (Amireault, Dubé, 2005a). Нами было проведено более подробное исследование экспрессии всех основных компонентов серотониновой сигнальной системы в фолликулярных клетках, полученных на разных стадиях фолликулогенеза (гранулеза стенки антрального фолликула, клетки постовуляторного кумулюса и желтое тело), а также в зрелых МП-ооцитах мыши (Никишин и др., 2018б). Было показано, что в ооцитах выявляется экспрессия мРНК трех серотониновых рецепторов, причем Htr7 и канальный Htr3a исчезают к дроблению, тогда как Htr5b экспрессируется в течение всего доимплантационного развития. Стоит отметить совпадение времени транзитной экспрессии редко встречающегося в оогенезе и раннем эмбриогенезе рецептора серотонина 3-го типа в ооцитах и перепелки (Stepińska et al., 2015), и мыши, постоянная экспрессия которого у обоих видов затем наблюдается значительно позже. Такое явление иллюстрирует наблюдающуюся в доимплантационном развитии млекопитающих временную избыточность и стохастическую экспрессию разных генов в

клетках раннего эмбриона (Dietrich, Hiiragi, 2007). Оговоримся здесь, что выявление экспрессии мРНК еще не означает присутствие соответствующего белка, и вопрос о функциональной активности этих рецепторов требует специального исследования.

Профили экспрессии ряда генов в клетках стенки фолликула и кумулюсе различаются (Burnik-Papler et al., 2015), но это не касается рецепторов к серотонину, за исключением рецептора Htr7, мРНК которого присутствует в клетках кумулюса, а затем в ооците (Никишин и др., 2018б). От ооцитов клетки гранулезы стенки антрального фолликула, клетки кумулюса и желтого тела отличаются наличием экспрессии мРНК рецепторов Htr1b, Htr1d и Htr2a. В желтом теле также экспрессируется рецептор Hhtr2b (Никишин и др., 2018б).

Важным показателем функциональной активности гена является динамика его экспрессии. Выраженные изменения уровня экспрессии гена могут свидетельствовать о его функциональной активности на той или иной стадии. Часть генов, такие как Htr1d, Htr2a, Htr2b, в ходе фолликулярного роста выраженной динамики не проявляют. В то же время относительное количество мРНК генов Htr1b и Htr7 уменьшается в ходе фолликулогенеза. В желтых телах, по сравнению с клетками гранулезы преовуляторного фолли-

кула, для гена *Hnr1b* наблюдается увеличение относительной экспрессии, как и в случае классических маркеров лютеинизации. Количество мРНК генов *Hnr7* при лютеинизации уменьшается (Никишин и др., 2017б).

Данные об одновременной экспрессии мРНК серотониновых рецепторов нескольких типов в фолликулогенезе и раннем эмбриогенезе млекопитающих и аналогичные данные на зародышах амфибий и птиц (Nikishin et al., 2012; Stepińska et al., 2015) возвращают к высказанной нами ранее идее о том, что к одному и тому же трансмиттеру в единичной эмбриональной клетке или ооците присутствуют рецепторы более чем одного типа, способные одновременно активировать разные сигнальные пути и, таким образом, реализовывать различные функции (Шмуклер, Никишин, 2018).

СЕРОТОНИНОВЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ В ООГЕНЕЗЕ

Роль вторичных мессенджеров (прежде всего, цАМФ и внутриклеточного Ca^{2+}) в росте фолликула и мейотическом созревании ооцита известна и исследуется достаточно давно (Cho et al., 1974; Dekel, Beers, 1978; Darszon et al., 1999; Stricker, 1999; см. также обзор Silvestre et al., 2011). Активация систем вторичных мессенджеров трансмиттерами и конкретно серотонином в оогенезе млекопитающих была впервые исследована на ооцитах и окружающих клетках кумулюса мыши. Экзогенный серотонин в физиологических концентрациях не вызывал изменений уровня внутриклеточного цАМФ или Ca^{2+} в изолированных ооцитах в метафазе II, тогда как такое воздействие вызывало дозозависимое повышение уровня цАМФ и Ca^{2+} в клетках кумулюса. Предполагалось, что этот эффект обусловлен активацией 5-HT₇-рецептора. С другой стороны, при добавлении серотонина в клетках кумулюса наблюдалось дозозависимое повышение Ca^{2+} , что могло быть связано с активацией 5-HT_{2A}- и 5-HT_{2B}-рецепторов, экспрессия мРНК которых была выявлена в клетках кумулюса (Amireault, Dubé, 2005a).

Воздействуя через такие стандартные цепи внутриклеточной передачи сигнала, серотонин способен вызывать ряд специфических эффектов в клетках женской репродуктивной системы. На клетках гранулезы было выявлено три гена, которые изменяют уровень экс-

прессии в клетках гранулезы в ответ на серотонин: *Has2*, *Ihh* и *Ccnd1* (Никишин и др., 2018в). *Has2* является ферментом синтеза гиалуроновой кислоты, характерного для клеток гранулезы (Salustri et al., 1992). Экспрессия этого гена коррелирует с синдромом поликистозного яичника (Kaur et al., 2012). *Ihh* является сигнальной молекулой Hedgehog-сигнального пути, экспрессия которой характерна для клеток гранулезы овариальных фолликулов на ранних стадиях фолликулогенеза (Liu et al., 2015). Третьим геном, экспрессия которого усиливается в ответ на серотонин, является один из регуляторов клеточного цикла циклин D1 *Ccnd1*, экспрессия которого запускает переход от G1 к S-фазе (Yang et al., 2006). По всей вероятности, серотонин через воздействие на экспрессию циклина D1 модулирует эффекты других факторов, активирующих пролиферацию клеток гранулезы, и способствует поддержанию активно пролиферирующего состояния. В культуре изолированных овариальных фолликулов наблюдается более выраженный эффект серотонина, что, по всей вероятности, объясняется большей восприимчивостью клеток гранулезы к воздействию серотонина в условиях, более приближенных к нативному состоянию. Ооциты теснейшим образом взаимосвязаны с фолликулярными клетками и регулируют функциональное состояние друг друга (Kidder, Vanderhyden, 2010; Никишин и др., 2021). Логично предполагать, что усиление влияния серотонина на функциональную активность клеток гранулезы связано с дополнительным воздействием ооцитов. В пользу этого предположения говорит подавление наблюдаемых эффектов при ингибировании обратного захвата серотонина, который активен в ооцитах, но не в клетках гранулезы (Никишин и др., 2021).

Наконец, на преовуляторных фолликулах крысы, культивируемых *in vitro*, было показано, что серотонин стимулирует синтез эстрадиола, а специфические антагонисты серотониновых рецепторов 2-го типа устраняют этот эффект (Tanaka et al., 1993). Стимулирующая активность серотониновых рецепторов 1-го типа на этот процесс была продемонстрирована на хомячках (Terranova et al., 1990), а в аналогичных экспериментах стимулирующий эффект серотонина наблюдается на клетках гранулезы человека (Korpan et al., 2004; Graveleau et al., 2000). При этом в наших экспериментах не было обнаружено воздей-

ствия серотонина на экспрессию ферментов и регуляторов стероидогенеза в клетках гранулезы. Вероятно это, как и отсутствие прямого эффекта серотонина на пролиферацию, обусловлено тем, что эффекты серотонина на клетки гранулезы носят лишь модуляторный, а не триггерный характер, и обусловлены не прямым влиянием этого трансммиттера, а опять-таки опосредованы другими клеточными компонентами яичника, вероятнее всего, ооцитом (Никишин и др., 2018в). Можно предположить, что ооцит способен экскретировать накопленный серотонин и создавать вокруг себя локальную область его повышенной концентрации, усиливая таким образом его воздействие на клетки гранулезы (Никишин и др., 2018б, 2021).

МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ (ЗАХВАТ) СЕРОТОНИНА В ООГЕНЕЗЕ

Мембранный транспорт серотонина обнаружили и стали изучать с конца 60-х годов XX столетия на тромбоцитах (Sneddon, 1969; Rudnick, Nelson, 1978), которые также предположили, что в нейронах имеет место идентичный процесс, что и подтвердилось впоследствии (Giannaccini et al., 2010; Hohmann et al., 2011; см. также обзор Rudnick, Sandtner, 2019).

В индивидуальном развитии мыши выраженный пик экспрессии мРНК SERT в яичнике выявляется на 14-й день после рождения, а иммуногистохимически SERT детектируется во всех клеточных компартментах яичника с максимальным уровнем иммуноокрашивания в ооцитах растущих овариальных фолликулов (Nikishin et al., 2019). На стадии первичного многослойного фолликула, наступающей после выхода примордиального фолликула из состояния покоя (блока мейоза), во время которой происходит реактивация оогенеза, подготовка к делениям созревания и активный рост яйцеклетки и всего фолликула, мРНК Sert экспрессируется и в фолликулярных клетках, и в ооцитах.

Однако при инкубации овариальных фолликулов с серотонином его накопление наблюдалось только в ооцитах. Следовательно, в клетках гранулезы отсутствует не только синтез, но и специфический захват серотонина. Было сделано предположение, что связанная с мембранным транспортом регуляция серотонином функциональной активности фолликулярных клеток может происходить

опосредованно через ооцит (Никишин и др., 2018а). То есть серотонин может модулировать синтез и выделение ооцитом факторов, влияющих на окружающие фолликулярные клетки, что образует обратную связь с кумулюсом, который, как указывалось выше, контролирует ооцит (Никишин и др., 2021) (рис. 1).

Экспрессия и активность мембранного транспортера серотонина SERT далее продолжают практически в ходе всего оогенеза и раннего эмбриогенеза – в ооцитах и на всех стадиях доимплантационного развития эмбрионов, но исчезают к стадии бластоцисты (Никишин и др., 2018б). На этих стадиях развития выявлен и белок SERT, а также его функциональная активность (Amireault, Dubé, 2005b; Basu et al., 2008). Как и в ооцитах, экспрессия и активность Sert показаны и в клетках кумулюса (Dubé, Amireault, 2007). Согласно нашим данным, мРНК гена *Sert* экспрессировалась также и в клетках гранулезы (Никишин и др., 2018а). Кроме того, в ней выявляется мРНК везикулярного транспортера Vmat2, а в желтом теле экспрессируются и Sert, и оба типа везикулярных транспортеров моноаминов, что может быть связано с интенсивной секреторной активностью лютеоцитов.

Таким образом, в отсутствие локального синтеза серотонина его захват специфическим мембранным транспортером SERT, вероятно, является основным механизмом аккумуляции серотонина в яичниках мыши.

БЛОКАТОРЫ ОБРАТНОГО ЗАХВАТА СЕРОТОНИНА – ЭФФЕКТЫ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ И ООГЕНЕЗЕ

Из изложенного выше ясно, что процесс обратного захвата серотонина, осуществляющийся транспортером SERT, критически важен для взаимодействия ооцита и окружающих его соматических клеток. Этот факт приобрел в последние десятилетия особое значение в связи с тем, что блокаторы этого белка-транспортера оказались эффективными средствами в терапии депрессивных и тревожных состояний, в частности, у беременных, которые, как выяснилось, могут подавляться специфическими блокаторами этого транспортера (Misri, Kendrick, 2007; Ram and Gandotra, 2015; Muzik, Hamilton, 2016).

Вопрос о потенциальных тератогенных эффектах трициклических антидепрессантов у человека впервые возник во времена из-

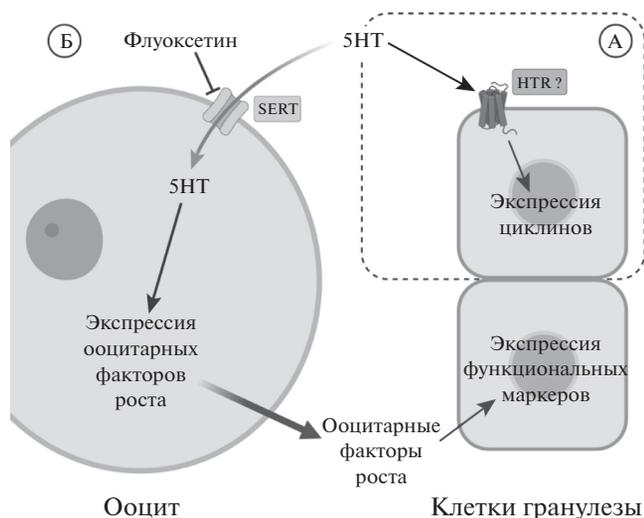


Рис. 1. Схема прямого (А) и опосредованного ооцитом (Б) влияния серотонина (5HT) на функциональную активность клеток гранулы. (А) – Серотонин повышает экспрессию мРНК циклинов *Ccnd1*, *Ccnd2* и *Ccne1* в первичной культуре клеток гранулы. Эффект не отменяется флуоксетином и, предположительно, опосредован рецепторами серотонина, экспрессирующимися в клетках гранулы (*HTR1B*, *HTR1D*, *HTR2A*, *HTR5* или *HTR7* – согласно Никишин и др., 2018). (Б) – В культуре изолированных овариальных фолликулов серотонин повышает экспрессию мРНК генов *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgr*, *Ihh* и *Igfbp4* в клетках гранулы. Эффект отменяется флуоксетином. Предполагается, что эффект опосредован ооцитарными факторами роста, так как серотонин накапливается в ооцитах и повышает в них экспрессию мРНК *Gdf9* (Никишин и др., 2021).

Fig. 1. The scheme of direct (a) and oocyte mediated (б) serotonin influence on the functional activity of granulosa cells. (a) – Serotonin enhances the expression of *Ccnd1*, *Ccnd2* and *Ccne1* cyclins' mRNAs in the primary granulosa cells culture. Fluoxetine do not eliminate this effect that is presumably mediated by serotonin receptors expressed in granulosa cells (*HTR1B*, *HTR1D*, *HTR2A*, *HTR5* or *HTR7* – after Nikishin et al., 2018). (б) – Serotonin enhances the expression of mRNAs of *Has2*, *Ptgs2*, *Ptgr*, *Ihh*, and *Igfbp4* in the granulosa cells in the culture of isolated oval follicles. Fluoxetine eliminates this effect. It is suggested that serotonin is accumulated in the oocytes and it evokes the enhance of *Gdf9* mRNA expression there.

вестной “талидомидной трагедии”. В конце 50-х – начале 60-х годов XX столетия произошла многотысячная вспышка рождений младенцев с разной степенью недоразвития конечностей и другими дефектами. Быстро выяснилось, что все их матери в период беременности получали седативно-снотворный трицикли-

ческий препарат талидомид, прошедший принятые в те времена процедуры проверки безопасности. Это послужило причиной для введения более углубленных испытаний новых препаратов, в том числе – расширения круга модельных животных, в частности хомячков (Homburger et al., 1965). Также при действии талидомида драматические нарушения эмбрионального скелета, отсутствовавшие на стандартных для того времени тест-объектах, были обнаружены на стадиях призмы и плутеуса в развитии морских ежей (Hagström, Lönning, 1973), что выгодно подчеркнуло пригодность этого объекта для первичного выявления потенциально тератогенных препаратов.

Тератогенные эффекты трициклического антидепрессанта имипрамина были на “талидомидной” волне таких исследований обнаружены у кроликов (Robson, Sullivan, 1964). Впоследствии и на зародышах морских ежей была обнаружена способность мелипрамина (русское название имипрамина) блокировать деления дробления (Бузников, 1967; Nikishin et al., 2016) и эффективно подавлять межбластомерные взаимодействия (Шмуклер, 1981; Shmukler, Nikishin, 2012). Однако в то время и позднее на основании разрозненных данных был сделан вывод, что достаточные основания считать трициклические антидепрессанты тератогенами отсутствуют. В дальнейшем исследования, сравнивавшие эффекты трициклических антидепрессантов с новейшими блокаторами обратного захвата серотонина, не выявляли повышенной тератогенности, а обнаруживали лишь кратковременные проходящие симптомы у новорожденных (Misri et al., 2006). Однако позднее отмечалось, что при применении некоторых препаратов этой категории в ходе беременности выявлялся повышенный риск неблагоприятных последствий для человека (см. обзор Creeley and Denton, 2019).

Одно из немногочисленных исследований воздействия наиболее назначаемого препарата этой категории – флуоксетина – непосредственно на эмбрион человека показало отсутствие его влияния в малых дозах на развитие. При этом действие 0.5 мкМ флуоксетина приводило к появлению 45 белков, уникально экспрессирующихся в таких эмбрионах. Эти белки участвуют в клеточном росте, выживании, пролиферации и воспалительном ответе. Культивирование с 0.5 мкМ флуоксетина, кроме того, вызывает существенное

увеличение плазминоген-активатора уроки-назного типа, а также небольшие эффекты на временные характеристики стадий развития (Kaihola et al., 2016).

Употребление ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина беременными самками крыс приводило к нарушениям репродуктивного цикла, изменениям фолликулярного пула, в том числе увеличению овариального апоптоза, а также к количественным изменениям экспрессии генов, регулирующих серотониновую сигнализацию и биологические ритмы у их потомства (Moore et al., 2015). На мышцах использование клинических доз флуоксетина резко увеличивало смертность потомства. Большинство плодов погибло постнатально от тяжелых патологий сердца, вызванных дозозависимой дилатационной кардиомиопатией (Noorlander et al., 2008).

Исследование влияния флуоксетина на транскрипцию генов, связанных с транспортерами серотонина, дофамина и норадреналина и рецепторами на ранних стадиях развития на костистой рыбе *Danio rerio* показало, что уровень транскрипции транспортеров серотонина и дофамина (*ser1* и *dat*), а также *vmat* снижался при адекватных возможном в среде концентрациях. Уровни мРНК рецепторов *5-ht2c*, *drd2b*, *adra2b* и *adra2c* также снижались после воздействия флуоксетина (Cunha et al., 2017). У самок *Danio rerio* флуоксетин приводил также к уменьшению количества яйцеклеток, содержания эстрадиола в яичниках, а также к снижению уровня экспрессии мРНК овариальной ароматазы и рецепторов к гонадотропным гормонам (Lister et al., 2009).

Данные о воздействии флуоксетина на собственно оогенез ограничиваются показанным нами устранением этим блокатором SERT стимулирующего эффекта серотонина на экспрессию ряда генов в клетках гранулезы (Nikishin et al., 2019).

Пароксетин, еще один блокатор обратного захвата серотонина, обратил на себя внимание большим канадским эпидемиологическим исследованием, сообщившим о пугающем увеличении на 620 процентов заболеваемости раком груди у женщин, которые его получали в течение четырех лет. Хотя затем эта величина была сочтена избыточной, другие исследования показали многочисленные побочные эффекты пароксетина, не обнаруженные при клинических испытаниях препа-

рата, среди которых и дефекты у новорожденных (Nevels et al., 2016).

Другой ингибитор — сертралин — на мышцах вызывал даже в умеренных дозах увеличение процента плодов с висцеральными и скелетными нарушениями. Кроме того, у получивших препарат животных наблюдалось неполное окостенение, у ряда плодов наблюдалось расщепление неба (Cabrera et al., 2020). На *Drosophila melanogaster*, использованной в качестве модельной системы для определения эффектов сертралина на развитие, это вещество не влияло на фертильность самок и эмбриогенез потомства, но у личинок, получивших сертралин, наблюдались задержка развития и уменьшенная выживаемость на всех стадиях развития (Jajoo et al., 2020).

Таким образом, блокаторы обратного захвата серотонина в течение всего периода оогенеза и эмбриогенеза в большей или меньшей степени представляют собой опасность различных патологий развития, помимо куда более изученных эффектов на психику взрослых. Талидомидная трагедия, казалось бы, многому научила исследователей, работающих в этой области, но, как можно видеть из нашего обзора, далеко не всегда заставляет проявлять достаточную бдительность, особенно когда речь идет о ходовом, хорошо продающемся препарате.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие исследований роли трансммиттеров в донервный период еще больше, чем на классических объектах, зависит не только от возникающих у исследователей идей, но в немалой степени и от появления и доступности тех или иных новых технологий. Начавшись во вполне традиционном духе эмбриологических и физиологических экспериментов 60-х годов XX века, они прошли стадию применения биохимических, цитологических и электрофизиологических методик, которые радикально сменились молекулярно-биологическими подходами, пока более ограничивающимися исследованиями экспрессии мРНК различных компонентов трансммиттерной системы. Очевидно, что предстоит переход к уточнению вопроса об экспрессии и функциональной активности соответствующих белков, а тогда — на основе этих знаний — и возвращение на новом уровне собственно физиологического подхода к изучению функций трансммиттеров — от ооцита до нейрона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выполнено в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН 2021 г. № ГЗ 0088-2021-0009, при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-04-00303) для Ю.Ш., Н.А., Л.М., Д.Н. и гранта Президента РФ (проект № МК-931.2020.4) для Д.Н., Н.А. Оригинальные исследования авторов выполнены с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. 1967. Москва, Наука. 265 с.

Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. 1987. М. Наука

Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. Онтогенез. 2007. 38 (4): 262–270.

Бузников Г.А., Манухин Б.Н. Влияние серотонина на эмбриональную моторику голожаберных моллюсков. Ж. общ. биол. 1960. 21 (5): 347–352.

Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б. Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные связи у ранних зародышей морских ежей. Онтогенез. 1978. 9 (2): 173–178.

Бузников Г.А., Мальченко Л.А., Никитина Л.А., Галанов А.Ю., Еманов В.С. Эффект нейротрансмиттеров и их антагонистов на созревание ооцитов. 1. Эффект серотонина и его антагонистов на чувствительность ооцитов морской звезды к 1-метиладенину. Онтогенез. 1990. 21: 375–380.

Григорьев Н.Г. Кортикальный слой цитоплазмы – возможное место действия донервных трансмиттеров. Ж. эвол. биохим. физиол. 1988. 24 (5): 625–629.

Коштыянец Х.С. Проблемы энзимохимии возбуждения и торможения и эволюции функций нервной системы. Изд. АН СССР. 1963. Москва.

Мартынова Л.Е. Гастрюляция у морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* в норме и при обработке различными веществами. Онтогенез. 1981. 12: 310–315.

Никитина Л.А., Мальченко Л.А., Теплиц Н.А., Бузников Г.А. Эффект серотонина и его аналогов на созревание ооцитов *in vitro*. Онтогенез. 1988. 19: 336–343.

Никитина Л.А., Трубникова О.Б., Бузников Г.А. Эффекты нейротрансмиттеров и их антагонистов на созревание ооцитов. Эффект антагонистов серотонина на созревание *in vitro* ооцитов амфибий. Онтогенез. 1993. 24: 229–236.

Никишин Д.А., Семенова М.Н., Шмуклер Ю.Б. Экспрессия генов трансмиттерных рецепто-

ров в раннем развитии морского ежа *Paracentrotus lividus*. Онтогенез. 2012. 43 (3): 212–216.

Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Локализация серотонина и его мембранного транспортера в яичнике мышцы. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия “Естественные и технические науки”. 2017а. № 11: 22–25.

Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Динамика экспрессии компонентов серотонинергической системы в клетках гранулезы развивающегося овариального фолликула и при лютеинизации. Гены и клетки. 2017б. 12 (4): 37–42.

Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развивающемся овариальном фолликуле мышцы. Доклады Академии наук. 2018а. 478 (1): 103–106.

Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мышцы. Онтогенез. 2018б. 49 (3): 208–216.

Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л., Шмуклер Ю.Б. Влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы в культуре *in vitro*. Фундаментальные аспекты психического здоровья, 2018в. № 4: 13–17.

Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Алешина Н.М., Мальченко Л.А., Шмуклер Ю.Б. Опосредованное ооцитом влияние серотонина на функциональный статус клеток гранулезы. Онтогенез, 2021. 52 (2): 000–000 в печати.

Ростомян М.А., Абрамян К.С., Бузников Г.А., Гусарева Э.В. Электронно-цитохимическое выявление аденилатциклазы у ранних эмбрионов морского ежа. Цитология. 1985. 27: 877–881.

Шмуклер Ю.Б. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. III. Влияние нейрофармакологических препаратов на тип дробления половинных зародышей *Scaphechinus mirabilis*. Онтогенез. 1981. 12 (4): 404–409.

Шмуклер Ю.Б. Специфическое связывание [H³]8-ОН-DРАТ ранними зародышами морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Биол. Мембр. 1992. 9 (10–11): 1167–1169.

Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. Трансмиттерные системы в эмбриогенезе – современное состояние проблемы. Успехи физиологических наук. 2018. 49 (4): 81–92.

Шмуклер Ю.Б., Бузников Г.А., Григорьев Н.Г., Мальченко Л.А. Влияние циклических нуклеотидов на чувствительность ранних зародышей морских ежей к цитотоксическим нейрофармакологическим препаратам. Булл. экп. биол. мед. 1984. 97 (3): 354–355.

- Aktas H., Wheeler M.B., First N.L., Leibfried-Rutledge M.L.* Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP]i may have physiological relevance in bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1995. 105: 237–245.
- Aluigi M.G., Diaspro A., Ramoino P., Russo P., Falugi C.* The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, as a model to investigate the onset of molecules immunologically related to the α -7 subunit of nicotinic receptors during embryonic and larval development. *Curr. Drug Targets.* 2012. 13 (5): 587–593.
- Amenta F., Vega J.A., Ricci A., Collier W.L.* Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *Anat. Rec.* 1992. 233. (3): 478–484.
- Amireault P., Dubé F.* Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes. *Mol. Pharmacol.* 2005a. 68 (6): 1678–1687.
- Amireault P., Dubé F.* Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol. Reprod.* 2005b. 73 (2): 358–365.
- Amireault P., Sibon D., Côté F.* Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci.* 2013. 4 (1): 64–71.
- Azmitia E.C.* Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 2001. 56 (5): 413–424.
- Basu B., Desai R., Balaji J., Chaerkady R., Sriram V., Maiti S., Panicker.* Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *MM. Reproduction.* 2008. 135 (5): 657–669.
- Batta S.K., Knudsen J.F.* Calcium concentration in cumulus enclosed oocytes of rats after treatment with pregnant mares serum. *Biol. Reprod.* 1980. 22: 243–246.
- Beyer T., Danilchik M., Thumberger T., Vick P., Tisler M., Schneider I., Bogusch S., Andre P., Ulmer B., Walentek P., Niesler B., Blum M., Schweickert A.* 2012. Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 22, 33–39.
- Bòdis J., Bognár Z., Hartmann G., Török A., Csaba I.F.* Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1992. 33 (3): 165–167.
- Bòdis J., Török A., Tinneberg H.R., Hanf V., Papenfuss F., Schwarz H.* Serotonin induces progesterone release from human granulosa cells in a superfused granulosa cell system. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 1993. 253 (2): 59–64.
- Burnik-Papler T., Vrtacnik-Bokal E., Maver A., Kopitar A.N., Lovrečić L.* Transcriptomic analysis and meta-analysis of human granulosa and cumulus cells. *PloS One.* 2015. 10 (8): e0136473.
- Buznikov G.A., Marshak T.L., Malchenko L.A., Nikitina L.A., Shmukler Yu.B., Buznikov A.G., Rakic Lj., Whitaker M.J.* Serotonin and acetylcholine modulate the sensitivity of early sea urchin embryos to protein kinase C activators. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998. 120A (2): 457–462.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Galanov A.Y., Malchenko L.A., Trubnikova O.B.* The control of oocyte maturation in the starfish and amphibians by serotonin and its antagonists. *Int. J. Dev. Biol.* 1993. 37: 363–364.
- Buznikov G.A., Peterson R.E., Nikitina L.A., Bezuglov V.V., Lauder J.M.* The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence. *Neurochem. Res.* 2005. 30 (6–7): 825–837.
- Cabrera R.M., Lin Y.-L., Law E., Kim J., Wlodarczyk B.J.* The teratogenic effects of sertraline in mice. *Birth Defects Res.* 2020. 112 (13): 1014–1024.
- Capasso A., Creti P., De Petrocellis B., De Prisco P., Parisi E.* Role of dopamine and indolamine derivatives in the regulation of sea urchin adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1988. 154: 758–764.
- Cerdà J., Subhedar N., Reich G., Wallace R.A., Selman K.* Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.* 1998. 59 (1): 53–61.
- Chaiyamoong A., Tinikul R., Chaichotranunt S., Poomthong T., Suphamungmee W., Sobhon P., Tinikul Y.* Distribution and dynamic expression of serotonin and dopamine in the nervous system and ovary of *Holothuria scabra* during ovarian maturation. *Journal of Comparative Physiology A.* 2018. 204: 391–407.
- Cho W.K., Stern S., Biggers J.D.* Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.* 1974. 187: 383–386.
- Čikoš Š., Veselá J., Il'kova G., Rehák P., Czikková S., Koppel J.* Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2005. 71: 145–153.
- Clausell D.E., Soliman K.F.* Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia.* 1978. 34 (3): 410–411.
- Collart C., Owens N.D.L., Bhaw-Rosun L., Cooper B., De Domenico E., Patrushev I., Sesay A.K., Smith J.N., Smith J.C., Gilchrist M.J.* High-resolution analysis of gene activity during the *Xenopus* mid-blastula transition. *Development.* 2014. 141 (9): 1927–1939.
- Noorlander C.W., Ververs F.F.T., Nikkels P.G.J., van Echteld C.J.A., Visser G.H.A., Smidt M.P.* Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart car-

- diomyopathy and lifelong behavioral abnormalities. *PLoS One*. 2008. 3 (7): e2782.
- Côté F., Fligny C., Bayard E., Launay J.-M., Gershon M.D., Mallet J., Vodjdani G. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 2007. 104 (1): 329–334.
- Creeley C.E., Denton L.K. Use of Prescribed Psychotropics during Pregnancy: A Systematic Review of Pregnancy, Neonatal, and Childhood Outcomes. *Brain Sci*. 2019. 9 (9): 235.
- Cunha V., Rodrigues P., Santos M.M., Moradas-Ferreira P., Ferreira M. Fluoxetine modulates the transcription of genes involved in serotonin, dopamine and adrenergic signalling in zebrafish embryos, *Chemosphere*. 2017.
- Darszon A., Labarca P., Nishigaki T., Espinosa F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 79: 481–510.
- Dekel N., Beers W.H. 1978. Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75: 4369–4373.
- Devic E., Paquereau L., Steinberg R., Caput D., Audigier Y. Early expression of a beta1-adrenergic receptor and catecholamines in *Xenopus* oocytes and embryos. *FEBS Lett*. 1997. 417: 184–190.
- Dietrich J.E., Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse preimplantation embryo. *Development*. 2007. 134 (23): 4219–4231.
- Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sciences*. 2007. 81: 1627–1637.
- Frazer A., Hensler J.G. Serotonin Receptors. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. (Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., eds). Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
- Gardner D.K., Lane M., Calderon I., Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: Metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril*. 1996. 65: 349–353.
- Garnerot F., Pellerin J., Blaise C., Mathieu M. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Gen. Comp. Endocrinol*. 2006. 149 (3): 278–284.
- Giannaccini G., Betti L., Palego L., Schmid L., Fabbrini L., Pelosini C., Gargini C., Da Valle Y., Lanza M., Marsili A., Maffei M., Santini F., Vitti P., Pinchera A., Lucacchini A. Human serotonin transporter expression during megakaryocytic differentiation of MEG-01 cells. *Neurochem. Res*. 2010; 35 (4): 628–635.
- Graveleau C., Paust H.J., Schmidt-Grimminger D., Mukhopadhyay A.K. Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000. 85 (3): 1277–1286.
- Hagström B.E., Lönning S. The sea urchin egg as a testing object in toxicology. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1973. 1: 3–49.
- Hamdan F.F., Ungrin M.D., Abramovitz M., Ribeiro P. Characterization of a novel serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*: cloning and expression of two splice variants. *J Neurochem*. 1999. 72: 1372–1383.
- Hinckley M., Vaccari S., Horner K., Chen R., Conti M. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev. Biol*. 2005.287: 249–261.
- Hohmann S., Schweinfurth N., Lau T., Deuschle M., Lederbogen F., Banaschewski T., Schloss P. Differential expression of neuronal dopamine and serotonin transporters DAT and SERT in megakaryocytes and platelets generated from human MEG-01 megakaryoblasts. *Cell Tissue Res*. 2011. 346 (2): 151–161.
- Homburger F., Chaube S., Eppenberger M., Bogdonoff P.D., Nixon C.W. Susceptibility of certain inbred strains of hamsters to teratogenic effects of thalidomide. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1965. 7 (5): 686–693.
- Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev*. 1994. 46 (2): 157–203.
- Iľkova G., Rehak P., Vesela J., Čikoš Š., Fabian D., Czikková S., Koppel J. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote*. 2004. 12 (3): 205–213.
- Ivashkin E., Khabarova M.Yu., Melnikova V., Nezhlin L.P., Kharchenko O., Voronezhskaya E.E., Adameyko I. Serotonin Mediates Maternal Effects and Directs Developmental and Behavioral Changes in the Progeny of Snails. *Cell Rep*. 2015 Aug 18; 12 (7): 1144–58. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.022>
- Jequier E., Robinson D.S., Lovenberg W., Sjoerdsma A. Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem. Pharmacol*. 1969. 18: 1071–1081.
- Jajoo A., Donlon C., Shnyder S., Levin M., McVey M. Sertraline induces DNA damage and cellular toxicity in *Drosophila* that can be ameliorated by antioxidants. *Sci. Rep*. 2020. 10 (1): 4512.
- Kaihola H., Yaldir F.G., Hreinsson J., Hörmaeus K., Bergquist J., Olivier J.D.A., Åkerud H., Sundström-Poromaa I. Effects of Fluoxetine on Human Embryo Development. *Front Cell Neurosci*. 2016. 10: 160.

- Katow H., Yaguchi S., Kyozyuka K.* Serotonin stimulates $[Ca^{2+}]_i$ elevation in ciliary ectodermal cells of echinoplutei through a serotonin receptor cell network in the blastocoel. *J. Exp. Biol.* 2007. 210 (Pt 3): 403–412.
- Kaur S., Archer K.J., Devi M.G., Kriplani A., Strauss J.F., Singh R.* Differential gene expression in granulosa cells from polycystic ovary syndrome patients with and without insulin resistance: identification of susceptibility gene sets through network analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2012. 97 (10): E2016–2021.
- Kidder G.M., Vanderhyden B.C.* Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: Ensuring oocyte developmental competence. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2010. 88 (4): 399–413.
- Koppa M., Bodis J., Verzar Z., Tinneberg H.-R., Török A.* Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine.* 2004. 24 (2): 155–159.
- Krantic S., Dube F., Querion R. and Guerrier P.* Pharmacology of the serotonin induced meiosis reinitiation of *Spisula* oocytes. *Develop. Biol.* 1991. 146: 491–497.
- Lauder J.M., Moiseiwitsch J., Liu J., Wilkie M.B.* Serotonin in development and pathophysiology. In: *Brain Lesions in the Newborn* (Lou H.C., Griesen G., Larsen J., Falck, eds.). 1994. Munksgaard, Copenhagen. P. 60–72.
- Lawrence T.S., Beers W.H., Gilula N.B.* Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature.* 1978. 272: 501–506.
- Levin M., Buznikov G.A., Lauder J.M.* Of minds and embryos: left-right asymmetry and the serotonergic controls of pre-neural morphogenesis. *Dev Neurosci.* 2006. 28 (3): 171–185.
- Lister A., Regan C., Van Zwol J., Van Der Kraak G.* Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquat. Toxicol.* 2009. 95 (4): 320–329.
- Liu C., Peng J., Matzuk M.M., Yao H.H.-C.* Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature Communications.* 2015. 6: 6934.
- Loewi O.* Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I: Mittellung. *Pflügers Arch.* 1921. 189 (3): 239–242.
- Masseau I., Bannon P., Anctil M., Dubé F.* Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.* 2002. 202 (1): 23–33.
- Misri S., Kendrick K.* Treatment of perinatal mood and anxiety disorders: a review. *Can J Psychiatry.* 2007. 52 (8): 489–98.
- Misri S., Reebye P., Kendrick K., Carter D., Ryan D., Grunau R.E., Oberlander T.F.* Internalizing behaviors in 4-year-old children exposed in utero to psychotropic medications. *Am. J. Psychiatry.* 2006. 163: 1026–1032.
- Moore C.J., DeLong N.E., Chan K.A., Holloway A.C., Petrik J.J., Sloboda D.M.* Perinatal administration of a selective serotonin reuptake inhibitor induces impairments in reproductive function and follicular dynamics in female rat offspring. *Reprod. Sci.* 2015. 22 (10): 1297–1311.
- Muzik M., Hamilton S.E.* Use of Antidepressants During Pregnancy? What to Consider when Weighing Treatment with Antidepressants Against Untreated Depression. *Matern. Child Health J.* 2016. 20 (11): 2268–2279.
- Nevels R.M., Gontkovsky S.T., Williams B.E.* Paroxetine – The Antidepressant from Hell? Probably Not, But Caution Required. *Psychopharmacol. Bull.* 2016. 46 (1): 77–104.
- Nikishin D.A., Ivashkin E.G., Mikaelyan A.S., Shmukler Y.B.* Expression of serotonin receptors during early embryogenesis. *Simpler Nervous Systems, IX East European Conference of the International Society for Invertebrate Neurobiology.* 2009. P. 70 (Abstr).
- Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V., Shmukler Yu.B.* Expression of serotonergic system components during early *Xenopus* embryogenesis. *Int. J. Developm. Biol.* 2012. 56: 385–391.
- Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić Lj., Bezuglov V.V., Shmukler Yu.B.* Expression and functional activity of neurotransmitter system components in sea urchins' early development. *Zygote.* 2016. 24 (2): 206–218.
- Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., Shmukler Yu.B.* Analysis of Expression and Functional Activity of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (DDC) and Serotonin Transporter (SERT) as Potential Sources of Serotonin in Mouse Ovary. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20: 3070.
- Niu W., Wang Y., Wang Z.; Xin Q., Wang Y., Feng L., Zhao L., Wen J., Zhang H., Wang C., Xia G.* JNK signaling regulates E-cadherin junctions in germline cysts and determines primordial follicle formation in mice. *Development.* 2016. 143, 1778–1787.
- Owens N.D., Blitz I.L., Lane M.A., Patrushev I., Overton J.D., Gilchrist M.J., Cho K.W., Khokha M.K.* Measuring Absolute RNA Copy Numbers at High Temporal Resolution Reveals Transcriptome Kinetics in Development. *Cell Rep.* 2016. 14 (3): 632–647.
- Peters M.A., Walenkamp A.M., Kema I.P., Meijer C., de Vries E.G., Oosting S.F.* Dopamine and serotonin regulate tumor behavior by affecting angiogenesis. *Drug Resist Updat.* 2014. 17 (4–6): 96–104.
- Preis K.A., Seidel G.Jr., Gardner D.K.* Metabolic markers of developmental competence for in vitro-

- matured mouse oocytes. *Reproduction*. 2005. 130: 475–483.
- Ram D., Gandotra S. Antidepressants, anxiolytics, and hypnotics in pregnancy and lactation. *Indian J Psychiatry*. 2015. 57 (Suppl. 2): S354–S371.
- Robson J.M., Sullivan F.M. Serotonin as a Teratogen. *BMJ*. 1964. 5379: 370.
- Rudnick G., Nelson P.J. Platelet 5-hydroxytryptamine transport, an electroneutral mechanism coupled to potassium. *Biochemistry*. 1978. 17 (22): 4739–42.
- Rudnick G., Sandtner W. Serotonin transport in the 21st century. *J. Gen. Physiol*. 2019. 151 (11): 1248–1264.
- Salustri A., Yanagishita M., Underhill C.B., Laurent T.C., Hascall V.C. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev. Biol*. 1992. 151 (2): 541–551.
- Sarrouilhe D., Mesnil M. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie*. 2019. 161: 46–50.
- Session A.M., Uno Y., Kwon T., Chapman J.A., Toyoda A., Takahashi S., Fukui A., Hikosaka A., Suzuki A., Kondo M., van Heeringen S.J., Quigley I., Heinz S., Ogino H., Ochi H., Hellsten U., Lyons J.B., Simakov O., Putnam N., Stites J., Kuroki Y., Tanaka T., Michiue T., Watanabe M., Bogdanovic O., Lister R., Georgiou G., Paranjpe S.S., van Kruijsbergen I., Shu S., Carlson J., Kinoshita T., Ohta Y., Mawaribuchi S., Jenkins J., Grimwood J., Schmutz J., Mitros T., Mozaffari S.V., Suzuki Y., Haramoto Y., Yamamoto T.S., Takagi C., Heald R., Miller K., Haudenschild C., Kitzman J., Nakayama T., Izutsu Y., Robert J., Fortriede J., Burns K., Lotay V., Karimi K., Yasuoka Y., Dichmann D.S., Flajnik M.F., Houston D.W., Shendure J., DuPasquier L., Vize P.D., Zorn A.M., Ito M., Marcotte E.M., Wallingford J.B., Ito Y., Asashima M., Ueno N., Matsuda Y., Veensstra G.J., Fujiyama A., Harland R.M., Taira M., Rokhsar D.S. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*. 2016. 538 (7625): 336–343.
- Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J.S., Montplaisir V., Tiberi M., Baltz J.M., Liu X.J. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species. *J. Cell Physiol*. 2005. 202: 777–786.
- Shmukler Yu.B. On the possibility of membrane reception of neurotransmitter in sea urchin early embryos. *Comp. Biochem. Physiol*. 1993. 106C (1): 269–273.
- Shmukler Y., Nikishin D. Transmitters in Blastomere Interactions. In: *Cell Interactions* (ed. S.Gowder), InTech, 2012, Ch. 2. P. 31–65.
- Shmukler Yu.B., Buznikov G.A., Whitaker M.J. Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium level in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus*. *Int. J. Dev. Biol*. 1999. 42 (3): 179–182.
- Shmukler Yu.B., Grigoriev N.G., Buznikov G.A., Turpaev T.M. Regulation of cleavage divisions: participation of “prenervous” neurotransmitters coupled with second messengers. *Comp. Biochem. Physiol*. 1986. 83C (2): 423–427.
- Shuey D.L., Sadler T.W., Tamir H., Lauder J.M. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat. Embryol. (Berl)*. 1993. 187 (1): 75–85.
- Silvestre F., Boni R., Fissore R.A., and Tosti E. Ca²⁺ Signaling During Maturation of Cumulus–Oocyte Complex in Mammals. *Molecular Reproduction & Development*. 2011. 78: 744–756.
- Sneddon J.M. Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. *Br. J. Pharmacol*. 1969. 37 (3): 680–688.
- Stepińska U., Kuwana T., Olszańska B. Serotonin receptors are selectively expressed in the avian germ cells and early embryos. *Zygote*. 2015. 23 (3): 394–405.
- Stricker S.A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol*. 1999. 211: 157–176.
- Stricker S.A., Smythe T.L. 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms. *Development*. 2001. 128 (8): 1415–1427.
- Tan M.H., Au K.F., Yablonovitch A.L., Wills A.E., Chuang J., Baker J.C., Wong W.H., Li J.B. RNA sequencing reveals a diverse and dynamic repertoire of the *Xenopus tropicalis* transcriptome over development. *Genome Res*. 2013. 23 (1): 201–216.
- Tanaka E., Baba N., Toshida K., Suzuki K. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sci*. 1993. 53: 563–570.
- Tinikul Y., Joffre Mercier A., Soonklang N., Sobhon P. Changes in the levels of serotonin and dopamine in the central nervous system and ovary, and their possible roles in the ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen. Comp. Endocrinol*. 2008. 158 (3): 250–258.
- Terranova P.F., Uilenbroek J.T., Saville L., Horst D., Nakamura Y. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia. *J. Endocrinol*. 1990 125: 433–438.
- Vesela J., Rehak P., Mihalik J., Czikkova S., Pokorny J., Koppel J. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol. Res*. 2003. 52: 223–228.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P. Apical sensory neurones mediate developmental retardation induced by conspecific environmental

- stimuli in freshwater pulmonate snails. *Development*. 2004. 131 (15): 3671–80.
<https://doi.org/10.1242/dev.01237>
- Wang Q., He M.* Molecular characterization and analysis of a putative 5-HT receptor involved in reproduction process of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014. 204: 71–79.
- Yang K., Hitomi M., Stacey D.W.* Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Division*. 2006. 1: 32.
- Zatylny C., Durantou F., Boucaud-Camou E., Henry J.* Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg laying. *Mol. Reprod. Dev.* 2000. 55 (2): 182–188.

SEROTONIN SYSTEM IN OOGENESIS OF MAMMALS

Yu. B. Shmukler^{a,#}, N. M. Alyoshina^a, L. A. Malchenko^a, and D. A. Nikishin^a

^a *N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia*

[#] *e-mail: yurishmukler@yahoo.com*

The transmitters, in particular serotonin, take part in a number of processes during ontogenesis, including ones originated far before nervous system formation, among classic function. Structures and functions of serotonin system in the mammalian oogenesis are discussed also as sources and mechanisms of transmitter accumulation in the oocytes and the expression of the components of this system in the cells of mammalian female reproductive system: receptors, enzymes of transmitter synthesis and degradation, and transporters. The data are examined concerning the influence of the inhibitors of serotonin reuptake transporter SERT on the oogenesis and embryogenesis.

Keywords: serotonin, oogenesis, oocyte, granulosa, cumulus, receptor, transporter, tryptophanhydroxylase, decarboxylase of aromatic aminoacids

УДК 57.024

ВЫСШИЕ КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ПТИЦ: СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

© 2021 г. З. А. Зорина^{1,*}, Т. А. Обозова^{1,**}, А. А. Смирнова^{1,***}

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: zoyazorina17@gmail.com

**e-mail: obozovat@gmail.com

***e-mail: annsmirn1@gmail.com

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 28.10.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Сравнительное исследование высших когнитивных способностей животных позволяет оценить эволюционные предпосылки формирования мышления и языка человека. В обзоре будут рассмотрены основные подходы к исследованию мышления животных и проанализированы полученные с их помощью данные. Результаты разноплановых тестов указывают на то, что животные с высоким уровнем развития мозга обладают широким спектром когнитивных способностей. Как и ожидалось, наиболее широкий спектр выявлен у человекообразных обезьян. Сходный по многим показателям спектр обнаружен у высших представителей класса птиц (врановых и попугаеобразных), несмотря на иное строение их мозга. Конвергентное сходство степени развития когнитивных способностей высших представителей млекопитающих и птиц отражает наличие единых факторов, определяющих их эволюцию. Сравнение нескольких видов врановых и попугаеобразных указывает на то, что высокий уровень развития их когнитивных способностей обусловлен высоким уровнем организации их мозга, а не особенностями экологии.

Ключевые слова: сравнительные исследования, мышление животных, высшие когнитивные способности, врановые, попугаи, понгиды

DOI: 10.31857/S004446772103014X

ВВЕДЕНИЕ

Одна из важнейших фундаментальных проблем современной когнитивной науки — поиск эволюционных предпосылок высших когнитивных функций человека, прежде всего мышления и языка. Согласно основной гипотезе на этот счет, высказанной еще Ч. Дарвином, даже самый сложный психический процесс — мышление человека — сформировался в результате эволюции высших когнитивных функций животных. Один из подходов к проверке этой гипотезы — широкое сравнительное изучение рассудочной деятельности животных.

Ниже будут рассмотрены основные подходы к исследованию высших когнитивных способностей животных и проанализированы полученные с их помощью данные. Особое внимание будет уделено сходству спектров когнитивных способностей понгид (челове-

кообразных обезьян) и высших представителей класса птиц (семейство врановых и отряд попугаеобразных). Эти группы птиц включают десятки видов, обитающих в различных регионах и радикально различающихся по своей экологии. В связи с этим возникает вопрос, специфичен ли высокий уровень развития когнитивных способностей лишь для отдельных видов или же он присущ многим представителям этих семейств в соответствии с высоким уровнем организации их мозга.

Основные подходы к исследованию высших когнитивных функций животных

Экспериментальные исследования высших когнитивных функций животных активно ведутся с начала XX века при помощи постоянно дополняемого комплекса тестов и с

учетом данных, полученных путем наблюдений в природных или приближенных к ним условиях.

После долгого периода скепсиса и дискуссий стало неоспоримым, что животным присущи не только наследственно обусловленные формы поведения и способность к обучению, но и различные виды мышления (наглядно-действенное, образное, понятийное). Мышление позволяет получать знание о таких свойствах, процессах, связях и отношениях действительности, которые не могут быть восприняты органами чувств, т.е. знание о существенных свойствах, связях и отношениях объектов и явлений (Леонтьев, 1983; Крушинский, 1977). Основу мышления составляют несколько взаимосвязанных операций, таких как обобщение (мысленное объединение предметов, явлений, действий и т.п. по общим для них существенным признакам) и абстрагирование (отвлечение от второстепенных признаков); сравнение, основанное на оценке сходства и различия; индукция и дедукция.

Поскольку сходные по внешнему проявлению поведенческие акты могут иметь разную природу — разный вклад врожденных и приобретенных компонентов (причем приобретенные компоненты могут быть обусловлены только обучением или же включать компоненты мышления), для исследования мышления животных важно представлять врожденный репертуар поведения конкретного вида, а также иметь возможность разделить механизмы, обусловленные непосредственным обучением или же операциями мышления. Последнее возможно, если создать в эксперименте ситуацию, относительно выхода из которой у субъекта нет готового решения — приобретенного в процессе обучения или врожденного (Лурия, 2003). Именно создание таких новых ситуаций является задачей большинства экспериментальных парадигм, используемых для исследования мышления животных.

Среди них можно выделить класс задач, структура которых определена физическими закономерностями (эмпирическими законами, Крушинский, 1977), которые субъект может усвоить в процессе жизни (“folk physics”, Rovinelli, 2000; Taylor, 2020). Такие задачи могут быть решены без обучения в ходе эксперимента за счет реорганизации ранее полученного опыта (путем инсайта; Köhler, 1925). В тестах такого рода оценивают, например,

наличие у животного представления о том, что предмет продолжает существовать и после того, как он исчезает из поля зрения (“object permanence”; Piaget, 1954; Pepperberg, Funk, 1990; Pepperberg et al., 1997; Hoffmann et al., 2011; Pollok et al., 2000; Krachun, Plowright, 2007; Zucca et al., 2007; Salwiczek et al., 2009; Ujfalussy et al., 2013; Singer, Henderson, 2015; Zentall, Pattiso, 2016; Zentall, Raley, 2019; Caicoya et al., 2019); или о том, что направление движения объекта, скрывшегося из поля зрения, позволяет предсказать, где он окажется в следующий момент (тест на экстраполяцию направления движения; Poletaeva, Zorina, 2014; Крушинский, 1977; Полетаева и др., 2017); или представление о том, что тонущие объекты поднимают уровень воды (Эзопов тест; Seed et al., 2006; Mendes et al., 2007; Bird, Emery, 2009b; Cheke et al., 2011; Hanus et al., 2011; Jelbert et al., 2014; Schwing et al., 2019) и т.п.

Животные с разными уровнями организации мозга заметно различаются по способности усваивать элементарные физические закономерности. Ярким примером таких различий может служить наличие или отсутствие представления о том, что предмет продолжает существовать и после того, как он исчез из поля зрения. Голубей можно обучить искать спрятанную пищу (Krachun, Plowright, 2007; Zentall, Raley, 2019), но, в отличие от врановых и попугаев, они не способны самостоятельно сформировать представление о “неисчезаемости” объектов (Pepperberg, Funk, 1990; Pepperberg et al., 1997; Pollok et al., 2000; Zucca et al., 2007; Salwiczek et al., 2009; Auersperg et al., 2014a; Jacobs et al., 2019).

К этому же типу экспериментальных парадигм можно отнести тесты, требующие использования орудий (или их упрощенных аналогов) для достижения приманки (Köhler, 1925; Werdenic, Huber, 2006; Bird, Emery, 2009a; Багоцкая и др., 2010; Shumaker et al., 2011; Sabbatini et al., 2012; Seed et al., 2012; McGrew, 2013; Обозова и др., 2013; Völter, Call, 2014; Jacobs, Osvath, 2015; Bohn et al., 2017; van Casteren, 2017; Visalberghi et al., 2017; Manriquea et al., 2017; Habl, Auersperg, 2017; Auersperg et al., 2011a, 2011b; 2016; 2018; Laumer et al., 2019; Gruber et al., 2019). Эти задачи могут быть решены без обучения в ходе эксперимента — за счет реорганизации ранее полученного опыта (путем инсайта; Köhler, 1925). Способность использовать орудия слабо выражена у низших узконосых обезьян и не вы-

явлена у хищных млекопитающих. Как будет рассмотрено ниже, не только понгиды, но и разные виды врановых птиц и попугаев способны решать “орудийные” задачи, демонстрируя при этом понимание причинно-следственных отношений и свойств, которыми должен обладать объект, чтобы его можно было использовать в качестве орудия (Werdenic, Huber, 2006; Bird, Emery, 2009a, 2009b; Багоцкая и др., 2010; McGrew, 2013; Hahl, Auersperg, 2017; Jelbert et al., 2018; Gruber et al., 2019; Laumer et al., 2016; 2017 и др.).

К другому типу экспериментальных парадигм можно отнести задачи, структура которых определена экспериментатором, и поэтому решению их базового варианта животных надо обучить. Именно эти методы используют для исследования способности животных к операциям логического вывода, обобщению, абстрагированию, формированию понятий, оценке сходства и различия, символизации. Примерами таких задач могут быть обучение дифференцировке (выбору определенных “правильных” стимулов; Зорина, Смирнова, 1995; 1996; Обозова и др., 2009; Agrillo et al., 2017; Bortot et al., 2020) либо одной из разновидностей задачи выбора по образцу (например, выбору по сходству с образцом или выбору по условному соответствию образцу; Wilson et al., 1985; Vonk, 2013; Smirnova et al., 2000; 2015; Obozova et al., 2015; Magnotti et al., 2015; Wright et al., 2016; 2017; Samuleeva, Smirnova, 2020; Wasserman et al., 2021).

После обучения механизм решения этих задач (уровень достигнутого животным обобщения) оценивают с помощью тестов на перенос правила выбора, в которых используют новые стимулы. Именно тесты на перенос создают новую ситуацию, относительно выхода из которой у субъекта нет готового решения, но оно может быть найдено путем выполнения операций мышления (Лурия, 2003). В тестах на перенос используют новые стимулы знакомой или новой категории. В первом случае для решения задачи требуется оперировать знакомым признаком, а во втором — выявить новый признак для сопоставления. Возможность переноса правила выбора на стимулы новой категории свидетельствует о том, что животное усвоило обобщенное правило выбора и, вероятно, способно оперировать соответствующим понятием.

Животные с разными уровнями организации мозга и высших когнитивных функций

заметно различаются по способности формировать правила выбора, которые обобщены настолько, что применимы к стимулам новых категорий. Готовность формировать обобщенные правила (и, соответственно, готовность использовать операции мышления) заметно отличается у животных с разными уровнями организации мозга — например, у понгид (шимпанзе, орангутанов, горилл), с одной стороны, и других обезьян, с другой (Oden et al., 1988; Fagot et al., 1999; Hopkins, Washburn, 2002; Flemming et al., 2011), или у врановых и попугаев по сравнению с голубями или другими птицами (Wilson et al., 1985; Smirnova et al., 2000; 2015; Elmore et al., 2012; Obozova et al., 2015; Magnotti et al., 2015; 2017; Wright et al., 2016; 2017; Samuleeva, Smirnova, 2020; Bastos, Taylor, 2020; Pepperberg, 1987; 2018; 2020).

При помощи процедуры выбора по образцу не только обнаружено, что понгиды, дельфины, врановые и попугаи могут формировать и использовать абстрактные понятия (например, число или сходство/различие; Смирнова и др., 2000; Смирнова, 2011; Zentall et al., 2014; Самулеева и др., 2015; Smirnova et al., 2015; Obozova et al., 2015), но и что они способны усваивать символы для их обозначения (Matsuzawa, 1985; Murofushi 1997; Biro, Matsuzawa 2001; Boysen, Berntson, 1989; Boysen, Hallberg, 2000; Самулеева, Смирнова, 2019; Samuleeva, Smirnova, 2020).

При помощи другого подхода для исследования способности животных к символизации — обучения человекообразных обезьян (Fouts, Mills, 1998; Fouts, Waters, 2001; Зорина, Смирнова, 2006; Gardner, 2007; Savage-Rumbaugh et al., 2009; Lyn, 2012; Rumbaugh, 2013) или попугаев (Pepperberg, 1987; 2006; 2009; 2018; 2020; Pepperberg, Gordon, 2005; Pepperberg, Carey, 2012) простейшим аналогом человеческого языка (языкам-посредникам) — показано, что усваиваемые ими коммуникативные системы обладают зачатками важнейших свойств второй сигнальной системы: семантической, преднамеренностью, продуктивностью, перемещаемостью.

Еще одним подходом к исследованию высших когнитивных функций животных является исследование зачатков их самосознания (“self-awareness”). Одним из показателей способности формировать образ самого себя (“Я-концепция”) считают способность узнавать свое отражение в зеркале (Anderson, Gallup, 2015; Gallup, Anderson, 2020). Для срав-

нительного изучения этой способности используют тест с меткой (Gallup, 1970), суть которого заключается в том, что на участок тела животного, находящийся вне поля его зрения, наносят метку, а затем сравнивают уровень внимания к метке при наличии зеркала и без него. Результатом, свидетельствующим об узнавании своего отражения, считают большее внимание к зоне нанесения метки именно при наличии зеркала. Подавляющее большинство накопленных к настоящему времени данных указывает на то, что узнавание своего отражения требует высокого уровня развития мозга и мышления, поскольку эта способность обычно выявляется лишь у отдельных представителей видов с высокоорганизованным мозгом: у понгид — шимпанзе и орангутанов (Gallup, 1970; Anderson, Gallup, 2015; Gallup, Anderson, 2020); слонов (Plotnik et al., 2006), дельфинов (Reiss, Marino, 2001; Morrison, Reiss, 2018), врановых птиц (Prior et al., 2008; Clary, Kelly, 2016; Ostojić et al., 2016; 2017; Buniyaadi et al., 2020).

Еще одним направлением исследования самосознания у животных является оценка их способности формировать представления о психическом состоянии другого индивида (“theory of mind”). В десятках работ обнаружено, что многие виды животных могут учитывать знания и намерения других особей: приматы (Call, Tomasello, 2008; van der Vaart, Hemelrij, 2014; Heyes, 2015; Krupenye, Call, 2019), врановые птицы и попугаеобразные (Emery, Clayton, 2004; Emery, Clayton 2016; Dally et al., 2010; Bugnyar et al., 2016; Legg et al., 2016; Tornick et al., 2016; Ostojić et al., 2016; 2017; Krupenye, Call, 2019; Krashennikova et al., 2019a; 2019b), дельфины (Pack, 2015; Hill et al., 2018), собаки (Catala et al., 2017). Однако только у понгид к настоящему времени обнаружена способность различать между истинными и ложными знаниями других особей (Krupenye et al., 2016; Kano et al., 2017), что ранее считали уникальной особенностью людей (Kaminski et al., 2008; Hare, 2011; Call, Tomasello, 2008).

Безусловно, максимальной степенью развития высших когнитивных способностей обладают понгиды (шимпанзе, орангутаны, гориллы). Это заключение коррелирует с данными о высоком уровне организации их мозга (Rilling, 2014; Herculano-Houzel et al., 2017). Высокая степень развития мышления обнаружена также у дельфинов (Reiss, Marino, 2001; Pack, 2015; Singer, Henderson, 2015;

Morrison, Reiss, 2018, Филатова, 2018) и слонов (Plotnik et al., 2006; Byrne et al., 2009; Irie, Hasegawa, 2009; Plotnik et al., 2014; 2019; Plotnik, Clayton, 2015; Irie et al., 2019), хотя высшие когнитивные способности этих групп изучены не столь детально.

Меньшей степенью развития высших когнитивных способностей по ряду показателей обладают другие приматы (Hopkins, Washburn, 2002; Flemming et al., 2011; Schmitt et al., 2012; Wright et al., 2017; Anderson, Gallup, 2015; Gallup, Anderson, 2020), хищные млекопитающие (Крушинский, 1977; Новоселова, 2001; Фирсов, Чиженков, 2004; Osthaus et al., 2005; Erdőhegyi et al., 2007; Rooijackers et al., 2009; Whitt et al., 2009; Zentall, Pattiso, 2016; Fiset, Plourde, 2013; Stanton et al., 2017) и птицы, не относящиеся к врановым и попугаеобразным (Krachun, Plowright, 2007; Elmore et al., 2012; Kraft et al., 2017; Zentall, Raley, 2019; Zentall, Raley, 2019), из которых лучше всего исследованы голуби, хотя их мозг по многим показателям значительно уступает мозгу высших представителей класса птиц (Portmann, 1946, 1947; 1978; Воронов, 1999, Olkowicz et al., 2016; Sayol et al., 2016; 2018).

У врановых и попугаеобразных обнаружен спектр высших когнитивных способностей, по многим показателям сходный с тем, что был выявлен у понгид. Об этом сходстве свидетельствуют данные, полученные в многочисленных независимых исследованиях с применением различных экспериментальных подходов. Некоторые аспекты высших когнитивных способностей этих птиц будут подробнее описаны в соответствующем разделе ниже.

Мозг врановых и попугаеобразных

Сходство спектров высших когнитивных способностей человекообразных обезьян и высших представителей класса птиц долгое время представлялось парадоксальным, поскольку мозг птиц отличается от мозга млекопитающих как по макро-, так и по микроструктуре. Длительное время его считали принципиально более примитивным из-за отсутствия в нем шестислойной новой коры. В настоящее время это представление пересмотрено. В последние два десятилетия, благодаря радикальным изменениям в представлениях о структурно-функциональной организации мозга птиц (Jarvis et al., 2005; Reiner, 2009; Olkowicz et al., 2016; Güntürkün, Bugnyar,

2016; Gutiérrez-Ibáñez et al., 2016; Sayol et al., 2016; Emery, 2016; Herculano-Houzel, 2017; Голубева, Корнеева, 2018; Обухов, Обухова, 2010; Maler, 2018; Обухов, Андреева, 2019), ошибочное представление о примитивности их мозга перестало противоречить данным, свидетельствующим о значительном вкладе мышления в поведение их высших представителей.

Еще в середине прошлого века стало известно, что врановые и попугаеобразные превосходят большинство других птиц по значению полушарного индекса Портмана (Portman, 1947) — показателя относительного размера переднего мозга птиц, который определяют как отношение средней массы переднего мозга исследуемого вида птиц к средней массе ствола мозга птиц из отряда куриных со сходным весом тела. К примеру, у сизого голубя этот показатель равен 4, тогда как у серой вороны и амазона он близок к 16. Позже было обнаружено, что врановые птицы превосходят голубей как по сложности структуры нейронов (Доброхотова, 1978), так и по величине нейроглиальных комплексов, содержащих до 30 элементов у ворон и не более 10 у голубей (Воронов, 1999). Недавно показано, что число нейронов на единицу объема паллиума у голубей намного ниже, чем у врановых и попугаев (Olkowicz et al., 2016).

В конце XX века стали появляться данные, свидетельствующие о том, что филогенетически молодые структуры мозга птиц (гиперстриатум и неостриатум), несмотря на то, что имеют ядерный тип организации, выполняют те же функции, что и новая кора млекопитающих (Крушинский, 1977; Зорина, Федотова, 1981; Богословская, Поляков, 1981). Позднее было обнаружено, что эти структуры в эмбриогенезе имеют такое же происхождение, что и новая кора (развиваются из паллиума), т.е. они гомологичны ей (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005; Reiner, 2009). Соответственно, согласно новой номенклатуре гиперстриатум и неостриатум называют не ядрами стриатума, а частями паллиума — *Hyper- и Nidopallium* (Reiner et al., 2004; Jarvis et al., 2005; Reiner, 2009; Зорина, Обозова, 2011; Güntürkün, Bugnyar, 2016). Тот факт, что некоторые структуры переднего мозга птиц являются гомологами новой коры млекопитающих, а не только ее аналогами, подтверждают данные, полученные при анализе РНК, выделенной из нидо- и мезопаллиума птиц. Оказалось, что набор РНК в мезопаллиуме птиц

совпадает с набором РНК во 2, 3, 5 и 6-м слоях новой коры млекопитающих (Briscoe et al., 2018). Обнаружено, что в мозге птиц и млекопитающих модульные сетевые связи организованы сходным образом (Shanahan et al., 2013).

Мозг птиц чрезвычайно компактен, однако его небольшие абсолютные размеры компенсирует повышенная плотность нейронов. Так, число нейронов в структурах паллиума у врановых и попугаеобразных примерно такое же, как у капуцинов (несмотря на вчетверо меньший абсолютный вес полушарий), и значительно больше, чем у голубей (Olkowicz et al., 2016).

Коэффициент энцефализации у врановых и попугаеобразных больше, чем у других групп птиц (Portmann, 1946, 1947; Sayol et al., 2016), и близок к таковому у приматов (Sayol et al., 2016). Если говорить о различиях внутри семейства врановых птиц, то у новокаледонских ворон, которые известны своей ярко выраженной способностью к орудийной деятельности, индекс энцефализации больше, чем у других представителей семейства: черной вороны, европейской сороки и европейской сойки (Snotka et al., 2008). Однако это может быть обусловлено тем, что новокаледонские вороны относятся к островным видам — недавно было обнаружено, что птицы-эндемики островов имеют больший относительный размер мозга по сравнению с филогенетически близкими к ним материковыми видами (Sayol et al., 2018).

Гипотезы о связи сложности социальной организации и уровня развития высших когнитивных способностей

Наряду с представлением о том, что широкий спектр доступных врановым и попугаеобразным когнитивных способностей обусловлен высоким уровнем развития их переднего мозга (например, Güntürkün, Bugnyar, 2016), существует тенденция связывать высокий уровень развития их когнитивных способностей со степенью сложности социальной организации конкретных видов (Emery et al., 2007; Krasheninnikova et al., 2013; 2019a; Boucherie et al., 2019).

Идея о влиянии сложности социальной организации на относительные размеры мозга лежала в основе “гипотезы социального мозга” (“social brain hypothesis”), которая была предложена для объяснения того факта,

что у приматов относительные размеры мозга больше, чем у других позвоночных животных (Dunbar, 1992). В соответствии с этой гипотезой, чем с большим числом сородичей контактирует животное, тем большее количество информации оно должно обрабатывать и тем больше у него должен быть размер мозга. По отношению к птицам была сформулирована другая гипотеза (“relationship intelligence hypothesis”, Emery et al., 2007), согласно которой относительный вес мозга больше у тех видов птиц, которые формируют более долговременные связи с сородичами. Однако доказательная база этой гипотезы вызывает сомнения. Так, в числе доказательств авторы (Emery et al., 2007) приводят сравнение грачей (*Corvus frugilegus*) и галок (*Corvus monedula*) с альбатросами и гусями, основываясь на том, что последние по ошибочному мнению авторов не формируют долговременные социальные связи (Scheiber et al., 2008).

О возможном влиянии сложности социальной организации на уровень развития высших когнитивных способностей (“social intelligence hypothesis”) могут свидетельствовать данные, полученные на четырех видах попугаеобразных (Krasheninnikova et al., 2013). Представители видов с более сложной социальной структурой сообщества — очковые воробьиные попугайчики (*Forpus conspicillatus*) и радужные лорикеты (*Trichoglossus moluccanus*) — успешнее решали протоорудийные задачи, требующие понимания причинно-следственных связей, чем зеленкрылые ара (*Ara chloropterus*) и большие желтохохлые какаду (*Cacatua galerita*).

Современные тенденции в сравнительно-психологических исследованиях

Ответ на вопрос, какие факторы влияют на уровень развития мозга и высших когнитивных способностей, может дать сопоставление их спектров у большого числа видов с разной или сходной экологией и с различными репертуарами видоспецифического поведения. Именно такая тенденция характерна для исследований, проводимых в последнее время.

Характеристика когнитивных способностей врановых и попугаеобразных первоначально складывалась на основе экспериментов с представителями единичных видов. Так, основным объектом наших исследований были и остаются серые вороны (*Corvus cornix*), у которых благодаря этому описан це-

лый спектр высших когнитивных способностей (Зорина, Федотова, 1981; Зорина, Смирнова, 1995; 1996; 2008; 2011; 2013; 2018; Зорина и др., 2001; Багоцкая и др., 2010; Smirnova et al., 2000; Lazareva et al., 2004; Смирнова, 2011; Smirnova et al., 2015; 2019; Samuleeva, Smirnova, 2020). Большой объем данных о высших когнитивных способностях попугаеобразных был получен благодаря работам Ирен Пепперберг (Pepperberg, 1987; Pepperberg, Funk, 1990; Pepperberg et al., 1997; Pepperberg, 2006; 2009; 2018; 2020; Pepperberg, Gordon, 2005; Pepperberg, Carey, 2012; Pepperberg et al., 2019) на серых попугаях (*Psittacus erithacus*).

В последнее десятилетие круг исследуемых видов значительно расширился. Например, среди врановых те или иные аспекты когнитивных способностей исследованы более чем у 10 видов: у серых ворон (*Corvus cornix*), большешклювых ворон (*Corvus macrorhynchos*; Обозова и др., 2018), новокаледонских ворон (*Corvus moneduloides*; Auersperg et al., 2011a; Taylor, 2014; 2020; Cnotka et al., 2008; Rutz et al., 2016b; Jelbert et al., 2014; 2018; 2019; von Bayern et al., 2018; Clayton, Taylor, 2019), черных ворон (*Corvus corone corone*; Hoffmann et al., 2011; Cibulski et al., 2014), гавайских ворон (*Corvus hawaiiensis*; Rutz et al., 2016a; Klump et al., 2018), обыкновенных воронов (*Corvus corax*; Heinrich, 2011; Cibulski et al., 2014; Bugnyar et al., 2016; Kabadayi et al., 2016; Kabadayi, Osvath 2017b; Jacobs et al., 2019; Adriaense et al., 2019), грачей (*Corvus frugilegus*; Seed et al., 2006; Tebbich et al., 2007; Bird, Emery, 2009a), галок (*Corvus monedula*; Ujfalussy et al., 2013; Kabadayi et al., 2016; Lee et al., 2019), обыкновенных сорок (*Pica pica*; Pollok et al., 2000; Prior et al., 2008), голубых соек (*Cyanopica cyanus*; Jones, Kamil, 1973; Wang et al., 2019), обыкновенных (европейских) соек (*Garrulus glandarius*, Zucca et al., 2007; Cheke et al., 2011; Cheke, Clayton, 2012; Ostojic et al., 2017), калифорнийских кустарниковых соек (*Aphelocoma californica*, Correia et al., 2007; Ostojic et al., 2017).

С попугаеобразными сравнительные исследования проводятся уже более чем с 35 видами. Среди крупных представителей попугаеобразных с большим коэффициентом энцефализации, в дополнение к серым попугаям (*Psittacus erithacus*; Pepperberg, 2006; 2009; 2018; 2020; Pailian et al., 2020; Krasheninnikova et al., 2019b; Brucks, von Bayern, 2020), накапливаются данные о высших когнитивных

способностях кеа (*Nestor notabilis*; Huber, Gajdon, 2006; Werdenich, Huber, 2006; Auersperg et al., 2011a; 2011b; Schwing et al., 2019), венесуэльских амазонов (*Amazona amazonica*; Obozova et al., 2015;), какаду Гоффина (*Cacatua goffiniana*; Auersperg et al., 2013; Auersperg et al., 2014a; 2014b; 2016; 2018; Laumer et al., 2016; 2017; Habl, Auersperg, 2017; Auersperg, von Bayern, 2019), горных ара (*Primolius couloni*, Brucks, von Bayern, 2020) и др.

В последнее время наблюдается расширение набора используемых методов, а также сочетание лабораторных экспериментов и наблюдений в природе. Очень ценны попытки сравнительного исследования когнитивных способностей разных видов стандартизированными методами: например, сравнение орудийной деятельности orangutanов (Laumer, 2019) и какаду (Laumer, 2016) или новокаледонских ворон и кеа (Auersperg et al., 2011a); сравнение способности планировать действия при решении многостадийных орудийных задач у новокаледонских ворон, детей и взрослых (Miller et al., 2020); сравнение способности оперировать понятиями “сходство”/“различие” и выявлять сходство по аналогии у серых ворон (Smirnova et al., 2015) и амазонов (Obozova et al., 2015); сравнение способности оценивать потребности сородичей у калифорнийских кустарниковых и обыкновенных соек (Ostojić et al., 2017).

В то же время попытка использования комплекса тестов, ранее успешно примененного для сравнительной оценки когнитивных способностей приматов, выявила неприемлемость их использования для оценки когнитивных способностей птиц без тонкой настройки методик под особенности конкретной группы животных (Krasheninnikova et al., 2019a). В этом исследовании представители четырех видов попугаев (солдатский ара (*Ara ambiguus*), синегорлый ара (*Ara glaucogularis*), красноухий ара (*Ara rubrogenys*) и серых попугаев (*Psittacus erithacus*)) справились с группой тестов, оценивающих способность к социальным взаимодействиям (“theory of mind”; способность к обучению путем наблюдения и к коммуникации и пр.) не хуже понгид (Krupenye, Call, 2019; Krasheninnikova et al., 2019a), что согласуется с полученными в других работах данными (Emery, Clayton, 2004; Emery, Clayton 2016; Dally et al., 2010; Bugnyar et al., 2016; Legg et al., 2016; Tornick et al., 2016; Ostojić et al., 2016; 2017; Krupenye, Call, 2019; Krasheninnikova et al., 2019a; 2019b; Brucks, von

Bayern, 2020). Однако эти птицы не справились с тестами, оценивающими понимание простейших физических закономерностей, причинно-следственных связей и т.п., что резко противоречит данным, ранее полученным в многочисленных независимых исследованиях (Крушинский, 1977; Pollok et al., 2000; Zucca et al., 2007; Salwiczek et al., 2009; Hoffmann et al., 2011; Ujfalussy et al., 2013; Pepperberg, Funk, 1990; Pepperberg et al., 1997; Pollok et al., 2000; Auersperg et al., 2014a; Jacobs et al., 2019; Pailian et al., 2020). Таким образом, разработка комплексов тестов, позволяющих производить оценку высших когнитивных способностей широкого круга, все еще остается актуальной задачей.

Некоторые аспекты высших когнитивных способностей врановых и попугаеобразных

Многочисленные исследования показали, что врановые и попугаеобразные в ходе онтогенеза способны усваивать простейшие физические закономерности. Они не только демонстрируют понимание того, что предмет, скрывшийся из поля зрения, продолжает существовать, но справляются со сложными вариантами задач, для решения которых требуется оперировать представлением о “неисчезаемости” (Крушинский, 1977; Pollok et al., 2000; Zucca et al., 2007; Salwiczek et al., 2009; Hoffmann et al., 2011; Ujfalussy et al., 2013; Pepperberg, Funk, 1990; Pepperberg et al., 1997; Pollok et al., 2000; Auersperg et al., 2014a; Jacobs et al., 2019; Pailian et al., 2020).

Так, серые вороны, сороки (*Pica pica*) и галки (*Coloeus monedula*), но не хищные млекопитающие, решают задачу на оперирование эмпирической размерностью фигур, требующей понимания того, что приманка может быть спрятана в объемный полый, но не в плоский объект (Крушинский, 1977; Зорина и др., 2013). Разные виды врановых птиц и попугаеобразных справляются с максимально сложными вариантами задач, требующими отслеживать перемещение скрытой приманки. Например, с задачей, в которой нужно отслеживать перемещение содержащего корм контейнера за серией преград и определять, за которой из них корм мог быть оставлен (Pollok et al., 2000; Zucca et al., 2007; Hoffmann et al., 2011; Ujfalussy et al., 2013; Pepperberg, Funk, 1990; Pollok et al., 2000). Кроме врановых и попугаеобразных такие задачи решают только понгиды (de Blois et al., 1998; Call,

2001; Collier-Baker, Suddendorf, 2006; Collier-Baker et al., 2006).

Важно подчеркнуть, что с подобными задачами справляются виды птиц с разной экологической специализацией: сороки (*Pica pica*; Pollok et al., 2000), галки (*Corvus monedula*; Ujfalussy et al., 2013), черные вороны (*Corvus corone*, Hoffmann et al., 2011; Jacobs et al., 2019), обыкновенные (европейские) сойки (*Garrulus glandarius*, Zucca et al., 2007), калифорнийские кустарниковые сойки (*Aphelocoma californica*; Salwiczek et al., 2009), какаду Гоффина (*Cacatua goffini*; Auersperg et al., 2014a), серые попугаи (*Psittacus erithacus*; Pailian et al., 2020) и пр.

Способность использовать орудия в естественной среде обитания обнаруживается у все большего числа видов птиц, что говорит о важной адаптивной роли такого поведения. Так, африканская серая мухоловка (*Bradornis microrhynchus*) использует травинки, чтобы выживать термитов; а черный дрозд (*Turdus merula*) использует палочки, чтобы искать еду под снегом; щетинистая ворона (*Corvus rhipidurus*) разбивает камнями украденные яйца; блестящий ворон (он же индийская домовая ворона, *Corvus splendens*) при помощи листьев добывает муравьев; изменчивая сителла (*Daphoenositta chrysoptera*) не только использует, но и сохраняет палочки, которыми выживает личинок жуков-древоточцев; белокрылый сук (*Corcorax melanorhamphos*) с помощью пустых ракушек открывает раковины моллюсков (Roelofs, 2010). Недавние наблюдения за атлантическим тупиком (*Fratercula arctica*) обнаружили, что две птицы из разных колоний чесали себе грудку при помощи палочки (Fayet et al., 2020; von Bayern et al., 2020). Степень вклада наследственности, обучения и мышления в подобное поведение у конкретных видов еще предстоит выяснить.

Вклад мышления в орудийное поведение врановых и попугаеобразных обнаружен благодаря лабораторным экспериментам (Jones, Kamil, 1973; Lefebvre et al., 2002; Werdenic, Huber, 2006; Bird, Emery, 2009a; Wimpenny et al., 2009; Багоцкая и др., 2010; Shumaker et al., 2011; Rutz et al., 2016 a, b; McGrew, 2013; Jelbert et al., 2014; 2018; Auersperg, 2015; Hahl, Auersperg, 2017; Gruber et al., 2019; Laumer et al., 2016; 2017; von Bayern et al., 2018; Klump et al., 2018; Wang et al., 2019; Taylor, 2012; 2014; Rutz et al., 2018). Описанные ниже данные указывают на то, что способность врановых и попугаеобразных использовать и изготавли-

вать орудия обусловлена высоким уровнем развития их мозга и когнитивных способностей, а не только видовыми экологическими особенностями.

Так, анализ решения врановыми и попугаеобразными комплекса протоорудийных задач, в которых орудие заранее совмещено с приманкой (например, задач с различным взаимным расположением нитей и привязанных к ним приманок), показал, что в отличие от птиц с относительно менее развитым мозгом и хищных млекопитающих, они действительно учитывают связь нити с приманкой и понимают причинно-следственные связи между действиями и их результатом (Багоцкая и др., 2010; Обозова и др., 2013; Heinrich, Bugnyar, 2005; Taylor et al., 2012; Wang et al., 2019; Jacobs, Osvath, 2015; Werdenich, Huber, 2006). Причем этот результат обнаружен и у тех птиц, у которых орудийная деятельность не входит в видоспецифический репертуар поведения.

Большой объем данных накоплен об орудийной деятельности новокаледонских ворон (*Corvus moneduloides*; Weir et al., 2002; Snotka et al., 2008; Auersperg et al., 2011a; Wimpenny et al., 2009; Kacelnik et al., 2012; McGrew, 2013; Taylor, 2014; Rutz et al., 2016b; von Bayern et al., 2018; Jelbert et al., 2014; 2018; Logan et al., 2016; Gruber et al., 2019; Wang et al., 2019; Claiton, Taylor, 2019). Использование орудий входит в репертуар их видоспецифического поведения — эти птицы регулярно используют ветки, палочки и кусочки жестких листьев для добывания личинок насекомых из-под коры деревьев (Hunt et al., 2012; Taylor et al., 2011; Matsui et al., 2016; Rutz et al., 2016b). Родственный новокаледонским воронам островной вид — гавайская ворона (*Corvus hawaiiensis*) — использует орудия похожим образом (Rutz et al., 2016 a; Klump et al., 2018).

Помимо безусловного врожденного компонента (Kenward et al., 2005; Kenward et al., 2006), заметный вклад в орудийную деятельность новокаледонских ворон вносит обучение. Молодые птицы вплоть до второго года жизни не достигают той степени развития навыков в изготовлении и использовании орудий, которая свойственна взрослым особям. Родители продолжают кормить молодых птиц до 20-месячного возраста, что дает последним возможность обучаться не только путем проб и ошибок, но и путем наблюдения (Holzhaider et al., 2010; Hunt et al., 2012). Лабораторные эксперименты обнаружили их спо-

способность обучаться использованию орудий путем наблюдения не только за поведением других ворон (Logan et al., 2016), но и людей (Kenward et al., 2006).

О вкладе высших когнитивных функций в орудийную деятельность новокаледонских ворон свидетельствуют данные лабораторных экспериментов (Weir et al., 2002; Rutz et al., 2018). Например, об этом может свидетельствовать тот факт, что эти птицы способны изготавливать орудия из новых материалов. В видоспецифическом поведенческом репертуаре новокаледонских ворон есть шаблонное действие, которым они сгибают веточки (Rutz et al., 2016b). Однако в экспериментальных условиях ворона Бетти тремя разными способами изгибала прямую проволоку, создавая подобие крючка, чтобы подтянуть с ее помощью контейнер с приманкой со дна узкого прозрачного цилиндра (Weir et al., 2002). Подобная пластичность орудийного поведения может указывать на вклад мышления в его реализацию (Gruber et al., 2019). О вкладе высших когнитивных функций в орудийную деятельность новокаледонских ворон свидетельствуют и другие факты. Например, недавно было обнаружено, что новокаледонские вороны способны сделать вывод о весе объекта (и, в зависимости от этого, о возможности использовать его в качестве орудия), оценивая, как на объект влияет поток воздуха (Jelbert et al., 2019). Они оказались способны соединять две полые трубки, для того чтобы создать более длинное орудие, позволяющее дотянуться до приманки и подтащить ее (von Bayern et al., 2018). Ранее способность изготавливать составные орудия была выявлена лишь у некоторых понгид (Köhler, 1925; Lethmate, 1982; Bania et al., 2009; Price et al., 2009; Shumaker et al., 2011).

Новокаледонские вороны способны решать многостадийные задачи на добывание приманки, для решения которых необходимо планировать последовательность действий. После ознакомления со всеми компонентами задачи (установленными в разных отсеках экспериментальными установками, с размещенными внутри орудиями или приманкой) птицы успешно выбирали (первая стадия) из двух орудий (например, палочки и камня) именно то, которое позволяло на второй стадии получить следующий инструмент, необходимый для добывания приманки на заключительной стадии. Для выбора подходящего орудия птицы должны были оперировать

представлениями об особенностях экспериментальных установок на следующих стадиях, поскольку они не могли их видеть в момент выбора (Gruber et al., 2019).

С подобной задачей справлялись и какаду Гоффина (Laumer et al., 2016; Weinhauer et al., 2018), для которых орудийная деятельность в естественных условиях не описана. Сравнение поведения новокаледонских ворон, 3- и 5-летних детей, и взрослых людей (Miller et al., 2020) с поведением какаду (Laumer et al., 2016) и орангутанов (Laumer et al., 2019) при решении подобных задач выявило как черты сходства, так и некоторые различия. Так, взрослые люди, какаду и вороны (но не дети и не орангутаны) могли воздержаться от выбора орудия, когда в нем не было необходимости. Взрослые люди, орангутаны и какаду (но не вороны и не дети) могли воздержаться от выбора нефункциональных орудий. Какаду и новокаледонские вороны хуже орангутанов и детей справлялись с задачами, где на каждом этапе нужно было выбирать между двумя установками, двумя орудиями и двумя разными приманками.

С многостадийными задачами, требующими планировать будущие действия, справлялись также обыкновенные вороны (*Corvus corax*; Kabadayi, Osvath, 2017b). Например, они выбирали из четырех предложенных объектов именно камень, поскольку только с его помощью спустя 15 мин они могли открыть дверцу экспериментальной установки и получить приманку. Вороны продемонстрировали высокий уровень самоконтроля — они отказывались от доступной в данный момент, но менее ценной приманки ради жетона, который в будущем они могли обменять на более ценную приманку. Кроме того, эти птицы оказались способны ожидать возможности обменять жетон на приманку в течение 17 ч (Kabadayi, Osvath, 2017b), тогда как бонобо и орангутаны делали это лишь в течение 30 мин (Bourjade et al., 2014). Хотя один из авторов ранее исследовал подобные способности понгид (Osvath, Persson, 2013), данные этой работы вызвали неоднозначную реакцию и нуждаются в уточнении (Voecle, Clayton, 2017; Redshaw et al., 2017). Однако сходство способности к самоконтролю врановых и попугаеобразных с одной стороны и понгид с другой подтверждают данные и других исследований (для обзора см. Miller et al., 2019).

Способность высокоорганизованных птиц планировать будущие действия подтвержда-

ют также данные о том, что обыкновенные сойки (*Garrulus glandarius*) и калифорнийские кустарниковые сойки (*Aphelocoma californica*) запасают пищу, которую они хотели бы получить в будущем, а не ту, в которой они заинтересованы в настоящее время (Correia et al., 2007; Cheke, Clayton, 2012).

На возможность мысленного “путешествия во времени” указывают также данные о наличии у калифорнийских кустарниковых соек (*Aphelocoma californica*) памяти, подобной эпизодической, т.е. способности оперировать представлениями о том, что, где и когда произошло и различать события, произошедшие в разное время (Clayton, Dickinson, 1998; Clayton et al., 2001; 2003a; 2003b). Например, эти птицы помнили, какую пищу (арахис или мучных червей), в какую емкость с песком и когда они спрятали. Если они получали доступ к кладовкам, спустя небольшой промежуток времени после запасаения пищи, когда мучные черви (предпочитаемый, но быстро портящийся корм) могли быть еще свежими, они в первую очередь проверяли именно места, где были спрятаны черви; если же проходило больше времени, то они предпочитали “кладовки” с арахисом (для того чтобы избежать выбора по запаху, в обоих случаях емкости с песком заменяли на такие же, но без запасенной пищи). При помощи задачи, имитирующей “игру в наперстки”, в которой объект, спрятанный на глазах у испытуемого под непрозрачный цилиндр, перемещали несколько раз, меняя его расположение с пустыми цилиндрами, было обнаружено, что серые попугаи (*Psittacus erithacus*) обладают зрительной рабочей памятью, превосходящей память 6–8-летних детей и сравнимой с памятью взрослых людей (Pailian et al., 2020).

Возвращаясь к обсуждению орудийной деятельности, важно отметить, что способность использовать и изготавливать орудия обнаружена не только у тех видов птиц, у которых орудийная деятельность является типичным элементом видоспецифического поведения. Например, среди врановых в условиях эксперимента использовать орудия оказались способны голубые сойки (*Cyanocitta cristata*; Jones, Kamil, 1973), грачи (*Corvus frugilegus*; Bird, Emery, 2009a, b; Seed et al., 2006; Tebbich et al., 2007) и обыкновенные вóроны (Kabadayi, Osvath, 2017b).

В настоящее время нет данных о том, что попугаеобразные используют орудия в есте-

ственных условиях (Habl, Auersperg, 2017; Auersperg et al., 2018; Beinhauer et al., 2018; Auersperg, von Bayern, 2019; O’Hara et al., 2019). Однако в условиях эксперимента они, как и врановые, оказались способны не только использовать, но даже изготавливать орудия и планировать их применение в будущем.

Еще в 2000-е годы стали появляться данные о выдающихся манипуляционных и инновационных способностях кеа (*Nestor notabilis*). Группа исследователей под руководством Людвига Губера изучала их “технический интеллект” – способность оценивать физические свойства объектов, понимать причинно-следственные связи и использовать орудия. У кеа была обнаружена способность применять орудия в разнообразных новых ситуациях. Они, как и врановые птицы, оказались способны планировать серию будущих действий – последовательно выбирать орудия, необходимые для решения задачи на следующей стадии (Huber, Gajdon, 2006). К настоящему времени в авиарии на территории Haidlhof Reseach station в Вене сформировалась единственная в Европе размножающаяся в неволе колония кеа (28 особей). На ее базе продолжается систематическое изучение “технического интеллекта” этих попугаев (Werdenich, Huber, 2006; Auersperg et al., 2011a; 2011b; Schwing et al., 2019).

В последнее десятилетие способность к орудийной деятельности в лабораторных условиях была обнаружена еще у одного представителя попугаеобразных – какаду Гоффина (*Cacatua goffiniana*). Один из содержащихся в лаборатории попугаев (Фигаро) отломил щепку, чтобы с ее помощью достать откатившийся орех (Auersperg et al., 2012). Почти сорок лет назад аналогичным случайным образом была обнаружена способность к орудийной деятельности у голубых соек (Jones, Kamil, 1973). Далее Фигаро продемонстрировал способность изготавливать орудия из разных материалов: дерева, воска, веток с листьями (Auersperg et al., 2016), проволоки (Laumer et al., 2017), картона (Auersperg et al., 2018). С помощью этих орудий птица успешно решала задачи разного уровня сложности. Например, Фигаро, а затем и другие какаду, сопоставляли форму предметов, предлагаемых в качестве орудий, и форму отверстия в экспериментальной установке, и выбирали именно тот предмет, который мог пройти в это отверстие и открыть доступ к приманке (Habl, Auersperg, 2017). Какаду успешно

справлялись с задачами, в которых требовалось максимизировать выгоду и минимизировать усилия, прилагаемые для достижения цели: они выбирали именно то орудие из двух предложенных (палочки и шарика), при помощи которого могли получить предпочитаемый корм (Laumer et al., 2016).

Таким образом, виды врановых и попугаеобразных, у которых применение орудий не входит в репертуар видоспецифического поведения, в условиях лабораторных экспериментов оказались способны использовать, изготавливать орудия и планировать их применение не менее успешно, чем новокаледонские вороны, которые регулярно делают это в естественной среде обитания.

У серых попугаев (*Psittacus erithacus*), но не у горных ара (*Primolius couloni*), обнаружена способность к кооперации: они помогали сородичу получить корм, не имея от этого никакой явной выгоды (Brucks, von Bayern, 2020). Например, самка, которую научили обменивать жетон на лакомство, в ситуации, когда отверстие, через которое происходил обмен с экспериментатором, было закрыто, передавала кольцо находившемуся в смежной клетке самцу, у которого отверстие для обмена было открыто. Такое поведение напоминает проявления альтруизма, ранее обнаруженные у понгид (де Вааль, 2017). Какаду не проявляли беспокойства, если сородич получал больше корма, выполняя те же действия, или если он получал столько же корма, выполнив меньше действий (Brucks, von Bayern, 2020).

Как уже упоминалось выше, и врановые, и попугаеобразные могут формировать обобщенные правила выбора и оперировать такими понятиями, как “число”, “сходство/различие” и др. (Koehler, 1953; Wilson et al., 1985; Зорина, Смирнова, 1995; 1996; Smirnova et al., 2000; 2015; Obozova et al., 2015; Magnotti et al., 2015; Wright et al., 2016; 2017; Samuleeva, Smirnova, 2020; Pepperberg, 1987; 2018; 2020). Мы обнаружили, что серые вороны (*Corvus cornix*) и венесуэльские амазоны (*Amazona amazonica*) способны формировать обобщенное правило выбора по сходству с образцом, применимое к стимулам новых категорий, и в том числе распознавать сходство двухкомпонентных стимулов по аналогии соотношения их компонентов (Smirnova et al., 2015; Obozova et al., 2015), что ранее считали доступным только детям старше 5–6 лет и понгидам (Premack, 1983; Wasserman et al., 2017; Hochmann et al., 2017).

Как и понгиды (Fouts, Mills, 1998; Fouts, Waters, 2001; Зорина, Смирнова, 2006; Gardner, 2007; Savage-Rumbaugh et al., 2009; Lyn, 2012; Rumbaugh, 2013), врановые и попугаеобразные способны усвоить символы для обозначения понятий (Смирнова, 2011; Самулеева и др., 2015; Самулеева, Смирнова, 2019; Samuleeva, Smirnova, 2020; Пепперберг, 2017; Pepperberg, 1987; 2006; 2009; 2018; 2020; Pepperberg, Gordon, 2005; Pepperberg, Carey, 2012; Зорина и др., 2018). Например, Ирен Пепперберг, благодаря применению особой методики (с участием двух человек, один из которых демонстрировал желаемое поведение и соперничал с попугаем за внимание тренера), удалось обучить серых попугаев (*Psittacus erithacus*) произношению и значению десятков английских слов, причем не только названиям конкретных объектов и не скольким необходимым в быту фразам (“хочу пить”, “хочу домой” и пр.), но и названиям категорий, таких как “цвет” (и названия семи цветов), “форма” (и названия пяти форм), “материал” (и названия пяти материалов), “число” (и названия семи числительных от 0 до 6). В тестах, в которых попугаям демонстрировали наборы новых объектов, они (и особенно один из трех попугаев — Алекс) успешно отвечали на такие вопросы, как “сколько зеленых?”, “сколько деревянных?”, “какого цвета больше/меньше?”, “какая цифра больше/меньше?”, “какого цвета 8 / 7 / 6 ...?” (про разноцветные пластиковые цифры), “что разное/одинаковое?” (ответы: “форма”; “материал”; “цвет”; Пепперберг, 2017; Pepperberg, 1987; 2006; 2009; 2018; 2020; Pepperberg, Gordon, 2005; Pepperberg, Carey, 2012; Pepperberg et al., 2019).

Результаты теста с меткой указывают на то, что некоторые врановые птицы: сороки (*Pica pica*; Prior et al., 2008), ореховки Кларка (*Nucifraga columbiana*; Clary, Kelly, 2016), индийские домовые вороны (*Corvus splendens*, Buniyaadi et al., 2019) и серые вороны (Смирнова, Самулеева, 2017; экспериментальная статья готовится к печати) — способны узнавать свое отражение в зеркале. О наличии у высокоорганизованных птиц элементов самосознания свидетельствует также их способность учитывать знания и намерения сородичей (Clayton, Emery, 2003; Emery, Clayton, 2004; Emery, Clayton 2016; Dally et al., 2010; Bugnyar et al., 2016; Legg et al., 2016; Tornick et al., 2016; Brecht, 2017; Ostojic et al., 2016; 2017). Например, обыкновенные вороны

(*Corvus corax*) адекватно изменяли свое поведение (запасали или не запасали корм), не видя сородича, а руководствуясь лишь основным на собственном опыте предположением (перед тестированием каждому вóрону давали возможность побыть как наблюдателем, так и наблюдаемым) о том, может ли он их видеть. Вóроны не запасали корм, если было открыто маленькое отверстие в стенке, разделяющей две смежные клетки, и сородич в соседней клетке, которого они не могли видеть, но слышали, потенциально мог видеть их. Если же глазок в соседний отсек был закрыт и сородич не мог их видеть, вóроны начинали прятать корм. Наличие сородича в соседней клетке в обоих случаях имитировали проигрыванием записи производимых им шумов. (Bugnyar et al., 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение числа исследуемых видов и расширение арсенала применяемых тестов подтверждают представление о том, что спектры высших когнитивных способностей представителей двух разных групп птиц (семейства врановых и отряда попугаеобразных), несмотря на 300 млн. лет независимого филогенетического развития и значительные различия в строении мозга, сходны с обнаруженными у человекообразных обезьян и превосходят те, что описаны для других млекопитающих (Крушинский, 1977; Зорина, Смирнова, 2008; 2011; 2013; 2018; Emery, 2006; 2016; Emery, Clayton, 2004; 2005; 2009; 2016; Clayton, Emery, 2015; Seed et al., 2009; Osvath et al., 2014; Güntürkün, 2012; Güntürkün, Bugnyar, 2016; Güntürkün et al., 2017; Van Horik et al., 2012; Taylor, 2014; Plotnik, Clayton, 2015). Факт такого сходства, по-видимому, отражает наличие единых факторов, которые определяют характер эволюции психики. Сходство спектров когнитивных способностей разных видов врановых и попугаеобразных указывает на то, что высокий уровень развития их высших когнитивных способностей обусловлен не столько особенностями экологии, сколько уровнем развития их переднего мозга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-113-50587 и при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Мозг, когнитивные системы, искусственный ин-

теллект”. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ №121032500080-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Багоцкая М.С., Смирнова А.А., Зорина З.А.* Врановые способны понимать логическую структуру задач на подтягивание закрепленной на нити прищипки. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2010. 60 (5): 543–551.
- Богословская Л.С., Поляков Г.И.* Пути морфологического прогресса нервных центров у высших позвоночных. М.: Наука, 1981. 159 с.
- Воронов Л.Н.* Особенности морфологического строения конечного мозга серой вороны и сизого голубя в связи с развитием их элементарной рассудочной деятельности. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1999. 49 (4): 684–688.
- Голубева Т.Б., Корнеева Е.А.* Головной мозг и сенсорные системы птиц: Современное представление. Орнитология: история, традиции, проблемы и перспективы. Материалы Всероссийской конференции, посвященной 120-летию со дня рождения профессора Г.П. Дементьева. М.: 2018, 119–129 с.
- де Вааль Ф.* Достаточно ли мы умны, чтобы судить об уме животных? М.: Альпина нон-фикшн, 2017. 404 с.
- Доброхотова Л.П.* Сравнительное изучение нейронного строения неостриатума птиц, обладающих различной способностью к экстраполяции. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1978. 28 (1): 162–168.
- Зорина З.А., Обозова Т.А.* Новое о мозге и когнитивных способностях птиц. Зоол. журн. 2011. 90 (7): 784–802.
- Зорина З.А., Смирнова А.А., Обозова Т.А.* Мышление птиц: понимают ли попугаи, о чем они говорят? Природа. 2018. 10: 58–64.
- Зорина З.А., Смирнова А.А.* Количественные оценки у серых ворон: обобщение по относительному признаку “большее множество”. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1995. 45 (3): 490–499.
- Зорина З.А., Смирнова А.А.* Количественная оценка серой вороной множеств, состоящих из 15–25 элементов. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1996. 46 (2): 298–301.
- Зорина З.А., Смирнова А.А.* О чем рассказали “говорящие” обезьяны (Способны ли высшие животные к оперированию символами?). М.: ЯСК, 2006. 423 с.
- Зорина З.А., Смирнова А.А.* Обобщение, умозаключение по аналогии и другие когнитивные способности врановых птиц. Когн. исслед.: Сборник науч. трудов. Ред. В.Д. Соловьев,

- Т.В. Черниговская. М.: Языки славянских культур, 2008. 148–165 с.
- Зорина З.А., Смирнова А.А. История и методы экспериментального изучения мышления животных. Современная экспериментальная психология: В 2 т. Под ред. В. А. Барабанщикова. М.: Институт психологии РАН, 2011. Т. 1. 61–87 с.
- Зорина З.А., Смирнова А.А. История экспериментального изучения мышления животных и роль идей Л.В. Крушинского в формировании современных представлений об элементарном мышлении. В кн.: Формирование поведения животных в норме и патологии: К 100-летию со дня рождения Л.В. Крушинского (1911–1984). Сост. И.И. Полетаева, З.А. Зорина М.: Языки славянских культур, 2013. 8–71 с.
- Зорина З.А., Смирнова А.А. Современные представления о когнитивных способностях врановых птиц. Орнитология: история, традиции, проблемы и перспективы. Материалы Всерос. конф., посвящ. 120-летию со дня рождения профессора Г.П. Деметьева. М.: 2018. 163–168 с.
- Зорина З.А., Смирнова А.А., Лазарева О.Ф. Умеют ли вороны “читать”? Природа. 2001. 2: 72–79.
- Зорина З.А., Федотова И.Б. Роль Wulst в решениях экстраполяционной задачи у вороновых птиц. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1981. 31 (1): 185–187.
- Крушинский Л.В. Биологические основы рассудочной деятельности. М.: Изд-во Московского университета, 1977. 270 с.
- Леонтьев А.Н. Избранные психологические произведения: В 2-х томах. Т. 2. М.: Педагогика, 1983. 320 с.
- Лурия А.Р. Основы нейропсихологии. М.: Издательский центр “Академия”, 2003. 384 с.
- Новоселова С.Л. Развитие интеллектуальной основы деятельности приматов. М.: Воронеж. 2001. 287 с.
- Обозова Т.А., Смирнова А.А., Зорина З.А. Ранний онтогенез поведения у слетков большеклювой вороны (*Corvus macrorhynchos*) их естественной среде обитания. Зоол. журн. 2018. 97 (1): 56–66.
- Обозова Т.А., Багоцкая М.С., Смирнова А.А., Зорина З.А. Сравнительная оценка способности разных видов птиц к решению протоорудийных задач. Зоол. журн. 2013. 92 (6): 731–741.
- Обозова Т.А., Смирнова А.А., Зорина З.А. Клестьеловики (*Loxia curvirostra*) способны к обобщению признака “больше”. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2009. 59 (3): 305–312.
- Обухов Д.К., Обухова Е.В. Эволюция конечного мозга птиц и млекопитающих – два пути развития – один результат. Морфология. 2010. 137 (4): 145.
- Обухов Д., Андреева Н. Эволюционная морфология нервной системы позвоночных. М.: Юрайт, 2019. 340 с.
- Пепперберг И. Алекс и я. М.: Языки славянских культур. 2017. 334 с.
- Полетаева И.И., Перепелкина О.В., Зорина З.А. Когнитивные способности животных (рассудочная деятельность) в свете генетических представлений. Вавил. журн. генет. и сел. 2017. 21 (4): 421–426.
- Самулеева М.В., Смирнова А.А., Обозова Т.А., Зорина З.А. Исследование формирования отношений симметрии между “знаком” и “обозначаемым” у серых ворон. Когнитивная наука в Москве: новые исследования (Москва, 16 июня 2015 г.). Материалы Третьей Международной постерной конференции под общ. ред. Е.В. Печенкова, М.В. Фаликман. М.: БукиВеди, 2015. 390–394 с.
- Самулеева М.В., Смирнова А.А. Изучение особенностей процесса символизации у серых ворон. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2019. 69 (4): 505–513.
- Смирнова А.А. О способности птиц к символизации. Зоол. журн. 2011. 90 (7): 803–810.
- Смирнова А.А., Зорина З.А. Когнитивные способности птиц: обобщение, использование понятий, символизация, умозаключения. В кн.: Формирование поведения животных в норме и патологии: К 100-летию со дня рождения Л.В. Крушинского (1911–1984). Сост. И.И. Полетаева, З.А. Зорина. М.: Языки славянских культур, 2013. 148–168 с.
- Смирнова А.А., Самулеева М.В. Исследование факторов, влияющих на внимание к зоне нанесения метки у серых ворон. Эволюционная и сравнительная психология в России: Теория и практика исследований под ред. И.А. Хватова, А.И. Харитоновна. М.: Когито-Центр, 2017: 142–151.
- Смирнова А.А., Калашишникова Ю.А., Самулеева М.В., Зорина З.А. Оценка способности серых ворон (*Corvus cornix*) узнавать свое отражение в зеркале. Зоол. журн. 2019. 98 (11): 1223–1232.
- Филатова О. Киты и дельфины. М.: Фитон XXI, 2018. 168 с.
- Фирсов Л.А., Чиженков А.М. Эволюция интеллекта (присущ ли разум животным?). Санкт-Петербург: Изд-во “Астер-Х”. 2004. 125 с.
- Adriaense J.E.C., Martin J.S., Schiestl M., Lamm C., Bugnyar T. Negative emotional contagion and cognitive bias in common ravens (*Corvus corax*). Proc. Natl. Acad. Sci. 2019. 116 (23): 11547 LP–11552.
- Agrillo C., Petrazzini M. E. M., Bisazza A. Numerical abilities in fish: A methodological review. Behav. Proc. 2017. 141 (2): 161–171.
- Anderson J.R., Gallup G.G. Mirror self-recognition: a review and critique of attempts to promote and en-

- gineer self-recognition in primates. *Primates*. 2015. 56 (4): 317–326.
- Auersperg A.M.I., Kacelnik A., von Bayern A.M.P. Exploratory learning and functional inferences on a five-step means-means-end problem in Goffin's Cockatoos (*Cacatua goffini*). *Plos One*. 2013. 8: e68979.
- Auersperg A.M.I. Exploration technique and technical innovations in corvids and parrots. Elsevier: Anim. creat. innov. 2015. 2: 45–72.
- Auersperg A.M.I., Borasinski S., Laumer I., Kacelnik A. Goffin's cockatoos make the same tool type from different materials. *Biol. Lett.* 2016. 12 (11): 20160689.
- Auersperg A.M.I., Köck C., O'Hara M., Huber L. Tool making cockatoos adjust the lengths but not the widths of their tools to function. *PLoS One*. 2018. 13 (11): e0205429.
- Auersperg A.M.I., Szabo B., von Bayern A.M.P., Bugnyar T. Object permanence in the goffin cockatoo (*Cacatua goffini*). *J. Comp. Psy.* 2014a. 128 (1): 88–98.
- Auersperg A.M.I., Szabo B., von Bayern A.M.P., Kacelnik A. Spontaneous innovation in tool manufacture and use in a Goffin's cockatoo. *Curr. Biol.* 2012. 22: 903–904.
- Auersperg A.M.I., von Bayern A.M.P., Gajdon G.K., Huber L., Kacelnik A. Flexibility in problem solving and tool use of kea and New Caledonian crows in a multi access box paradigm. *PLoS One*. 2011a. 6 (6): e20231.
- Auersperg A.M.I., von Bayern A.M.I., Weber S., Szabadvari A., Bugnyar T., Kacelnik A. Social transmission of tool use and tool manufacture in Goffin cockatoos (*Cacatua goffini*). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2014b. 281: 20140972.
- Auersperg A.M.I., von Bayern A.M.P. Who's a clever bird – Now? A brief history of parrot cognition. *Behaviour*. 2019. 156: 1–17.
- Auersperg A.M.I., Huber L., Gajdon G.K. Navigating a tool end in a specific direction: stick-tool use in kea (*Nestor notabilis*). *Biol. Lett.* 2011b. 7: 825–828.
- Bania A.E., Harris S.H., Kinsley R., Boysen S.T. Constructive and deconstructive tool modification by chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Anim. Cogn.* 2009. 12 (1): 85–95.
- Bastos A.P.M., Taylor A.H. Macphail's Null Hypothesis of Vertebrate Intelligence: Insights From Avian Cognition. *Front. Psychol.* 2020. 11: 1692.
- Beinhauer I., Bugnyar T., Auersperg A. Prospective but not retrospective tool selection in the Goffin's cockatoo (*Cacatua goffiniana*). *Behaviour*. 2018. 156 (5): 633–659.
- Bird C., Emery N. Insightful Problem Solving and Creative Tool Modification by Captive Nontool-using Rooks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009a. 106 (25): 10370–10375.
- Bird C., Emery N. Rooks Use Stones to Raise the Water Level to Reach a Floating Worm. *Curr. Biol.* 2009b. 19 (16): 1410–1414.
- Biro D., Matsuzawa T. Use of numerical symbols by the chimpanzee (*Pan troglodytes*): Cardinals, ordinals, and the introduction of zero. *Anim. Cogn.* 2001. 4: 193–199.
- Boeckle M., Clayton N.S. A raven's memories are for the future. *Science*. United States. 2017. 357 (6347): 126–127.
- Bohn M., Allritz M., Call J., Völter C.J. Information seeking about tool properties in great apes. *Sci. Rep.* 2017. 7: 10923.
- Bond A., Diamond J. Thinking Like a Parrot: Perspectives from the Wild. University of Chicago Press, 2019. 296 pp.
- Bortot M., Stancher G., Vallortigara G. Transfer from number to size reveals abstract coding of magnitude in honeybees. *iSci*. 2020. 23 (5): 101122.
- Boucherie P.H., Loretto M.C., Massen J.J.M., Bugnyar T. What constitutes “social complexity” and “social intelligence” in birds? Lessons from ravens. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2019. 73: 12.
- Bourjade M., Call J., Pelé M., Maumy M., Dufour V. Bonobos and orangutans, but not chimpanzees, flexibly plan for the future in a token-exchange task. *Anim. Cogn.* 2014. 17: 1329–1340.
- Boysen S.T., Berntson G.G. Numerical competence in a chimpanzee (*Pan troglodytes*). *J. Comp. Psychol.* US. 1989. 103 (1): 23–31.
- Boysen S.T., Hallberg K.I. Primate numerical competence: Contributions toward understanding non-human cognition. *Cogn. Sci.* 2000. 24: 423–443.
- Brecht K.F. A multi-faceted approach to investigating theory of mind in corvids. Doctoral thesis. 2017.
- Briscoe S.D., Albertin C.B., Rowell J.J., Ragsdale C.W. Neocortical Association Cell Types in the Forebrain of Birds and Alligators. *Curr. Biol.* 2018; 28(5): 686–696.
- Brucks D., von Bayern A.M.P. Parrots Voluntarily Help Each Other to Obtain Food Rewards. *Curr. Biol.* England. 2020. 30 (2): 292–297.
- Bugnyar T., Reber S.A., Buckner C. Ravens attribute visual access to unseen competitors. *Nat. Commun.* 2016. 7: 10506.
- Buniyaadi A., Taufique S.K.T., Kumar V. Self-recognition in corvids: evidence from the mirror-mark test in Indian house crows (*Corvus splendens*). *J. Ornithol.* 2020. 161 (2): 341–350.
- Byrne R.W., Bates L.A., Moss C.J. Elephant cognition in a primate perspective. *Comp. Cogn. Behav. Rev.* 2009. 4: 1–15.
- Caicoya Á.L., Amici F., Ensenyat C., Colell M. Object permanence in Giraffa Camelopardalis: First steps in Giraffes' physical cognition. *J. Comp. Psychol.* 2019. 133 (2): 207–214.
- Call J. Object permanence in orangutans (*Pongo pygmaeus*), chimpanzees (*Pan troglodytes*), and chil-

- dren (*Homo sapiens*). *J. Comp. Psychol.* 2001. 115: 159–171.
- Call J., Tomasello M. Does the chimpanzee have a theory of mind? 30 years later. *Trends Cogn. Sci.* 2008. 12: 187–192.
- Catala A., Mang B., Wallis L., Huber L. Dogs demonstrate perspective taking based on geometrical gaze following in a Guesser–Knower task. *Anim. Cogn.* 2017. 20 (4): 581–589.
- Cheke L., Bird C., Clayton N. Tool-use and instrumental learning in the Eurasian jay (*Garrulus glandarius*). *Anim. Cogn.* 2011. 14 (3): 441–455.
- Cheke L.G., Clayton N.S. Eurasian jays (*Garrulus glandarius*) overcome their current desires to anticipate two distinct future needs and plan for them appropriately. *Biol. Lett.* 2012. 8: 171–175.
- Cibulski L., Wascher C.A., Weiss B.M., Kotrschal K. Familiarity with the experimenter influences the performance of Common ravens (*Corvus corax*) and Carrion crows (*Corvus corone corone*) in cognitive tasks. *Behav. Proc.* 2014. 103 (100): 129–137.
- Clary D., Kelly D.M. Graded mirror self-recognition by Clark’s nutcrackers. *Sci. Rep.* 2016. 6 (1): 1–11.
- Clayton N., Emery N. What Do Jays Know About Other Minds and Other Times? *Nat. Rev. Neurosci.* 2003b. 4 (8): 685–691.
- Clayton N.S., Bussey T.J., Dickinson A. Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews Neuroscience.* 2003a. 4: 685–691.
- Clayton N.S., Dickinson A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature. England.* 1998. 395 (6699): 272–274.
- Clayton N.S., Emery N.J. Avian Models for Human Cognitive Neuroscience: A Proposal. *Neuron. United States.* 2015. 86 (6): 1330–1342.
- Clayton N.S., Griffiths D.P., Emery N. J., Dickinson A. Elements of episodic-like memory in animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2001. 356 (1413): 1483–1491.
- Cnotka J., Güntürkün O., Rehkämper G., Gray R.D., Hunt G.R. Extraordinary large brains in tool-using New Caledonian crows (*Corvus moneduloides*). *Neurosci.* 2016. Lett. 433: 241–245.
- Collier-Baker E., Davis J., Nielsen M., Suddendorf T. Do chimpanzees (*Pan troglodytes*) understand single invisible displacement? *Anim. Cogn.* 2006. 9: 55–61.
- Collier-Baker E., Suddendorf T. Do chimpanzees (*Pan troglodytes*) and 2-year-old children (*Homo sapiens*) understand double invisible displacement? *J. Comp. Psychol.* 2006. 120: 89–97.
- Correia S.P.C., Dickinson A., Clayton N.S. Western scrub-jays anticipate future needs independently of their current motivational state. *Curr. Biol.* 2007. 17: 856–861.
- Dally J.M., Emery N.J., Clayton N.S. Avian theory of mind and counter espionage by food-caching western scrub-jays (*Aphelocoma californica*). *Eur. J. Dev. Psychol.* 2010. 7: 17–37.
- de Blois S.T., Novak M.A., Bond M. Object permanence in orangutans (*Pongo pygmaeus*) and squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Psychol.* 1998. 112: 137–152.
- Dunbar R.I.M. Neocortex size as a constraint on group size in primates. *J. Hum. Evol.* 1992. 22: 469–493.
- Elmore L.C., Magnotti J.F., Katz J.S., Wright A.A.: Change detection by rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and pigeons (*Columba livia*). *J. Comp. Psychol.* 2012. 126: 203–212.
- Emery N.J. Bird brain: An exploration of avian intelligence. Princeton University Press, 2016. 192 pp.
- Emery N.J., Clayton N.S. The mentality of crows: convergent evolution of intelligence in corvids and apes. *Science.* 2004. 306: 1903–1907.
- Emery N.J. Cognitive ornithology: The evolution of avian intelligence. *Phil. Trans. R. Soc. Bio. Sci.* 2006. 361: 23–43.
- Emery N.J., Clayton N.S. An avian perspective on simulating other minds. *Learn. Behav.* 2016. 44 (3): 203–204.
- Emery N.J., Clayton N.S. Comparative social cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 2009. 60: 87–113.
- Emery N.J., Clayton N.S. Evolution of the avian brain and intelligence. *Curr. Biol. England.* 2005. 15 (23): 946–950.
- Emery N.J., Clayton N.S., Frith C.D. Introduction. Social intelligence: From brain to culture. *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* 2007. 362: 485–488.
- Erdőhegyi Á., Topál J., Virányi Z., Miklósi Á. Dog-logic: inferential reasoning in a two-way choice task and its restricted use. *Anim. Behav.* 2007. 74: 725–737.
- Fagot J., Tomonaga M. Global and local processing in humans (*Homo sapiens*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*): Use of a visual search task with compound stimuli. *J. Comp. Psychol.* 1999. 113: 3–12.
- Fayet A.L., Hansen E.S., Biro D. Evidence of tool use in a seabird. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. 117: 1277–1279.
- Fiset S., Plourde V. Object permanence in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) and gray wolves (*Canis lupus*). *J. Comp. Psychol.* 2013. 127: 115–127.
- Flemming T.M., Thompson R.K.R., Beran M.J., Washburn D.A. Analogical reasoning and the differential outcome effect: Transitory bridging of the conceptual gap for rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proces.* 2011. 37: 353–360.
- Fouts R.S., Mills S.T. Next of kin: My conversations with chimpanzees. NY: Harper Paperbacks, 1998. 448 pp.
- Fouts R.S., Waters G. Chimpanzee sign language and Darwinian continuity: Evidence for a neurology continuity of language. *Neurol. Res.* 2001. 23: 787–794.

- Gallup G.G.* Chimpanzees: Self-recognition. *Science*. 1970. 167: 86–87.
- Gallup G.G., Anderson J.R.* Self-recognition in animals: Where do we stand 50 years later? Lessons from cleaner wrasse and other species. *Psychol. Conscious.* (Wash. D. C.). *Theory Research, and Practice*. 2020. 7 (1): 46–58.
- Gardner R.A.* Review of sign language studies of cross-fostered chimpanzees. *J. Wash. Acad. Sci.* 2007. 93 (1): 37–57.
- Gruber R., Schiestl M., Boeckle M., Frohnwieser A., Miller R., Gray R.D., Clayton N.S., Taylor A.H.* New caledonian crows use mental representations to solve metatool problems. *Curr. Biol.* 2019. 29 (4): 686–692.
- Güntürkün O.* The convergent evolution of neural substrates for cognition. *Psychol. Res.* 2012. 76: 212–219.
- Güntürkün O., Bugnyar T.* Cognition without Cortex. *Trends Cogn. Sci. Eng.* 2016. 20 (4): 291–303.
- Güntürkün O., Ströckens F., Scarf D., Colombo M.* Apes, feathered apes, and pigeons: differences and similarities. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017. 16: 35–40.
- Gutiérrez-Ibáñez C., Iwaniuk A.N., Wylie D.R.* Parrots have evolved a primate-like telencephalic-mid-brain-cerebellar circuit. *Sci. Rep.* 2018. 8: 9960.
- Habl C., Auersperg A.M.I.* The keybox: Shape-frame fitting during tool use in Goffin's cockatoos (*Cacatua goffiniana*). *PLoS One*. 2017. 12 (11): e0186859.
- Hanus D., Mendes N., Tennie C., Call J.* Comparing the Performances of Apes (*Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus*) and Human Children (*Homo sapiens*) in the Floating Peanut Task. *PLoS One*. 2011. 6 (6): e19555.
- Hare B.* From hominoid to hominid mind: What changed and why? *Annu. Rev. Anthropol.* 2011. 40 (1): 293–309.
- Heinrich B.* Conflict, cooperation, and cognition in the common raven. *Advances in the Study of Behavior*. 2011. 43: 189–237.
- Heinrich B., Bugnyar T.* Testing problem solving in ravens: String-pulling to reach food. *Ethology*. 2005. 111: 962–976.
- Herculano-Houzel S.* Numbers of neurons as biological correlates of cognitive capability. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017. 16: 1–7.
- Heyes C.M.* Animal mindreading: What's the problem? *Psychon. Bull. Rev.* 2015. 22 (2): 313–327.
- Hill H., Dietrich S., Cadena A., Raymond J., Cheves K.* More than a fluke: Lessons learned from a failure to replicate the false belief task in dolphins. *Int. J. Comp. Psychol.* 2018. 31: 37823.
- Hochmann J.-R., Tuerk A.S., Sanborn S., Zhu R., Long R., Dempster M., Carey S.* Children's representation of abstract relations in relational/array match-to-sample tasks. *Cogn. Psychol.* 2017. 99: 17–43.
- Hoffmann A., Rüttler V., Nieder A.* Ontogeny of object permanence and object tracking in the carrion crow, *Corvus corone*. *Anim. Behav.* 2011. 82 (2): 359–367.
- Holzhaider J.C., Hunt G.R., Gray, R.D.* Social learning in new Caledonian crows. *Learn. Behav.* 2010. 38(3): 206–219.
- Hopkins W.D., Washburn D.A.* Matching visual stimuli on the basis of global and local features by chimpanzees (*Pan troglodytes*) and rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Anim. Cogn.* 2002. 5: 27–31.
- Huber L., Gajdon G.K.* Technical intelligence in animals: The kea model. *Anim. Cogn.* 2006. 9: 295–305.
- Hunt G.R., Holzhaider, J.C., Gray R.D.* Prolonged Parental Feeding in Tool-Using New Caledonian Crows. *Ethology*. 2012. 118: 423–430.
- Irie N., Hasegawa T.* Elephant psychology: What we know and what we would like to know. *Jpn. Psychol. Res.* 2009. 51: 177–181.
- Irie N., Hiraiwa-Hasegawa M., Kutsukake N.* Unique numerical competence of Asian elephants on the relative numerosity judgment task. *J. Ethol.* 2019. 37: 111–115.
- Jacobs I., Kabadayi C., Osvath M.* The Development of Sensorimotor Cognition in Common Ravens (*Corvus corax*) and its Comparative evolution. *Animal Behavior and Cognition*. 2019. 6 (3): 194–212.
- Jacobs I.F., Osvath M.* The String-Pulling Paradigm in Comparative Psychology. *Am. Psych. Assoc.* 2015. 129 (2): 89–120.
- Jarvis E., Güntürkün O., Bruce L., Csillag A., Karten H., Kuenzel W., Medina L., Paxinos G., Perkel D., Shimizu T., Striedter G., Wildy J., Ball G., Dugas-Ford J., Durand S., Hough G., Husband S., Kubikova L., Lee D.* Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. 6 (6): 151–159.
- Jelbert S.A., Hosking R.J., Taylor A.H., Gray R.D.* Mental template matching is a potential cultural transmission mechanism for New Caledonian crow tool manufacturing traditions. *Sci. Rep.* 2018. 8: 8956–8958.
- Jelbert S.A., Miller R., Schiestl M., Boeckle M., Cheke L.G., Gray R.D., Taylor A.H., Clayton N.S.* New Caledonian crows infer the weight of objects from observing their movements in a breeze. *Proc. Biol. Sci.* 2019. 286: 20182332.
- Jelbert S.A., Taylor A.H., Cheke L.G., Clayton N.S., Gray R.D.* Using the Aesop's fable paradigm to investigate causal understanding of water displacement by New Caledonian crows. *PLoS One*. 2014. 9: e92895.
- Jones T.B., Kamil A.C.* Tool-making and tool-using in the Northern blue jay. *Science*. 1973. 180: 1076–1078.
- Kabadayi C., Bobrowicz K., Osvath M.* The detour paradigm in animal cognition. *Anim. Cogn.* 2018. 21: 21–35.

- Kabadayi C., Krasheninnikova A., O'Neill L., van de Weijer J., Osvath M., von Bayern A.M.P.* Are parrots poor at motor self-regulation or is the cylinder task poor at measuring it? *Anim. Cogn.* 2017a. 20 (6): 1137–1146.
- Kabadayi C., Osvath M.* Ravens parallel great apes in flexible planning for tool-use and bartering. *Science*. United States. 2017b. 357 (6347): 202–204.
- Kabadayi C., Taylor L.A., von Bayern A.M., Osvath M.* Ravens, New Caledonian crows and jackdaws parallel great apes in motor self-regulation despite smaller brains. *R. Soc. Open. Sci.* 2016. 3: 160104.
- Kacelnik A., Chappell J., Kenward B., Weir A.A.S.* Cognitive Adaptations for Tool-Related Behavior in New Caledonian Crows. *Comparative Cognition: Experimental Explorations of Animal Intelligence*. Oxford University Press, 2012. 720 pp.
- Kamil A.C., Balda R.P., Olson D.J.* Performance of four seed-caching corvid species in the radial-arm maze analog. *J. Comp. Psychol.* United States. 1994. 108 (4): 385–393.
- Kaminski J., Call J., Tomasello M.* Chimpanzees know what others know, but not what they believe. *Cognition*. 2008. 109 (2): 224–234.
- Kano F., Krupenye C., Hirata S., Call J.* Eye tracking uncovered great apes' ability to anticipate that other individuals will act according to false beliefs. *Commun. Integr. Biol.* 2017. 10: 1–12.
- Kenward B., Rutz C., Weir A.A.S., Kacelnik A.* Development of tool use in New Caledonian crows: inherited action patterns and social influences. *Anim. Behav.* 2006.72: 1329–1343.
- Kenward B., Schloegl C., Rutz C., Weir A.A.S., Bugnyar T., Kacelnik A.* On the evolutionary and ontogenetic origins of tool-oriented behaviour in New Caledonian crows (*Corvus moneduloides*). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 2011. 102 (4): 870–877.
- Kenward B., Weir A.A.S., Rutz C., Kacelnik A.* Tool manufacture by naive juvenile crows. *Nature*. 2005. 433: 121.
- Klump B.C., Masuda B.M., St Clair J.J.H., Rutz C.* Preliminary observations of tool-processing behaviour in Hawaiian crows *Corvus hawaiiensis*. *Commun. Integr. Biol.* 2018. 11 (4): e1509637.
- Koehler O.* Thinking without words. *Proceedings of the 14th International Congress of Zoology*. 1953. Copenhagen, 1956. 75–88 pp.
- Köhler W.* The mentality of apes. NY: Harcourt, Brace and World. 1925.
- Krachun C., Plowright C.M.S.* When pigeons in motion lose sight of their food: Behaviour on visible displacement tasks revisited. *Canadian J. Zool.* 2007. 85: 644–652.
- Kraft F.L., Forštová T., Urhan A.U., Exnerová A., Brodin A.* No evidence for self-recognition in a small passerine, the great tit (*Parus major*) judged from the mark/mirror test. *Anim Cogn.* 2017. 20 (6): 1049–1057.
- Krasheninnikova A., Berardi R., Lind M.A., O'Neil L., Von Bayern A.M.P.* Primate cognition test battery in parrots. *Behaviour*. 2019a. 156: 721–761.
- Krasheninnikova A., Bräger S., Wanker R.* Means-end comprehension in four parrot species: explained by social complexity. *Anim. Cogn. Germany*. 2013. 16 (5): 755–764.
- Krasheninnikova A., Brucks D., Blanc S., von Bayern A.* Assessing African grey parrots' prosocial tendencies in a token choice paradigm. *R. Soc. Open Sci.* 2019b. 6 (12): 190696.
- Krupenye C., Call J.* Theory of mind in animals: Current and future directions. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* United States. 2019. 10 (6): e1503.
- Lambert M., Jacobs I., Osvath M., von Bayern A.* Birds of a feather? Parrot and corvid cognition compared. *Behaviour*. 2018. 156: 505–594.
- Laumer I.B., Auersperg A.M.I., Bugnyar T., Call J.* Orangutans (*Pongo abelii*) make flexible decisions relative to reward quality and tool functionality in a multi-dimensional tool-use task. *PLoS ONE*. 2019. 14 (2): e0211031.
- Laumer I.B., Bugnyar T., Auersperg A.M.I.* Flexible decision-making relative to reward quality and tool functionality in Goffin cockatoos (*Cacatua goffiniana*). *Sci. Rep.* 2016. 6: 28380.
- Laumer I.B., Bugnyar T., Reber S.A., Auersperg A.M.I.* Can hook-bending be let off the hook? Bending/unbending of pliant tools by cockatoos. *Proc. Biol. Sci.* 2017. 284 (1862): 20171026.
- Lazareva O.F., Smirnova A.A., Bagozkaja M.S., Zorina Z.A., Rayevsky V.V., Wasserman E.A.* Transitive responding in hooded crows requires linearly ordered stimuli. 2004. *J. Exp. Anal. Behav.* 82: 1–19.
- Lee V.E., McIvor G.E., Thornton A.* Testing relationship recognition in wild jackdaws (*Corvus monedula*). *Sci. Rep.* 2019. 9 (1): 6710.
- Lefebvre L., Nicolakakis N., Boire D.* Tools and brains in birds. *Behaviour*. 2002. 139 (3): 939–973.
- Legg E.W., Ostojić L., Clayton N.S.* Caching at a distance: A cache protection strategy in Eurasian jays. *Anim. Cogn.* 2016. 19 (4): 753–758.
- Lethmate J.* Tool-using skills of orang-utans. *J. Hum. Evol.* 1982.11: 49–64.
- Logan C.J., Breen A.J., Taylor A.H., Gray R.D., Hoppitt W.J.E.* How New Caledonian crows solve novel foraging problems and what it means for cumulative culture. *Learn. Behav.* 2016. 44: 18–28.
- Lyn H.* Apes and the evolution of language: Taking stock of 40 years of research. In J. Vonk, T.K. Shackelford (Eds.), *Oxford Library of Psychology. The Oxford handbook of comparative evolutionary psychology*. UK: Oxford University Press, 2012. 356–378 pp.
- Magnotti J.F., Katz J.S., Wright A.A., Kelly D.M.* Superior abstract-concept learning by Clark's nutcrackers (*Nucifraga columbiana*). *Biol. Lett.* 2015. 11: 20150148.

- Magnotti J.F., Wright A.A., Leonard K., Katz J.S., Kelly D.M. Abstract-concept learning in Black-billed magpies (*Pica hudsonia*). *Psychon. Bull. Rev.* 2017. 24: 431–435.
- Maler L. Brain Evolution: Intelligence without a Cortex. *Curr. Biol.* 2018. 28: 213–215.
- Manriquea H.M., Molina A.C., Posada S., Colell M. Vertical string-pulling in green jays (*Cyanocorax yncas*). *Behav. Proc.* 2017. 140: 74–80.
- Matsui H., Hunt G.R., Oberhofer K., Ogihara N., McGowan K.J., Mithraratne K., Yamasaki T., Gray R.D., Izawa E.I. Adaptive bill morphology for enhanced tool manipulation in New Caledonian crows. *Sci. Rep.* 2016. 6: 22776.
- Matsuzawa T. Use of numbers by a chimpanzee. *Nature.* 1985. 315: 57–59.
- McGrew W.C. Is primate tool use special? Chimpanzee and New Caledonian crow compared. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2013. 368 (1630): 20120422.
- Mendes N., Hanus D., Call J. Raising the level: Orangutans use water as a tool. *Biol. Lett.* 2007. 3 (5): 453–455.
- Miller R., Boeckle M., Jelbert S.A., Frohnwieser A., Wascher C.A.F., Clayton N.S. Self-control in crows, parrots and nonhuman primates. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science.* 2019. 10.
- Miller R., Gruber R., Frohnwieser A., Schiestl M., Jelbert S.A., Gray R.D., Boeckle M., Taylor A.H., Clayton N.S. Decision-making flexibility in New Caledonian crows, young children and adult humans in a multi-dimensional tool-use task. *PLoS ONE.* 2020. 15 (3).
- Morrison R., Reiss D. Precocious development of self-awareness in dolphins. *PLoS One.* 2018. 13 (1): e0189813.
- Murofushi K. Numerical matching behavior by a chimpanzee (*Pan troglodytes*): Subitizing and analogue magnitude estimation. *Jpn. Psychol. Res.* 1997. 39: 140–153.
- O'Hara M., Mioduszevska B., Haryoko T., Prawiradilaga D.M., Huber L., Auersperg A. Extraction without tooling around – The first comprehensive description of the foraging- and socio-ecology of wild Goffin's cockatoos (*Cacatua goffiniana*). *Behaviour.* 2019. 156: 661–690.
- Obozova T., Smirnova A., Zorina Z., Wasserman E. Analogical reasoning in amazons. *Anim. Cogn.* 2015. 18: 1363–1371.
- Oden D.L., Thompson R.K.R., Premack D. Spontaneous Transfer of Matching by Infant Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proces.* 1988.14: 140–145.
- Olkowicz S., Kocourek M., Lučan R.K., Porteš M., Fitch W.T., Herculano-Houzel S., Němec P. Birds have primate-like numbers of neurons in the forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. 113 (26): 7255–7260.
- Osthaus B., Lea S., Slater A. Dogs (*Canis lupus familiaris*) fail to show understanding of means end connections in a string pulling task. *Anim. Cogn.* 2005. 8: 37–47.
- Ostojić L., Cheke L.G., Shaw R.C., Legg E.W., Clayton N.S. Desire-state attribution: Benefits of a novel paradigm using the foodsharing behavior of Eurasian jays (*Garrulus glandarius*). *Commun. Integr. Biol.* 2016. 9 (2): e1134065.
- Ostojić L., Legg E.W., Brecht K.F., Lange F., Deininger C., Mendl M., Clayton N.S. Current desires of conspecific observers affect cache-protection strategies in California scrub-jays and Eurasian jays. *Curr. Biol.* 2017. 27 (2): 51–53.
- Osvath M., Kabadayi C., Jacobs I. Independent Evolution of Similar Complex Cognitive Skills: The Importance of Embodied Degrees of Freedom. *Anim. Behav. Cogn.* 2014. 1 (3): 249–264.
- Osvath M., Persson T. Great apes can defer exchange: A replication with different results suggesting future oriented behavior. *Front. Psychol.* 2013. 4: 698.
- Pack A.A. Experimental studies of dolphin cognitive abilities. In D.L. Herzog & C.M. Johnson (Eds.). *Dolphin communication and cognition: Past, present, and future* Cambridge, MA: MIT Press, 2015. 175–200 pp.
- Pailian H., Carey S.E., Halberda J., Pepperberg I.M. Age and Species Comparisons of Visual Mental Manipulation Ability as Evidence for its Development and Evolution. *Sci. Rep.* 2020. 10: 7689.
- Pepperberg I.M., Willner M.R., Gravitz L.B. Development of Piagetian object permanence in grey parrot (*Psittacus erithacus*). *J. Comp. Psychol.* 1997. 111 (1): 63–75.
- Pepperberg I.M. Acquisition of the same/different concept by an African Grey parrot (*Psittacus erithacus*): Learning with respect to categories of color, shape, and material. *Anim. Learn. Behav.* 1987. 15: 423–432.
- Pepperberg I.M. Grey parrot numerical competence: a review. *Anim. Cogn.* 2006. 9: 377–391.
- Pepperberg I.M. Grey Parrots (*Psittacus erithacus*) – Cognitive and Communicative Abilities. *Field and Laboratory Methods in Animal Cognition.* Cambridge University Press, 2018. 329–353 pp.
- Pepperberg I.M. The Alex studies: cognitive and communicative abilities of grey parrots. UK: Harvard Univ. Press, 2009. 448 pp.
- Pepperberg I.M. The Comparative Psychology of Intelligence: Some Thirty Years Later. *Front. Psychol.* 2020. 11: 973.
- Pepperberg I.M., Carey S. Grey parrot number acquisition: the inference of cardinal value from ordinal position on the numeral list. *Cognition.* 2012. 125: 219–232.
- Pepperberg I.M., Funk M.S. Object permanence in four species of psittacine birds: An African Grey parrot (*Psittacus erithacus*), an Illiger mini macaw

- (*Ara maracana*), a parakeet (*Melopsittacus undulatus*), and a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Anim. Learn. Behav.* 1990. 18 (1): 97–108.
- Pepperberg I.M., Gordon J.D. Number comprehension by a grey parrot (*Psittacus erithacus*), including a zero-like concept. *J. Comp. Psychol.* United States. 2005. 119 (2): 197–209.
- Pepperberg I.M., Gray S.L., Mody S., Cornero F.M., Carey S. Logical reasoning by a Grey parrot? A case study of the disjunctive syllogism. *Behaviour.* 2019. 156: 409–445.
- Piaget J. *The Construction of Reality in the Child.* NY: Basic Books, 1954.
- Plotnik J.M., Brubaker D.L., Dale R., Tiller L.N., Mumby H.S., Clayton N.S. Elephants have a nose for quantity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. 116 (25): 12566–12571.
- Plotnik J.M., Clayton N.S. Convergent cognitive evolution across animal taxa: Comparisons of chimpanzees, corvids and elephants. *Concepts: New Directions in the Study of Concepts.* MIT Press: Cambridge, MA, 2015. 29–56 pp.
- Plotnik J.M., de Waal F.B., Reiss D. Self-recognition in an Asian elephant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. 103 (45): 17053–17057.
- Plotnik J.M., Shaw R.C., Brubaker D.L., Tiller L.N., Clayton N.S. Thinking with their trunks: Elephants use smell but not sound to locate food and exclude nonrewarding alternatives. *Anim. Behav.* 2014. 88: 91–98.
- Poletaeva I.I., Zorina Z.A. A Genetic Approach to the Study of Simple Cognitive Abilities in Animals. *Russian J. Cogn. Sci.* 2014. 1 (3): 31–55.
- Pollok B., Prior H., Güntürkün O. Development of object permanence in food-storing magpies (*Pica pica*). *J. Comp. Psychol.* 2000. 114 (2): 148–157.
- Portmann A. Études sur la cérébralisation chez les oiseaux: II Les indices intra cérébraux. *Alauda.* 1947. 15: 1–15.
- Portmann A. Études sur la cérébralisation chez les oiseaux. I. *Alauda.* 1946. 14: 1–20.
- Povinelli D.J. *Folk physics for apes: The chimpanzee's theory of how the world works.* Oxford, UK: Oxford University Press, 2000. 408 pp.
- Premack D. The codes of man and beasts. *Behav. Brain. Sci.* 1983. 6 (1): 125–136.
- Price E.E., Lambeth S.P., Schapiro S.J., Whiten A. A potent effect of observational learning on chimpanzee tool construction. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 2009. 276 (1671): 3377–3383.
- Prior H., Schwarz A., Gunturkun O. Mirror-induced behavior in the magpie (*Pica pica*): evidence of self-recognition. *PLoS Biol.* 2008. 6 (8): 1642–1650.
- Redshaw J., Taylor A.H., Suddendorf T. Flexible Planning in Ravens? *Trends Cogn. Sci.* 2017. 21: 821–822.
- Reiner A. Avian evolution: from Darwin's finches to a new way of thinking about avian forebrain organization and behavioural capabilities. *Biol. Lett.* 2009. 5 (1): 122–124.
- Reiner A., Perkel D.J., Bruce L.L., Butler A.B., Csillag A., Kuenzel W., Medina L., Paxinos G., Shimizu T., Striedter G., Wild M., Ball G.F., Durand S., Güntürkün O., Lee D.W., Mello C. V., Powers A., White S.A., Hough G., Kubikova L., Smulders T.V., Wada K., Dugas-Ford J., Husband S., Yamamoto K., Yu J., Siang C., Jarvis E.D. The Avian Brain Nomenclature Forum: Terminology for a New Century in Comparative Neuroanatomy. *J. Comp. Neurol.* 2004. 473: 1–6.
- Reiss D., Marino L. Mirror self-recognition in the bottlenose dolphin: A case of cognitive convergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. 98 (10): 5937–5942.
- Rilling J.K. Comparative primate neurobiology and the evolution of brain language systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. 28: 10–14.
- Roelofs Y. Tool use in birds – An overview of reported cases, ontogeny and underlying cognitive abilities. *Doctoral thesis.* 2010. 31 pp.
- Rooijackers E.F., Kaminski J., Call J. Comparing dogs and great apes in their ability to visually track object transpositions. *Anim. Cogn.* 2009. 12: 789–796.
- Rumbaugh D.M. *With Apes in mind: Emergents, communication and competence.* KB Press: New Holland, 2013. 280 pp.
- Rutz C., Hunt G.R., St Clair J.J.H. Corvid Technologies: How Do New Caledonian Crows Get Their Tool Designs? *Curr. Biol.* 2018. 28: 1109–1111.
- Rutz C., Klump B.C., Komarczyk L., Leighton R., Kramer J., Wischniewski S., Sugasawa S., Morrissey M.B., James R., St Clair J.J.H., Switzer R., Masuda B. Discovery of species-wide tool use in the Hawaiian crow. *Nature.* 2016a. 537: 403–407.
- Rutz C., Sugasawa S., van der Wal J.E.M., Klump B.C., St Clair J.J.H. Tool bending in New Caledonian crows. *R. Soc. Open Sci.* 2016b. 3 (8): 160439.
- Sabbatini G., Truppa V., Hribar A., Gambetta B., Call J., Visalberghi E. Understanding the functional properties of tools: chimpanzees (*Pan troglodytes*) and capuchin monkeys (*Cebus paella*) attend to tool features differently. *Anim. Cogn.* 2012. 15: 577–590.
- Salwiczek L.H., Emery N.J., Schlinger B., Clayton N.S. The Development of Caching and Object Permanence in Western Scrub-Jays (*Aphelocoma californica*): Which Emerges First? *J. Comp. Psychol.* 2009. 123 (3): 295–303.
- Samuleeva M., Smirnova A. Emergence of reflexivity relation without identity matching-to-sample training in hooded crows (*Corvus cornix*). *Cogn. Neurosci.* 2020. 65: 157–162.
- Savage-Rumbaugh E.S., Rumbaugh D.M., Fields W.M. Empirical Kanzi: the ape language controversy, revisited. *Skeptic.* 2009. 15: 25–33.

- Sayol F., Downing P.A., Iwaniuk A.N., Maspons J., Sol D. Predictable evolution towards larger brains in birds colonizing oceanic islands. *Nat. Commun.* 2018. 9: 2820.
- Sayol F., Lefebvre L., Sol D. Relative brain size and its relation with the associative pallium in birds. *Behav. Evol.* 2016. 87: 69–77.
- Scheiber I.B.R., Weiß B.M., Hirschenhauser K., Wascher C.A.F., Nedelcu I.T., Kotrschal K. Does “Relationship Intelligence” Make Big Brains in Birds? *Open Biol. J.* 2008. 1: 6–8.
- Schmitt V., Pankau B., Fischer J. Old world monkeys compare to apes in the primate cognition test battery. *PLoS One.* 2012. 7 (4): e32024.
- Schwing R., Weiss F., Tichy A., Gajdon G. Testing the causal understanding of water displacement by kea (*Nestor notabilis*). *Behaviour.* 2019. 156: 1–32.
- Seed A., Emery N., Clayton N. Intelligence in corvids and apes: a case of convergent evolution? *Ethology.* 2009. 115: 401–420.
- Seed A., Seddon E., Greene B., Call J. Chimpanzee ‘folk physics’: bringing failures into focus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2012. 367: 2743–2752.
- Seed A., Tebbich S., Emery N., Clayton S. Investigating physical cognition in rooks, *Corvus frugilegus*. *Curr. Biol.* 2006. 16 (7): 697–701.
- Shanahan M., Bingman V.P., Shimizu T., Wild M., Güntürkün O. Large-scale network organization in the avian forebrain: a connectivity matrix and theoretical analysis. *Front Comput Neurosci.* 2013. 7: 89.
- Shumaker R.W., Walkup K.R., Beck B.B. Animal tool behavior: The use and manufacture of tools by animals. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, 2011. 282 pp.
- Smirnova A., Zorina Z., Obozova T., Wasserman E. Crows spontaneously exhibit analogical reasoning. *Curr. Biol.* 2015. 25 (2): 256–260.
- Smirnova A.A., Lazareva O.F., Zorina Z.A. Use of number by crows: investigation by matching and oddity learning. *J. Exp. Anal. Behav.* 2000. 73: 163–176.
- Stanton L., Davis E., Johnson S., Gilbert A., Benson-Amram S. Adaptation of the Aesop’s Fable paradigm for use with raccoons (*Procyon lotor*): considerations for future application in non-avian and non-primate species. *Anim. Cogn.* 2017. 20 (6): 1147–1152.
- Taylor A.H. Corvid cognition. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science.* 2014. 5: 361–372.
- Taylor A.H. Folk Physics for Crows? *Anim. Behav. Cogn.* 2020. 7: 452–456.
- Taylor A.H., Hunt G.R., Gray R.D. Context-dependent tool use in New Caledonian crows. *Biol. Lett.* 2012. 8 (2): 205–207.
- Taylor A.H., Knaebe B., Gray R.D. An end to insight? New Caledonian crows can spontaneously solve problems without planning their actions. *Proc. Royal Soc. B* 2012. 279 (1749): 4977–4981.
- Tebich S., Seed A.M., Emery N.J., Clayton N.S. Non-tool-using rooks, *Corvus frugilegus*, solve the trap-tube problem. *Anim. Cogn.* 2007. 10: 225–231.
- Tornick J.K., Rushia S.N., Gibson B.M. Clark’s nut-crackers (*Nucifraga columbiana*) are sensitive to distance, but not lighting when caching in the presence of a conspecific. *Behav. Proc.* 2016. 123: 125–133.
- Ujfalussy D.J., Miklósi Á., Bugnyar T. Ontogeny of object permanence in a non-storing corvid species, the jackdaw (*Corvus monedula*). *Anim. Cogn.* 2013. 16 (3): 405–416.
- van Casteren A. Tool Use: Crows Craft the Right Tool for the Job. *Curr. Biol.* 2017. 27 (24): 1314–1316.
- van der Vaart E., Hemelrij C.K. ‘Theory of mind’ in animals: ways to make progress. *Synthese.* 2014. 191 (3): 335–354.
- van Horik J.O., Clayton N.S., Emery N.J. Convergent Evolution of Cognition in Corvids, Apes and Other Animals. *The Oxford Handbook of Comparative Evolutionary Psychology.* Oxford University Press, 2012. 80–101 pp.
- Visalberghi E., Sabbatini G., Taylor A.H., Hunt G.R. Cognitive insights from tool use in nonhuman animals. In J. Call, G.M. Burghardt, I.M. Pepperberg, C.T. Snowdon, T. Zentall (Eds.), *APA handbooks in psychology. APA handbook of comparative psychology: Perception, learning, and cognition*, 2017. 673–701 pp.
- Völter C.J., Call J. The cognitive underpinnings of flexible tool use in Great Apes. *J. Exp. Psychol. Anim. Learn. Cogn.* 2014. 40 (3): 287–302.
- von Bayern A.M.P., Danel, S., Auersperg A.M.I., Mioduszewska B., Kacelnik A. Compound tool construction by New Caledonian crows. *Scientific Reports.* 2018. 8: 1–8.
- von Bayern A.M.P., Jacobs I., Osvath M. Tool-using puffins prick the puzzle of cognitive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. 117: 2737–2739.
- Vonk J. Matching based on biological categories in Orangutans (*Pongo abelii*) and a Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *PeerJ.* 2013. 1: e158.
- Wang L., Luo Y., Wang X., Maierdiyali A., Chang H., Li Z. Azure-winged magpies solve string-pulling tasks by partial understanding of the physical cognition. *Current Zoology* 2019. 65 (4): 385–392.
- Wasserman E., Castro L., Fagot J. Relational thinking in animals and humans: From percepts to concepts. *APA handbook of comparative psychology: Perception, learning, and cognition.* American Psychological Association, 2017. 359–384 pp.
- Wasserman E.A., Young M.E., Castro L. Mechanisms of same–different conceptualization: entropy happens! *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2021. 37: 19–28.

- Weir A.A.S., Chappell J., Kacelnik A. Shaping of hooks in new caledonian crows. *Science*. 2002. 297 (5583): 981.
- Werdenich D., Huber L. A case of quick problem solving in birds: string pulling in keas, *Nestor notabilis*. *Anim. Behav.* 2006. 71 (4): 855–863.
- Whitt E., Douglas M., Osthaus B., Hocking I. Domestic cats (*Felis catus*) do not show causal understanding in a string_pulling task. *Anim. Cogn.* 2009. 12 (5): 739–743.
- Wilson B., Mackintosh N.J., Boakes R.A. Transfer of relational rules in matching and oddity learning by pigeons and corvids. *Q. J. Exp. Psychol. Sect. B*. 1985. 37: 313–332.
- Wimpenny J.H., Weir A.A.S., Clayton L., Rutz C., Kacelnik A. Cognitive processes associated with sequential tool use in New Caledonian crows. *PLoS One*. 2009. 4 (8): e6471.
- Wright A.A., Magnotti J.F., Katz J.S., Leonard K., Kelly D.M. Concept learning set-size functions for Clark's nutcrackers. *J. Exp. Anal. Behav.* 2016. 105: 76–84.
- Wright A.A., Magnotti J.F., Katz J.S., Leonard K., Vernouillet A., Kelly D.M. Corvids Outperform Pigeons and Primates in Learning a Basic Concept. *Psychol. Sci.* 2017. 8: 437–444.
- Zentall T.R., Pattiso K.F. Now You See It, Now You Don't: Object Permanence in Dogs. *Current Directions in Psychological Science*. 2016. 25(5): 357–362.
- Zentall T.R., Raley O.L. Object permanence in the Pigeon (*Columba livia*): Insertion of a delay prior to choice facilitates visible- and invisible-displacement accuracy. *J. Comp. Psy.* 2019. 133 (1): 132–139.
- Zentall T.R., Wasserman E.A., Urcuioli P.J. Associative concept learning in animals. *J. Exp. Anal. Behav.* 2014. 101(1): 130–151.
- Zucca P., Milos N., Vallortigara G. Piagetian object permanence and its development in Eurasian jays (*Garrulus glandarius*). *Anim. Cogn.* 2007. 10: 243–258.

COGNITIVE ABILITIES OF BIRDS: COMPARATIVE EVOLUTIONARY ANALYSIS

Z. A. Zorina^{a,#}, T. A. Obozova^{a,##}, and A. A. Smirnova^{a,###}

^a *Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: zoyazorina17@gmail.com*

^{##}*e-mail: obozovat@gmail.com*

^{###}*e-mail: annsmirn1@gmail.com*

Comparative study of the complex cognitive abilities of animals allows assessing the evolutionary prerequisites of human thinking and language. The review will consider the main approaches to investigation of complex cognitive abilities in animals and analysis of published data. The results of various tests indicate that animals with a high level of brain development have a wide range of cognitive abilities. As expected, the widest range has been revealed in great apes. A spectrum similar in many indicators was found in corvids and psittacine birds, despite the fact that their brain structure is fundamentally different from that of mammals. This convergent similarity probably reflects the presence of common factors that determine the evolution of cognitive abilities. A comparison of several species of corvids and psittacine birds suggests that the high level of development of their cognitive abilities is due to the high level of organization of their brains, rather than the peculiarities of their ecology.

Keywords: comparative study, animal cognition, reasoning, apes, corvids, psittacine birds

The reported study was funded by RFBR, project number 19-113-50587, and Educational School of Moscow University “Brain, Cognitive Systems, Artificial Intelligence”. The research was carried out within the project of state assignment of MSU No.121032500080-8.

УДК 594.6

РАЗВИТИЕ И СТРОЕНИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У ФОРОНИД: ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

© 2021 г. Е. Н. Темерева^{1,2,*,**}

¹ Кафедра зоологии беспозвоночных, Биологический факультет,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

*e-mail: etemereva@hse.ru

**e-mail: temereva@mail.ru

Поступила в редакцию 27.11.2020 г.

После доработки 22.01.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Развитие и строение нервной системы традиционно используется для филогенетического анализа и реконструкции эволюционных событий. Форониды – необычная группа первичноротых животных, чьи черты организации и развития сходны с таковыми у вторичноротых животных. В настоящей работе приводится краткое описание развития и строения нервной системы у форонид на основании опубликованных результатов. Анализ имеющихся данных позволяет предполагать, что у общего предка *Bilateria* нервная система включала и нервный центр, и нервный плексус. Важно отметить, что нервный центр предка *Bilateria* гомологичен аборальному органу радиально-симметричных бластул и гаструл современных представителей группы, тогда как апикальный орган билатерально-симметричных ресничных личинок появляется как новообразование для жизни в планктоне, связи с родительскими особями и метаморфоза. Именно поэтому апикальный орган исчезает в ходе метаморфоза у большинства первичноротых и у всех вторичноротых.

Ключевые слова: аборальный орган, апикальный орган, ресничные личинки, эволюция, общий предок *Bilateria*

DOI: 10.31857/S0044467721030114

ВВЕДЕНИЕ

Форониды – это отдельный тип животного царства, в составе большого ствола *Lophotrochozoa* (Kocot et al., 2018). Форониды обитают в море и имеют бифазный жизненный цикл: взрослые животные живут в трубках в толще субстрата, а планктотрофные личинки – актинотрохи – продолжительное время живут в толще воды. Превращение личинки во взрослое животное происходит в результате катастрофического метаморфоза. Взрослые форониды имеют необычный план строения, и изучение его формирования в онтогенезе имеет большое значение для реконструкции этапов ранней эволюции группы (Temereva, Tsitrin, 2014a), (Temereva, Malakhov, 2015). Из-за сходства анатомического строения и эмбриологии форонид традиционно рассматривали как группу, родственную вторичноротым животным. Однако молекулярная фило-

генетика показала, что форониды входят в состав ствола первичноротых животных. В строении нервной системы у личинок форонид проявляются характеристики, свойственные как первичноротым (Santagta, Zimmer, 2002), так и вторичноротым (Temereva, Wanninger, 2012), а взрослые форониды обладают исключительно нервным плексусом и лишены настоящих ганглиев и нервных стволов, что является признаком чрезвычайной примитивности. Поскольку строение и развитие нервной системы традиционно используется для филогенетических построений, то анализ этих черт у такой необычной группы животных, как форониды, может внести существенный вклад в реконструкцию этапов ранней радиации *Bilateria*. Так, организация нервной системы лофофора у форонид, брахиопод и мшанок позволила предположить гомологию лофофора и вос-

становить монофилию клады *Lophophorata* (Temereva, Tsitrin, 2015; Temereva, Kosevich, 2016; Temereva, 2017a; Temereva, 2017b). В этой работе обобщены сведения, имеющиеся в литературе и касающиеся строения и развития нервной системы форонид от ранних стадий онтогенеза до взрослых животных.

Эмбриональное развитие нервной системы

Развитие нервной системы форонид изучено у представителей трех видов этой группы, демонстрирующих разные типы эмбрионального развития: *Phoronis ijimai* (*Phoronis vancouverensis*), развитие которого происходит в эмбриональных скоплениях вплоть до стадии молодой личинки, *Phoronis embryolabi*, эмбрионы которого развиваются в полости тела материнского организма и который нерестится молодыми личинками (Temereva, Chichvarikhin, 2017), и *Phoronopsis harmeri*, у которого все стадии развития протекают в толще воды (Hay-Schmidt, 1990a; Temereva, Wanninger, 2012; Temereva, 2012; Temereva, Malakhov, 2012; Temereva, 2015; Temereva, 2017c). Несмотря на различия в развитии, нервная система у изученных видов развивается в целом сходным образом. Первые нейроны появляются на стадии билатерально-симметричной поздней гастролы. Это серотонин-эргические перикарии, которые располагаются на переднем конце зародыша. На ранних стадиях детектируются от двух до четырех перикариев, которые залегают среди клеток апикальной пластинки – утолщенной части покровного эпителия. Дальнейшее развитие связано с формированием сложного апикального органа, который состоит из нескольких серотонин-эргических сенсорных клеток. Они расположены на преоральной лопасти личинки полукругом, и их отростки, направленные к центру этого полукруга, формируют нейропиль (рис. 1 (а-е)). У *P. harmeri* первым появляется нервный тракт, подстилающий постротовой ресничный шнур, а маргинальный нерв, иннервирующий предротовой ресничный шнур, появляется позже. Интересно, что у личинок *P. embryolabi* нервные тракты, подстилающие предротовой и постротовой ресничные шнуры, закладываются одновременно на стадии молодой актинотрохи.

У 6-дневной личинки *P. harmeri* оральное поле богато иннервировано: вдоль его вентральной стороны проходит вентральный

нервный ствол, ассоциированный с сериально расположенными перикариями (Temereva, 2012). По мере роста личинки у нее появляются щупальца, вдоль латеральных сторон которых проходит постротовой ресничный шнур (рис. 1 (в, е)). Постротовой нервный тракт приобретает сложную морфологию, так как формирует ответвления в щупальца. У личинки появляется часть тела под щупальцами и телотрох, с которым ассоциирован серотонин-эргический нервный тракт (рис. 1 (в, е)). У двадцатидневной личинки хорошо иннервирован пищеварительный тракт: имеются нервные кольца вокруг пищевода, средней и задней кишки (рис. 1 (в, е)).

Строение нервной системы у компетентной личинки

Нервная система личинок форонид изучена на разных стадиях личиночного развития методами гистологической техники, трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноцитохимии (Zimmer, 1964; Hay-Schmidt, 1989; Hay-Schmidt, 1990b; Lacalli, 1991; Santagata, 2002; Santagata, Zimmer, 2002; Sonnleitner et al., 2014; Temereva, Tsitrin, 2014b; Temereva, 2015; Temereva, 2017c). Перед метаморфозом нервная система актинотрохи устроена очень сложно (рис. 2 (а)). В ходе личиночного развития усложнение нервной системы связано в основном с появлением новых нервных элементов преоральной лопасти. Считается, что перед метаморфозом именно нервные центры преоральной лопасти ответственны за выбор субстрата для оседания. Хотя общий план организации нервной системы актинотрох сходен, он довольно сильно различается в деталях, что позволяет выделить четыре основных типа организации нервной системы личинок форонид (Temereva, 2017c). Эти различия касаются строения апикального органа, иннервации щупалец, числа и расположения дополнительных нервных центров в преоральной лопасти (рис. 3 (а-г)).

Апикальный орган становится очень крупным и у большинства изученных личинок состоит из нескольких типов перикариев: выделяют от 2 до 4 типов. Наиболее многочисленными – это сенсорные биполяры, несущие длинный жгутик; их насчитывается 30–50 (рис. 3 (а-г)). Перикарии с округлой сомой и крупным ядром занимают базальное положение и у *P. harmeri* формируют две латеральные

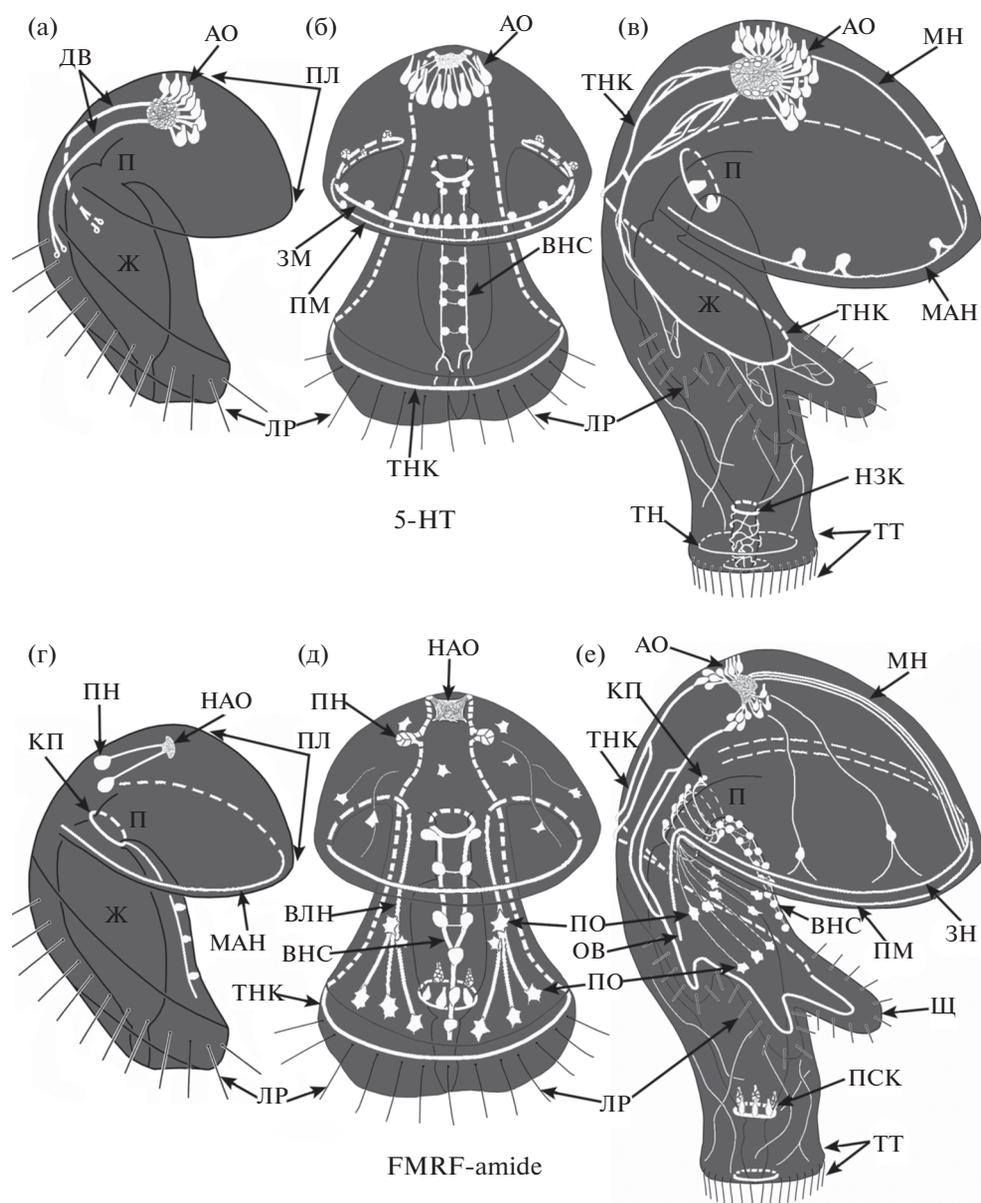


Рис. 1. Развитие серотонин-эргической (верхний ряд) и FMRF-амид-эргической (нижний ряд) нервной системы в эмбриональном развитии *Phoronopsis harmeri*. По (Temereva, Wanninger, 2012) с изменениями. (а, г) – молодая актинотроха, (б, д) – 6-дневная актинотроха, (в, е) 20-дневная актинотроха. Обозначения: АО – апикальный орган, ВЛН – вентро-латеральные нейриты, ВНС – вентральный нервный ствол, ДВ – дорсальные ветви щупальцевого нервного кольца, ЗН – задний тяж маргинального нерва, КП – кольцевые нейриты пищевода, ЛР – чувствительные реснички постротового ресничного шнура, МАН – маргинальный нерв, МН – медиальный нерв, НАО – нейропил апикального органа, НЗК – нейриты вокруг задней кишки, ОВ – оральная ветвь маргинального нерва, П – пищевод, ПМ – передний тяж маргинального нерва, ПЛ – преоральная лопасть, ПН – первые FMRF-амид-эргические перикарии, ПСК – перикарии в средней кишке, ПО – перикарии орального поля, ТНК – щупальцевого нервной кольцо, ТН – нервное кольцо телотроха, ТТ – телотрох, Щ – щупальце.

Fig. 1. Schemes of several steps of development of 5HT-like and FMRF-amide-like immunoreactive elements of the nervous system of *Phoronopsis harmeri*. Based on (Temereva, Wanninger, 2012) with changes. (a, г) – young actinotrocha, (б, д) – 6-days-old actinotrocha, (в, е) 20-days-old actinotrocha. Abbreviations: АО – apical organ, ВЛН – ventro-lateral neurites, ВНС – ventral nerve cord, ДВ – dorsal branches of tentacular nerve ring, ЗН – posterior part of the marginal nerve, КП – circular neurites of esophagus, ЛР – sensory cilia of postoral ciliated band, МАН – marginal nerve, МН – median nerve, НАО – neuropil of the apical organ, НЗК – neurites around hindgut, ОВ – oral branch of the marginal nerve, П – esophagus, ПМ – anterior part of the marginal nerve, ПЛ – preoral lobe, ПН – first FMRF-amide-like immunoreactive perikarya, ПСК – perikarya in the midgut, ПО – perikarya of the oral field, ТНК – tentacle nerve ring, ТН – telotroch nerve ring, ТТ – telotroch, Щ – tentacle.

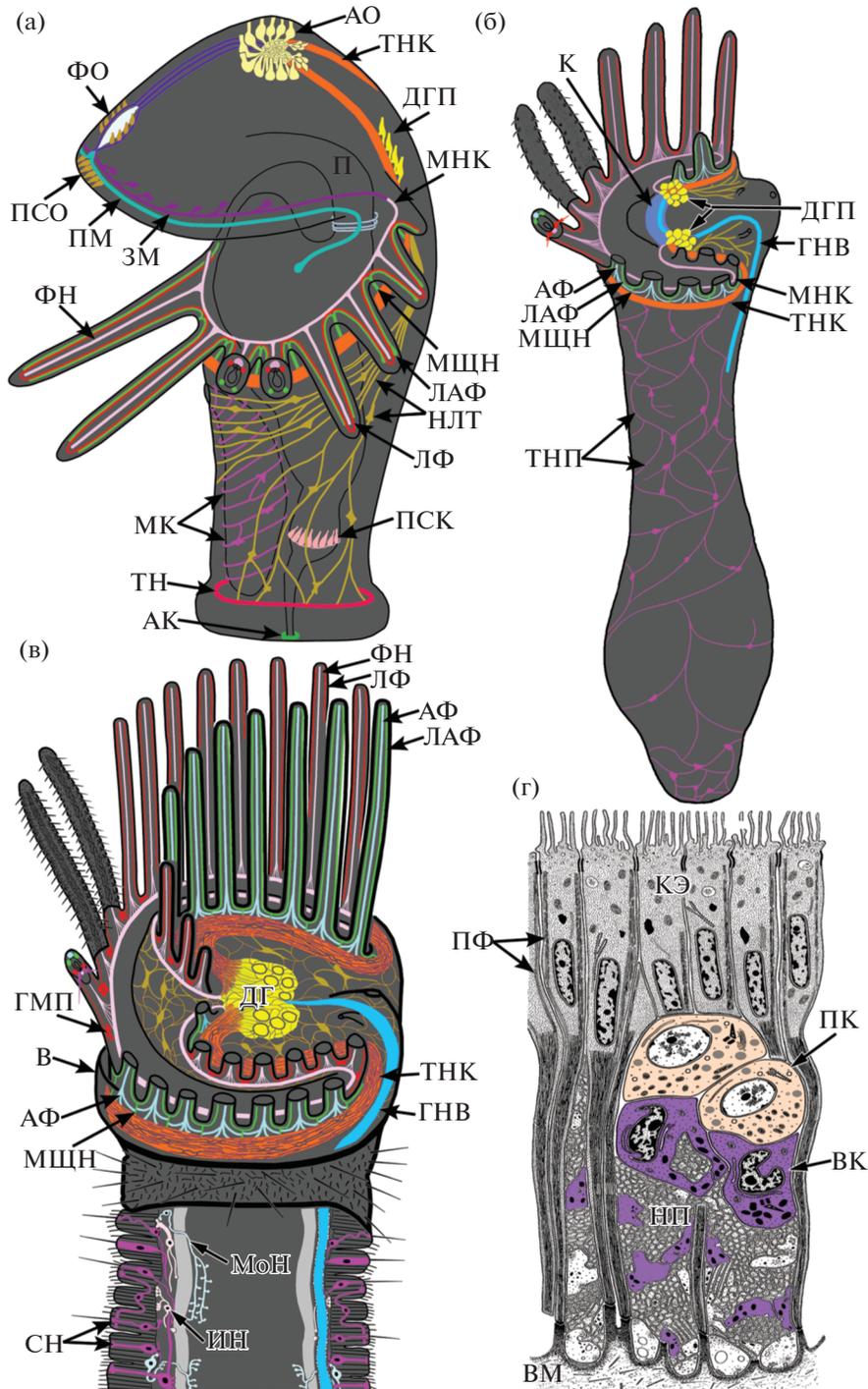


Рис. 2. Организация нервной системы у *Phoronopsis harmeri* на разных стадиях жизненного цикла. (а) – компетентная личинка (по Temereva, Tsitrin, 2014б с изменениями); показаны нервные элементы, выявляемые иммуоцитохимической реакцией к ацетилированному альфа-тубулину, серотонину, FMRF-амиду, а также методом трансмиссионной электронной микроскопии, (б) – ювенильное животное (по Temereva, Tsitrin, 2014а с изменениями); показаны нервные элементы, выявляемые иммуоцитохимической реакцией к ацетилированному альфа-тубулину и серотонину, а также методом трансмиссионной электронной микроскопии, (в) – головной конец тела взрослого животного (по Temereva, 2015 и Temereva, 2020 с изменениями); показаны нервные элементы, выявляемые иммуоцитохимической реакцией к ацетилированному альфа-тубулину и серотонину, (г) – схема ультраструктурной организации участка щупальцевого нервного кольца (по Темерева, Малахов, 2009 с изменениями). Обозначения (см. на рис. 1): АК – анальный кольцевой нейрит, АФ – абфронтальные нервы щупалец, В – воротничок, ВК – вспомогательная

клетка, ВМ – внеклеточный матрикс, ГМП – группы межщупальцевых перикариев, ГНВ – гигантское нервное волокно, ДГ – дорсальное нервное сплетение, ДГП – дорсальные группы перикариев, ИН – вставочный нейрон, К – комиссура, КЭ – клетки эпидермиса, ЛАФ – латеро-абфронтальные нервы щупалец, ЛФ – латеро-фронтальные нервы щупалец, МК – нейриты и перикарии метасомального кармана, МНК – малое нервное кольцо, МоН – моторный нейрон, МЩН – межщупальцевые нервы, НЛТ – нейриты личиночного тела, ПК – перикарий, ПСО – передний сенсорный орган, ПФ – промежуточные филламенты, СН – чувствительный нейрон, ТНП – туловищный нервный плексус, ФН – фронтальные нервы щупалец.

Fig. 2. Organization of the nervous system at different stages of the life cycle in *Phoronopsis harmeri*. (a) – competent larva; based on (Temereva, Tsitrin, 2014b) with changes; elements detected by staining with acetylated alpha-tubulin, serotonin, FMRF-amide, and by transmission electron microscopy are shown, (б) – juvenile; based on (Temereva, Tsitrin, 2014a) with changes; elements detected by staining with acetylated alpha-tubulin, serotonin, and by transmission electron microscopy are shown, (в) – the head of the adult; based on (Temereva, 2015) and (Temereva, 2020) with changes; elements detected by staining with acetylated alpha-tubulin and serotonin are shown, (г) – scheme of ultrastructure of tentacle nerve ring; based on (Temereva, Malakhov, 2009) with changes. Abbreviations (see Fig. 1): АК – anal circular neurite, АФ – abfrontal tentacle nerve, В – collar fold, ВК – helper cell, ВМ – extracellular matrix, ГМП – groups of intertentacular perikarya, ГНВ – giant nerve fiber, ДГ – dorsal nerve plexus, ДГП – dorsal groups of perikarya, ИН – interneuron, К – commissure, КЭ – epidermal cells, ЛАФ – latero-abfrontal tentacle nerve, ЛФ – latero-frontal tentacle nerve, МК – neurites and perikarya of metasomal sack, МНК – minor nerve ring, МоН – motor neuron, МЩН – intertentacular nerve, НЛТ – neurites of larval body, ПК – perikaryon, ПСО – anterior sensory organ, ПФ – intermediate filaments, СН – sensory neuron, ТНП – trunk nerve plexus, ФН – frontal tentacle nerve.

группы, от которых берут начало дорсальные ветви постротового нерва (Temereva, Waninger, 2012; Temereva, Tsitrin, 2014b). С дорсальными ветвями связаны дорсальные группы перикариев (рис. 3 (а–в)).

Вперед от апикального органа отходит медиальный нерв, строение которого сильно усложняется перед метаморфозом и связано с появлением фронтального органа (рис. 2 (а)). Фронтальный орган имеется у всех личинок форонид и в большинстве случаев располагается недалеко от апикального органа (рис. 3 (а–г)), однако может быть смещен ближе к краю преоральной лопасти (Temereva, Tsitrin, 2014b). У некоторых личинок кроме фронтального органа имеются другие нервные центры в преоральной лопасти. Наибольшее их число было выявлено у личинок *P. embryolabi* (Temereva, 2017c). Обилие нервных центров преоральной лопасти у личинок *P. embryolabi*, вероятно, связано с особым образом жизни взрослых представителей этого вида. Они живут в норах роющих креветок и для прохождения метаморфоза должны найти креветку (см. ниже).

Иннервация щупалец осуществляется по-разному (рис. 3 (а–в)). У разных личинок форонид описано 3, 5 и 6 нервных трактов, проходящих в каждом щупальце. Малое нервное кольцо дает фронтальные, латеро-абфронтальные и в некоторых случаях латеро-фронтальные щупальцевые нервные тракты. Щупальцевое нервное кольцо может давать лате-

ро-абфронтальные и абфронтальные нервные тракты (рис. 3 (а–г)).

Метаморфоз

Последовательные стадии метаморфоза форонид изучены в основном гистологическими методами и посвящены судьбе отдельных систем органов. Однако преобразования нервной системы долгое время оставались практически неисследованными. С появлением методов иммуноцитохимии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии появилась возможность проследить судьбу отдельных нервных элементов личинки в метаморфозе (Santagata, 2002, 2004; Temereva, Tsitrin, 2013, 2014a).

Наиболее детально преобразование нервной системы при метаморфозе актинотрохи изучено только на одном виде форонид – *P. harmeri* (Temereva, Tsitrin, 2014a). Метаморфоз начинается с резкого сокращения тела личинки: ее длина уменьшается примерно в 3 раза за счет сокращения задних и передних мышц ретракторов. Сокращение приводит к повышению давления внутри туловищного целома личинки, что инициирует выворачивание метасомального кармана (Temereva, Tsitrin, 2013; Temereva, Malakhov, 2015). Метасомальный карман – это глубокое впячивание покровов тела под щупальцами, которое появляется у личинки задолго до метаморфоза, растет и занимает весь объем туловищного целома (рис. 2 (а)). Метасомальный карман хорошо иннервирован густой сетью серото-

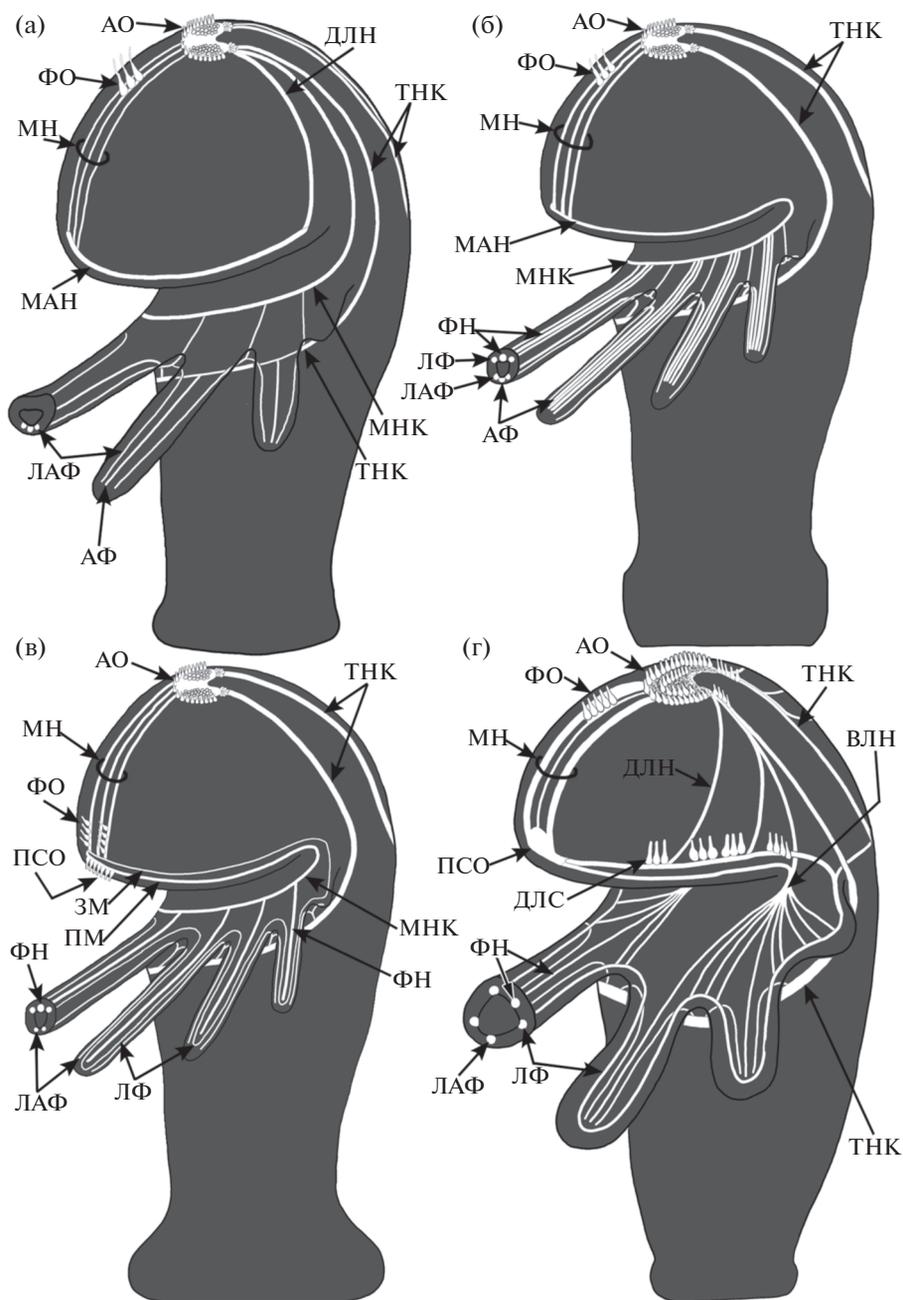


Рис. 3. Четыре типа организации нервной системы у компетентных личинок форонид (по Temereva, 2017в с изменениями). (а) – тип-1, описанный у *Actinotrocha D* и *Actinotrocha C* (это личинки форонид, видовую принадлежность которых до сих пор не удается установить), (б) – тип-2, описанный у личинок *Phoronis pallida*, *P. vancouverensis* и *P. hippocrepia*, (в) – строение нервной системы у компетентных личинок *Phoronopsis harmeri*, (г) – строение нервной системы у компетентных личинок *Phoronis embryolabi*. Обозначения (см. рис. 1, 2): ДЛС – дорсо-латеральное сенсорное поле, ДЛН – дорсо-латеральные нейриты преоральной лопасти, ФО – фронтальный орган.

Fig. 3. Four types of organization of the nervous system in competent phoronid larvae. Based on (Temereva, 2017в) with changes. (а) – type-1, described in *Actinotrocha D* and *Actinotrocha C* (these are phoronid larvae, which cannot be still matched any known phoronid species), (б) – type-2, described in *Phoronis pallida*, *P. vancouverensis*, and *P. hippocrepia*, (в) – organization of the nervous system in competent larvae of *Phoronopsis harmeri*, (г) – organization of the nervous system in competent larvae of *Phoronis embryolabi*. Abbreviations (see Fig. 1 and Fig. 2): ДЛС – dorso-lateral sensory field, ДЛН – dorso-lateral neurites of the preoral lobe, ФО – frontal organ.

нин-эргических нервных волокон и связанных с ними перикариев. Эти нейриты и перикарии дадут начало туловищному нервному плексусу взрослого животного. После выворачивания метасомального кармана происходит мацерация преоральной лопасти и ее поедание. Все нервные центры, связанные с преоральной лопастью, в ходе метаморфоза поедаются формирующимся ювенильным организмом. Однако сохраняются дорсальные группы перикариев, связанные с дорсальными ветвями постротового нерва (рис. 2 (б)). Группы перикариев оказываются на спинной стороне тела ювенильного животного и соединяются друг с другом толстой поперечной комиссурой, так что формируется так называемый “комиссуральный мозг” (Temereva, Tsitrin, 2014б). В толще комиссуры на последующих стадиях обнаруживается гигантское нервное волокно, которое затем станет гигантским нервным волокном взрослого животного. В метаморфозе сохраняется также и малое нервное кольцо личинки. Щупальца личинки трансформируются. Интересно отметить, что у разных форонид личиночные щупальца претерпевают разные изменения: (1) формирующаяся ювениль может съесть щупальца целиком, и дефинитивные щупальца образуются заново из небольших бугорков; (2) дефинитивные щупальца могут закладываться еще на личиночной стадии под личиночными щупальцами, которые в метаморфозе поедаются; (3) личиночные щупальца могут напрямую трансформироваться в дефинитивные, однако из них выдавливается эпителий постротового ресничного шнура, который затем поедает ювениль. Трансформация щупалец приводит к изменению их иннервации (рис. 2 (б)). Формируются абфронтальные нервные пучки, а латеро-фронтальные оказываются не связанными ни с какими нервными трактами (см. ниже). Туловище личинки подвергается сильной редукции и сохраняется лишь как небольшой участок тела между ртом и анусом. Сохраняются и некоторые нейриты, иннервировавшие личиночное тело. Телотрох и связанные с ним нервные кольца полностью дегенерируют. Пищеварительный тракт личинки напрямую становится дефинитивной пищеварительной трубкой и, вероятно, сохраняет нервные элементы, появившиеся еще на личиночной стадии (рис. 2 (б)).

Строение нервной системы у взрослых форонид

Общая анатомия и гистология нервной системы взрослых форонид исследованы довольно полно и приведены в нескольких классических анатомических исследованиях (Selys-Longchamps, 1907; Silén, 1954; Bullock, Horridge, 1965). Наиболее подробное описание, выполненное с использованием гистологической методики, представлено в работе Силена (Silén, 1954), результаты которой вошли во многие общие сводки по форонидам (Human, 1959). В последние десятилетия появлялись работы, в которых отдельные элементы нервной системы были исследованы с применением методов иммуоцитохимии и трансмиссионной электронной микроскопии (Лагутенко, 1996; Лагутенко, 1997; Лагутенко, 1998; Лагутенко, 2002; Fernández et al., 1996; Темерева, Малахов, 2009; Temereva, 2015; Temereva, 2017b; Temereva, 2020).

У взрослых форонид все элементы нервной системы залегают интраэпидермально: над слоем внеклеточного матрикса между базальными отростками клеток покровного эпителия. По сути, нервная система форонид представляет собой нервный плексус (сеть), который формирует сгущения в некоторых участках тела, образуя главные нервные элементы. У большинства форонид таких главных нервных элементов два: дорсальное нервное сплетение и щупальцевое нервное кольцо (рис. 2 (в)). Строение дорсального нервного сплетения не соответствует определению ганглия (Richter et al., 2010) и имеет иное, нежели типичный ганглий, расположение нервных элементов – перикариев и нейропилля. Дорсальное нервное сплетение располагается на морфологически дорсальной стороне тела – между ртом и анусом. От дорсального нервного сплетения вправо и влево расходятся кольцевые нервные волокна, формирующие щупальцевое нервное кольцо. Оно проходит с наружной стороны лофофора, в основании щупалец и у видов рода *Phoronopsis* прикрыто воротничком (рис. 2 (в)). Ко рту от дорсального нервного сплетения отходит узкий нервный тракт – внутреннее нервное кольцо, которое проходит в основании щупалец с их фронтальной стороны. От дорсального нервного сплетения вправо и влево отходят два (правое и левое), либо только одно (левое) гигантских нервных волокон (рис. 2 (в)). Важной составляющей нервной системы взрослых форонид является нервный плексус

туловища и нервы, проходящие в щупальцах (см. ниже).

Щупальца иннервируются от щупальцевого нервного кольца и внутреннего нервного кольца (рис. 2 (в)). От щупальцевого нервного кольца отходят многочисленные абфронтальные нервы, из которых выделяются латеро-абфронтальные, демонстрирующие иммунореактивность к серотонину. Фронтальный нервный пучок отходит от внутреннего нервного кольца. У всех форонид имеются латеро-фронтальные нервные тракты, которые связаны либо с внутренним нервным кольцом, либо с межщупальцевыми группами перикариев, которые не связаны с нервными трактами и, возможно, характерны только для видов со сложно устроенным лофофором (Temereva, 2020). Группы межщупальцевых перикариев, вероятно, работают как автономные нервные центры, координирующие работу соседних щупалец.

Все элементы нервной системы форонид залегают в толще покровного эпителия – интраэпидермально, организованы по общему плану и состоят как бы из нескольких ярусов (Fernandez et al., 1996), (Темерева, Малахов, 2009; Temereva, 2020). Верхний ярус составляют тела эпителиальных клеток, образующих покровный эпителий (рис. 2 (г)). Согласно современным представлениям (Helm et al., 2017; Beckers et al., 2019) эти эпителиальные клетки, вероятно, являются клетками так называемой радиальной глии, поскольку в их длинных базальных отростках проходят пучки электронно-плотных промежуточных филаментов (рис. 2 (г)). Под телами эпидермальных клеток располагаются тела нервных клеток – перикарии нейронов. Типы перикариев различаются по особенностям ультраструктуры, размерам, ядерно-цитоплазматическому соотношению и т.д. В дорсальном эпителии многочисленны крупные перикарии с электронно-светлой цитоплазмой и округлым крупным ядром, тогда как основу щупальцевого кольцевого сплетения составляют относительно небольшие перикарии с электронно-плотной цитоплазмой и неправильной формы ядром. Под перикариями нейронов располагаются клетки, которые, возможно, выполняют питающую функцию для нервной ткани (рис. 2 (г)). Эти клетки образуют отростки, которые охватывают перикарии и пучки нервных волокон. Отростки этих питающих клеток содержат характерные крупные электронно-плотные

включения овальной формы. Самый нижний слой составляют нервные отростки и отростки питающих клеток, которые формируют нейропилль непосредственно над базальной пластинкой (рис. 2 (б)).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Форониды представляют собой уникальный пример комбинации различных планов строения на взрослой и личиночной стадиях жизненного цикла. Это касается как морфологии всего тела, так и организации нервной системы. У личинок форонид имеется сложно организованный апикальный орган – личиночный мозг. Появление первых нейронов происходит у форонид на апикальном конце личинки. Для ранних стадий развития первичноротых животных характерно формирование так называемых пионерных нейронов, которые появляются на заднем конце эмбриона и формируют нервные тракты, по которым затем будет развиваться личиночная нервная система (Незлин, 2010; Воронежская, Ивашкин, 2010). Затем пионерные нейроны исчезают. У вторичноротых первые нейроны появляются на переднем конце эмбриона, а пионерные нейроны (которые исчезают в ходе развития) не обнаружены. В этом ключе раннее развитие нервной системы форониды демонстрирует признаки, характерные для вторичноротых животных. В то же время стоит отметить, что появление апикального органа у форонид происходит не на ранних стадиях развития, а на билатеральной стадии поздней гастролы. Радиальные стадии (а у форонид это бластула), хотя и имеют теменную пластинку и апикальный султанчик, но апикального нервного центра лишены (Temereva, Wanninger, 2012). Именно радиально-симметричных личинок – бластулу и гастролу – следует рассматривать как настоящих личинок, свойственных жизненному циклу общего предка *Bilateria*, тогда как билатерально-симметричные личинки – это поднятые в толщу воды ювенили (Малахов и др., 2019). Отсутствие апикального органа на ранних стадиях развития не только у форонид, но и у других первичноротых, а также вторичноротых, ставит под сомнение идею о том, что у предка *Bilateria* имелся нервный центр, а не только нервный плексус (Arendt et al., 2008; Nomaksteinsky et al., 2009). Интересно, однако, что уже на ранних стадиях развития у бластулы появляется апикальная пла-

стинка и теменной султанчик. Возможно, что на самых ранних стадиях у бластул и гаструл в области теменной пластинки дифференцируются клетки, экспрессирующие нетипичные для апикального органа нейромедиаторы. Тогда апикальный орган билатерально-симметричных ресничных личинок следует рассматривать как новообразование, появившееся, вероятно, для поддержания связи со взрослыми животными и для инициации метаморфоза (Воронежская и др., 2008). Если так, то апикальный орган личинок билатерально симметричных животных — это вовсе не первичный мозг, а вторичное приобретение. Именно поэтому апикальный орган исчезает в метаморфозе. Настоящим же первичным мозгом следует считать аборальный орган радиально-симметричных личинок *Bilateria* — бластул и ранних гаструл. Тем не менее апикальный орган появился еще у билатеральных личинок предка *Bilateria* и, конечно, не возникал независимо в разных группах (Marlow et al., 2014).

Интересен тот факт, что у личинок *P. embryolabi* нервные тракты, подстилающие предротовой и постротовой ресничные шнуры, появляются в эмбриональном развитии одновременно. Это, несомненно, свидетельствует о единстве ресничного аппарата околотротовой ресничной зоны актинотрох и, возможно, всех ресничных личинок *Bilateria* (Малахов и др., 2019).

Хотя нервная система ресничных личинок *Bilateria* демонстрирует существенную пластичность, принято, тем не менее, считать, что для личинок первичноротых характерно наличие малоклеточного апикального органа, состоящего из небольшого числа перикариев (от 4 до 16), тогда как у личинок вторичноротых апикальный орган состоит из большого числа перикариев (более 30) (Nau-Schmidt, 2000). В состав апикального органа у актинотрох входит более 50 перикариев до четырех различных типов, что делает его похожим на апикальный орган личинок вторичноротых. Еще одной интересной особенностью нервной системы актинотрох является наличие дорсальных групп перикариев, связанных с основаниями дорсальных ветвей щупальцевого нервного кольца. Именно эти группы перикариев в ходе метаморфоза дают дорсальное нервное сплетение взрослого животного. Наличие дорсальных групп перикариев — это “адультиный” признак, который свидетельствует о том, что компетентная ак-

тинотроха — это уже не совсем личинка, поскольку она имеет многие черты строения взрослого животного. Это не только дорсальные группы перикариев, но и наличие метасомального кармана и полностью сформированной кровеносной системы (Темерева, Малахов, 2000). Личинки форонид, таким образом, представляют собой яркий пример “ларвализации” развития (Малахов и др., 2019).

Преобразования нервной системы в метаморфозе форонид приводят к появлению дефинитивной нервной системы, в которой имеет место комбинация личиночных структур и структур, формирующихся *de novo*. При этом апикальный орган у форонид полностью редуцируется и не входит в состав дефинитивной нервной системы. Традиционно считается, что полная утрата апикального органа характерна для вторичноротых животных, тогда как у первичноротых апикальный орган полностью или частично входит в состав нервной системы взрослого животного (Schmidt-Rhaesa, 2007; Helm et al., 2016; Magarlamov et al., 2020). С этой точки зрения форониды проявляют “вторичноротые” черты метаморфоза. Преобразование щупалец форонид в ходе метаморфоза является интересным вопросом, который важно рассмотреть в свете фундаментальной проблемы о морфологическом облике предка *Bilateria*: имел ли он щупальцевый аппарат или был его лишен (Малахов и др., 2019). Поскольку механизм работы щупалец и у личинок, и у взрослых форонид принципиально сходен, то смена щупалец в метаморфозе выглядит необоснованной и, возможно, свидетельствует о том, что щупальца личинки — это лишь провизорный орган, а щупальца взрослого животного появляются *de novo*. Такая трактовка не позволяет провести непрерывный ряд от щупалец личинки к щупальцам взрослого животного и ставит под вопрос наличие щупалец у общего предка *Bilateria*. Возможно, однако, преобразование личиночных щупалец свидетельствует о специализации лофофора форонид по сравнению с исходным щупальцевым аппаратом общего предка *Bilateria*, который, конечно, был мало специализированным и служил для сбора частиц пищи с поверхности грунта.

Нервная система взрослых форонид представляет собой один из наиболее ярких примеров плексусного типа организации нервного аппарата. У форонид нет ни ганглиев, ни настоящих нервных стволов. Вероятно, со-

хранение нервного плексуса у форонид отражает общую примитивность тканевой организации этих животных. Сходное строение демонстрирует нервная система ближайших родственников форонид – брахиопод, у которых так называемые ганглии образованы нейроэпителием или стратифицированным нейроэпителием (Kuzmina, Temereva, 2021). Возможно, плексусная интраэпидермальная организация нервной системы взрослых форонид является отражением анцестрального для всех *Bilateria* паттерна организации нервной системы (Martín-Durán, Hejnol, 2019). С другой стороны, такая нервная система у форонид могла возникнуть вследствие мало-подвижного сидячего образа жизни.

Таким образом, форониды, будучи принадлежащими стволу первичноротых животных, демонстрируют многие черты строения и развития нервной системы, характерные для вторичноротых. Наличие сходных черт у представителей двух главных стволов *Bilateria* позволяет предполагать, что они отражают исходный для всех билатерий паттерн и были присущи общему предку билатерально-симметричных животных. Это, в том числе, позволяет реконструировать нервную систему общего предка *Bilateria* как содержащую нервный центр и нервный плексус. Важно отметить, что нервный центр предка *Bilateria* гомологичен аборальному органу бластул и гаструл современных представителей группы, тогда как апикальный орган билатерально-симметричных ресничных личинок появляется как новообразование для жизни в планктоне и связи с родительскими особями.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00082).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронежская Е., Ивашкин Е. Пионерные нейроны: основа или лимитирующий фактор разнообразия нервных систем Lophotrochozoa. Онтогенез. 2010. 41 (6): 403–413.
- Воронежская Е.Е., Незлин Л.П., Хабарова М.Ю. “Что говорят улитки своим личинкам”. Природа. 2008. 2: 14–22.
- Лагутенко Ю.П. Клеточная организация афферентного звена в кожном нервном плексусе метасомы форонид (Tentaculata, Phoronidea). Журн. эвол. биохим. физиол. 1996. 32 (4): 440–447.
- Лагутенко Ю.П. Система двигательных нейронов в кожном нервном слое (плексусе) форонид (Tentaculata, Phoronidea). Журн. эвол. биохим. и физиол. 1997. 33 (2): 218–227.
- Лагутенко Ю.П. Интерневральная система в кожном нервном плексусе форонид (Tentaculata, Phoronidea) и проблема возникновения ассоциативной связи у низших *Bilateria*. Журн. эвол. биохим. физиол. 1998. 33 (1): 64–75.
- Лагутенко Ю.П. Ранние формы эволюции базисного эпидермального нервного сплетения *Bilateria* как возможное свидетельство первичного разнообразия его исходного строения. Журн. эвол. биохим. физиол. 2002. 38 (3): 354–363.
- Малахов В.В., Богомолова Е.В., Кузьмина Т.В., Темерева Е.Н. Эволюция жизненных циклов Metazoa и происхождение пелагических личинок. Онтогенез. 2019. 50 (6): 383–397.
- Незлин Л.П. Золотой век сравнительной морфологии: лазерная сканирующая микроскопия и нейрогенез трохофорных животных. Онтогенез. 2010. 41: 370–380.
- Темерева Е.Н., Малахов В.В. Кровеносная система личинок форонид. Докл. Акад. наук. 2000. 375 (5): 712–714.
- Темерева Е.Н., Малахов В.В. Микроскопическая анатомия и ультраструктура нервной системы *Phoronopsis harmeri* Pixell, 1912 (Lophophorata, Phoronida). Биол. моря. 2009. 35 (5): 388–404.
- Arendt D., Denes A.S., Jekely G., Tessmar-Raible K. The evolution of nervous system centralization. Phil. Trans. Roy. Soc.: Biol. Sci. 2008. 363: 1523–1528.
- Beckers P., Helm C., Purschke G., Worsaae K., Hutchings P., Bartolomaeus Th. The central nervous system of Oweniidae (Annelida) and its implications for the structure of the ancestral annelid brain. *Frontiers in Zoology* (2019) 16 (6): <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0305-1>
- Bullock H., Horridge G.A. Structure and function in the nervous system of invertebrates (Vol. 1). San Francisco: W.H. Freeman, 1965. 1719 pp.
- Fernández I., Pardos F., Benito J., Roldan C. Ultrastructural observation on the phoronid nervous system. *J. Morphol.* 1996. 230: 265–281.
- Hay-Schmidt A. The nervous system of the actinotroch larva of *Phoronis muelleri* (Phoronida). *Zoomorphol.* 1989. 108: 333–351.
- Hay-Schmidt A. Catecholamine-containing, serotonin-like and FMRFamide-like immunoreactive neurons and processes in the nervous system of the early actinotroch larva of *Phoronis vancouverensis* (Phoronida): distribution and development. *Can. J. Zool.* 1990a. 68 (7): 1525–1536.
- Hay-Schmidt A. Distribution of catecholamine containing, serotonin-like and neuropeptide FMRFamide-like immunoreactive neurons and processes in the nervous system of the actinotroch larva of *Phoronis muelleri* (Phoronida). *Cell and Tissue Res.* 1990b. 259: 105–118.

- Hay-Schmidt A.* The evolution of the serotonergic nervous system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci.* 2000. 267: 1071–1079.
- Helm C., Vöcking O., Kourtesis I., Hausen H.* *Owenia fusiformis* – a basally branching annelid suitable for studying ancestral features of annelid neural development. *BMC Evol. Biol.* 2016. 16: 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0690-4>
- Helm C., Karl A., Beckers P., Kaul-strehlow S., Ulbricht E., Kourtesis I., Kuhrt H., Hausen H., Bartolomaeus Th., Reichenbach F., Bleidorn Ch.* Early evolution of radial glial cells in Bilateria. *Proc. R. Soc. B.* 2017. 284 (20170743). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0743>
- Hyman L.H.* Phoronida. The invertebrates. V. 5. Smaller coelomate groups. Ed. Boell E.J. New York: McGraw-Hill, 1959. 228–274 pp.
- Kocot K.M., Struck T.H., Merkel L., Waits D.S., Todt C., Brannock P.M., Weese D.A., Cannon J.T., Moroz L.L., Lieb B., Halanych K.M.* Phylogenomics of Lophotrochozoa with consideration of systematic error. *Syst. Biol.* 2018. 66 (2): 256–282.
- Kuzmina T.V., Temereva E.N.* Ultrastructure of ganglia in the brachiopod *Coptothyris grayi* and its phylogenetic significance. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2021. 59 (2): 376–386.
- Lacalli T.C.* Structure and organization of the nervous system in the actinotroch larva of *Phoronis vancouverensis*. *Phil. Trans. Roy. Soc.* 1991. 327: 655–685.
- Magarlamov T.Y., Dyachuk V., Chernyshev A.V.* Does the frontal sensory organ in adults of the hoploneurtean *Quasitetrastemma stimpsoni* originate from the larval apical organ? *Front. Zool.* 2020. 17: 2. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0347-4>
- Marlow H., Tosches M.A., Tomer R., Steinmetz P., Lauri A., Larsson T., Arendt D.* Larval body patterning and apical organs are conserved in animal evolution. *BMC Biol.* 2014. 12 (7). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-7>
- Martín-Durán J.M., Hejnol A.* A developmental perspective on the evolution of the nervous system. *Dev. Biol.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.10.003>
- Nomaksteinsky M., Roettinger E., Dufour H.D., Chetouh Z., Lowe C.J., Martindale M.Q., Brunet J.F.* Centralization of the deuterostome nervous system predates chordates. *Curr. Biol.* 2009. 19: 1264–1269.
- Richter S., Loesel R., Purschke G., Schmidt-Rhaesa A., Scholtz G., Stach T., Vogt L., Wanninger A., Brenneis G., Döring C., Faller S., Fritsch M., Grobe P., Heuer C.M., Kaul S., Möller O.S., Müller C., VRieger V., Rothe B., Stegner M., Harzsch S.* Invertebrate neurophylogeny: suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. *Front. Zool.* 2010. 7 (1): 29.
- Santagata S.* Structure and metamorphic remodeling of the larval nervous system and musculature of *Phoronis pallida* (Phoronida). *Evol. Dev.* 2002. 4: 28–42.
- Santagata S.* A waterborne behavioral cue for the actinotroch larva of *Phoronis pallida* (Phoronida) produced by *Upogebia pugettensis* (Decapoda: Thalassinidea). *Biol. Bull.* 2004. 207: 103–115.
- Santagata S., Zimmer R.L.* Comparison of the neuromuscular system among actinotroch larvae: Systematic and evolutionary implication. *Evol. Dev.* 2002. 4: 43–54.
- Schmidt-Rhaesa A.* The evolution of organ systems. Oxford: Oxford University Press, 2007. 365 pp.
- Selys-Longchamps. Phoronis. *Fauna Flora Golf Neapel.* 1907. 30: 1–280 (1907).
- Silén L.* On the nervous system of Phoronis. *Ark. Zool.* 1954b. 6: 1–40.
- Sonnleitner B., Schwaha T., Wanninger A.* Inter- and intraspecific plasticity in distribution patterns of immunoreactive compounds in actinotroch larvae of Phoronida (Lophotrochozoa). *J. Zool. Syst. Evol.* 2014. 52 (1): 1–14.
- Temereva E.N.* Ventral nerve cord in *Phoronopsis harmeri* larvae. *J. Exp. Zool. Part B, Mol. Dev. Evol.* 2012. 318: 26–34.
- Temereva E.* Phoronida. Structure and evolution of invertebrate nervous systems. Eds. Schmidt-Rhaesa A., Harzsch S., Purschke G. London, UK: Oxford University Press, 2015. 351–359 pp.
- Temereva E.N.* Ground plan of the larval nervous system in phoronids: Evidence from larvae of viviparous phoronid. *Evol. Dev.* 2017a. 19: 171–189.
- Temereva E.N.* Innervation of the lophophore suggests that the phoronid *Phoronis ovalis* is a link between phoronids and bryozoans. *Sci. Rep.* 2017b. 7 (1): 1–16.
- Temereva E.N.* Morphology evidences the lophophorates monophyly: brief review of studies on the lophophore innervation. *Invertebr. Zool.* 2017c. 14: 85–91.
- Temereva E.N.* First data on the organization of the nervous system in juveniles of *Novocrania anomala* (Brachiopoda, Craniiformea). *Sci. Rep.* 2020. 10 (1): 1–15.
- Temereva E.N., Chichvarkhin A.* A new phoronid species, *Phoronis embryolabi*, with a novel type of development, and consideration of phoronid taxonomy and DNA barcoding. *Invertebr. Syst.* 2017. 31: 65–84.
- Temereva E.N., Kosevich I.A.* The nervous system of the lophophore in the ctenostome *Amathia gracilis* provides insight into the morphology of ancestral ectoprocts and the monophyly of the lophophorates. *BMC Evol. Biology.* 2016. 16: 1–24. <https://doi.org/10.1186/s1286>

- Temereva E.N., Malakhov V.V.* Embryogenesis in phoronids. *Invertebr. Zool.* 2012. 9 (1): 1–39.
- Temereva E.N., Malakhov V.V.* Metamorphic remodeling of morphology and the body cavity in *Phoronopsis harmeri* (Lophotrochozoa, Phoronida): The evolution of the phoronid body plan and life cycle. *BMC Evol. Biol.* 2015. 15: 1–28. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0504-0>
- Temereva E.N., Tsitirin E.B.* Development, organization, and remodeling of phoronid muscles from embryo to metamorphosis (Lophotrochozoa: Phoronida). *BMC Dev. Biol.* 2013. 13: 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-14>
- Temereva E.N., Tsitirin E.B.* Organization and metamorphic remodeling of the nervous system in juveniles of *Phoronopsis harmeri* (Phoronida): Insights into evolution of the bilaterian nervous system. *Front. Zool.* 2014a. 11: 1–25. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-35>
- Temereva E.N., Tsitirin E.B.* Development and organization of the larval nervous system in *Phoronopsis harmeri*: New insights into phoronid phylogeny. *Front. Zool.* 2014b. 11 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-3>
- Temereva E.N., Tsitirin E.B.* Modern Data on the Innervation of the Lophophore in *Lingula anatina* (Brachiopoda) Support the Monophyly of the Lophophorates. *PLoS One.* 2015. 10: 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137111>
- Temereva E., Wanninger A.* Development of the nervous system in *Phoronopsis harmeri* (Lophotrochozoa, Phoronida) reveals both deuterostome- and trochozoan-like features. *BMC Evol. Biol.* 2012. 12: 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-121>
- Zimmer R.L.* Reproductive biology and development of Phoronida. *Ann Arbor: University Microfilm,* 1964. 416 pp.

DEVELOPMENT AND ORGANIZATION OF THE NERVOUS SYSTEM IN PHORONIDS: EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE

E. N. Temereva^{a,b,#,##}

^a Dept. invertebrate zoology, Biological faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^b Faculty of biology and biotechnology, National research university Higher school of economics, Moscow, Russia

[#]e-mail: etemereva@hse.ru

^{##}e-mail: temereva@mail.ru

Development and organization of the nervous system are traditionally used for phylogenetic analysis and reconstruction of evolutionary events. Phoronids are unusual protostomian animals, whose peculiarities of development and organization have a lot in common with that of Deuterostomia. In this report all data on development and organization of phoronid nervous system are summarized. The analysis of published results allows to suggest that the nervous system of the last common bilaterian ancestor had included a nerve center and a nerve plexus. It is important to mention that the nerve center of the last common bilaterian ancestor is homologous to the aboral organ of radially symmetrical blastula and gastrula of recent bilaterians, whereas the apical organ of bilaterally symmetrical ciliated larvae had appeared *de novo* for life in plankton, communication with parental animals, and metamorphosis. Exactly for this reason the apical organ disappears in metamorphosis of most protostomians and all deuterostomians.

Keywords: aboral organ, apical organ, ciliated larvae, evolution, last common bilaterian ancestor

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

УДК 612.82

**ТРЕВОЖНОЕ ПОВЕДЕНИЕ РОДИТЕЛЕЙ В ПЕРИОД ФОРМИРОВАНИЯ
ОБОРОНИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ПОТОМСТВА ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЕ
НА ПАРАМЕТРЫ ЭЭГ ПТЕНЦОВ МУХОЛОВКИ-ПЕСТРУШКИ**

© 2021 г. Е. В. Корнеева^{1,*}, Л. И. Александров¹, Т. Б. Голубева²

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² Кафедра зоологии позвоночных Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: eko.ihna@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2020 г.

После доработки 09.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Исследовали тревожное поведение взрослых мухоловок-пеструшек, воспитывающих выводки птенцов из ранних и поздних, отложенных взамен разоренных кладок, и его влияние на формирование электрической активности головного мозга птенцов. Показано, что родители поздних выводков исполняют видоспецифический сигнал тревоги более продолжительное время по сравнению с родителями ранних выводков. Количественный анализ спектральных характеристик ЭЭГ 7-суточных птенцов показал, что у птенцов из ранних и поздних выводков они различаются в большей части выделенных частотных диапазонов, что может свидетельствовать о влиянии повышенной тревожности родителей на созревание ЭЭГ.

Ключевые слова: электроэнцефалография, ЭЭГ, спектральный анализ, птенцы, мухоловка-пеструшка, тревожное поведение, сигнал тревоги

DOI: 10.31857/S0044467721030059

Забота о потомстве является фундаментальным свойством эндотермных животных. У экзотермных животных – рыб, амфибий и рептилий – нередко имеет место охрана и забота о кладке, в редких случаях и забота о вылупившихся личинках, кроме того, для крокодилов описаны элементы коммуникации с потомством (Combrink et al., 2016, Farmer, 2018). У млекопитающих и человека поведение родителей при взаимоотношении с потомством усложняется настолько, что становится решающим фактором раннего онтогенеза, влияющим не только на выживание, но и на особенности развития потомства. Так, качество материнской заботы во многом способно как модифицировать раннее поведение потомства, так и оказывать влияние на поведение и способность к обучению в зрелом возрасте (Шишелова, Раевский, 2018). У птиц, другого класса эндотермных позвоночных, ведущим фактором, влияющим на развитие птенцов в раннем онтогенезе, ока-

зывается акустическая коммуникация между матерью и потомством. Акустическая коммуникация на последних сроках эмбрионального развития выводковых птиц способствует синхронному вылуплению из яиц и нормальному поведению птенцов после вылупления (Голубева, 2006). Окружающая среда оказывает существенное влияние на поведение взрослых птиц при выкармливании, в результате может меняться стратегия выкармливания, позволяющая выжить слабым птенцам (Caro et al., 2016). Остается неизвестным, могут ли индивидуальные особенности поведения родителей более тонко, чем влияние на выживание, модулировать процессы развития потомства. Цель нашей работы заключалась в выяснении вопроса о том, могут ли вариации поведения родителей оказывать влияние на формирование ЭЭГ птенцов в период их раннего онтогенеза.

У мухоловки-пеструшки наблюдается высокий уровень гибели выводков в результате

разорения гнезд хищниками (Артемьев, 2008, Голубева и др., 2017). Из-за этого формирование кладок и вылупление птенцов происходят не синхронно, а волнообразно. Вылупление птенцов из кладок первой волны происходит, как правило, в начале июня. Во второй половине июня происходит вылупление птенцов из повторных кладок, отложенных после гибели яиц, отложенных в мае. В конце июня – начале июля может иметь место третья волна вылуплений птенцов из кладок, отложенных взамен погибших птенцов (Голубева и др., 2017). Поведение родителей поздних выводков, потерявших первые выводки в результате хищничества, может отличаться от поведения родителей ранних кладок. Задача настоящей работы состояла в изучении тревожного поведения родителей ранних и поздних выводков и его влияния на формирование электрической активности головного мозга птенцов. Исследовалось исполнение родителями видоспецифического сигнала тревоги (ВСТ). Этот сигнал состоит из ритмически повторяемых акустических посылок с энергетическим максимумом 5 кГц. Частота следования посылок может изменяться в пределах 1.5–2 раза в секунду.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными по протоколу, утвержденному этической комиссией ИВНД и НФ РАН. Исследовали тревожное поведение родителей ранних и поздних выводков; вылупление первых проходило в период 3–16 июня, вторых – 7–13 июля. Анализировали продолжительность издавания ВСТ взрослыми птицами при появлении около гнезда экспериментатора. Экспериментатор располагался на расстоянии 10 м от гнезда. Фиксировали время начала и окончания звучания ВСТ и количество птиц, исполняющих сигнал тревоги. Регистрацию поведения родителей проводили при возрастном интервале птенцов 7–9 сут. Исследовано тревожное поведение родителей 20 ранних и 15 поздних выводков.

Регистрацию фоновой ЭЭГ проводили в светлое время суток у 6 птенцов мухоловки-пеструшки в возрасте 7 дней. Три птенца были взяты из ранних кладок, вылупление которых проходило в начале июня, три – из поздних кладок, вылупившихся в июле. Все птенцы

были из выводков, которые выкармливались двумя родителями. Птенцов в эксперименте кормили каждые 30 мин стандартными порциями корма. Вживление регистрирующих электродов проводили под нембуталовым наркозом (100 мг/кг, внутривенно). Серебряные электроды помещали в симметричные области правого и левого каудомедиального нидопаллиума (высший интегративный центр слуховой системы птиц). Референтный электрод располагался субдурально над средней линией мозга, электрод заземления – над поверхностью мозжечка. Для фильтрации и усиления сигналов использовали усилитель L-Amp (ООО “Л Кард”, Россия), полоса пропускания составляла 1–250 Гц. При анализе ЭЭГ для удаления шумовой составляющей сигналы предварительно подвергали обработке с использованием метода разложения на эмпирические моды (Грубов и др., 2012). Для частотно-временного анализа сигналов ЭЭГ использовали непрерывное вейвлетное преобразование (Павлов и др., 2012). Вычисляли энергию вейвлетного спектра во фрагментах ЭЭГ длительностью 8 с. Проводили анализ вейвлетных спектров мощности в диапазонах 1–2, 2–3, 3–5, 5–12 и 12–20 Гц.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием факторного анализа ANOVA, одновариантного анализа ANOVA и последующего LSD-теста (статистический пакет Statistica 8).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ продолжительности исполнения ВСТ показал, что в ранних выводках продолжительность исполнения сигнала тревоги двумя родителями составляла в среднем 291 с ($SE = 43$, $n = 16$), в случае одного родителя его продолжительность была несколько меньше и составляла 249 с ($SE = 44.7$, $n = 15$). В поздних выводках продолжительность исполнения сигнала тревоги 2 родителями составляла 453 с ($SE = 59.2$, $n = 6$), одним родителем – 152 с ($SE = 40.3$, $n = 9$). Статистический анализ показал значимость фактора количества родителей, исполняющих ВСТ ($p = 0.001812$) и комбинации факторов количества родителей и ранних или поздних выводков ($p = 0.015799$). LSD-test показал, что продолжительность исполнения ВСТ двумя родителями в поздних выводках была достоверно выше по сравнению как с продолжительностью исполнения ВСТ одним родителем в поздних

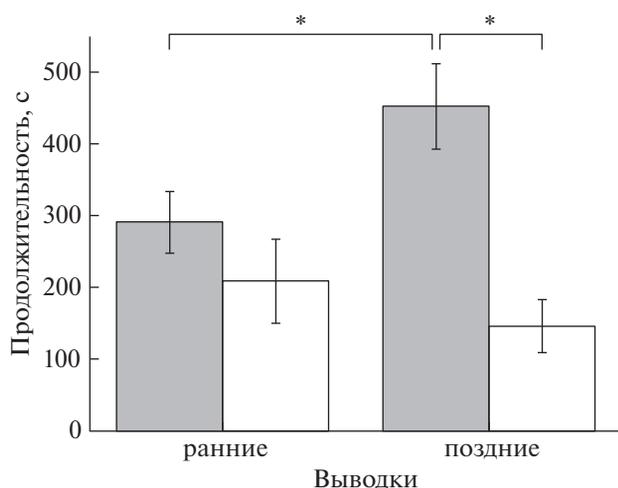


Рис. 1. Продолжительности исполнения ВСТ родителями ранних и поздних выводков двумя родителями (темные столбики) и одним родителем (светлые столбики). * $p < 0.05$.

Fig. 1. Duration of alarm call by both parents (dark columns) and single parent (light columns) to early and late broods. * $p < 0.05$.

выводках ($p = 0.042209$), так и с продолжительностью исполнения сигнала тревоги двумя родителями в ранних выводках ($p = 0.000999$) (рис. 1).

Учитывая тот факт, что повторные кладки откладываются как правило взамен разоренных хищниками, можно полагать, что такая повышенная тревожность родителей вызвана именно этим событием.

Статистический анализ вейвлетных спектров мощности показал значимое различие между ЭЭГ исследованных 7-дневных птенцов из ранних и поздних выводков ($F = 10.05$, $p < 0.01$). Для ЭЭГ птенцов из ранних выводков были характерны максимальные показатели мощности в частотных диапазонах 3–5 Гц (0.53944 SE = 0.0162) и 5–12 Гц (0.53391 SE = 0.01325). Для птенцов из поздних выводков максимальные показатели мощности были отмечены в частотных диапазонах 1–2 Гц (0.47621 SE = 0.01478) и 2–3 Гц (0.49561 SE = 0.01653). Количественный анализ, проведенный для каждого из частотных диапазонов, выявил значимую разницу спектральных характеристик ЭЭГ птенцов из ранних и поздних выводков практически во всех частотных диапазонах (рис. 2). При этом в ЭЭГ птенцов из поздних выводков показатели спектров мощности в диапазоне 1–2 Гц были

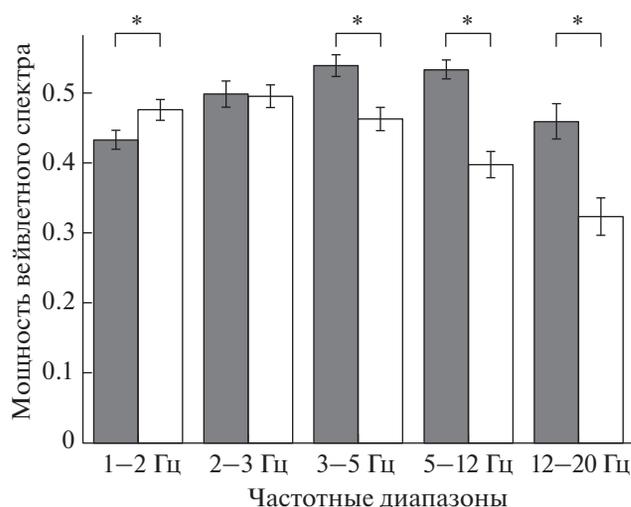


Рис. 2. Средние значения мощности вейвлетных спектров ЭЭГ каудомедиального нидопаллиума (отн. ед. \pm станд. ошибка) у птенцов из ранних (темные столбики) и поздних (светлые столбики) кладок. * $p < 0.05$.

Fig. 2. Power of wavelet spectra (Mean \pm SE) of EEG from caudomedial nidopallium in nestlings from early (dark columns) and late (light columns) broods. * $p < 0.05$.

значимо выше, а в диапазонах 3–5, 5–12 и 12–20 Гц значимо ниже, чем в ЭЭГ “ранних” птенцов.

Исследование электрофизиологических коррелятов разных поведенческих состояний взрослых птиц показало, что низкоамплитудная ЭЭГ-активность с частотой выше 10–12 Гц сопровождается активное бодрствование, а высокоамплитудная активность с частотой менее 5 Гц характерна для их медленноволнового сна (Jones et al., 2010, Szymczak et al., 1992). Исследование ЭЭГ у старших птенцов мухоловки-пеструшки (11 суток) показало, что двигательная активность птенцов сопровождалась увеличением спектральной мощности в частотных диапазонах 5–10 и 12–20 Гц (Корнеева и др., 2014). Различные диапазоны максимальной спектральной мощности свидетельствуют о разнице в функциональных состояниях птенцов из ранних и повторных выводков, при этом большая выраженность низкочастотной области спектра в ЭЭГ у птенцов из повторных выводков может говорить об их менее активном функциональном состоянии. Значимо более низкая спектральная мощность в частотных диапазонах 5–10 и 12–20 Гц у птенцов из поздних кладок свиде-

тельствует о более низкой двигательной активности этих птенцов.

Из литературных источников известно, что ритмическая стимуляция модулирует электрические колебания головного мозга, увеличивая их синхронизацию со структурой стимулов (Keitel, Quigley, 2014). Обнаруженное нами более частое исполнение ритмичного, повторяемого с частотой 1–2 Гц ВСТ родителями поздних выводков может способствовать увеличению в биоэлектрической активности мозга таких птенцов ритмической компоненты, соответствующей частоте ВСТ, которая соответствует частотному диапазону 1–2 Гц. В норме такое усвоение ритма внешнего стимула сохраняется достаточно недолго. Однако мы полагаем, что длительная ритмическая стимуляция в ходе раннего онтогенеза биологически значимым акустическим сигналом, вызывающим снижение двигательной активности птенцов, может оказывать модулирующее влияние на процессы раннего развития и, как следствие, приводить к достаточно стойким изменениям ЭЭГ птенцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Птенцы из повторных кладок, отложенных взамен разоренных хищниками, получают повышенную экспозицию видоспецифического сигнала тревоги, вызывающего снижение двигательной активности. Для фоновой ЭЭГ таких птенцов характерны более низкие показатели спектральной мощности в высокочастотных диапазонах.

Исследования выполнены за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-013-00176.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Артемов А. В. Популяционная экология мухоловки-пеструшки в северной зоне ареала. М.: Наука, 2008. 267 с.
- Голубева Т. Б. Сенсорное обеспечение ранней акустической коммуникации выводковых и птенцовых птиц. Развитие современной орнитологии в Северной Евразии. Ставрополь. 2006. 600–625.
- Голубева Т. Б., Корнеева Е. В., Александров Л. И. Успешность и сроки гнездования мухоловки пеструшки в Приокско-Террасном государственном природном биосферном заповеднике в начале XXI века. Динамика численности птиц в наземных ландшафтах. 30-летие программ мониторинга зимующих птиц России и сопредельных регионов, “*Parus*” и “Евразийский Рождественский учет” Материалы Всероссийской конференции. М: Товарищество научных изданий. 2017. С. 219–225.
- Грубов В. В., Ситникова Е. Ю., Короновский А. А., Павлов А. Н., Храмов А. Е. Автоматическое выделение и анализ осцилляторных паттернов на нестационарных сигналах ЭЭГ с использованием вейвлетного преобразования и метода эмпирических мод. Изд. РАН. Сер. физическая. 2012. 76 (12): 1520–1523.
- Корнеева Е. В., Александров Л. И., Храмов А. Е., Ситникова Е. Ю., Раевский В. В. ЭЭГ незрелорождающихся птенцов мухоловки-пеструшки при состояниях, связанных с циклом естественного поведения. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2014. 64 (2): 208–217.
- Павлов А. Н., Храмов А. Е., Короновский А. А., Ситникова Е. Ю., Макаров В. А., Овчинников А. А. Вейвлет-анализ в нейродинамике. Успехи физиол. наук. 2012. 182 (9): 905–939.
- Шишелова А. Ю., Раевский В. В. Влияние пре- и постнатальных факторов на формирование ранних поведенческих реакций. ДАН. 2018. 479 (3): 351–353.
- Caro S. M., Griffin A. S., Hinde C. A., West S. A. Unpredictable environments lead to the evolution of parental neglect in birds. *Nat. Commun.* 2016. 7:10985.
- Combrink X., Warner J. K., Downs C. T. Nest predation and maternal care in the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) at Lake St Lucia, South Africa. *Behav. Processes.* 2016. 133: 31–36.
- Farmer C. G. Parental Care, Destabilizing Selection, and the Evolution of Tetrapod Endothermy. *Physiology.* 2020. 35: 160–176.
- Jones S. G., Paletz E. M., Obermeyer W. H., Hannan C. T., Benca R. M. Seasonal influences on sleep and executive function in the migratory White-crowned Sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *BMC Neuroscience.* 2010. 11: 87.
- Keitel C., Quigley C., Ruhnau P. Stimulus-driven brain oscillations in the alpha range: entrainment of intrinsic rhythms or frequency-following response? *J. Neurosci.* 2014. 34: 10137–10140.
- Szymczak J. T., Helb H. W., Kaiser W. Electrophysiological and behavioral correlates of sleep in the blackbird (*Turdus merula*). *Physiol. Behav.* 1992. 53: 1201–1210.

PARENTS' ANXIETY LEVEL DURING THE DEVELOPMENT OF DEFENSE BEHAVIOR IN OFFSPRING AFFECTS EEG PARAMETERS IN PIED FLYCATCHER NESTLINGS

E. V. Korneeva^{a, #}, L. I. Alexandrov^a, and T. B. Golubeva^b

^a *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow, Russia*

^b *Department of Vertebrate Zoology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: eko.ihna@mail.ru*

We studied the alarm behavior of adult pied flycatchers raising broods hatched from the early clutches and from the late clutches, laid after initial clutches were destroyed by predators. The study was focused on the effect of variations of parents' alarm behavior on the maturation of electric activity of nestlings' brain. Parents of the later broods have been shown to emit alarm calls longer than parents of the early broods. Analysis of EEG spectral characteristics in 7-day-old nestlings showed that EEG parameters in the nestlings from early broods differed from those in the nestlings from later broods – differences spanned through most of the selected frequency ranges. These differences indicate the possible influence of increased parents' anxiety level on EEG maturation.

Keywords: electroencephalography, EEG, spectral analysis, nestlings, pied flycatcher, anxiety, alarm call

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612; 612,65; 612,66; 612,88

ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К ОБУЧЕНИЮ
В ЗРЕЛОМ ВОЗРАСТЕ КРЫС WAG/RIJ

© 2021 г. А. Ю. Шишелова^{1,2}, В. В. Раевский^{1,*}

¹ ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

*e-mail: vraevsky@mail.ru

Поступила в редакцию 02.12.2020 г.

После доработки 11.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

У крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии и характеризующихся депрессивным статусом, исследовали влияние полной 3-часовой ежедневной социальной изоляции в разные критические периоды раннего постнатального онтогенеза (2–8-й, 9–15-й, 16–22-й дни после рождения) на поведение во взрослом возрасте. Установлено, что изоляция со 2-го по 8-й и с 16-го по 22-й дни жизни обуславливает увеличение двигательной активности в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта и в тесте “открытого поля”. У животных, подвергавшихся изоляции с 9-го по 15-й день, не отмечено изменения двигательной активности по сравнению с животными контрольной группы, но выявлено повышение эмоциональной реактивности. Формирование условного рефлекса двустороннего избегания обнаружено у большего числа животных, перенесших изоляцию с 9-го дня жизни.

Ключевые слова: социальная изоляция, онтогенез, двигательная активность, обучение

DOI: 10.31857/S0044467721030072

ВВЕДЕНИЕ

Социальная среда является важным фактором раннего онтогенеза, оказывающим существенное влияние как на формирование ранних поведенческих реакций, так и на способность адаптации к окружающей среде в зрелом возрасте (Curley et al., 2011; Cohen et al., 2015). Основными компонентами социальной среды для новорожденных являются мать и сиблинги. Особенное значение материнской заботы было идентифицировано в экспериментах с перекрестным выращиванием потомства крыс линий WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии, и Wistar без врожденной патологии ЦНС. В этих экспериментах было установлено, что у крысят линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии, воспитанных здоровыми самками линии Wistar, эпилептическая активность формируется позже и менее выражена (Sitnikova et al., 2015, 2016; Саркисова и др., 2017). Ограничение

сенсорного притока в течение первых 20 дней жизни за счет ежедневного выстригания вибрисс, напротив, инициирует у этих животных более раннее развитие патологии (Sitnikova, 2011).

В то же время ранний онтогенез представляет собой ряд периодов, в течение которых сенсорные факторы специфически влияют на развитие организма. Так, в экспериментах на крысах линии Wistar было показано, что ограничение видоспецифической афферентации за счет ежедневного выстригания вибрисс в разные сроки постнатального онтогенеза (со 2-го или 9-го по 20-й дни жизни) оказывает разное влияние на формирование ранних поведенческих реакций, а также на исследовательское поведение во взрослом возрасте (Шишелова, Раевский, 2009; Шишелова и др., 2015, 2016), что позволило выделить два критических периода в раннем онтогенезе крысят — со 2-го и с 9-го дня жизни. Однако есть основания считать, что после

МЕТОДИКА

прозревания крысят (15–17-й день жизни) наступает третий период развития, для которого характерно включение в репертуар взаимодействия с окружающей средой нового сенсорного входа. Это позволяет предполагать, что на развитие генетически предопределенной патологии у крыс линии WAG/Rij особое влияние могут оказывать сенсорные факторы одного из указанных критических периодов раннего онтогенеза. Изменение социальной среды в определенный критический период в последующем может приводить к изменению эмоционального статуса животных, коррелирующего с вероятностью развития эпилептической активности. Так, известно, что для крыс линии WAG/Rij, генетически предрасположенных к абсанс эпилепсии, характерны депрессивные нарушения (Sarkisova et al., 2003; Sarkisova, van Luijcklaag, 2011). При этом показано, что у тех молодых животных, у которых наблюдается низкий уровень тревожности, в последующем развивается эпилептическая активность (Смирнов, Ситникова, 2020).

Основная цель нашего исследования заключалась в выявлении влияния социального опыта новорожденных в разные периоды раннего онтогенеза (со 2-го по 8-й, с 9-го по 15-й и с 16-го по 22-й дни жизни) на поведение и способность к обучению во взрослом возрасте у крыс линии WAG/Rij.

Одной из моделей исследования роли социального опыта в развитии служит изоляция от сородичей. Для грызунов в раннем постнатальном онтогенезе наиболее распространенным способом изоляции является ежедневное отлучение на несколько часов помета от матери (Litvin et al., 2010; Rana et al., 2015; Vetulani, 2013). В этих условиях новорожденный остается в окружении сиблингов, т.е. социальные контакты ограничены только частично. Реже в качестве модели социальной депривации применяется полная социальная изоляция, когда каждого детеныша удаляют из гнезда и содержат отдельно не только от матери, но и от сиблингов (Marmendal et al., 2006; Zhang et al., 2013). Этот способ социальной депривации, как более эффективный, был использован нами. Применение такой методики социальной изоляции отдельно для разных недель постнатального онтогенеза крыс использовано впервые.

Все эксперименты выполняли в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского Сообщества от 22 сентября 2010 – Directive 2010/63/EU).

Работа проведена на крысах линии WAG/Rij с генетической предрасположенностью к абсанс эпилепсии. Все животные были выращены в виварии лаборатории, с поддерживаемым режимом смены светлого и темного периодов суток (по 12 ч в соответствии с естественным ритмом, свет включали в 8.00). Беременных самок за два дня до предполагаемых родов отсаживали в отдельные клетки. День родов принимали за первый день жизни. На 2-й день проводили осмотр крысят и ограничивали число крысят в помете до 6–8, оставляя одинаковое количество самцов и самок в помете. Сформированы три экспериментальные группы, в которых детенышей подвергали ежедневной изоляции от матери и сиблингов в течение трех часов: в первой группе со 2-го по 8-й день жизни (5 пометов: 18 самцов и 13 самок), во второй – с 9-го по 15-й день (4 помета: 16 самцов, 16 самок), в третьей – с 16-го по 22-й день постнатального онтогенеза (5 пометов: 19 самцов, 19 самок). Изоляцию проводили в помещении виварии при температуре воздуха 20–21 градус по Цельсию. Всех крысят обоего пола из каждого помета изолировали одновременно. Во время изоляции каждого детеныша содержали в отдельном непрозрачном контейнере с опилками (для первой и второй групп – в круглом с диаметром 9.8 см и высотой 4.3 см, 13.0 см и 7.5 см соответственно, для третьей – в квадратном со стороной 15.3 см и высотой 7.5 см). Контейнеры с крысятами из одного помета размещали на столике рядом друг с другом. Столик с контейнерами находился на расстоянии 2 м от клеток с кормящими самками и другими пометами, что снижало влияние на них возможной ультразвуковой вокализации изолированных крысят (Gulia et al., 2014). В контрольной группе проводили только осмотр крысят в возрасте 2 и 9 дней (6 пометов: 22 самца и 22 самки). В возрасте 27 дней крысят отсаживали от матери и далее содержали группами по 3–4 животных одного пола в каждой клетке. Во взрослом возрасте тестировали поведение самцов: 1) в 2 мес – в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) в течение пяти минут, 2) в 2.5 мес – в “открытом поле” в течение десяти

минут, 3) в 6–6.5 мес – в челночной камере, где животных обучали условному рефлексу двустороннего избегания.

ПКЛ состоял из 4 рукавов равной длины (45 см): двух противоположных открытых и двух закрытых (огороженных стенками), с центральной открытой площадкой размером 10×10 см, на высоте 80 см над полом. “Открытое поле” представляло собой квадратную, равномерно освещенную (26 люкс) арену черного цвета размером 108×108 см, огороженную стенками высотой 40 см. Каждый эксперимент начинали с посадки животного в центр установки.

Регистрацию движения осуществляли с помощью компьютерной программы “Easy Track”, которая определяла координаты положения крысы каждые 40 мсек. Координаты использовали для построения траектории перемещения животного и для вычисления кинематических характеристик его движения. Анализировали длину пройденного пути, максимальную скорость движения животного (V_{\max} , наибольшее значение за период тестирования), время “сидения” – суммарную продолжительность отсутствия ходьбы и вертикальной активности (что соответствует регистрируемой скорости движения менее 2 см/с), время “бега” – суммарную продолжительность перемещения с высокой скоростью (более 30 см/с). Показатели движения в ПКЛ вычисляли отдельно для открытых и закрытых рукавов, а также анализировали время пребывания в этих зонах. В “открытом поле” вычисляли суммарные параметры движения для целого “открытого поля” и для его центральной зоны (квадрат в центре, площадью $1/9$ от площади “открытого поля”). Путем визуального наблюдения регистрировали число стоек, актов груминга, дефекаций.

Обучение условному рефлексу двустороннего избегания (УРДИ). Для исследования УРДИ использовали челночную камеру, разделенную на два одинаковых по размеру отсека с отверстием в перегородке. К полу камеры (металлическая решетка) был подключен электростимулятор, что позволяло подавать ток отдельно на каждую половину камеры. Крысу помещали в камеру за 5 мин до начала обучения. В качестве условного раздражителя использовали 5-секундный звуковой сигнал (с уровнем звукового давления 80 дБ). Безусловным раздражителем служило электрокожное раздражение конечностей живот-

ного (силу тока (мА) подбирали достаточную для инициации реакции отдергивания лап). Во время обучения отсек, в котором находилось животное при предъявлении условного раздражителя, был опасным, подключенным в данный момент к электростимулятору. Безусловный раздражитель предъявляли через 4.5 сек после включения условного сигнала до перехода животного в соседний (безопасный) отсек. Если животное не переходило в безопасный отсек в течение 40 сек, электрическую стимуляцию прекращали. После перехода крысы в соседний отсек последний становился опасным, а покинутый отсек – безопасным. Интервал между сочетаниями составлял 20–40 сек. Переход крысы в безопасный отсек до включения электрокожного раздражения считали проявлением условной реакции избегания. Процедура обучения состояла из 5 последовательных серий, каждая из которых содержала 10 предъявлений сочетаний условного и безусловного раздражителей. Анализировали: (1) общее количество условных реакций избегания (в % от суммарного числа предъявлений условного раздражителя); (2) число условных реакций в каждой серии; (3) порядковый номер предъявления условного раздражителя, при котором животное демонстрировало первую условную реакцию избегания; (4) долю животных в группе, достигших критерия обученности животного (наличие 9 условных реакций избегания в ответ на 10 последовательных предъявлений условного раздражителя), когда условный рефлекс считали стойко сформированным.

Статистический анализ проводили в программе STATISTICA 10.0. При обработке данных использовали тест для проверки на нормальность распределений (критерий Шапиро–Уилка W), однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (для показателей поведения в ПКЛ, имевших нормальные распределения), непараметрические статистические критерии – Манна–Уитни (U) для показателей, имевших отличные от нормальных распределения, парный Вилкоксона (T), и сравнение двух долей (пропорций) (difference between two proportions, two-sided test). Для *post-hoc* анализа использовали тест Ньюмена–Коулса (Newman–Keuls).

Таблица 1. Показатели поведения в отсеках ПКЛ крыс контрольной и экспериментальных групп (среднее \pm С.К.О.)
Table 1. The signs of plus-maze behavior in control and experimental rat groups (mean \pm Std.Dev.)

Показатели поведения	Контрольная группа $n = 19$	Изолированные со 2-го дня жизни $n = 17$	Изолированные с 9-го дня жизни $n = 15$	Изолированные с 16-го дня жизни $n = 19$
Показатели поведения в закрытых рукавах				
Длина пути, см	886.6 \pm 182.0	936.2 \pm 154.6	1006.6 \pm 208.5	818.6 \pm 133.2 #
V_{\max} , см/с	33.65 \pm 6.5	40.8 \pm 9.1 #	37.05 \pm 5.0	36.2 \pm 5.9
Число актов груминга	0.9 \pm 1.0	1.8 \pm 1.6	1.7 \pm 1.0 *	1.5 \pm 1.3
Число дефекаций	0.7 \pm 1.5	1.2 \pm 1.5	1.9 \pm 1.9 *	1.4 \pm 2.2
Показатели поведения в открытых рукавах				
	$n = 13$	$n = 10$	$n = 10$	$n = 16$
Длина пути, см	114.9 \pm 76.7	214.6 \pm 126.1 *	175.2 \pm 83.6	232.4 \pm 130.8 **
Время пребывания, с	32.1 \pm 21.9	57.0 \pm 24.6 *	52.8 \pm 30.0	60.2 \pm 30.4 **
V_{\max} , см/с	16.0 \pm 5.4	23.4 \pm 9.8	18.75 \pm 4.2	22.4 \pm 7.9 *
Число выходов в рукава	2.3 \pm 1.2	3.3 \pm 1.1	2.6 \pm 1.2	3.25 \pm 1.6

Примечание. Жирным шрифтом в строке выделены показатели групп, имеющих статистически значимые различия между собой (ANOVA, *post-hoc* анализ, Newman–Keuls тест: # – $p < 0.05$). * – статистически значимые отличия от контрольной группы (тест Манна–Уитни, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$).

Note. The bold values in line are the behavior signs of groups with statistically significant differences (ANOVA, *post-hoc* analysis, Newman–Keuls test: # $p < 0.05$). * – the values differ significantly from those of control group (Mann–Whitney test, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поведение в приподнятом крестообразном лабиринте

Основные показатели поведения в приподнятом крестообразном лабиринте проанализированы отдельно для закрытых и открытых рукавов. Сводные данные по показателям, имевшим статистически значимые различия в исследованных группах, представлены в табл. 1.

Обращает внимание, что у животных, перенесших изоляцию со 2-го по 8-й день жизни, скорость перемещения в закрытых рукавах лабиринта была значимо больше, чем у контрольных животных (ANOVA $F(3,66) = 3.401$, $p = 0.022$; *post-hoc* анализ, тест Newman–Keuls, $p = 0.014$). В открытые рукава выходили 59% крыс из группы, изолированных со 2-го дня жизни, что сравнимо с контрольными животными (68%), но у этих животных зафиксированы статистически значимо большие продолжительность пребывания и длина пройденного пути в открытых рукавах по сравнению с контрольной группой (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$), а также тенденция к более высокой скорости перемещения во время побегов (тест Манна–Уитни, $p = 0.088$).

У крыс, изолированных от матери и сиблингов с 9-го по 15-й день жизни, по сравнению с контрольной группой во время нахождения в закрытых рукавах выявлено большее число дефекаций и груминга (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$). В открытые рукава выходило столько же крыс, перенесших изоляцию с 9-го дня (67%), что и в контрольной группе.

У крыс, которых изолировали от матери и сиблингов с 16-го по 22-й день жизни, поведение в закрытых рукавах статистически значимо отличалось только от поведения животных, изолированных с 9-го дня, меньшей длиной пройденного пути (ANOVA $F(3,66) = 3.685$, $p = 0.016$; *post-hoc* анализ, тест Newman–Keuls, $p = 0.010$).

В открытые рукава лабиринта выходило 67% крыс, изолированных с 16-го дня жизни. У этих крыс наблюдались наибольшие статистически значимые отличия показателей исследовательской активности в открытых рукавах по сравнению с контрольными животными: увеличение длины пути, времени пребывания (тест Манна–Уитни, $p < 0.01$), максимальной скорости передвижения (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$).

Таким образом, установлено влияние ранней полной социальной изоляции на эмоци-

Таблица 2. Показатели поведения в “открытом поле” крыс контрольной и экспериментальных групп, за первые и последующие 5 мин тестирования (среднее \pm С.К.О.)**Table 2.** The signs of the open field behavior in control and experimental rat groups in the first and next 5 minutes (mean \pm Std.Dev.)

Показатели поведения	Контрольная группа <i>n</i> = 19		Изолированные со 2-го дня жизни <i>n</i> = 17		Изолированные с 9-го дня жизни <i>n</i> = 16		Изолированные с 16-го дня жизни <i>n</i> = 17	
	1–5 мин	6–10 мин	1–5 мин	6–10 мин	1–5 мин	6–10 мин	1–5 мин	6–10 мин
Длина пути, см	1726.9 \pm 603.5	1271.2 \pm 583.35&&	2114.9 \pm 669.1	1414.1 \pm 598.5&&&	1910.9 \pm 476.3	1205.5 \pm 461.0&&&	2354.5 \pm 358.8 **	1667.4 \pm 372.5*&&&
Время “бега”	18.9 \pm 13.0	13.8 \pm 8.6	29.15 \pm 16.1	15.6 \pm 11.6&&	13.9 \pm 12.2	8.0 \pm 8.9 &&	29.5 \pm 11.3 *	18.5 \pm 7.9 &&&
Время “сидения”	134.65 \pm 38.4	173.7 \pm 55.1&	118.65 \pm 37.4	164.8 \pm 43.9&&&	125.2 \pm 32.2	178.7 \pm 39.8&&&	96.4 \pm 16.65***	137.5 \pm 23.1*&&&
<i>V</i> max, см/с	40.3 \pm 7.9	37.7 \pm 11.7	44.6 \pm 6.4 *	42.1 \pm 6.6	41.6 \pm 5.05	39.8 \pm 6.4&	44.9 \pm 5.2*	44.7 \pm 4.9*
Число стоек	4.6 \pm 3.6	5.6 \pm 2.85	5.65 \pm 4.5	6.3 \pm 4.3	5.4 \pm 2.2	4.7 \pm 4.3	7.8 \pm 3.5 **	7.2 \pm 2.5
Число актов груминга	1.2 \pm 1.1	1.3 \pm 1.1	2.35 \pm 2.3	2.8 \pm 2.3	3.1 \pm 1.4***	2.5 \pm 1.5*	2.2 \pm 1.2 **	2.8 \pm 2.6*
Доля крыс, вышедших в ЦЗ, %	73%	58%	88%	71%	94%	44%	94%	94%
Длина пути в ЦЗ, см	57.0 \pm 46.7	47.2 \pm 33.0	79.5 \pm 68.4	94.9 \pm 94.5	101.7 \pm 81.0	102.6 \pm 88.3	205.0 \pm 101.1***	100.1 \pm 57.1 *

Примечание. * – статистически значимые отличия от контрольной группы в данный период тестирования (тест Манна–Уитни, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$). & – статистически значимые различия между поведением в первые и последующие 5 мин тестирования (парный тест Вилкоксона, & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$). ЦЗ – центральная зона “открытого поля”.

Note. * – the values differ significantly from those of control group in this test period (Mann–Whitney test, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$). & – statistically significant differences between behavior in the first and next 5 minutes (paired Wilcoxon test, & – $p < 0.05$, && – $p < 0.01$, &&& – $p < 0.001$). CZ – the central zone of the “open field”.

ональную реактивность и исследовательское поведение в ПКЛ во взрослом возрасте. Эффект изоляции зависит от периода раннего онтогенеза, во время которого эта процедура осуществляется.

Изоляция в первую неделю жизни увеличивает во взрослом возрасте общее время пребывания в потенциально опасном пространстве открытых рукавов лабиринта, длину пройденного пути и скорость передвижения по сравнению с контрольными животными.

Изоляция во вторую неделю жизни приводит только к увеличению эмоциональной реактивности, что проявляется в повышенном количестве актов груминга и дефекации по сравнению с контрольной группой.

Изоляция в третью неделю жизни оказывает наиболее выраженное влияние на поведение в приподнятом крестообразном лабиринте и особенно в открытых рукавах. При этом не наблюдается изменений показателей эмоциональной реактивности.

Поведение в “открытом поле”

Поведение в ОП анализировали отдельно для первых и последующих пяти минут тестирования, принимая в качестве рабочей гипотезы, что в течение первых 5 мин двигательная активность отражает комплексное ориентировочное поведение, имеющее как активно-оборонительную, так и исследовательскую компоненты, а во вторые 5 мин теста – в большей степени исследовательскую активность (Маркель и др., 1988). У контрольных животных при сравнении поведения в первом и втором 5-минутных периодах тестирования обнаружены статистически значимое снижение длины пути и увеличение продолжительности “сидения” во втором периоде (парный тест Вилкоксона, $p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно) (табл. 2). Поведение в центральной зоне от первого периода ко второму не изменилось.

Во всех экспериментальных группах наблюдались сходные изменения во втором периоде тестирования: статистически значимое снижение длины пути (парный тест Вилкок-

сона, $p < 0.001$), времени “бега” ($p < 0.01$) и увеличение продолжительности “сидения” ($p < 0.001$).

Поведение крыс, изолированных со 2-го по 8-й день жизни от матери и сиблингов, во взрослом возрасте не отличается от поведения контрольных животных ни по одному показателю (за исключением статистически значимо большей V_{\max} в первые 5 мин тестирования, тест Манна–Уитни, $p < 0.05$).

В группе животных, подвергнутых изоляции с 9-го дня, обнаружено только одно отличие от контроля – у экспериментальных крыс во взрослом возрасте выявлено значимо большее число актов груминга, что было характерно как для первых, так и для вторых пятиминутных периодов тестирования (тест Манна–Уитни, $p < 0.001$ и $p < 0.05$).

По сравнению с контрольной группой наибольшие отличия выявлены для крыс, изолированных с 16-го дня жизни: статистически значимо большие значения длины пройденного пути, скорости перемещения, числа актов груминга, сниженная продолжительность “сидения” в каждый из периодов теста, а также большие величины времени “бега” и числа стоек в первые 5 мин тестирования (тест Манна–Уитни, см. табл. 2).

По поведению в центральной зоне отличия от контрольной группы получены для животных, изолированных с 9-го и 16-го дней жизни. У первых статистически значимо уменьшалась доля крыс, выходящих в центральную зону во вторые 5 мин теста, по сравнению с предшествующим периодом (тест сравнения двух долей, $p = 0.002$), что характеризует снижение исследовательской активности у этой группы животных. У крыс, подвергавшихся изоляции с 16-го дня жизни, доля животных, выходящих в центральную зону во втором периоде теста, была статистически значимо больше по сравнению с крысами контрольной группы и изолированными с 9-го дня жизни (тест сравнения двух долей, $p = 0.015$ и $p = 0.002$), что свидетельствует о повышенной исследовательской активности.

Таким образом, изоляция со 2-го и 9-го дня оказывала незначительное влияние на поведение в “открытом поле” у взрослых крыс, в то время как изоляция с 16-го дня жизни вызывала выраженное увеличение двигательной и исследовательской активности в этом тесте.

Обучение условному рефлексу двустороннего избегания

В группе контрольных животных общее количество избеганий при предъявлении условного раздражения составило $37.05 \pm 21.0\%$ от всех 50 предъявлений условного раздражителя во время обучения. УРДИ (по критерию 9 условных реакций в ответ на 10 последовательных предъявлений условного стимула) в этой группе удалось выработать у 48% крыс. Анализ динамики обучения выявил последовательное увеличение числа условных реакций от первой серии до третьей, после чего число избеганий не увеличивается (рис. 1). Таким образом, стабилизация проявления реакций избегания в этой группе возникала в течение первых тридцати предъявлений условного стимула.

У крыс, изолированных со 2-го по 8-й день жизни, общее количество реакций избегания ($52.13 \pm 13.18\%$ от 50 предъявлений условного раздражителя) было статистически значимо больше, чем у животных контрольной группы (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$). Условный рефлекс был выработан у 60% крыс, что статистически значимо не отличалось от доли обучившихся крыс в группе контрольных животных. Динамика обучения характеризовалась последовательным увеличением числа избеганий от 1-й до 4-й серии (рис. 1), что свидетельствует об увеличении времени, необходимого для выработки стабильного навыка в этой группе по сравнению с контрольной.

В группе, подвергшейся изоляции с 9-го по 15-й день жизни, общее количество реакций избегания ($52.58 \pm 18.33\%$ от 50 предъявлений условного раздражителя) было статистически значимо большим, чем у контрольной группы (тест Манна–Уитни, $p < 0.05$). УРДИ был выработан у 83% крыс (отличие от контрольной группы статистически значимо, тест сравнения двух долей, $p = 0.046$). У животных, изолированных с 9-го дня жизни, динамика увеличения числа реакций избегания была такой же, как и у крыс контрольной группы – они достигали максимума в третьей серии.

У животных, изолированных от матери и сиблингов с 16-го по 22-й день жизни, общее количество реакций избегания ($42.75 \pm 16.87\%$ от 50 предъявлений условного раздражителя) не отличалось статистически значимо от контрольной группы. Условный рефлекс удалось выработать у 56% крыс, что также статисти-

чески значимо не отличалось от доли обучившихся крыс в группе контрольных животных. Число реакций избегания у животных, подвергнутых изоляции с 16-го дня жизни, постепенно возрастало в течение всего периода обучения — от первой к пятой серии (рис. 1), что характеризует увеличение времени, необходимого для выработки стабильной реакции избегания, по сравнению с остальными группами.

Статистически значимых различий долей обучившихся УРДИ животных между группами, подвергавшимися изоляции, не было обнаружено.

Время появления первой реакции избегания (по критерию порядкового номера условного раздражителя, при котором животное демонстрировало первую условную реакцию) у животных контрольной группы и крыс, подвергнутых социальной изоляции, не различалось.

Таким образом, у крыс, социально изолированных с 9-го по 15-й дни постнатального онтогенеза, наблюдается повышение способности к обучению УРДИ. У других групп животных, подвергавшихся изоляции в более ранние или поздние сроки, доля обучившихся животных не изменялась по сравнению с контрольной группой, но наблюдалось увеличение времени, необходимого для достижения уровня стабильного проявления условного рефлекса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было установлено, что сенсорные факторы раннего онтогенеза способны изменить темпы развития генетически предопределенной абсанс эпилепсии у крыс линии WAG/Rij (Sitnikova, 2011; Sitnikova et al., 2015, 2016; Саркисова и др., 2017).

Известно, что первый месяц жизни крыс можно разделить на несколько критических периодов, в течение которых видоспецифическая афферентация по-разному сказывается как на формировании ранних поведенческих реакций, так и на адаптивном поведении в зрелом возрасте.

В течение первых 8–9 дней у крысят происходит формирование специфической организации соматосенсорной коры, что обеспечивает адекватное восприятие сигналов от вибрисс — сенсорного входа, играющего большую роль в организации поведения нор-

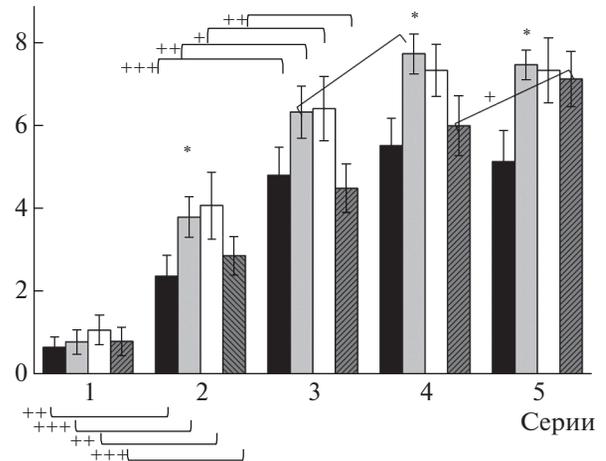


Рис. 1. Динамика обучения УРДИ. По горизонтали — серии обучения, по вертикали — суммарное число условных реакций во время этих серий. Обозначения: черные столбики соответствуют контрольной группе, серые — группе крыс, изолированных со 2-го дня жизни, белые — группе крыс, изолированных с 9-го дня жизни, заштрихованные — группе крыс, изолированных с 16-го дня жизни. Вертикальные линии для каждой фигуры отражают ошибку средней. Статистически значимые различия между двумя последовательными периодами (парный критерий Вилкоксона): + — $p < 0.05$; ++ — $p < 0.01$; +++ — $p < 0.001$. * — статистически значимые различия между группами контрольной и изолированной со 2-го дня жизни ($p < 0.05$, тест Манна–Уитни).

Fig. 1. Dynamics of active avoidance learning. Horizontal — series of trials, vertical — the total number of conditioned responses during these series. Legend: black bars correspond to the control group, gray bars — to the group of rats isolated from the 2nd day of life, white bars — to the group of rats isolated from the 9th day of life, shaded bars — to the group of rats isolated from the 16th day of life. The vertical lines for each bar represent the error of the mean. Statistically significant differences between two consecutive periods (paired Wilcoxon test): + — $p < 0.05$; ++ — $p < 0.01$; +++ — $p < 0.001$. * — statistically significant differences between the control and isolated groups from the 2nd day of life ($p < 0.05$, Mann–Whitney test).

ных животных (Guido et al., 1998). Выстригание вибрисс с 2-дневного возраста приводит к реорганизации корреляционных связей между сроками созревания ранних поведенческих реакций, выражающейся в исчезновении некоторых корреляционных связей и появлении новых связей между временем созревания и формирования ранних поведенческих реакций (Шишелова, Раевский, 2009). Такую реорганизацию можно рассматривать как компенсаторную перестройку в сенсорных

системах, что свидетельствует о значительных пластических возможностях адаптации к сенсорной депривации в первую неделю жизни. Благоприятным обстоятельством для противодействия негативным внешним факторам в этот период жизни также можно считать наиболее низкий уровень функционирования гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы по критерию количества основного белка рецепторов к глюкокортикоидам в гиппокампе (Galeeva et al., 2010) и низкой реактивности в виде невысокой секреции кортикостерона в ответ на стрессовое воздействие (Levine, 2002).

Наши исследования показали, что выстригание вибрисс с 9-го дня постнатального онтогенеза (после структурного формирования соматосенсорной системы) приводит к исчезновению большинства корреляционных связей между сроками формирования ранних поведенческих реакций и прозреванием, что может препятствовать эффективной консолидации разрозненно созревающих реакций в целостные функциональные системы (Шишелова, Раевский, 2009). Вероятно, что последствия сенсорной депривации в данный период могут усиливаться в связи с повышением в это время у крысят чувствительности к стрессовому воздействию за счет увеличения количества белка рецепторов к глюкокортикоидам в гиппокампе, которое к 13-му дню жизни достигает максимума (Galeeva et al., 2010).

В совокупности эти факты позволили нам на первом этапе выделить два критических периода раннего онтогенеза (первые 8 дней и последующий период), в течение которых дефицит сенсорной информации по-разному влияет на формирование поведения в зрелом возрасте (Шишелова, Раевский, 2009). Однако вследствие особенностей развития поведения крысят в течение второй и третьей недели жизни возникла необходимость разделить второй критический период на два, выделив, таким образом, третий период, который начинается после прозревания (происходящего в возрасте 15–17 дней). Для него характерны основные признаки перехода к новому этапу развития: включение в репертуар взаимодействия с окружающей средой нового сенсорного входа, обусловленное прозреванием (Wills et al., 2014), становление способности к пространственному обучению с вовлечением гиппокампа (Wills et al., 2014), смена ведущей афферентации, обеспечивающей взаимодей-

ствие новорожденного с матерью и сиблингами, — у крысят постепенно прекращается ультразвуковая оборонительная вокализация при разлучении с матерью (Gulia, 2014). К 15-му дню жизни заканчивается период сниженной чувствительности гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы к стрессовым факторам (stress hypo-responsive period), и далее, к 25–30-му дню жизни, происходит постепенное возрастание уровня кортикостерона в крови — как базального, так и вызванного стрессовыми факторами (Galeeva et al., 2010; Holmes et al., 2005; Romeo, 2016; Wills et al., 2014). В этот период происходит полное созревание базовых поведенческих реакций: стоек, груминга, манипуляторной активности (Шишелова, Раевский, 2009). Таким образом, по степени зрелости сенсорных систем и эмоциональной реактивности после третьей недели жизни крысята в целом становятся подготовленными к покиданию гнезда.

Настоящее исследование показало, что специфика влияния полной социальной изоляции крысят линии WAG/Rij на поведение и способность к обучению в зрелом возрасте зависит от того, в какой критический период раннего онтогенеза эта изоляция осуществлялась.

Последствия изоляции крысят в возрастной период со 2-го по 8-й день жизни проявлялись в повышении двигательной активности по критериям увеличения длины пройденного пути и скорости перемещения, преимущественно в открытых рукавах ПКЛ, что указывает на сниженную тревожность.

У крыс, изолированных с 9-го по 15-й день жизни, по сравнению с контрольными животными изменений в двигательной активности практически не происходит, но при тестировании как в ПКЛ, так и в ОП у них выявлено повышение эмоциональной реактивности по критерию увеличения числа эпизодов груминга и дефекации (Estanislau et al., 2019; Fernández-Teruel et al., 2016).

Как было отмечено, этот период характеризуется высокой активностью гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы. Возможно, именно это обстоятельство является причиной наиболее существенного влияния полной изоляции в этот период на проявление эмоциональной реактивности в зрелом возрасте.

Наибольшие изменения двигательной активности в ПКЛ и в тесте ОП обнаружены у

животных, изолированных с 16-го по 22-й день жизни. Причина этого не очевидна. В качестве гипотезы можно предположить, что в основе данного феномена лежит ограничение визуального опыта в период наиболее интенсивного развития зрительной сенсорной системы. В этот период также происходит развитие функциональных связей гиппокампа — структуры, которая считается одним из центров, контролирующих поведение в конфликтной ситуации и усиливающих исследовательское поведение для получения большего количества информации с целью разрешения конфликта (например, при реакции на новую обстановку) (Sturman et al., 2018). По данным литературы, выявлены связи между плотностью нервных волокон в гиппокампе и количеством стоек без опоры в “открытом поле”, отражающих исследование окружающего пространства с помощью зрительной системы. Таким образом, ограничение зрительной афферентации после прозревания (Sturman et al., 2018) могло привести к формированию повышенной потребности в ее получении для разрешения конфликта при освоении новой обстановки.

Исследование влияния социальной изоляции в раннем онтогенезе на способность к обучению оборонительному поведению выявило, на первый взгляд, парадоксальный факт: общее число реакций избегания в процессе обучения УРДИ статистически значимо больше у крыс, подвергавшихся изоляции со 2-го по 8-й день, и у крыс, изолированных с 9-го по 15-й день, а число крыс, обучившихся условному рефлексу, больше только в последней группе. Основой для лучшего обучения животных, изолированных в течение второй недели жизни, может служить тот факт, что у них наблюдается повышенная эмоциональная реактивность по критерию числа эпизодов груминга и дефекаций при первом помещении в новую потенциально опасную обстановку, а также повышение чувствительности гипоталамо-гипофизарно-кортикоидной системы (Galeeva et al., 2010). Можно предполагать, что наблюдаемая наибольшая эмоциональная реактивность обуславливает более выраженную оборонительную мотивацию, что, в свою очередь, приводит к лучшему обучению животных. Большое число реакций избегания у крыс, изолированных в течение первой недели жизни, следует отнести за счет повышенной двигательной активности, в результате чего животные часто пе-

ремещаются из одного отсека в другой, что может совпадать с включением условного стимула и создавать впечатление “правильной” реакции. Однако отсутствие повышения доли животных, достигших критерия обученности, не позволяет в этом случае говорить об улучшении консолидации адаптивного навыка.

Неожиданным и требующим дальнейшего анализа является тот факт, что полная изоляция крысят в возрасте с 16-го по 22-й день жизни вызывает самые существенные изменения поведения в ПКЛ и тесте “открытое поле” и в то же время не влияет на способность к обучению УРДИ в зрелом возрасте.

ВЫВОДЫ

1. Полная ежедневная социальная изоляция крыс WAG/Rij со 2-го по 8-й и с 16-го по 22-й дни жизни обуславливает увеличение двигательной и исследовательской активности в зрелом возрасте, причем изоляция с 16-го по 22-й день жизни оказывает наибольший эффект.

2. Изоляция с 9-го по 15-й день жизни приводит к повышению эмоциональной реактивности взрослых крыс в новой обстановке.

3. Крысы, подвергавшиеся изоляции с 9-го по 15-й день жизни, демонстрируют большую способность к обучению условному рефлексу двустороннего избегания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-013-00597 “Социальные факторы, аггравирующие проявление абсанс эпилепсии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маркель А.Л., Галактионов Ю.К., Ефимов В.М. Факторный анализ поведения крыс в тесте открытого поля. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 1988. 38 (5): 855–863.
- Саркисова К.Ю., Габова А.В., Куликов М.А., Федосова Е.А., Шацкова А.Б., Морозов А.А. Воспитание приемной матерью Wistar с высоким уровнем проявления материнской заботы препятствует развитию наследственной абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии у крыс линии WAG/Rij. ДАН. 2017. Т. 473. № 2. 246–249.
- Смирнов К.С., Ситникова Е.Ю. Формирование эпилептического фенотипа у крыс WAG/Rij связано со сниженной тревожностью. “Эпилепсия: от фундаментальной науки к практике”. Материалы I онлайн-конференции и школы с международным участием. М., 2020.

- Шишелова А.Ю., Алиев Р.Р., Раевский В.В.* Ранний сенсорный опыт определяет разнообразие исследовательского поведения в зрелом возрасте. Экспериментальная психология. 2015. 8 (1): 73–84.
- Шишелова А.Ю., Алиев Р.Р., Раевский В.В.* Влияние раннего сенсорного опыта на исследовательскую активность взрослых животных. Доклады Академии наук. 2016. 468 (1): 1–3.
- Шишелова А.Ю., Раевский В.В.* Влияние вибрисс-эктомии в раннем постнатальном онтогенезе у крысят на развитие поведения. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2009. 59 (3): 326–334.
- Curley J.P., Jensen C.L., Mashoodh R., Champagne F.A.* Social influences on neurobiology and behavior: epigenetic effects during development. *Psychoneuroendocrinology*. 2011. 36 (3): 352–371. <https://doi.org/10.1016/j.psycheneu.2010.06.005>
- Cohen J.L., Glover M.E., Pugh P.C., Fant A.D., Simmons R.K., Akil H., Kerman I.A., Clinton S.M.* Maternal Style Selectively Shapes Amygdalar Development and Social Behavior in Rats Genetically Prone to High Anxiety. *Dev. Neurosci*. 2015. 37 (3): 203–214. <https://doi.org/10.1159/000374108>
- Estanislau C., Veloso A.W.N., Filgueiras G.B., Maio T.P., Dal-Cól M.L.C., Cunha D.C., Klein R., Carmona L.F., Fernández-Teruel A.* Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. *Physiol Behav*. 2019. 209:112585. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112585>
- Fernández-Teruel A., Estanislau C.* Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. 2016 *Nature Rev. Neurosci*. V. 17 (9), 591–591. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.102>
- Galeeva A., Pelto-Huikko M., Pivina S., Ordyan N.* Postnatal ontogeny of the glucocorticoid receptor in the hippocampus. *Vitam Horm*. 2010. 82:367–389. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)82019-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82019-9)
- Guido W., Gunhan-Agar E., Erzurumlu R.S.* Developmental changes in the electrophysiological properties of brain stem trigeminal neurons during pattern (barelette) formation. *J. Neurophysiol*. 1998. 79: 1295–1306.
- Gulia K.K., Patel N., Radhakrishnan A., Kumar V.M.* Reduction in Ultrasonic Vocalizations in Pups Born to Rapid Eye Movement Sleep Restricted Mothers in Rat Model. *PLoS One*. 2014. 9 (1): e84948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084948>
- Holmes A., le Guisquet A.M., Vogel E., Millstein R.A., Leman S., Belzung C.* Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005. 29 (8):1335–1346. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.012>
- Levine S.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox. Res*. 2002. 4 (5–6): 557–564. <https://doi.org/10.1080/10298420290030569>
- Litvin Y., Tovote P., Pentkowski N.S., Zeyda T., King L.B., Vasconcellos A.J., Dunlap C., Spiess J., Blanchard D.C., Blanchard R.J.* Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Horm Behav*. 2010. 58 (2): 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.03.010>
- Marmendal M., Eriksson C.J., Fahlke C.* Early deprivation increases exploration and locomotion in adult male Wistar offspring. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006. 85 (3):535–44. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.10.005>
- Rana S., Pugh Ph.C., Jackson N., Clinton S.M., Kerman I.A.* Inborn Stress Reactivity Shapes Adult Behavioral Consequences of Early-Life Maternal Separation Stress. *Neurosci Lett*. 2015. 584: 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.011>
- Romeo R.D., Patel R., Pham L., So V.M.* Adolescence and the Ontogeny of the Hormonal Stress Response in Male and Female Rats and Mice *Neurosci Biobehav Rev*. 2016. 70: 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.05.020>
- Sarkisova K.Yu., Midzyanovskaya I.S., Kulikov M.A.* Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Behav. Brain Res*. 2003. 144 (2–3): 211–226.
- Sarkisova K., van Luijtelaaar G.* The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011. 35 (4):854–76. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
- Sitnikova E.* Neonatal sensory deprivation promotes development of absence seizures in adult rats with genetic predisposition to epilepsy. *Brain Research*. 2011. 1377:109–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.067>
- Sitnikova E., Rutskova E.M., Raevsky V.V.* Reduction of epileptic spike-wave activity in WAG/Rij rats fostered by Wistar dams. *Brain Res*. 2015; 1594: 305–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.067>
- Sitnikova E., Rutskova E.M., Raevsky V.V.* Maternal care affects EEG properties of spike-wave seizures (including pre- and post ictal periods) in adult WAG/Rij rats with genetic predisposition to absence epilepsy. *Brain Res Bull*. 2016; 127: 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.019>
- Sturman O., Germain P.-L., Bohacek J.* Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. 2018. 21

- (5):443–452.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
- Vetulani J.* Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological Reports*. 2013. 65: 1451–1461.
- Wills T.J., Muessig L., Cacucci F.* The development of spatial behaviour and the hippocampal neural representation of space. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014. 369 (1635): 20130409.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0409>
- Zhang Y., Zhu X., Bai M., Zhang L., Xue L., Yi J.* Maternal deprivation enhances behavioral vulnerability to stress associated with miR-504 expression in nucleus accumbens of rats. *PLoS One*. 2013. 8 (7): e69934.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069934>

THE INFLUENCE OF EARLY SOCIAL ISOLATION ON MOTOR ACTIVITY AND LEARNING ABILITY IN THE MATURE AGE OF WAG/RIJ RATS

A. Yu. Shishelova^{a,b} and V. V. Raevsky^{a,#}

^a *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia*

^b *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: vraevsky@mail.ru*

In WAG/Rij rats, genetically predisposed to absence epilepsy and characterized by a depressive status, we studied the effect of a complete daily 3 h social isolation in different critical periods of early postnatal ontogenesis (2–8, 9–15, 16–22 postnatal days) on behavior in adulthood. It was found that the isolation from the 2nd to the 8th and from the 16th to the 22nd postnatal days produces an increase in the locomotor activity in the open arms of the elevated plus-maze and in the open field test. In animals isolated from the 9th to the 15th postnatal day, there was no change in the locomotion compared to the control group, but an increase in an emotional reactivity was revealed. The rats isolated from the 9th postnatal day showed the best acquisition of two-way active avoidance behavior in the shuttle box compared to the other groups.

Keywords: social isolation, ontogeny, locomotion, learning

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.453+57.02

**ХРОНИЧЕСКИЙ СТРЕСС, ВЫЗВАННЫЙ СОДЕРЖАНИЕМ В УСЛОВИЯХ
ДЕФИЦИТА ГНЕЗДОВОГО МАТЕРИАЛА В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ
ПЕРИОДЕ, ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЕ НА ПОВЕДЕНИЕ
И СТРЕСС-РЕАКТИВНОСТЬ САМЦОВ КРЫС**

© 2021 г. М. Ю. Степаничев^{1,*}, О. А. Недогреева¹, М. А. Климанова¹, Ю. В. Моисеева¹,
М. В. Онуфриев¹, Н. А. Лазарева¹, Н. В. Гуляева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: m_stepanichev@ihna.ru

Поступила в редакцию 16.11.2020 г.

После доработки 26.01.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Модели депривации родительской заботы на грызунах все чаще применяются для моделирования депрессивно-подобных расстройств, вызванных ранним стрессом. В данной работе использована модель последствий содержания матери и приплода в условиях дефицита гнездового материала (ДГМ) в течение длительного периода раннего постнатального онтогенеза у крыс. Задачей работы было исследовать, меняется ли с возрастом поведение самцов крыс, перенесших стресс, обусловленный содержанием в условиях ДГМ в раннем постнатальном периоде, и связаны ли эти изменения с нарушением стресс-реактивности животных. Содержание крысят в условиях ДГМ со второго по девятый постнатальный день не приводило к существенным изменениям показателей поведения, характеризующих тревожность и депрессивность, которые регистрировали в стандартных тестах (открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, предпочтение раствора сахарозы), ни в подростковом возрасте, ни у взрослых животных. При этом ДГМ в раннем постнатальном периоде вызывал усиление социального предпочтения (выраженности социально-ориентированного поведения, которое проявлялось в желании больше времени проводить в присутствии незнакомого особи в новой обстановке) у 1-месячных, но не взрослых животных. Содержание в условиях ДГМ улучшало пространственное обучение, но не влияло на долговременную память у взрослых крыс при оценке способности взрослых животных к обучению решению пространственной задачи в лабиринте Барнс. Изменения стресс-реактивности животных (по динамике выброса в кровь кортикостерона) были наиболее выражены у взрослых крыс. Таким образом, ДГМ в раннем постнатальном периоде не вызывал развития тревожного и депрессивно-подобного поведения у самцов крыс в возрасте 1 и 6 мес, оказывал переходящее влияние на социальное предпочтение у молодых животных, но изменял стресс-реактивность при кратковременном действии умеренного стрессорного фактора (иммобилизации).

Ключевые слова: стресс, ранний постнатальный период, дефицит гнездового материала, кортикостерон, стресс-реактивность, тревожность, депрессия

DOI: 10.31857/S0044467721030096

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВП	– вынужденное плавание;
ГГНО	– гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось;
ДГМ	– дефицит гнездового материала;
КС	– кортикостерон;
ЛП	– латентный период;

НУ	– нормальные условия;
ОП	– открытое поле;
ПКЛ	– приподнятый крестообразный лабиринт;
Р	– постнатальный день

ВВЕДЕНИЕ

Взрывной рост психических расстройств в структуре заболеваемости большинства стран обуславливает центральную роль борьбы с этими патологиями в современной медицине, как клинической, так и фундаментальной (Vigo et al., 2016; Rehm, Shield, 2019). Нарушения эмоциональной сферы, депрессия, тревожные расстройства часто коморбидны хроническим неврологическим и соматическим заболеваниям, однако, в отличие от других заболеваний, прогресс терапии психических заболеваний происходит чрезвычайно медленно. Это связано в том числе с недостаточной клинической релевантностью используемых в фундаментальных и прикладных исследованиях моделей психических расстройств на животных (Григорьян, Гуляева, 2015; Robinson, 2018). Разработка и исследование таких моделей, несомненно, относятся к приоритетам современной нейробиологии и фундаментальной медицины.

Принято считать, что действие экстремальных факторов (стрессоров) разной природы в перинатальный/неонатальный период приводит к долговременным изменениям нейрогуморальной регуляции, которые могут формироваться в последующие периоды жизни, способствовать развитию различных психопатологий у подростков и взрослых (Малиновская и др., 2016; Kentner, Pittman, 2010; Stepanichev et al., 2014; Kraaijevanger et al., 2020). В связи с этим в последние годы особое внимание уделяется роли перинатальных воздействий, вызывающих нарушения адаптивных возможностей, в созревании центральной нервной системы у животных. Так, популярные модели предполагают применение провоспалительных стимулов у грызунов в раннем постнатальном онтогенезе, что способствует длительному сдвигу регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО), сопровождающемуся изменением стресс-чувствительности особей (Onufriev et al., 2017; Tishkina et al., 2016), существенной модификацией процессов нейропластичности (Кудряшова и др., 2018, 2019; Tishkina et al.,

2016; Kudryashova et al., 2019) и увеличением вероятности возникновения поведенческих нарушений в подростковом и взрослом периодах онтогенеза (Брошевицкая и др., 2020; Bilbo et al., 2005; 2006; Tishkina et al., 2016). Основной проблемой такого рода моделей является их невысокая трансляционная значимость, поскольку у человека ранние инфекционные заболевания, обладающие высоким провоспалительным потенциалом, не всегда приводят к существенным нарушениям психоэмоциональной сферы (Du Preez et al., 2016).

Одним из популярных в настоящее время направлений моделирования психопатологий является использование “натуралистичных” моделей создания у животных поведенческих нарушений, аналогичных таковым при психических расстройствах у человека. Среди таких моделей первенство, безусловно, принадлежит моделям депривации родительской заботы, а именно: “материнской” и “отцовской” депривации/сепарации (Малиновская и др., 2016; Feldman et al., 2019). Наряду с этим широко применяемым подходом, несколько групп исследователей разработали модель и активно исследуют последствия содержания матери и приплода в условиях дефицита гнездового материала (ДГМ) в течение длительного периода раннего постнатального онтогенеза (Avishai-Eliner et al., 2001; Walker et al., 2017). Предполагается, что в этих условиях мать не имеет возможности осуществлять заботу о потомстве в достаточной степени. В основе модели лежит содержание самки с приплодом на приподнятой металлической сетке в домашней клетке при наличии небольшого куса бумаги в качестве материала для строительства гнезда. Период содержания приходится обычно на 2–9-й постнатальные дни (Р), после чего самку возвращают в нормальные условия с достаточным количеством опилок в качестве подстилки. Важным условием является то, что самки должны быть первородящими, т.е. не иметь предыдущего опыта выращивания потомства, поскольку это повышает выраженность

игнорирования детенышей. Подобное воздействие оказывает влияние на работу ГНО, что сопровождается повышением уровня кортикостерона (КС) в крови крысят на P10 (Molet et al., 2014; Rainekei et al., 2010), которое сохраняется на более высоком уровне до P21, по крайней мере у самок (Moussaoui et al., 2017); однако такой ответ удается зафиксировать не всегда (McLaughlin et al., 2016). Было отмечено, что гипертрофия надпочечников проявлялась у аутбредных крысят Вистар и Лонг-Эванс уже к концу стрессорного периода (P9), но исчезала у взрослых (Brunson et al., 2005; Gilles et al., 1996).

Стрессорное воздействие на крысят в модели ДГМ приводит к развитию более высокой ситуативной тревожности у взрослых крыс (Guadagno et al., 2018; Dalle Molle et al., 2012). В работах на мышах результаты были противоречивы (Naninck et al., 2015; Wang et al., 2013). Взрослые крысы, в детстве содержащиеся в условиях ДГМ в течение P2–P9, демонстрировали признаки ангедонии в тесте предпочтения сахарозы (Molet et al., 2016) при “нормальном” поведении в тесте вынужденного плавания и неизменном уровне тревожности. При этом содержание крыс в условиях ДГМ в течение P8–P12 приводило к увеличению времени иммобильности в тесте Порсолта (Rainekei et al., 2012). В последнем случае также наблюдали снижение социальных взаимодействий со сверстниками как во время игр у подростков (Moriceau et al., 2009; Rainekei et al., 2012), так и у взрослых особей (Rainekei et al., 2012; Rainekei et al., 2015; Rincón-Cortés, Sullivan, 2016). Снижение игрового поведения может быть признаком развития ангедонии. Животные, подвергнутые стрессу в моделях ДГМ, демонстрируют снижение способности обучаться в водном лабиринте (Naninck et al., 2015), выполнять тесты на распознавание объекта (Brunson et al., 2005; Bath et al., 2016; Molet et al., 2016; Naninck et al., 2015). В то же время выработка условно-рефлекторной реакции замирания, наоборот, улучшается (Arg et al., 2016; Krugers et al., 2016).

В настоящей работе мы проследили, меняется ли с возрастом поведение самцов крыс, перенесших стресс, обусловленный содержанием в условиях ДГМ в раннем постнатальном периоде, и связаны ли предполагаемые нарушения с изменением стресс-реактивности животных.

МЕТОДИКА

Экспериментальные животные и моделирование ДГМ

Все эксперименты с животными выполняли в соответствии с принципами Базельской декларации, Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22.09.2010 и приказа Минздрава РФ № 199н от 1.04.2016. Протоколы эксперимента были одобрены Этической комиссией ИВНД и НФ РАН. Схема экспериментов представлена на рис. 1 (а).

Производителей (10 самцов и 20 самок крыс Вистар) приобретали в Филиале “Столбовая” Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” (Московская обл., РФ) и размещали в конвенциональном виварии ИВНД и НФ РАН за 14 дней до начала эксперимента. Для эксперимента использовали нерожавших самок возрастом 3 мес. Самцов содержали индивидуально в течение 7 дней до скрещивания, после чего к каждому подсаживали по две самки. После скрещивания беременных самок размещали индивидуально в клетках вивария. Животных содержали в условиях постоянного доступа к неограниченному количеству пищи и воды и 12 ч светового цикла (свет 8.00–20.00) при температуре 20–22°C. Появление потомства проверяли ежедневно в дневное время суток. День появления потомства считали нулевым (P0). В возрасте двух дней (P2) определяли пол детенышей, после чего их число в помете снижали до 9 таким образом, чтобы в помете оставалось не менее 5 самцов.

Разделение пометов на две экспериментальные группы проводили в P2. Подопытную группу содержали в условиях ДГМ (Gilles et al., 1996). Самок с пометами помещали в специальные камеры, имевшие расположенный на высоте 2.5 см решетчатый пластиковый вкладыш, под которым находилось до 1 см опилок. Самок вместе с пометами, которые были определены в контрольную группу, помещали в камеры, наполненные опилками до высоты 5 см. В каждую камеру дополнительно помещали 200 мл “древесной шерсти” в качестве гнездового материала (рис. 1 (б), (в)). Вода и корм были доступны без ограничений. Камеры располагались в хорошо вентилируемом помещении, изолированном от основного помещения вивария. Освещение камер было синхронизировано с освещением ос-

ональным поведением, и более эффективно выявить имеющиеся особенности “эмоционально окрашенных” форм поведения (de Kloet, Molendijk, 2016; Commons et al., 2017; Molendijk, de Kloet, 2019; Stepanichev et al., 2016). Поэтому в качестве первого метода оценки поведения использовали тест ВП, который иногда применяется даже в качестве отдельного стрессора (Molendijk, de Kloet, 2019). Далее последовательность тестов была следующей: тест “открытое поле” (ОП), тест “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), тест “социальное предпочтение”, обучение в лабиринте Барнс у 6-месячных крыс, тест на ангедонию (тест предпочтения сахарозы). Подробное описание протоколов проведения тестов ВП, ОП, ПКЛ, предпочтения сахарозы приведены в предыдущих публикациях (Манолова и др., 2018; Tishkina et al., 2016). Коротко, тест ВП проводили по 2-дневному протоколу. В 1-й день крыс помещали в узкие, прозрачные цилиндры, заполненные водой до высоты 40 см, на 15 мин. На второй день крыс помещали в цилиндры с водой на 5 мин, в течение которых регистрировали время иммобильности, т.е. состояния неподвижности животного, при котором оно совершало движения, необходимые только для поддержания головы над уровнем воды. Тест ПКЛ проводили в установке с двумя открытыми и двумя закрытыми рукавами в течение 5 мин. При этом регистрировали время, проведенное в закрытых и открытых рукавах и на центральной платформе, а также число посещений рукавов. Тест ОП проводили в круглой арене. Крысу высаживали в центр арены и регистрировали длину пройденной дистанции, число вертикальных стоек, выходов в центр арены и дефекационных болюсов. Тест на предпочтение сахарозы проводили, помещая крыс индивидуально в прозрачные боксы. Каждому животному предъявляли две поилки с водой и 2%-м раствором сахарозы. Бутылки взвешивали до начала эксперимента и меняли местами каждые 12 ч, проводя дополнительные взвешивания. Предпочтение рассчитывали в процентах от общего количества выпитой жидкости.

Тест “социальное предпочтение”. Изучение поведения в тесте “социальное предпочтение” проводили согласно протоколу (Raineki et al., 2012) с использованием установки “Трехкамерный социальный тест” (ООО “Открытая наука”, РФ). Камера размером 120 × 80 × 40 см была разделена на три отсека

размером 40 × 80 см. Боковые отсеки от центрального были отделены прозрачными стенками с дверцами. В оба боковых отсека помещали цилиндрические клетки высотой 30 см и диаметром 22 см с решетчатой боковой стенкой и прозрачной крышкой с отверстиями для вентиляции. Тест проводили при освещенности 50 лк. Крысу помещали в центральный отсек при закрытых дверцах в боковые отсеки и в течение 5 мин давали возможность его обследовать. После этого в одну из цилиндрических клеток помещали незнакомую для тестируемого животного крысу того же пола и возраста и открывали дверцы. В течение 10 мин поведение животных регистрировали на видео и анализировали следующие параметры: время нахождения в каждом из отсеков (без крысы, с незнакомой крысой и центральном), продолжительность собственно социального взаимодействия, т.е. время, в течение которого животное было обращено мордой к клетке с другой крысой и находилось не далее, чем в 5 см от нее, число болюсов и уринаций.

Обучение в лабиринте Барнс. Для оценки способности к пространственному обучению у взрослых самцов использовали лабиринт Барнс (Barnes, 1979; Gawel et al., 2019). Установка представляла собой круглую арену диаметром 122 см (ООО “Открытая наука”, РФ). По краям арены располагались 18 отверстий диаметром 9.5 см, к одному из которых крепилась изготовленная из черного пластика камера-убежище размером 30 × 11 × 11 см. Остальные отверстия во время опыта были закрыты пластиковыми заглушками того же цвета. Арена располагалась на высоте 113 см над полом. Платформа была ярко равномерно освещена (500 лк). Вокруг арены на трех стенах были размещены зрительные ориентиры (квадрат, треугольник, крест) черного цвета размером 60 × 60 см. Четвертая стена не имела ориентира. Во время ознакомительной попытки животное помещали в центр арены под непрозрачный пластиковый контейнер на 15 с для того, чтобы в момент начала попытки животное было случайным образом ориентировано по отношению к убежищу и дистантным зрительным стимулам. Контейнер убирали, и крысе позволяли свободно исследовать среду. Если в течение 3 мин экспериментальное животное не находило убежище или не заходило в него, экспериментатор мягко направлял крысу в убежище, где она находилась в течение 1 мин. В последующие

пять дней проводили по 2 обучающие попытки с интервалом между ними 2–3 мин продолжительностью не более 2 мин. На седьмой день проводили тестовую попытку, в ходе которой камеру-убежище изымали из установки, и время исследования лабиринта сокращали до 1 мин. После каждой попытки арену очищали 70% этиловым спиртом. Между попытками одного животного лабиринт вращали на произвольный угол для дополнительного снижения вероятности ориентирования по запаховым меткам и другим возможным стимулам внутри лабиринта. При этом положение убежища не меняли по отношению к внешним ориентирам. Поведение животных в лабиринте фиксировали с помощью видеокамеры и программного пакета IC-Capture Ver. 2.2.248.1000 (“The Imaging Source Europe GmbH”, ФРГ). Анализ поведения проводили с помощью программы Ethovision XT11 (Noldus, Нидерланды). Платформу условно делили на четыре равных сектора. Целевое отверстие, ведущее в убежище, располагали так, чтобы оно делило дугу целевого сектора пополам. Также выделяли 10-сантиметровую зону вокруг целевого отверстия (целевая зона) и вокруг отверстия, расположенного напротив (зона-антипод). Анализировали латентный период (ЛП) нахождения убежища в течение 10 обучающих сеансов, время пребывания в каждом из четырех секторов и в целевой зоне, а также число посещений целевого сектора и целевой зоны в ходе тестовой попытки. Для построения кривой обучения ЛП двух попыток каждого сеанса усредняли и использовали эти значения для анализа.

Иммобилизационный стресс и оценка стресс-реактивности

На следующий день после завершения батареи тестов проводили оценку стрессоустойчивости особей. Для этого крыс подвергали иммобилизации в пластиковых домиках для 1- и 6-месячных животных (ООО “Открытая Наука”, РФ) размером 120 × 50 × 55 и 210 × 65 × 65 соответственно, в течение 1 ч. Домики были выполнены из прозрачного пластика и имели отверстия для доступа воздуха и дополнительной вентиляции. Животное в домике не могло совершать активных движений.

Оценку развития стрессорного ответа проводили по уровню глюкозы и кортикостерона (КС) в крови. Для этого сразу после помещения в домик, через 30 и 60 мин проводили за-

бор периферической крови из хвостовой вены для биохимических измерений (Lee, Goosens, 2015). Были предприняты все усилия для того, чтобы уровень болевой стимуляции был одинаковым для всех животных одной возрастной категории. Кровь собирали в пробирки, предварительно смоченные 10 мкл гепарина, и после 30 мин отстаивания центрифугировали в течение 15 мин при 1500 × g. Плазму отбирали, замораживали и хранили до анализа при –80°C.

Уровень глюкозы в периферической крови из хвостовой вены измеряли *in situ* с помощью глюкометра OneTouch Select Simple и тест-полосок OneTouch Select (LifeScan, США), и ее концентрацию выражали в ммоль/л. Для этого хвост крысы протирали тампоном, смоченным теплой водой, затем тампоном со спиртом и делали надрез. Первую каплю крови снимали, а следующую наносили на тест-полоску.

Уровень КС определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов “DRG corticosterone kit” (DRG Systems, ФРГ). Система основана на принципе конкурентного связывания и измеряет содержание свободного и связанного с белком КС. Спектрофотометрический анализ проводили на планшетном ридере Hydrex Sense 425-301 (Hydrex Oy, Финляндия) при длине волны поглощения 450 нм. Концентрацию КС подсчитывали методом построения стандартной кривой и выражали в нмоль/л.

Статистический анализ

Распределение переменных в полученных выборках не соответствовало нормальному в абсолютном большинстве случаев ($p < 0.05$, тест Шапиро-Уилкса). Учитывая это, для сравнения независимых групп между собой использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Изменение ЛП во время обучения в лабиринте Барнс оценивали по критерию Фридмана для связанных переменных в каждой группе животных с последующим сравнением временных точек по критерию Вилкоксона, а сравнение между группами проводили по критерию Манна–Уитни. Удаление выбросов в выборках проводили межквартильным методом. Распределение биохимических показателей в выборках соответствовало нормальному. Анализ изменения концентрации КС и глюкозы в крови проводи-

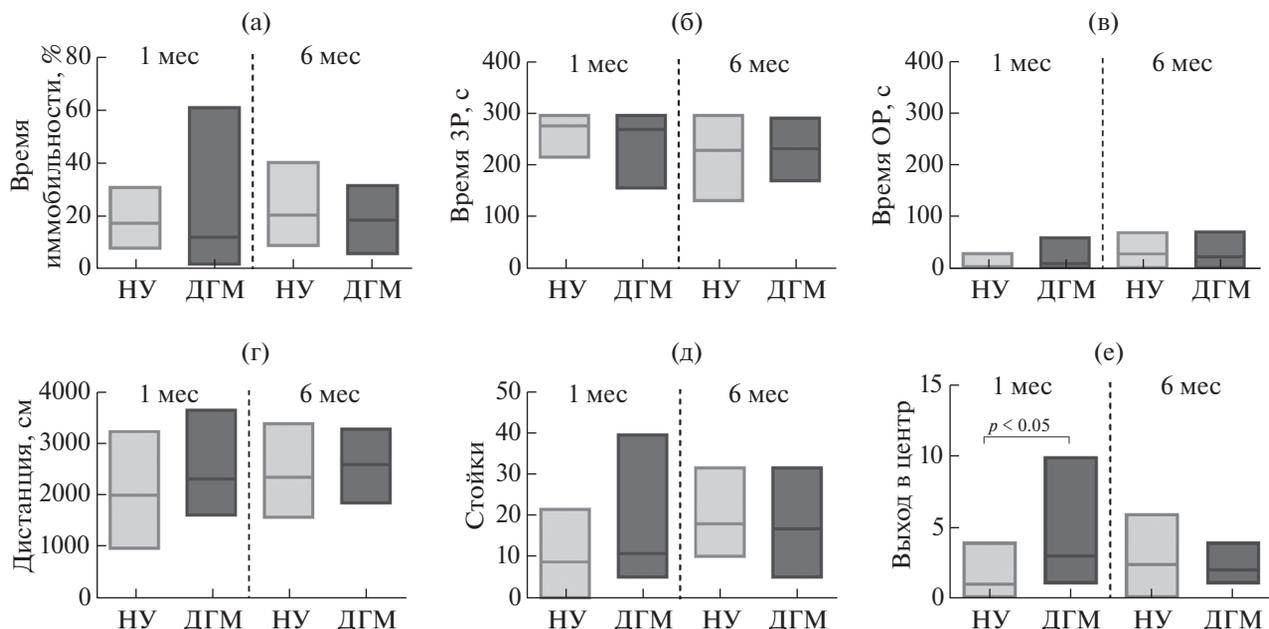


Рис. 2. Показатели тревожности и депрессивно-подобного поведения у крыс разных возрастных групп. (а) – время иммобильности в тесте ВП; (б) и (в) – время, проведенное в закрытых (ЗР) и открытых (ОР) рукавах лабиринта в тесте ПКЛ соответственно; (г), (д) и (е) – пройденная дистанция, число стоек и число выходов в центр арены соответственно, в тесте ОП. Данные представлены в виде медианы (линия) и максимального и минимального значений для каждой группы. НУ и ДГМ – крысы, содержавшиеся в неонатальном периоде в нормальных условиях и в условиях дефицита гнездового материала соответственно. Число животных в группах НУ и ДГМ в возрасте 1 мес было $n = 9$ и $n = 11$, и в возрасте 6 мес – $n = 10$ и $n = 10$ соответственно.

Fig. 2. Indices of anxiety and depressive-like behavior in rats of different age groups. (a) – immobility duration in the FS test; (б) and (в) – time spent in the closed arms (ЗР) and open arms (ОР), respectively, in the EPM test; (г), (д) and (е) – distance traveled, rearing, and number of visits into the arena center, respectively, in the OF test. Data are presented as median (line) and maximal and minimal values for each experimental group. NU and ДГМ, rats maintained under the normal conditions and limited bedding and nesting conditions, respectively, in the neonatal period. Number of animals in the NU and DGM groups in 1-month-old rats was $n = 9$ and $n = 11$ and in 6-month-old rats – $n = 10$ and $n = 10$, respectively.

ли с использованием дисперсионного анализа для связанных переменных (RM-ANOVA). Данные представлены в виде бокс-плотов, отражающих максимальное и минимальное значения показателя и медиану или среднее значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Содержание в условиях ДГМ в ранний постнатальный период не оказывает существенного влияния на тревожность и депрессивно-подобное поведение у крыс

Исследование поведения самцов крыс в тесте ВП проводили в возрасте 1 и 6 мес. Было показано, что как крысы, содержавшиеся в нормальных условиях (НУ), так и крысы, содержавшиеся в условиях ДГМ, демонстрировали сходное время иммобильности (рис. 2 (а)). Другие показатели поведения в

тесте ВП, а именно: время активного плавания или плавания с царапанием стенок – также были близки у этих групп крыс (данные не представлены).

Крысы как подросткового, так и зрелого возраста демонстрировали сходный уровень тревожности при тестировании в ПКЛ. Как 1-, так и 6-месячные животные предпочитали большую часть времени проводить в закрытых рукавах ПКЛ (рис. 2 (б)), изредка посещая открытые рукава (рис. 2 (в)). При этом содержание новорожденных крысят в разных условиях не оказывало существенного влияния на поведение в ПКЛ. Число переходов между рукавами также значимо не различалось (данные не представлены).

Пребывание крыс в условиях ДГМ в течение P2–P9 не оказывало влияния на локомоторную активность в тесте ОП ни в возрасте

1 мес, ни в возрасте 6 мес (рис. 2 (г)). Во всех группах наблюдали сходный уровень исследовательской активности, который оценивали по числу стоек (рис. 2 (д)). Интересно, что 1-месячные крысы, содержащиеся в условиях ДГМ в течение неонатального периода, совершали большее число выходов в центр арены по сравнению ровесниками, которых содержали в НУ (рис. 2 (е)). По другим показателям поведения в тесте ОП существенных различий не было обнаружено (данные не представлены).

Животные, содержащиеся в НУ в неонатальном периоде, предпочитали пить подслащенный раствор в ситуации выбора между раствором сахарозы и водой как в возрасте 1 мес (уровень предпочтения 86.2% [64.7–95.8%]), так и в возрасте 6 мес (90.5% [46.8–98.8%]). Содержание новорожденных крысят в условиях ДГМ не оказывало значимого влияния на показатели предпочтения раствора сахарозы ни в подростковой группе (71.7% [19.2–95.0%]), ни в группе взрослых (89.4% [78.9–97.6%]) крыс.

Таким образом, содержание крысят в условиях ДГМ в течение P2–P9 не приводило к существенным изменениям показателей поведения особей, характеризующих их тревожность и депрессивность, которые регистрировали в стандартных тестах в подростковом возрасте или у взрослых животных. Единственным статистически значимым изменением было увеличение числа выходов в центр арены в тесте ОП, которое наблюдали у 1-месячных крыс, что до определенной степени могло отражать некоторое снижение тревожности в этой группе, но это изменение не подтверждалось данными теста ПКЛ. К тому же это изменение не было стойким, так как у взрослых особей оно уже не наблюдалось.

Содержание в условиях ДГМ в ранний постнатальный период вызывает усиление социального предпочтения у крыс подросткового возраста, но не у взрослых животных

В течение времени проведения теста каждая крыса имела возможность выбрать один из трех отсеков: с незнакомой крысой того же пола и возраста, с пустой клеткой без крысы или центральный. Среди 1-месячных крыс группы НУ 1 особь предпочитала находиться в отсеке с пустой клеткой, а 3 крысы оставались в центральном отсеке все время тестиро-

вания, тогда как остальные животные большую часть времени проводили в отсеке с другой крысой. Однако в целом время предпочтения отсека с другой крысой не отличалось значимо от времени, проведенного в других отсеках камеры (рис. 3 (а)). В группе ДГМ 3 крысы также находились все время в центральном отсеке, но в отличие от крыс, содержащихся в НУ в неонатальном периоде, остальные животные этой группы предпочитали большую часть времени (по сравнению с пустым отсеком) находиться в отсеке с незнакомой особью (рис. 3 (а)).

Среди 6-месячных животных лишь 1 крыса из группы НУ все время проводила в центральном отсеке, остальные значительную часть времени проводили в отсеке с другой особью. В группе НУ время, проведенное в отсеке с другой крысой, было значимо больше по сравнению с пустым отсеком, у крыс ДГМ сохранялась аналогичная тенденция (рис. 3 (б)). При этом время непосредственного контакта с незнакомой особью не отличалось ни у подростков, ни у взрослых крыс, которых содержали в разных условиях в раннем онтогенезе.

Таким образом, содержание животных в условиях ДГМ приводило к более ранней выраженности социально-ориентированного поведения, которое проявлялось в желании больше времени проводить в присутствии другой, хоть и незнакомой, особи в новой незнакомой обстановке.

Содержание в условиях ДГМ в ранний постнатальный период улучшает пространственное обучение, но не влияет на долговременную память у взрослых крыс

Для оценки когнитивных способностей взрослых животных, перенесших разные воздействия в неонатальном периоде, использовали обучение решению пространственной задачи в лабиринте Барнс. В ходе решения крыса должна научиться отыскивать убежище по внелабиринтным ориентирам. Как видно из приведенных кривых обучения, и у контрольных (НУ), и у подопытных (ДГМ) животных происходило постепенное снижение ЛП поиска убежища в процессе обучения (рис. 4 (а)). Это подтверждалось и результатами статистического анализа, выполненного с помощью критерия Фридмана, отдельно для каждой группы крыс. В группе НУ наблюдали тенденцию к снижению ЛП в процессе

обучения ($\chi^2(10, 4) = 8.31, p = 0.08$). Особи подопытной группы ДГМ демонстрировали статистически значимое снижение ЛП в ходе обучения ($\chi^2(10, 4) = 25.19, p < 0.001$). На рис. 4 (б) представлены индивидуальные значения ЛП в группах НУ и ДГМ. Наблюдавшаяся тенденция к снижению ЛП выполнения задачи в группе НУ, по-видимому, была обусловлена наличием небольшой разницы в величине ЛП в последнем сеансе обучения по сравнению с первым ($p = 0.07$ по критерию Вилкоксона для связанных переменных). В группе ДГМ значимое снижение ЛП наблюдали и в четвертом, и в пятом сеансах обучения по сравнению с первым ($p < 0.01$ по критерию Вилкоксона для связанных переменных). Кроме того, ЛП нахождения убежища в последней попытке был почти вдвое выше в контрольной группе по сравнению с подопытной на уровне тенденции с учетом множественности сравнений ($p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни). Таким образом, наблюдалось некоторое улучшение и/или ускорение обучения поиску убежища в лабиринте Барнс у крыс, которые были подвергнуты содержанию в условиях ДГМ.

Через 24 ч после последнего сеанса обучения проводили проверку сохранности памятного следа о месте нахождения убежища в лабиринте. Как число визитов в область убежища (рис. 4 (в)), так и время, проведенное в этой области (рис. 4 (г)), были выше по сравнению с числом визитов и проведенным временем в области-антипode в обеих группах животных. Вместе с тем в случае числа визитов эта разница была значимой только в группе ДГМ.

Содержание в условиях ДГМ в ранний постнатальный период модифицирует стрессорный ответ в зависимости от возраста

Для исследования реакции крыс на часовую мягкую иммобилизацию оценивали содержание глюкозы и КС в периферической крови. Крыс помещали в пластиковые домики, и сразу после посадки в домик, через 30 и 60 мин иммобилизации, периферическую кровь собирали и в ней измеряли указанные параметры. На рис. 5 (а, б) представлены результаты измерения концентрации глюкозы в крови крыс при экспозиции стрессору. Крысы экспериментальной и подопытной группы не различались по исходному уровню

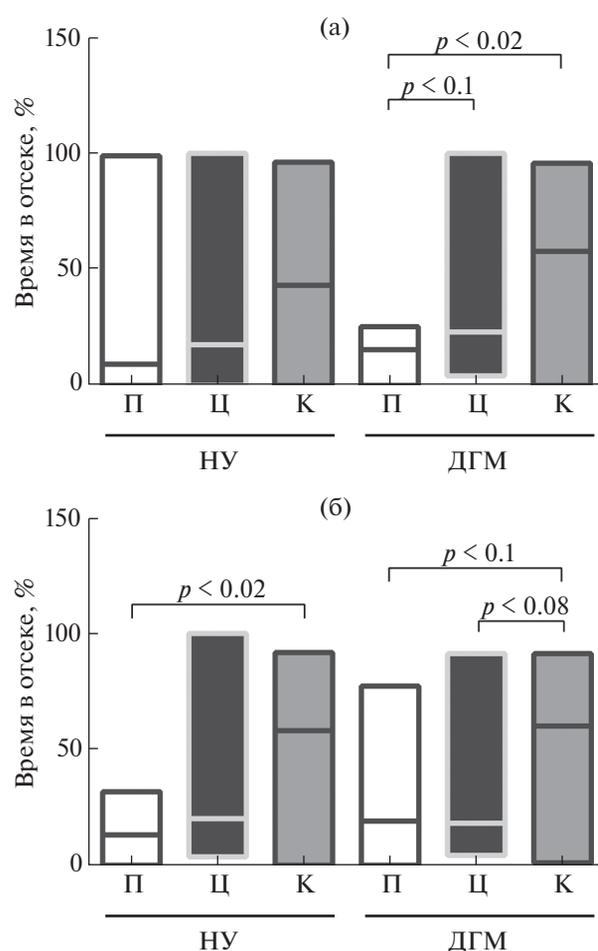


Рис. 3. Показатели поведения крыс возрастом 1 мес (а) и 6 мес (б) в тесте “социальное предпочтение”. П, Ц и К – пустой отсек, центральный отсек и отсек с незнакомой крысой соответственно. Число животных в группах НУ и ДГМ в возрасте 1 мес было $n = 9$ и $n = 11$ и в возрасте 6 мес – $n = 10$ и $n = 10$ соответственно. Остальные обозначения как на рис. 2.

Fig. 3. Behavior of 1- (a) and 6-month-old rats (б) in the “social preference/attachment” test. П, Ц and К – empty alley, central alley, and alley with an unknown rat, respectively. Number of animals in the NU and DGM groups in 1-month-old rats was $n = 9$ and $n = 11$ and in 6-month-old rats – $n = 10$ and $n = 10$, respectively. The other indications are similar to those in fig. 2.

глюкозы в крови ни в возрасте 1 мес, ни в возрасте 6 мес. У 1-месячных крыс обеих групп увеличение концентрации глюкозы в крови в ответ на стрессорное воздействие было слабым и при статистическом анализе выявлялось лишь на уровне тенденции (фактор “время иммобилизации” $F(2, 36) = 2.54; p = 0.09$; рис. 5 (а)). Существенной разницы между группами не наблюдали ($F(1, 18) = 1.38$;

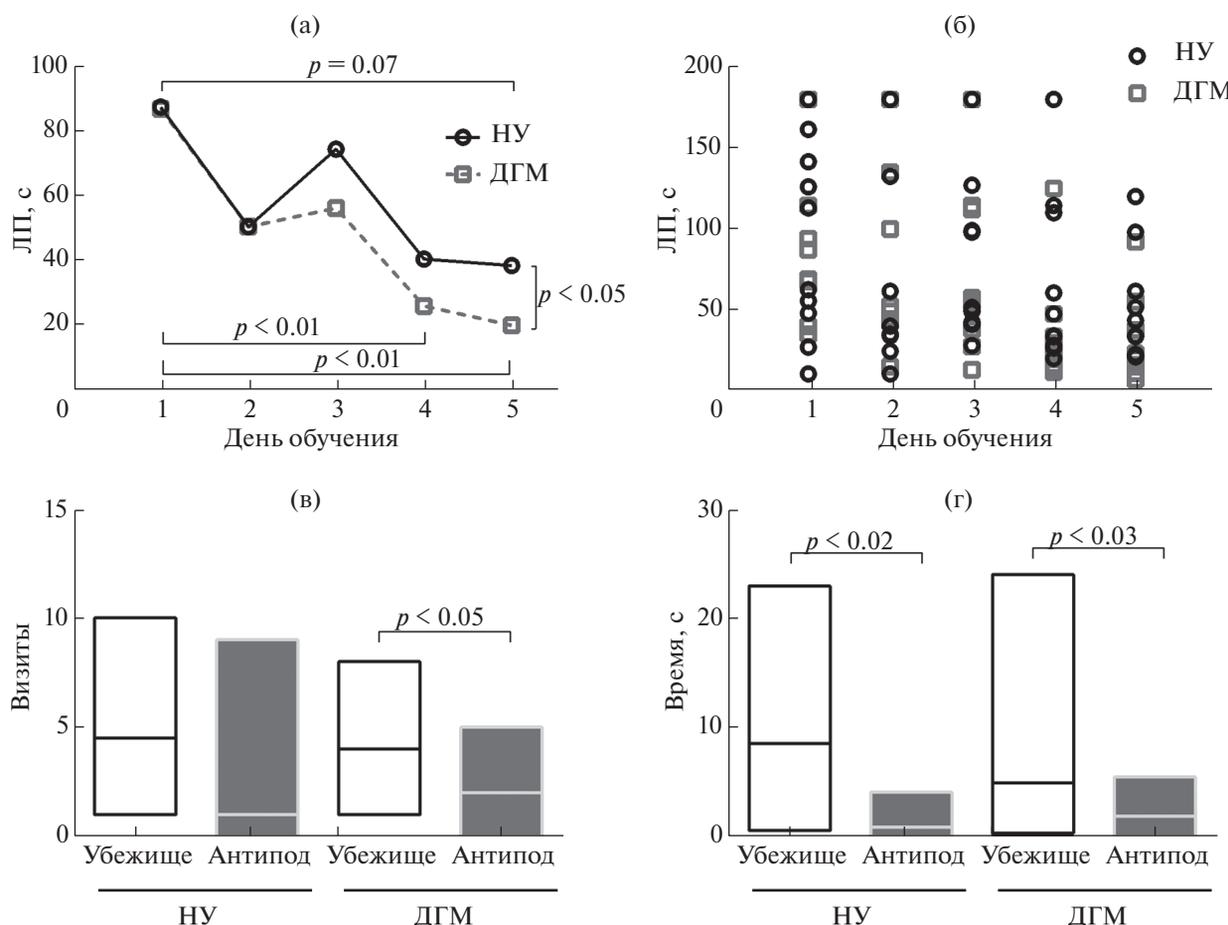


Рис. 4. Показатели обучения 6-месячных крыс выполнению поиска убежища в лабиринте Барнс. (а) – кривые обучения, построенные по данным ЛП поиска убежища. ЛП двух попыток каждого дня для каждой крысы усредняли, после чего получили значение медианы для группы; (б) – индивидуальные средние значения двух попыток для всех исследованных животных; (в) – число визитов в целевую зону или зону-антипод в тестовой попытке; (г) – время, проведенное в целевой зоне или зоне-антипode в тестовой попытке. Обозначения как на рис. 2. Число животных в группах НУ и ДГМ было $n = 10$ и $n = 10$ соответственно.

Fig. 4. Training of 6-month-old rats to find a safety shelter in the Barnes' maze. (a), learning curves representing changes in the latency to find a shelter. Latencies of two trials of each day were averaged and median values for each group were used to build the curves; (б) – averaged latencies of two trials for all trained animals; (в) – number of visits into the target zone and antipode zone in the test trial; (г) – time spent in the target zone and antipode zone in the test trial. The other indications are similar to those in fig. 2. Each group consisted of 10 male rats.

$p = 0.26$), и взаимодействие между факторами отсутствовало ($F(2, 36) = 0.51$; $p = 0.61$).

Изменения концентрации глюкозы у взрослых животных разных групп в ответ на иммобилизацию были также сходны (рис. 5 (б)). Содержание глюкозы возрастало в обеих группах через 30 мин после начала воздействия и сохранялось на том же уровне к концу периода иммобилизации (фактор “время иммобилизации” $F(2, 36) = 54.81$; $p < 0.001$). При этом эффекта фактора “группа” и взаимодействия между факторами не наблюдалось ($F(1, 18) = 0.0059$; $p = 0.94$ и $F(2, 36) = 0.14$; $p = 0.86$ соответственно). Таким образом, изменение

концентрации глюкозы в ответ на действие стрессора было слабее выражено у 1-месячных крыс по сравнению с взрослыми животными. При этом характер изменения у крыс-подростков и взрослых животных был сходным в подопытной и контрольной группах.

При анализе содержания КС в периферической крови были обнаружены выбросы, которые вычисляли с учетом интерквартильного размаха. После удаления выбросов (по одному животному из каждой группы у 1-месячных крыс) распределение параметра в выборках соответствовало нормальному ($p > 0.3$

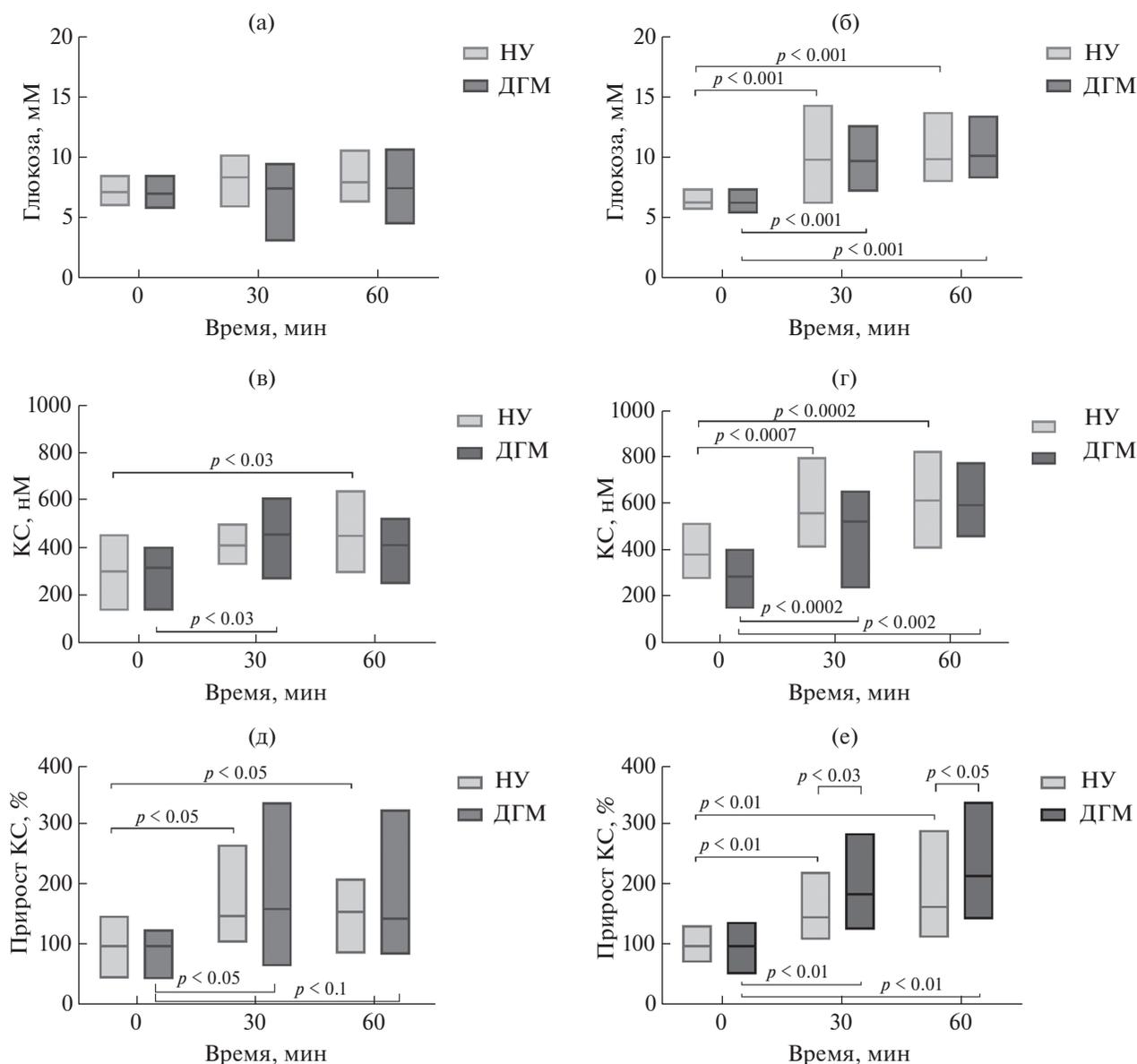


Рис. 5. Базовый и индуцированный иммобилизационным стрессом уровни глюкозы и КС в плазме крови 1-мес ((а), (в) и (д)) и 6-мес ((б), (г) и (е)) крыс, содержащихся в нормальных условиях или в условиях ДГМ в раннем неонатальном периоде. (а) и (б) – содержание глюкозы; (в) и (г) – содержание КС; (д) и (е) – прирост КС относительно базового уровня. Линия внутри бокса на рис. (а) – (г) обозначает среднее значение по группе. Число животных в группах НУ и ДГМ в возрасте 1 мес было $n = 8$ и $n = 9$, и в возрасте 6 мес – $n = 10$ и $n = 10$ соответственно. Обозначения как на рис. 2.

Fig. 5. Basal and restraining-induced levels of glucose and CS in blood plasma of 1- ((a), (v) and (d)) and 6-month-old ((б), (г) and (e)) rats housed under the normal or LBN conditions in the early neonatal period. (a) and (б) – glucose content; (в) and (г) – CS content; (д) and (e) – CS increase respective to the basal CS level. Lines within the boxes in (a) – (г) represent group mean values. Number of animals in the NU and DGM groups in 1-month-old rats was $n = 8$ and $n = 9$ and in 6-month-old rats – $n = 10$ and $n = 10$, respectively. The other indications are similar to those in fig. 2.

по критерию Шапиро–Уилка). Анализ различий концентрации КС в группах проводили с использованием RM-ANOVA. Как видно из приведенных данных, не наблюдалось существенных различий в базовом содержании

КС между крысами 1-месячного возраста, которые содержались в разных условиях в неонатальном периоде (рис. 5 (в)). Иммобилизация вызывала рост содержания КС в обеих группах (фактор “время иммобилизации”

$F(2, 39) = 6.72, p < 0.004$). При этом эффекта содержания в условиях ДГМ не наблюдалось (фактор “группа” $F(1, 39) = 0.048, p = 0.83$), так же как и взаимодействия между этими факторами ($F(2, 39) = 0.61, p = 0.55$). Апостериорное множественное сравнение средних подтвердило рост содержания КС в группе НУ, статистически значимая разница по сравнению с исходным уровнем наблюдалась через 60 мин иммобилизации ($p = 0.03$ по критерию Тьюки). В подопытной группе прирост становился максимальным уже через 30 мин после начала действия стрессора ($p = 0.03$), и далее роста не происходило. Таким образом, в подростковом возрасте у крыс реакция на действие гетеротипичного стрессора (иммобилизации) в группе ДГМ несколько отличалась по сравнению с контролем по показателям, характеризующим динамику выброса КС.

У взрослых животных также не наблюдалось существенной разницы в базовом уровне КС в крови (рис. 5 (г)). Иммобилизация приводила к значительному росту уровня КС в крови как крыс НУ, так и крыс ДГМ по сравнению с исходным уровнем через 30 мин после начала иммобилизации, этот эффект был еще более выражен через 60 мин иммобилизации в обеих группах крыс (фактор “время иммобилизации” $F(2, 54) = 27.98, p < 0.0001$). При этом эффекта содержания в условиях ДГМ не наблюдалось (фактор “группа” $F(1, 54) = 2.71, p = 0.11$), так же как и взаимодействия между этими факторами ($F(2, 54) = 0.54, p = 0.59$). Таким образом, взрослые особи обеих групп реагировали сходным нарастанием содержания КС в крови с достижением максимального уровня к концу иммобилизации.

Обратил на себя внимание тот факт, что в исходной точке усредненный уровень КС в подопытной группе был почти на 25% ниже, чем в контроле, хотя эта разница не была статистически значимой. Поэтому мы попытались оценить степень нарастания содержания КС в течение периода иммобилизации, выразив прирост в процентах от исходного уровня. Было обнаружено, что у 1-месячных крыс нарастание уровня КС происходило примерно одинаково (рис. 5 (д)) и в группе НУ ($p < 0.05$ для обеих точек по критерию Вилкоксона), и в группе ДГМ ($p < 0.05$ для 30 мин и $p = 0.093$ для 60 мин). Различий между группами не наблюдалось ($p > 0.3$ по кри-

терию Манна–Уитни). У взрослых крыс прирост КС также был значимым и в контроле ($p < 0.01$ для обеих точек по критерию Вилкоксона), и в опыте ($p < 0.01$ для обеих точек). В то же время у взрослых животных выброс КС был явно выше у животных группы ДГМ по сравнению с НУ (рис. 5 (е); $p < 0.05$ по критерию Манна–Уитни для обеих исследованных точек). Таким образом, содержание крыс в условиях ДГМ в раннем постнатальном онтогенезе изменяло реакцию ГГНО на иммобилизацию на более поздних стадиях онтогенеза. При этом у молодых животных несколько менялась временная динамика выброса КС со сдвигом влево у подопытных крыс, а у взрослых крыс прирост содержания этого гормона в ответ на действие стрессора был больше у подопытных животных по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Модель неонатального стрессорного воздействия, основанная на использовании сетчатой платформы и дефиците гнездового материала, применяется в разных лабораториях. В исходно разработанной для крыс и мышей модели (Gilles et al., 1996; Avishai-Eliner et al., 2001; Brunson et al., 2005; Ivy et al., 2008; Rice et al., 2008) самку с потомством содержат в условиях ограниченного количества подстилки и гнездового материала. Для моделирования используют первородящих самок возрастом старше 75 дней. Детенышей из разных пометов случайным образом перераспределяют между самками для уменьшения вклада индивидуальных генетических особенностей. В ходе выполнения эксперимента самок с новым пометом делят на подопытную и контрольную группы. При этом подопытную группу помещают в клетки на покрытую пластиком алюминиевую сетчатую платформу с ограниченным количеством подстилки, достаточным, чтобы тонким слоем покрыть пол клетки, а в качестве гнездового материала предлагается использовать одно бумажное полотенце (Gilles et al., 1996; Molet et al., 2014). Такие обедненные условия не позволяют самке построить нормальное гнездо, что ведет к изменению паттернов заботы о потомстве. Эпизоды взаимодействия самки с детенышами становятся фрагментарными и теряют регулярность (Ivy et al., 2008; Rice et al., 2008; Molet et al., 2016), а последовательность

различных актов становится непредсказуемой (Rice et al., 2008; Varam et al., 2012). При этом достоверных свидетельств изменения суммарной длительности материнской заботы или изменений в определенных ее аспектах, таких как вылизывание, груминг и других, не наблюдается (Ivy et al., 2008; Molet et al., 2014). Важно отметить, что именно непредсказуемость и фрагментированность материнского ухода считаются отличительными особенностями материнского поведения в ситуации неглекта (пренебрежения родительскими обязанностями) и плохого обращения с детьми (Whipple, Webster-Stratton, 1991; Gaudin et al., 1996). Предполагается, что именно нарушенное материнское поведение является причиной хронического раннего стресса у детенышей грызунов, однако изменения в температурном режиме и в паттернах кормления также могут играть в его возникновении значительную роль. Последствия такого стрессорного воздействия мы и исследовали в настоящей работе.

Как и в других моделях раннего стресса, можно было ожидать, что ДГМ вызовет изменения поведения и стресс-реактивности, которые проявляются в последующие периоды жизни. Эти изменения потенциально связаны со многими регуляторными системами, в первую очередь с основными стресс-реализующими системами, такими как ГГНО и симпато-адреналовая система.

В нашем исследовании содержание в условиях ДГМ в ранний постнатальный период не оказывало существенного влияния на тревожность и депрессивно-подобное поведение у самцов крыс. Возможно, что причиной этого были незначительные отличия использованного протокола (применение пластмассовой платформы вместо металлической сетки, использование в качестве гнездового материала “древесной шерсти” вместо бумажного полотенца) от исходно описанного (Walker et al., 2017) модели. Не исключено, что эти отличия могли обеспечить более комфортное пребывание детенышей в клетке в условиях родительского неглекта и меньший стрессирующий эффект созданной среды. По-видимому, раннее физическое или провоспалительное воздействие представляет собой намного более сильный стрессор. Действительно, большинство существующих моделей депрессии базируются на представлении о стрессорной природе этого заболевания и используют

стрессоры преимущественно физической природы для индукции депрессивно-подобных симптомов у лабораторных животных (Григорьян, Гуляева, 2015). Стрессовые условия ранней материнской депривации/сепарации, в основе которой лежит прерывание непосредственного контакта между телом матери и детеныша, оказывают влияние на формирование всех систем организма, повышая стрессоустойчивость индивидуума в краткосрочной перспективе и делая его уязвимым к развитию депрессии в долгосрочной перспективе (Andersen, 2015; Bergman, 2019). Означает ли это, что содержание в условиях ДГМ не оказалось стрессорным фактором для самцов крыс? Данные, полученные в настоящей работе, позволили выявить изменения, которые указывают на трансформации, произошедшие при развитии животных под влиянием постнатального содержания в условиях ДГМ.

Важно отметить, что ряд преходящих изменений был отмечен только у 1-месячных животных. Изменения поведения включали усиление социального предпочтения, т.е. реакции на незнакомую особь в незнакомой обстановке, что может указывать на изменения эмоциональной сферы в этом возрасте. Считают, что изменения в социальном поведении могут быть симптомами психических и неврологических нарушений (Andersen, 2015). Интересно, что эти изменения отсутствуют у взрослых животных, что может говорить о возрастной коррекции социального поведения.

Содержание в условиях ДГМ в ранний постнатальный период модифицировало стрессорный ответ в зависимости от возраста. Судя по динамике выброса КС в ответ на иммобилизационный стресс у животных разного возраста, взросление крыс, содержащихся в условиях неонатального ДГМ, приводило к более выраженной реактивности ГГНО.

Важно, что довольно умеренные модификации нейрогуморальной системы и изменения стресс-реактивности наблюдались в отсутствие явных патологических изменений поведения. Более того, в лабиринте Барнс взрослые подопытные животные продемонстрировали улучшение пространственного обучения, хотя и без изменений долговременной памяти. С учетом умеренно повышенной стресс-реактивности можно предположить, что быстрая, но не чрезмерная активация ГГНО в условиях обучения может

иметь благоприятный эффект, связанный с ключевым участием глюкокортикоидов и их рецепторов, прежде всего в лимбической системе, в процессе обучения (de Kloet et al., 2018). В последние годы становится все более популярной гипотеза о необходимости “двойного” или даже “тройного удара” для развития психических заболеваний, в первую очередь депрессии (“two hit” or “three-hit” hypotheses). Согласно этой гипотезе, необходимы два или более значимых воздействия на организм в период его развития для запуска патофизиологических механизмов заболевания (Daskalakis et al., 2013; Lesse et al., 2017). Первый, как принято считать, приходится на ранний период и может создать условия для реализации действия следующего неблагоприятного фактора и индукции заболевания. Исходя из этого, модель ДГМ, которая не вызывает продолжительных и драматических изменений поведения, может быть валидной в качестве “первого удара”, а трансформации, в том числе нейроэндокринной системы, вызванные содержанием в условиях ДГМ, существенно повышают уязвимость мозга к действию сильных острых или хронических стрессорных факторов (второй и последующие удары). С этой точки зрения модель ДГМ заслуживает дальнейшего исследования как база для моделей депрессии, предусматривающих последующие стрессорные “удары”. Такие исследования позволят оценить трансляционную значимость такого подхода и клиническую релевантность модели, основанной на ДГМ.

ВЫВОДЫ

1. Содержание самки с приплодом в условиях дефицита гнездового материала в течение 2–9 дней постнатального периода приводит к модификациям поведения, которые наблюдаются у самцов крыс в возрасте 1 и 6 мес. У 1-месячных животных происходит усиление социального предпочтения, которое нивелируется по мере взросления. У 6-месячных крыс наблюдается некоторое улучшение обучения поиску укрытия в лабиринте Барнс.

2. Содержание самки с приплодом в условиях дефицита гнездового материала в течение 2–9 дней постнатального периода приводит к изменениям острого стрессорного ответа, который был более выражен у взрослых особей. У 6-месячных самцов прирост содер-

жания кортикостерона в ответ на действие стрессора был больше у подопытных животных по сравнению с контролем.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-00-00125).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Григорьян Г.А.* Половые различия в оборонительном поведении взрослых крыс в ответ на ранний нейровоспалительный стресс. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2020. 70: 259–276.
- Григорьян Г.А., Гуляева Н.В.* Моделирование депрессии на животных: методология, критерии оценки и классификации. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2015. 65: 643–660.
- Кудряшова И.В., Тишкина А.О., Гуляева Н.В.* Неонатальный провоспалительный стресс и дефицит индукции долговременной потенциации в гиппокампе крыс: гендерные различия. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2018. 68: 524–536.
- Кудряшова И.В., Степанчиков М.Ю., Гуляева Н.В.* Неонатальный провоспалительный стресс и созревание межклеточной коммуникации в гиппокампе. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2019. 69: 680–699.
- Малиновская Н.А., Моргунов А.В., Лопатина О.Л., Панина Ю.А., Волкова В.В., Гасымлы Э.Д., Таранушенко Т.Е., Салмина А.Б.* Стресс раннего периода жизни: последствия для развития головного мозга. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2016. 66: 643–668.
- Манолова А.О., Степанчиков М.Ю., Гуляева Н.В.* Поведение крыс в тесте вынужденного плавания не является однозначным предиктором развития ангедонии при хроническом стрессе. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2018. 68: 488–495.
- Andersen S.* Exposure to early adversity: Points of cross-species translation that can lead to improved understanding of depression. Dev. Psychopathol. 2015. 27: 477–491.
- Avishai-Eliner S., Gilles E.E., Eghbal-Ahmadi M., Bar-El Y., Baram T.Z.* Altered regulation of gene, protein expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis components in an immature rat model of chronic stress. J. Neuroendocrinol. 2001. 13: 799–807.
- Arp J.M., Ter Horst J.P., Loi M., den Blaauwen J., Bangert E., Fernández G., Joëls M., Oitzl M.S., Kru-*

- gers H.J. Blocking glucocorticoid receptors at adolescent age prevents enhanced freezing between repeated cue-exposures after conditioned fear in adult mice raised under chronic early life stress. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2016. 133: 30–38.
- Baram T.Z., Davis E.P., Obenaus A., Sandman C.A., Small S.L., Solodkin A., Stern H. Fragmentation, unpredictability of early-life experience in mental disorders. *Am. J. Psychiatry.* 2012. 169: 907–915.
- Barnes C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1979. 93: 74–104.
- Bath K.G., Manzano-Nieves G., Goodwill H. Early life stress accelerates behavioral, neural maturation of the hippocampus in male mice. *Horm. Behav.* 2016. 82: 64–71.
- Bergman N.J. Birth practices: Maternal-neonate separation as a source of toxic stress. *Birth Defects Res.* 2019. 111: 1087–1109.
- Bilbo S.D., Levkoff L.H., Mahoney J.H., Watkins L.R., Rudy J.W., Maier S.F. Neonatal infection induces memory impairments following an immune challenge in adulthood. *Behav. Neurosci.* 2005. 119: 293–301.
- Bilbo S.D., Rudy J.W., Watkins L.R., Maier S.F. A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. *Behav. Brain Res.* 2006. 169: 39–47.
- Brunson K.L., Kramár E., Lin B., Chen Y., Colgin L.L., Yanagihara T.K., Lynch G., Baram T.Z. Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *J. Neurosci.* 2005. 25: 9328–9338.
- Commons K.G., Cholani A.B., Babb J.A., Ehlinger D.G. The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS Chem Neurosci.* 2017. 8: 955–960.
- Daskalakis N.P., Bagot R.C., Parker K.J., Vinkers C.H., de Kloet E.R. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 2013. 38: 1858–1873.
- Dalle Molle R., Portella A., Goldani M., Kapczinski F., Leistner-Segala S., Salum G., Manfro G.G., Silveira P.P. Associations between parenting behavior, anxiety in a rodent model, a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. *Transl. Psychiatry.* 2012. 2: e195.
- de Kloet E.R., Meijer O.C., de Nicola A.F., de Rijk R.H., Joëls M. Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. *Front. Neuroendocrinol.* 2018. 49: 124–145.
- de Kloet E.R., Molendijk M.L. Coping with the forced swim stressor: towards understanding an adaptive mechanism. *Neural Plast.* 2016. 2016: 6503162.
- Du Preez A., Leveson J., Zunszain P.A., Pariante C.M. Inflammatory insults and mental health consequences: does timing matter when it comes to depression? *Psychol. Med.* 2016. 46: 2041–2057.
- Feldman R., Braun K., Champagne F.A. The neural mechanisms and consequences of paternal caregiving. *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. 20: 205–224.
- Gaudin J.M., Polansky N.A., Kilpatrick A.C., Shilton P. Family functioning in neglectful families. *Child Abuse Neglect.* 1996. 20: 363–377.
- Gawel K., Gibula E., Marszałek-Grabska M., Filarowska J., Kotlinska J.H. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents-methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2019. 392: 1–18.
- Gilles E.E., Schultz L., Baram T.Z. Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress. *Pediatric Neurol.* 1996. 15: 114–119.
- Guadagno A., Wong T.P., Walker C.-D. Morphological, functional changes in the preweaning basolateral amygdala induced by early chronic stress associate with anxiety, fear behavior in adult male, but not female rats. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2018. 81: 25–37.
- Ivy A.S., Brunson K.L., Sandman C., Baram T.Z. Dysfunction of nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience.* 2008. 154: 1132–1142.
- Kentner A.C., Pittman Q.J. Minireview: early-life programming by inflammation of the neuroendocrine system. *Endocrinology.* 2010. 151: 4602–4606.
- Kraaijenvanger E.J., Pollok T.M., Monninger M., Kaiser A., Brandeis D., Banaschewski T., Holz N.E. Impact of early life adversities on human brain functioning: A coordinate-based meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020. 113: 62–76.
- Krugers H.J., Arp J.M., Xiong H., Kanatsou S., Lesuis S.L., Korosi A., Joëls M., Lucassen P.J. Early life adversity: Lasting consequences for emotional learning. *Neurobiol. Stress.* 2016. 6: 14–21.
- Kudryashova I., Stepanichev M., Manolova A., Gulyaeva N. Deficit of Long-Term Potentiation Induction, but not maintenance, in the juvenile hippocampus after neonatal proinflammatory stress. *Dev Neurosci.* 2019; 41 (5–6): 318–326.
- Lee G., Goosens K.A. Sampling blood from the lateral tail vein of the rat// *Journal of visualized experiments. JoVE.* 2015. 99: e52766.

- Lesse A., Rether K., Gröger N., Braun K., Bock J.* Chronic postnatal stress induces depressive-like behavior in male mice and programs second-hit stress-induced gene expression patterns of OxtR and AvpR1a in adulthood. *Mol. Neurobiol.* 2017. 54: 4813–4819.
- McLaughlin R.J., Verlezza S., Gray J.M., Hill M.N., Walker C.D.* Inhibition of anandamide hydrolysis dampens the neuroendocrine response to stress in neonatal rats subjected to suboptimal rearing conditions. *Stress.* 2016. 19: 114–124.
- Molendijk M.L., de Kloet E.R.* Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. *Behav. Brain Res.* 2019. 364: 1–10.
- Molet J., Maras P.M., Avishai-Eliner S., Baram T.Z.* Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. *Dev. Psychobiol.* 2014. 56: 1675–1688.
- Moriceau S., Shionoya K., Jakubs K., Sullivan R.M.* Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, olfactory bulb norepinephrine. *J. Neurosci.* 2009. 29: 15745–15755.
- Moussaoui N., Jacobs J.P., Larauche M., Biraud M., Million M., Mayer E., Taché Y.* Chronic early-life stress in rat pups alters basal corticosterone, intestinal permeability, fecal microbiota at weaning: influence of sex. *J. Neurogastroenterol. Motility.* 2017. 23: 135–143.
- Naninck E.F.G., Hoeijmakers L., Kakava-Georgiadou N., Meesters A., Lazic S.E., Lucassen P.J., Korossi A.* Chronic early life stress alters developmental, adult neurogenesis, impairs cognitive function in mice. *Hippocampus.* 2015. 25: 309–328.
- Onufriev M.V., Freiman S.V., Peregud D.I., Kudryashova I.V., Tishkina, A.O., Stepanichev M.Yu., Gulyaeva N.V.* Neonatal proinflammatory stress induces accumulation of corticosterone and interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: Potential mechanism of synaptic plasticity impairments. *Biochemistry (Moscow).* 2017. 82: 275–281.
- Raineki C., Cortés M.R., Belnoue L., Sullivan R.M.* Effects of early-life abuse differ across development: infant social behavior deficits are followed by adolescent depressive-like behaviors mediated by the amygdala. *J. Neurosci.* 2012. 32: 7758–7765.
- Raineki C., Moriceau S., Sullivan R.M.* Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biol. Psychiatry.* 2010. 67: 1137–1145.
- Raineki C., Sarro E., Rincón-Cortés M., Perry R., Boggs J., Holman C.J., Wilson D.A., Sullivan R.M.* Paradoxical neurobehavioral rescue by memories of early-life abuse: The safety signal value of odors learned during abusive attachment. *Neuropsychopharmacology.* 2015. 40: 906–914.
- Rehm J., Shield K.D.* Global burden of disease and the impact of mental and addictive disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 2019. 21 (2): 10.
- Rice C., Sandman C.A., Lenjavi M.R., Baram T.Z.* A novel mouse model for acute, long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology.* 2008. 149: 4892–4900.
- Rincón-Cortés M., Sullivan R.* Emergence of social behavior deficit, blunted corticolimbic activity, adult depression-like behavior in a rodent model of maternal maltreatment. *Transl. Psychiatry.* 2016. 6: e930.
- Robinson E.S.J.* Translational new approaches for investigating mood disorders in rodents and what they may reveal about the underlying neurobiology of major depressive disorder. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2018. 373: 20170036.
- Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N.* Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. *BioMed Res. Int.* 2014. 2014: 932757.
- Stepanichev M.Y., Tishkina A.O., Novikova M.R., Levshina I.P., Freiman S.V., Onufriev M.V., Levchenko O.A., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V.* Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 2016. 76: 324–333.
- Tishkina A., Stepanichev M., Kudryashova I., Freiman S., Onufriev M., Lazareva N., Gulyaeva N.* Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. *Behav. Brain Res.* 2016. 304: 1–10.
- Vigo D., Thornicroft G., Atun R.* Estimating the true global burden of mental illness. *Lancet Psychiatry.* 2016. 3: 171–178.
- Walker C., Bath K.G., Joels M., Korosi A., Larauche M., Lucassen P.J., Morris M.J., Raineki C., Roth T.L., Sullivan R.M., Taché Y.F., Baram T.Z.* Chronic early life stress induced by limited bedding, nesting (LBN) material in rodents: critical considerations of methodology, outcomes, translational potential. *Stress.* 2017. 20: 421–448.
- Wang K.C., Fan L.W., Kaizaki A., Pang Y., Cai Z., Tien L.T.* Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response, hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience.* 2013. 234: 146–157.
- Whipple E.E., Webster-Stratton C.* The role of parental stress in physically abusive families. *Child Abuse Neglect.* 1991. 15: 279–291.

CHRONIC STRESS INDUCED BY HOUSING UNDER THE LIMITED BEDDING AND NESTING CONDITIONS DURING EARLY POSTNATAL ONTOGENY AFFECTS BEHAVIOR AND STRESS-RESPONSIVENESS IN MALE RATS

M. Yu. Stepanichev^{a,#}, O. A. Nedogreeva^a, M. A. Klimanova^a, Yu. V. Moiseeva^a, M. V. Onufriev^a,
N. A. Lazareva^a, and N. V. Gulyaeva^a

^a *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: m_stepanichev@ihna.ru*

Rodent models of parental care deprivation are often used for reproduction of depressive-like disorders induced by early life stress. In the present study we used a model in which mother and litter are housed under the limited bedding and nesting (LBN) conditions during early postnatal ontogeny to evaluate its consequences. The aim of the study was to investigate whether the behavior of male rats that have experienced stress due to the exposure to LBN environment in the early postnatal period changes with age, and whether these changes are associated with an impairment of the stress-responsiveness of animals. The housing of rat pups in the LBN conditions during postnatal day 2 – day 9 did not result in significant alterations of anxiety- or depressive-like behavior observed in the standard tests, including the open field test, elevated plus-maze test, sucrose preference test in either adolescent or adult animals. However, the exposure to LBN increased social attachment or socially-oriented behavior, which was expressed in the desire to spend more time in the presence of an unfamiliar individual in a new environment, in 1-month-old but not adult rats. The exposure to LBN improved spatial learning but did not affect long-term memory in adult rats trained to perform a spatial task in the Barnes' maze. Changes in the stress-responsiveness, evaluated using blood corticosterone release, were more expressed in adult animals. Thus, the exposure to LBN in the early postnatal period did not result in the development of anxiety- or depressive-like behavior in 1- and 6-month-old male rats; it transiently affected social attachment in young animals and modified response to short-term mild stressor.

Keywords: stress, early postnatal period, limited bedding and nesting, corticosterone, stress-responsiveness, anxiety, depression

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.062:577.25

ЗАВИСИМОЕ ОТ ПОЛА ВЛИЯНИЕ СТРЕССА САМЦОВ КРЫС
НА ПАМЯТЬ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО
ФАКТОРА РОСТА 2 В МОЗГЕ ПОТОМКОВ

© 2021 г. Н. Э. Ордян^{1,*}, О. В. Малышева^{1,2}, Г. И. Холова¹, В. К. Акулова¹, С. Г. Пивина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта”, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: neo@infran.ru

Поступила в редакцию 26.11.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Изучены последствия стрессирования самцов крыс в парадигме “стресс-рестресс” (модель посттравматического стрессового расстройства, ПТСР) на память и экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) в отдельных структурах мозга их половозрелых потомков обоего пола. Экспрессию гена *Igf2* дополнительно исследовали у новорожденных потомков. Показано, что стресс отца вызывает дефицит памяти в тестах “Реакция пассивного избегания” и “Распознавание нового объекта” преимущественно у потомков-самцов. У потомков-самок дефицит памяти обнаружен только в тесте “Распознавание нового объекта”. Только у потомков-самцов выявлено снижение экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе в половозрелом возрасте, но не у новорожденных потомков-самцов. Полученные результаты свидетельствуют о секс-специфических эффектах ПТСР-подобного состояния самцов-отцов на память и экспрессию гена *Igf2* в мозге половозрелых потомков.

Ключевые слова: стресс отца, потомки, реакция пассивного избегания, распознавание нового объекта, инсулиноподобный фактор роста 2, мозг, самцы, самки, крыса

DOI: 10.31857/S0044467721030060

В последние годы инсулиноподобный фактор роста 2 (ИФР2) и его участие в процессах, связанных с когнитивными функциями и памятью, привлекают пристальное внимание. В научной литературе появились доказательства участия ИФР2 гиппокампа и медиальной префронтальной коры в когнитивных процессах. Так, при исследовании *post mortem* головного мозга больных шизофренией, характеризующейся выраженными когнитивными нарушениями, было показано снижение экспрессии гена *Igf2* в префронтальной коре (Fromer et al., 2016). Посмертное исследование образцов мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, вызывающей деменцию, также выявило снижение уровня мРНК и самого белка ИФР2 в гиппокампе (Steen et al., 2005). В генетических исследованиях на здоровых добровольцах была обнаружена связь между когнитивными функциями и по-

лиморфизмом участка *Apa1* в гене *Igf2* (Алфинова и др., 2012). В этом исследовании выявлено, что лица с генотипом *AA*, которые характеризуются повышенным содержанием в крови ИФР2, отличаются повышенной продуктивностью избирательного зрительного внимания.

Основные данные, указывающие на участие ИФР2 в когнитивных процессах, были получены на лабораторных животных. Показано, что в гиппокампе крыс после обучения в тесте “Оборонительная реакция пассивного избегания” примерно через 20 ч с момента обучения увеличивается содержание ИФР2, и это является необходимым условием для формирования долгосрочной гиппокамп-зависимой памяти (Chen et al., 2011). При билатеральном введении в дорсальный гиппокамп рекомбинантного ИФР2, но не ИФР1, с последующим тестированием крыс в тесте

“Реакция пассивного избегания” наблюдается улучшение консолидации следов памяти и долговременного хранения информации, проявляющееся в значительном увеличении латентного периода перехода в темный отсек камеры, в том числе через 3 нед после обучения (Lee et al., 2015; Stern et al., 2014). Показано также, что мыши, лишенные регуляторов циркадного ритма *Sharp 1* и *2*, характеризуются повышенной экспрессией гена *Igf2* в передней цингулярной коре и усилением консолидации памяти при выработке условнорефлекторной реакции страха (Shahmoradi et al., 2015). В исследованиях Ouchi и соавт. (Ouchi et al., 2013) установлено снижение экспрессии *Igf2* в гиппокампе взрослых нокаутных по гену *Dgcr8* мышей, являющихся моделью шизофрении, что сопровождалось снижением клеточной пролиферации и нейрогенеза в гиппокампе и ухудшением зависимых от этой мозговой структуры форм обучения.

Помимо когнитивных функций, ИФР2 играет значительную роль в росте и развитии эмбриона. Снижение экспрессии гена *Igf2* в период внутриутробного развития приводит к задержке роста плода и даже его гибели (Bergman et al., 2013). Полагают, что низкий вес новорожденных детей может быть обусловлен, в том числе, изменением содержания ИФР2 в тканях самого плода или в плаценте (Moore et al., 2015; White et al., 2018). ИФР2 в эмбриональный период экспрессируется во многих соматических тканях, но вскоре после рождения экспрессия гена *Igf2* здесь значительно снижается, и функцию посредника между гормоном роста и тканями-мишенями начинает выполнять белок ИФР1. В тканях ЦНС относительно высокий уровень экспрессии гена *Igf2* сохраняется у взрослых особей, хотя и на значительно меньшем уровне, чем в эмбриональный и ранний неонатальный периоды (Ye et al., 2015).

Следует отметить, что низкий вес при рождении служит фактором риска развития в последующей жизни многих заболеваний, таких как метаболический синдром (Gluckman, Hanson, 2004), сердечно-сосудистые заболевания (Alexander et al., 2015) и депрессия (Loret de Mola et al., 2014). Имеются доказательства того, что низкий вес новорожденных может быть обусловлен различными факторами, воздействующими на мать во время беременности (Braithwaite et al., 2018; Sprya et al., 2020). Не только состояние матери во время беременности, но и состояние отца может обуслов-

ливать определенную задержку развития. Так, нами показано, что воздействие на самцов крыс сильного травматического стресса в парадигме “стресс-рестресс”, являющегося моделью посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), задолго (больше месяца) до оплодотворения ими здоровых самок приводит к снижению веса у их потомков мужского и женского пола в неонатальный период развития (Ордян и др., 2020). Кроме того, в наших исследованиях было установлено, что стрессирование самцов крыс в парадигме “стресс-рестресс” перед спариванием значительно ухудшает консолидацию памяти у их потомков-самцов в тесте оборонительной реакции пассивного избегания, усиливает уровень тревожности и депрессивность поведения, что сопровождается снижением экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе (Ордян и др., 2020а). Поскольку у самок – потомков стрессированных отцов – мы также обнаружили изменения в поведении (Ордян и др., 2020б), можно полагать, что способность к обучению и память у этих животных также будут нарушены. Кроме того, остается неизвестным, характерно ли снижение экспрессии гена *Igf2* в мозге в результате отцовского стресса только для взрослых потомков, или изменение экспрессии гена *Igf2* наблюдается и у новорожденных крысят.

В связи с этим в настоящем исследовании было изучено влияние стрессорного воздействия на самца-отца в отношении памяти его потомков обоего пола. Кроме того, в целом мозге новорожденных потомков и в гиппокампе и неокортексе половозрелых потомков изучена экспрессия гена *Igf2*.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на крысах линии Вистар из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище и со сменой темной и светлой фаз суток 12/12 ч. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве Европейского сообщества 2010 г. (2010/63/ЕЕС), и согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Протоколы опытов утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Формирование состояния, подобного ПТСР, у самцов проводили с использованием парадигмы “стресс-рестресс” по методике, описанной ранее (Ордян и др., 2013). Самцов ($n = 10$) в возрасте 3 мес и весом 250–260 г подвергали комбинированному стрессорному воздействию, которое состояло из трех последовательно сменяющихся стрессоров, а именно: двухчасовая иммобилизация в узких пластиковых пеналах, двадцатиминутное плавание в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой с температурой $24 \pm 2^\circ\text{C}$, а после небольшой паузы – эфирный стресс в течение 1 мин. На 7-е сутки после комбинированного стресса производили тридцатиминутную иммобилизацию – так называемый “рестресс”, который служит триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния (Liberzon et al., 1997). Контрольных животных ($n = 10$) оставляли интактными.

Ранее нами было показано, что в парадигме “стресс-рестресс” у самцов уже на 10-й день после рестресса выявляются нарушения функции сперматогенного эпителия, преимущественно в отношении ранних стадий сперматогенеза (Пивина и др., 2019). Для того чтобы у стрессированных животных прошел полный цикл сперматогенеза с учетом его длительности у крыс (48 дней), спаривание контрольных и подопытных самцов с интактными самками осуществляли через 46–48 сут после комбинированного стресса. С этой целью самцов подсаживали поодиночке к двум регулярно циклирующим самкам, находящимся в стадии проэструс–эструс. На следующий день у самок отбирали мазки из влагалища с целью обнаружения сперматозоидов. Беременных самок сразу отсаживали от самцов в клетки по 4–5 особей, а с 17-го дня беременности – в индивидуальные клетки.

Полученные пометы на 2-й день жизни выравняли до 8–10 крысят с равным соотношением полов. От контрольных самцов было получено 20 пометов (каждый самец покрыл 2 самки), а от подопытных самцов – 18 (2 самца покрыли по одной самке). Из каждого помета на 2-й день жизни по 1 самцу и 1 самке умерщвляли, из черепной коробки извлекали целый мозг, который в дальнейшем использовали для анализа экспрессии гена *Igf2*. Немедленно после получения образцы помещали в пробирки с реагентом In-

tactRNA (“Евроген”, Россия) и хранили до выделения РНК при -80°C .

Пометы содержали с матерями до 30-дневного возраста, а далее по 6–7 особей в клетке. В эксперимент брали самцов в возрасте 2.5 мес и весом 230–250 г, а также самок того же возраста и весом 200–220 г, формируя группы таким образом, чтобы в каждой группе присутствовало не более 2 животных из каждого помета с целью исключения влияния поведения матери на крысят. Перед началом тестирования крыс подвергали ежедневному взятию в руки в течение 10 дней. У самок такую процедуру совмещали с исследованием вагинальных мазков, по характеру которых определяли стадию эстрального цикла. В экспериментах использовали только регулярно циклирующих самок, тестирование которых проводили в стадии диэструс в каждом из поведенческих тестов. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 самцов и 10 самок.

Вначале проводили изучение памяти в тесте “Распознавание нового объекта”. Этот тест основан на естественном для грызунов исследовании нового объекта (предпочтении новизны) (Cohen et al., 2015). Тест выполняли в установке “Открытое поле”, которая представляла собой четырехугольную камеру размером $90 \times 90 \times 50$ см. В центре “поля” на высоте 50 см помещали источник света (150 лк). Использовали три объекта округлой формы, выполненных из пластика. Животных предварительно помещали в установку на 5 мин, что способствовало привыканию к ней и снижению стрессорного воздействия новизны обстановки. В первую фазу “ознакомления”, которую проводили через 24 ч после первого помещения животного в установку, крысам позволяли исследовать два незнакомых объекта в течение 5 мин. Фиксировали время исследования каждого объекта (с). Затем крысу помещали в домашнюю клетку. Во второй, “тестовой” фазе, которую проводили через 24 ч после первой фазы, тот объект, который крыса исследовала меньше, меняли на новый объект, сохраняя позиционное положение объектов. После чего в течение 5 мин регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Перед началом теста для каждой последующей крысы установку и объекты протирали перекисью водорода. Для оценки памяти крыс использовали коэффициент распознавания (Кр), отражающий разницу между временем исследования нового и

знакомых объектов по отношению к суммарному времени их исследования. Чем меньше

K_r , тем хуже память распознавания животного (Cohen et al., 2013).

$$K_r = \frac{\text{Время(Объект Новый)} - \text{Время(Объект Знакомый)}}{\text{Время(Объект Новый)} + \text{Время(Объект Знакомый)}}$$

Оборонительную реакцию пассивного избегания (РПИ) вырабатывали в экспериментальной установке, состоящей из двух отсеков: светлого отсека размером 50×50 см и темного отсека размером 15×15 см. Отсеки были разделены автоматически открывающейся дверцей. Пол темного отсека содержал металлические прутья, подключенные к источнику электрического тока. Предварительно животное помещали на 3 мин в светлый отсек камеры с открытой дверцей в темный отсек и регистрировали время перехода крысы в темный отсек. На следующий день проводили обучение (первая сессия): крысу помещали в светлый отсек, через 10 с дверцу в темный отсек открывали. После перехода крысы в темный отсек дверцу закрывали, а животное подвергали электрокожному раздражению током 0.9 мА и длительностью 2 с. Затем животное возвращали в домашнюю клетку. Через 24 ч после первого тестирования крысу вновь помещали в светлый отсек (вторая сессия). Фиксировали латентный период входа животного в темный отсек. Максимальная длительность тестирования составляла 300 с. Результаты теста представлены в процентах, где общее время тестирования принимали за 100%. Поведение животных фиксировали с помощью видеокамеры (CANON, Япония), расположенной над соответствующей установкой, с последующим просмотром видео и анализом параметров поведения на ПК.

Для изучения влияния ПТСР-подобного состояния отцов на экспрессию гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе их половозрелых потомков использовали отдельную группу потомков самцов и самок, рожденных от контрольных или подопытных отцов-самцов. В каждой группе число животных составило по 7 самцов и самок. Количественный анализ экспрессии гена *Igf2* оценивали с применением метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией.

Крыс декапитировали, из черепной коробки извлекали мозг, из которого на льду выделяли гиппокамп и часть неокортекса, содержащую фронтальную и медиальную пре-

фронтальную области. Полученные области мозга помещали в пробирки с реагентом IntactRNA (“Евроген”, Россия) и хранили до выделения РНК при -80°C . Кровь, собранную при декапитации, центрифугировали ($1000 \times g$, 20 мин, $+4^\circ\text{C}$) и далее плазму хранили при температуре -20°C до момента определения содержания в ней тестостерона или эстрадиола. Самок декапитировали в стадии диэструса.

Для выделения тотальной РНК использовали набор Pure Link RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы производителя.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, в присутствии 10 ммоль dNTP, 200 Е/мл обратной транскриптазы MMLV, рассеянной затравки (3 мг/мл) и с добавлением от 100 до 500 нг тотальной РНК. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени проводили на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) с использованием расходных материалов производства ThermoFisher Scientific, США. Для исследования экспрессии гена *Igf2* использовали набор зондов и праймеров (Rn01454518_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген *Hprt1* (Rn01527840_m1, TaqMan® Gene Expression Assays, ThermoFisher Scientific, США). Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Измерения проводили не менее чем в трех параллельных пробах для каждого образца.

Содержание тестостерона в плазме самцов и эстрадиола в плазме самок анализировали методом ИФА, используя стандартные наборы производства “ХЕМА”, Россия, и анализатор Multiskan FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

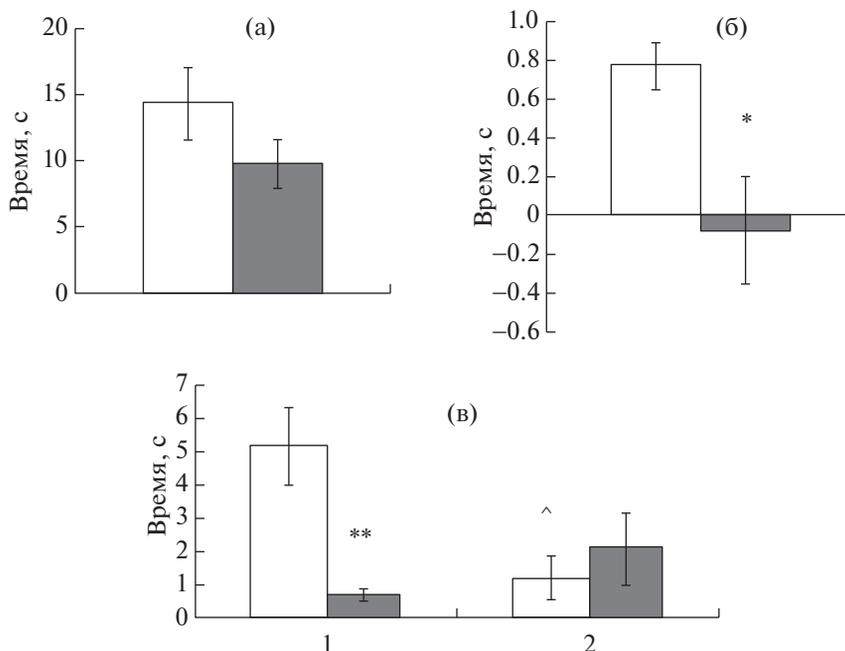


Рис. 1. Влияние стресса отца на память распознавания у потомков-самцов в тесте “Распознавание нового объекта”. (а) – суммарное время исследования объектов в ознакомительной фазе теста. (б) – коэффициент распознавания (K_p). (в) – исследование объектов в “тестовой” фазе. По оси ординат – время в с. По оси абсцисс (в): 1 – время исследования нового объекта; 2 – время исследования знакомого объекта. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. ^ – статистически значимые различия во времени исследования нового и знакомого объекта ($p < 0.01$).

Fig. 1. The influence of paternal stress on recognition memory in the male offspring in novel object recognition task. (а) – total time of the objects examination in the “introductory” phase of the task. (б) – the recognition rate. (в) – the objects examination in the “test” phase of the task. On vertical axis – time in s. On horizontal axis (в): 1 – exploration time of a new object examination; 2 – exploration time of a familiar object. Light bars – the offspring of control fathers. Dark bars – the offspring of stressed fathers. * – the significant differences between the offspring of control and stressed fathers ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. ^ – the significant differences between exploration time of a novel and a familiar objects ($p < 0.01$).

Статистический анализ проводили с использованием параметрических критериев ANOVA и t -критерия Стьюдента и программы “STATISTICA 8.0”. Для проверки гипотезы нормальности распределения данных в выборках использовали критерий Шапиро–Уилка. Для оценки межгрупповых различий (фактор ГРУППА или ПОЛ) в тестах РПИ и “Распознавание нового объекта” использовали однофакторный анализ ANOVA. Результаты показателей экспрессии гена *Igf2* и уровень половых стероидов в плазме крови оценивали с использованием непарного t -критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выполненные исследования показали, что в тесте “Распознавание нового объекта” межполовые различия отсутствуют по всем анализируемым параметрам. В контрольной группе животных у самцов обнаружены статистически значимые различия во времени исследования “нового” и “знакомого” объекта в “тестовой” фазе ($F_{1,19} = 10.3$, $p = 0.005$, рис. 1). Сходные различия были выявлены и у самок – потомков контрольных самцов-отцов ($F_{1,19} = 4.8$, $p = 0.03$, рис. 2).

У самцов – потомков самцов-отцов с ПТСР-подобным состоянием – и потомков контрольных самцов-отцов различий в суммарном времени исследования объектов в “ознакомительной” фазе теста не обнаруже-

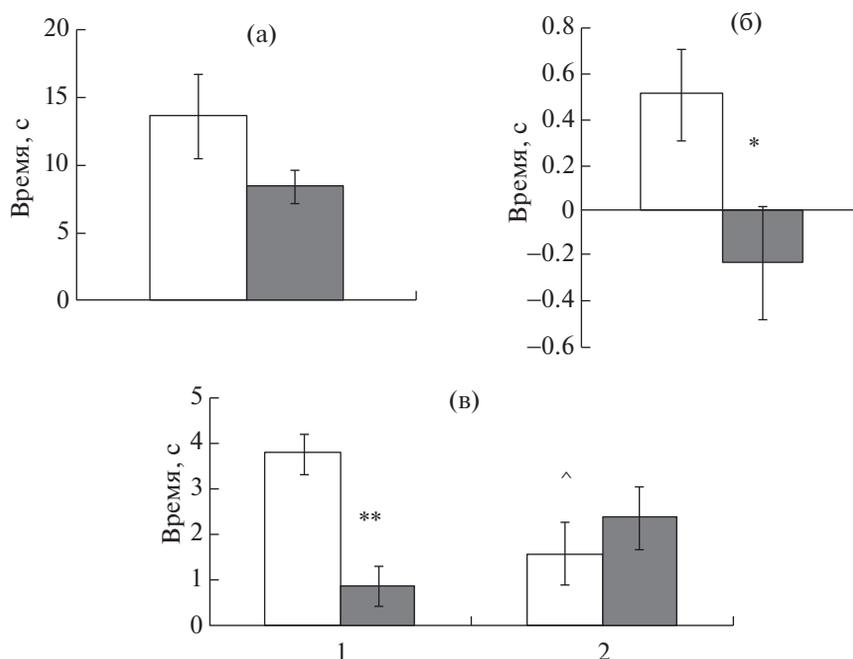


Рис. 2. Влияние стресса отца на память распознавания у потомков-самок в тесте “Распознавание нового объекта”. (а) – суммарное время исследования объектов в ознакомительной фазе теста. (б) – коэффициент распознавания (Кр). (в) – исследование объектов в “тестовой” фазе. По оси ординат – время в с. По оси абсцисс (в): 1 – время исследования нового объекта; 2 – время исследования знакомого объекта. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. ^ – статистически значимые различия во времени исследования нового и знакомого объекта ($p < 0.01$).

Fig. 2. The influence of paternal stress on recognition memory in the female offspring in novel object recognition task. (а) – total time of the objects examination in the “introductory” phase of the task. (б) – the recognition rate. (в) – the objects examination in the “test” phase of the task. On vertical axis – time in s. On horizontal axis (в): 1 – exploration time of a new object examination; 2 – exploration time of a familiar object. Light bars – the offspring of control fathers. Dark bars – the offspring of stressed fathers. * – the significant differences between the offspring of control and stressed fathers ($p < 0.05$), ** – $p < 0.01$. ^ – the significant differences between exploration time of a novel and a familiar objects ($p < 0.01$).

но (рис. 1 (а)), так же как и у самок, рожденных от стрессированных или контрольных самцов-отцов (рис. 2 (а)). Различий во времени исследования “нового” и “знакомого” объекта в “тестовой” фазе не выявлено ни у самцов – потомков стрессированных самцов-отцов ($F_{1,19} = 1.12, p = 0.31$), ни у самок, которые родились от стрессированных самцов-отцов ($F_{1,19} = 3.25, p = 0.09$). При этом Кр статистически значимо различался между потомками контрольных и стрессированных самцов-отцов (потомки-самцы $F_{1,19} = 7.5, p = 0.014$; потомки-самки $F_{1,19} = 5.3, p = 0.035$).

Результаты экспериментов, где исследовали выработку РПИ у потомков подопытных и контрольных самцов-отцов, представлены на рис. 3. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA не выявил межполовых различий

в выработке РПИ у животных – потомков контрольных или стрессированных самцов. Статистический анализ показателей экспериментальных групп выявил, что латентный период захода в темный отсек камеры во время второй сессии обучения был снижен у самцов – потомков стрессированных отцов – по сравнению с контрольными крысами ($F_{(1,19)} = 5.8, p = 0.02$). У самок однофакторный анализ ANOVA не выявил статистически значимого влияния фактора ГРУППА на латентный период захода в темный отсек камеры во второй день тестирования ($F_{(1,19)} = 1.9, p = 0.2$).

Анализ экспрессии гена *Igf2* у новорожденных крысят не выявил статистически значимых различий ни между самцами и самками, родившимися от контрольных самцов, ни между животными – потомками кон-

трольных или стрессированных самцов-отцов (рис. 4 (а)). Тем не менее у половозрелых крыс обнаружены статистически значимые различия между самцами и самками, где экспрессия гена *Igf2* была существенно более высокой у самок как в неокортексе (рис. 4 (б)), так и в гиппокампе (рис. 4 (в)). Кроме того, экспрессия гена *Igf2* у самцов – потомков стрессированных отцов – была достоверно снижена в неокортексе (фронтальная и медиальная префронтальная кора) и гиппокампе по сравнению с потомками контрольных отцов, тогда как у самок статистически значимых различий в экспрессии исследованного гена не выявлено ни в одной из исследованных структур мозга.

Анализ содержания тестостерона в плазме крови потомков-самцов показал статистически значимое снижение уровня гормона у самцов – потомков стрессированных отцов (рис. 5 (а)). Статистически значимых различий в уровне эстрадиола между самками – потомками контрольных или стрессированных отцов – не выявлено (рис. 5 (б)).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши исследования показали, что стрессирование самцов-отцов в период сперматогенеза оказывает существенное влияние на память потомков. Значительные изменения в процессах памяти были обнаружены у потомков обоего пола в тесте “Распознавание нового объекта”. Самцы и самки, родившиеся от стрессированных отцов, демонстрируют ухудшение памяти об объектах, что проявлялось в снижении Кр, отражающего различие нового и знакомого объекта. Такое изменение памяти подопытных крыс, вероятнее всего, не связано с изменением их исследовательской активности, так как в “ознакомительной” фазе тестирования они исследовали объекты такое же время, как и потомки контрольных самцов. Кроме того, в предыдущих исследованиях мы обнаружили влияние стресса отца только на локомоторную активность потомков-самцов в тесте “Открытое поле”, но не на исследовательскую, оцениваемую по числу вертикальных стоек. При этом у потомков-самок эти показатели ориентировочно-исследовательской активности не менялись (Ордян и др., 2020). Нельзя исключить, что снижение Кр, свидетельствующее о нарушении памяти об объекте у самцов – потомков стрессированных самцов-отцов, свя-

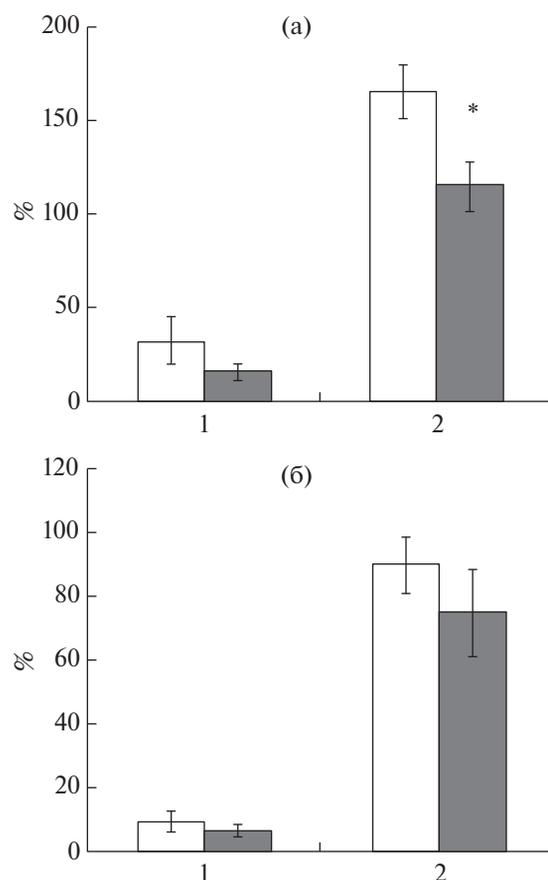


Рис. 3. Выработка рефлекса пассивного избегания самцов (а) и самок (б) крыс – потомков отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме “стресс-рестресс”. По оси ординат – латентный период захода в темный отсек камеры в % от общего времени тестирования (300 с). По оси абсцисс – день тестирования. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$).

Fig. 3. Acquisition of passive avoidance in the male (а) and female (б) offspring of fathers exposed to stress in the “stress-restress” paradigm. On vertical axis – latency to enter the dark compartment of the chamber, % of total test duration (300 s). On horizontal axis – day of testing. Light bars – the offspring of control fathers. Dark bars – the offspring of stressed fathers. * – the significant differences between the offspring of control and stressed fathers ($p < 0.05$).

зано с нарушением внимания у этих животных, учитывая данные, полученные М.В. Алфимовой и соавт. в исследованиях на людях, о роли ИФР2 именно в продуктивности избирательного внимания при зрительном поиске (Алфимова и др., 2012).

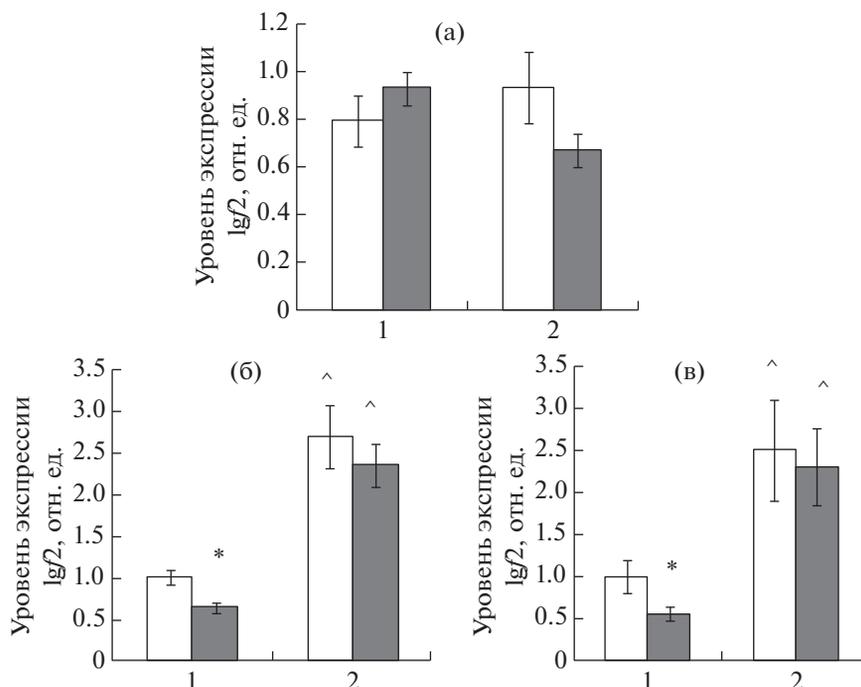


Рис. 4. Влияние стресса отца на уровень экспрессии гена *Igf2* в мозге потомков. (а) – новорожденные крысята (2-й день жизни). (б) – уровень экспрессии *Igf2* в неокортексе взрослых крыс; (в) – в гиппокампе. По оси абсцисс: 1 – самцы крыс, 2 – самки крыс. Светлые столбики – потомки контрольных самцов. Темные столбики – потомки стрессированных отцов. * – статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.05$). ^ – статистически значимые различия между самцами и самками крыс ($p < 0.01$).

Fig. 4. The influence of paternal stress on the *Igf2* gene expression in the offspring brain. (а) – newborn rats (2nd day of life). (б) – *Igf2* expression in the neocortex of adult rats. (в) – in the hippocampus. On horizontal axis: 1 – male rats; 2 – female rats. Light bars – the offspring of control fathers. Dark bars – the offspring of stressed fathers. * – the significant differences between the offspring of control and stressed fathers ($p < 0.05$). ^ – the significant differences between male and female rats ($p < 0.01$).

Межполовые различия в эффектах стресса отца нами обнаружены при исследовании выработки РПИ, где наиболее существенные изменения были выявлены у потомков-самцов. У этих животных обнаружен дефицит памяти, что проявилось в сниженном латентном периоде захода в темный отсек камеры на следующий день после обучения. При этом самки – потомки стрессированных отцов – не отличались от контрольных самок показателем консолидации следов памяти в этом тесте.

Следует отметить, что снижение экспрессии гена *Igf2* в неокортексе и гиппокампе было выявлено только у самцов, родившихся от стрессированных самцов-отцов, по сравнению с потомками контрольных крыс, тогда как у самок изменений по этому показателю не обнаружено. Различия в экспрессии гена *Igf2* в мозге самцов – потомков подопытных или контрольных отцов – наблюдали только

у взрослых животных, тогда как у новорожденных крыс такие различия выявлены не были.

Исследователями предпринимались попытки выявить влияние стресса отца до зачатия на способность к обучению их потомков. Однако данные, полученные в этих исследованиях, противоречивы. Yeshurun и соавт. показали, что длительное введение с питьем самцам мышей кортикостерона с целью моделирования хронического стресса нарушает процесс реконсолидации памяти только у потомков-самок при тестировании пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Yeshurun et al., 2017). Другие авторы, используя хроническое умеренное стрессирование самцов крыс в течение 27 дней (ежедневная иммобилизация в условиях повышенной освещенности в течение 30 мин дважды в день), не выявили изменений в обучении в аналогичном тесте у их потомков, самцов и самок

(Harker et al., 2018). Кроме того, рядом авторов показано, что изменения в поведенческом фенотипе в результате стрессирования отцов до зачатия более выражены у самцов, чем у самок (Short et al., 2016), или вообще не проявляются (Rodgers et al., 2013).

В литературе имеются указания на значимость неблагоприятных воздействий на организм матери или отца в отношении экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе потомков. Так, в исследованиях, где изучали последствия ограничения калорийности питания у самок крыс во время беременности (8–21-й день), показано повышение экспрессии этого гена в гиппокампе потомков-самок первого и второго поколения, но не потомков-самцов (Harper et al., 2014). Также было проведено исследование, где изучены последствия стрессирования мышей-отцов, которое моделировали хроническим введением кортикостерона, на экспрессию гена *Igf2* в гиппокампе потомков обоего пола (Short et al., 2016). Эти авторы показали, что в возрасте 8 нед у потомков-самок наблюдается снижение экспрессии этого гена, а у потомков-самцов — напротив, повышение. Интересно, что в этом исследовании существенных изменений в поведении и выработке условно-рефлекторной реакции страха у самок этого возраста не обнаружено, тогда как у самцов выявлено повышение уровня тревожности и депрессивности поведения.

Вероятно, подобные различия определяются тем, что в указанных работах авторы использовали разные парадигмы стрессорных воздействий. Кроме того, в этих исследованиях самцов-отцов подвергали воздействиям, создающим хронически повышенный уровень глюкокортикоидных гормонов в крови, тогда как использованная нами парадигма “стресс-рестресс”, являющаяся экспериментальной моделью ПТСР, подразумевает применение к крысам комбинированного стресса, который включает несколько последовательно применяющихся стрессорных процедур разной модальности и общей длительности воздействия более 2 ч, а также повторного стрессорного воздействия через 7 сут, что приводит к длительному снижению уровня кортикостерона в крови (Ордян и др., 2013; Пивина и др., 2014). Однако что в данном случае является критическим для нарушения памяти потомков — характер стрессорного воздействия или сниженный уро-

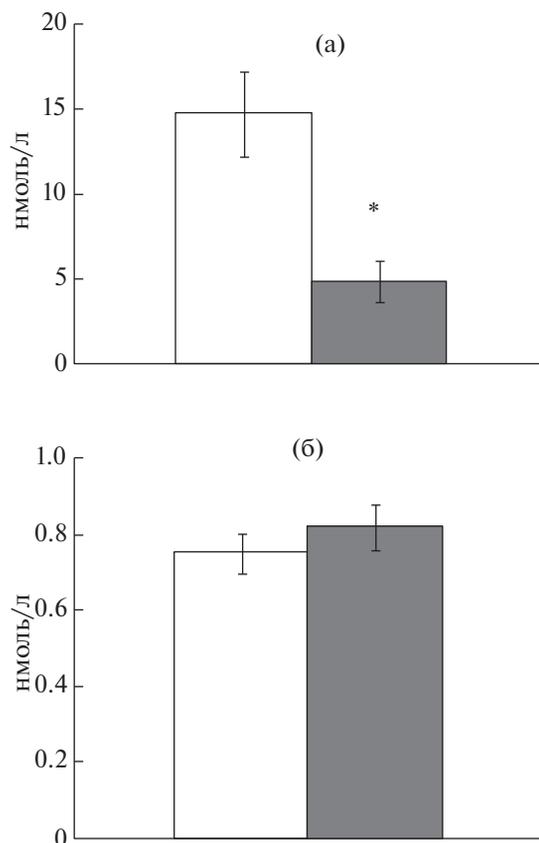


Рис. 5. Содержание половых стероидных гормонов в плазме крови потомков контрольных и стрессированных отцов. (а) — уровень тестостерона в крови самцов. (б) — уровень эстрадиола в крови самок. Светлые столбики — потомки контрольных самцов. Темные столбики — потомки стрессированных отцов. * — статистически значимые различия между потомками контрольных и стрессированных отцов ($p < 0.01$).

Fig. 5. Plasma level of sex steroid hormones in the offspring of control and stressed fathers. (a) — testosterone level in male rats. (b) — estradiol level in female rats. Light bars — the offspring of control fathers. Dark bars — the offspring of stressed fathers. * — the significant differences between the offspring of control and stressed fathers ($p < 0.01$).

вень кортикостерона в крови отцов — еще предстоит выяснить.

Интересны обнаруженные нами межполовые различия в экспрессии гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе половозрелых, но не новорожденных крыс. В исследованиях Takeo и соавт. показано, что экспрессия гена *Igf2* в некоторых тканях, в том числе в нейронах гиппокампа, увеличивается под воздействием эстрадиола (Takeo et al., 2009). Именно уровнем эстрадиола, который у половозрелых самок существенно выше, чем у самцов,

можно объяснить выявленные нами межполовые различия в экспрессии данного гена в мозге половозрелых животных. Кроме того, показано, что у овариэктомированных крыс улучшение памяти, вызванное введением эстрадиола, сопровождается увеличением количества ИФР2 в гиппокампе (Sárvár et al., 2015). Эти данные дают дополнительную информацию о вовлеченности ИФР2 гиппокампа в процессы, связанные с памятью. Вероятно, отсутствие существенных изменений в формировании памяти у самок – потомков стрессированных отцов – определяется в том числе сходным с контрольными самками уровнем эстрадиола крови. Может ли у подопытных самцов снижение экспрессии гена *Igf2* в мозге быть связано со снижением у них уровня тестостерона – неизвестно, и хотя многие эффекты тестостерона в мозге самцов реализуются через его ароматизацию и синтез эстрадиола (Cooke et al., 2017; Frick et al., 2018), данные о влиянии уровня тестостерона на ген *Igf2* в литературе отсутствуют.

Тем не менее остается неясным вопрос о механизмах нарушения памяти в тесте “Распознавание нового объекта” у самок, родившихся от стрессированных самцов. Следует отметить, что формирование памяти в данном тесте регулируется не только гиппокампом, но и периринальной корой. При этом гиппокамп ответственен за формирование “сильной” памяти в тесте “Распознавание нового объекта”, а периринальная кора – “слабой” (Cinalli et al., 2020). Используемая нами модификация теста “Распознавание нового объекта” подразумевает формирование “слабой” памяти, которая возникает при суммарном исследовании объектов в “ознакомительной” фазе теста около 10 с. При этом “сильная” память развивается при суммарном исследовании двух объектов в “ознакомительной” фазе не менее 38 с, что требует предъявления животным исследуемых объектов в течение не менее трех последовательных дней (Cohen et al., 2015).

Роль ИФР2 в формировании памяти об объектах в обоих вариантах неизвестна. Хотя недавно было показано, что эффекты ИФР2 на гиппокамп-зависимую память опосредуются через взаимодействие этого ростового фактора с ИФР2-рецептором, известным как катион-независимый рецептор маннозо-6-фосфата (М6Ф), который специфически связывает ИФР2, но не взаимодействует с ИФР1 и инсулином (Yu et al., 2020). Вовлеченность

данного рецептора в гиппокамп-зависимую память эти авторы исследовали не только в отношении выработки РПИ, но и в отношении памяти в тесте “Распознавание нового объекта”. Выявлено, что мыши с дефицитом гиппокампального М6Ф/ИФР2-рецептора в результате нокдауна хуже различают новый и знакомый объект. Кроме того, эти авторы показали, что связывание данного рецептора с ИФР2 имеет критическое значение для консолидации памяти, но не влияет на сам процесс обучения и реконсолидацию памяти.

Следует отметить, что М6Ф/ИФР2-рецептор не связан ни с какими вторичными посредниками. Долгое время считалось, что основная функция этого рецептора заключается в транспорте связавшихся с ним молекул в лизосомы и их деградацию (Brown et al., 2009). Тем не менее Yu и соавт. (Yu et al., 2020) установили, что этот рецептор вовлечен в контроль увеличения синтеза *de novo* в гиппокампе ряда белков, являющихся продуктами ранних генов, таких как *Arc*, *Fos* и *Egr1*, быстрая индукция которых на уровне трансляции и транскрипции наблюдается при обучении. Показано, что такая индукция ранних генов необходима для формирования памяти (Gallo et al., 2018). Для выяснения вовлеченности М6Ф/ИФР2-рецептора в выявленные нами изменения памяти у потомков стрессированных самцов нужны дальнейшие исследования.

Обсуждая возможные механизмы действия стресса отца на различные функции потомков, отметим, что в настоящее время в качестве основного механизма рассматривается эпигенетическая модификация генома в сперматозоидах, связанная с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией микроРНК (Day et al., 2016; Morgan et al., 2019). Такая эпигенетическая модификация генома может осуществляться только в зреющих сперматозоидах на стадиях от сперматогониев до сперматид (Vale, 2014). Поскольку в наших исследованиях спаривание стрессированных самцов с самками осуществляли после полного цикла созревания сперматозоидов, любой из этих механизмов может быть вовлечен в эффекты стресса отцов на потомков.

Кроме того, экспрессия импринтированных генов, к которым относится и ген *Igf2*, строго зависит от метилирования особой регуляторной последовательности на хромосоме, представляющей из себя центр импринтинга (ЦИ). Метилирование ЦИ происходит

в период гаметогенеза, его паттерн различен на хромосомах материнского и отцовского происхождения, что определяет специфичность экспрессии генов, находящихся в импринтированном локусе. Ген *Igf2* по-разному метилирован на аллеле отцовского и материнского происхождения, в результате чего его экспрессия осуществляется преимущественно на отцовском аллеле (Nordin et al., 2014). Однако такая моноаллельная экспрессия *Igf2* характерна только для соматических тканей, тогда как в ЦНС наблюдается биаллельная экспрессия данного гена (Ye et al., 2015). Вопрос о том, за счет отцовского или материнского аллеля снижается экспрессия *Igf2* у самцов, родившихся от стрессированных отцов, и наблюдается ли при этом нарушение импринтинга данного гена, требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что стрессирование самцов крыс в период сперматогенеза в парадигме “стресс-рестресс” вызывает у их половозрелых потомков обоего пола нарушение памяти в тесте “Распознавание нового объекта”. Только у самцов, родившихся от стрессированных отцов, наблюдали дефицит памяти в тесте “Реакция пассивного избегания”. Снижение экспрессии гена *Igf2* в неокортексе и гиппокампе было выявлено только у самцов, родившихся от стрессированных отцов, тогда как у самок влияние стресса самцов-отцов на экспрессию данного гена не обнаружено. Различия в экспрессии гена *Igf2* в мозге самцов – потомков подопытных или контрольных отцов – наблюдали только у взрослых животных, тогда как у новорожденных крыс такие различия выявлены не были. Полученные данные впервые демонстрируют влияние ПТСР-подобного состояния самцов-отцов в период сперматогенеза на память их потомков, а также дают дополнительные сведения о роли снижения экспрессии ИФР2 мозга в дефиците памяти.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-015-00186.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алфимова М.В., Лежейко Т.В., Гриценко И.К., Голимбет В.Е. Ассоциация гена инсулиноподобного фактора роста II (*Igf2*) с когнитивными способностями человека. Генетика. 2012. 48 (8): 993–998.
- Ордян Н.Э., Мальшева О.В., Акулова В.К., Пивина С.Г., Холова Г.И. Способность к обучению и экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста II в мозге самцов крыс – потомков отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме “стресс-рестресс”. Нейрохимия. 2020а. 37 (2): 153–160.
- Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Акулова В.К., Холова Г.И. Изменение характера поведения и активности гипофизарно-адренкортикальной системы крыс – потомков отцов, подвергнутых стрессированию в парадигме “стресс-рестресс” перед спариванием. Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020б. 106 (9):1085–1097.
- Ордян Н.Э., Смоленский И.В., Пивина С.Г., Акулова В.К. Особенности формирования тревожно-депрессивного состояния в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства у пренатально стрессированных самцов крыс. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2013. 63 (2):1–10.
- Пивина С.Г., Акулова В.К., Ракицкая В.В., Ордян Н.Э. Развитие поведенческих и гормональных нарушений в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства у пренатально стрессированных самок крыс. Бюлл. Эксперим. Биол. Мед. 2014.157 (3): 289–293.
- Пивина С.Г., Холова Г.И., Ракицкая В.В., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Изменение репродуктивных функций самцов крыс при моделировании посттравматического стрессового расстройства. Журнал эвол. биохим. физиол. 2019. 55 (5): 374–376.
- Alexander B.T., Dasinger J.H., Intapad S. Fetal programming and cardiovascular pathology. Compr. Physiology. 5. (2): 997–1025. 2015.
- Bale T.L. Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming. Dialogues Clin. Neurosci. 2014.16: 297–305.
- Bergman D., Halje M., Nordin M., Engström W. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. Gerontology. 2013. 59: 240–249.
- Braithwaite E.C., Jonathan Hill J., Pickles A., Glover V., Kieran O'Donnell K., Sharp H. Associations between maternal prenatal cortisol and fetal growth are specific to infant sex: findings from the Wirral child health and development study. J. Dev. Orig. Health Dis. 2018. 9 (4): 425–431.
- Brown J., Jones E.Y., Forbes B.E. Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and

- biological outcomes. *Vitam. Horm.* 2009. 80: 699–719.
- Chen D.Y., Stern S.A., Garcia-Osta A., Saunier-Rebori B., Pollonini G., Bambah-Mukku D., Blitzer R.D., Alberini C.M. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature*. 2011. 469: 491–497.
- Cinalli D.A., Cohen S.J., Guthrie K., Stackman R.W. Object recognition memory: distinct yet complementary roles of the mouse CA1 and perirhinal cortex. *Front. Mol. Neurosci.* 2020. 13: 527543.
- Cohen S.J., Munchow A.H., Rios L.M., Zhang G., Ásgeirsdóttir, H.N., Robert Stackman R. W. The rodent hippocampus is essential for non-spatial object memory. *Curr. Biol.* 2013. 23 (17): 1685–1690.
- Cohen S.J., Stackman R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object behavior. *Brain Res.* 2015. 285: 105–117.
- Cooke P.S., Nanjappa M.K., Ko C., Prins G.S., Hess R.A. Estrogens in male physiology. *Physiol. Rev.* 2017. 97 (3): 995–1043.
- Frick K.M., Tuscher J.J., Koss W.A., Kim J., Taxier L.R. Estrogenic regulation of memory consolidation: A look beyond the hippocampus, ovaries, and females. 2018. *Physiol. Behav.* 187 (1): 57–66.
- Fromer M., Roussos P., Sieberts S.K., Johnson J.S., Kavanagh D.H., Perumal T.M., Ruderfer D.M., Oh E.C., Topol A., Shah H.R., Klei L.L., Kramer R., Pinto D., Gümüş Z.H., Cicek A.E., Dang K.K., Browne A., Lu C., Xie L., Readhead B., Stahl E.A., Xiao J., Parvizi M., Hamamsy T., Fullard J.F., Wang Y.C., Mahajan M.C., Derry J.M., Dudley J.T., Hemby S.E., Logsdon B.A., Talbot K., Raj T., Bennett D.A., De Jager P.L., Zhu J., Zhang B., Sullivan P.F., Chess A., Purcell S.M., Shinobu L.A., Mangravite L.M., Toyoshiba H., Gur R.E., Hahn C.G., Lewis D.A., Haroutunian V., Peters M.A., Lipska B.K., Buxbaum J.D., Schadt E.E., Hirai K., Roeder K., Brennand K.J., Katsanis N., Domenici E., Devlin B., Sklar P. Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nat. Neurosci.* 2016. 19 (11): 1442–1453.
- Day J., Savani S., Krempley B.D., Nguyen M., Kitlinska J.B. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. *Am. J. Stem Cells.* 2016. 5 (1): 11–18.
- Gallo F.T., Katche C., Morici J.F., Medina J.H., Weisstaub N.V. Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on c-Fos, Egr1 and arc. *Front. Behav. Neurosci.* 2018. 12: 180.
- Gluckman P.D., Hanson M.A. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 2004. 15 (4): 183–187.
- Harker A., Carroll C., Raza S., Kolb B., Gibb R. Preconception paternal stress in rats alters brain and behavior in offspring. *Neuroscience.* 2018. 388: 474–485.
- Harper K.M., Tunc-Ozcan E., Graf E.N., Herzing L.B., Redei E.E. Intergenerational and parent of origin effects of maternal calorie restriction on IGF2 expression in the adult rat hippocampus. *Psychoneuroendocrinol.* 2014. 45: 187–91.
- Lee Y., Lee Y.W., Gao Q., Lee Y., Lee H.E., Ryu J.H. Exogenous insulin-like growth factor 2 administration enhances memory consolidation and persistence in a time-dependent manner. *Brain Res.* 2015. 1622: 466–473.
- Liberzon I., Krstov M., Young E.A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology.* 1997. 22 (6): 443–453.
- Loret de Mola C., de França G.V., Quevedo Lde A., Horta B.L. Low birth weight, preterm birth and small for gestational age association with adult depression: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Psychiatry.* 2014. 205 (5): 340–347.
- Moore G.E., Ishida M., Demetriou C., Al-Olabi L., Leon L.J., Thomas A.C., Abu-Amero S., Frost J.M., Stafford J.L., Chaoqun Y., Duncan A.J., Baigel R., Brimioulle M., Iglesias-Platas I., Apostolidou S., Aggarwal R., Whittaker J.C., Syngelaki A., Nicolaidis K.H., Regan L., Monk D., Stanier P. The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 2015. 370 (1663): 20140074.
- Morgan C.P., Chan J.C., Bale T.L. Driving the next generation: paternal lifetime experiences transmitted via extracellular vesicles and their small RNA. *Cargo Biologic. Psychiat.* 2019. 85: 164–171.
- Nordin M., Bergman D., Halje M., Engström W., Ward A. Epigenetic regulation of the IGF2/H19 gene cluster. *Cell Prolif.* 2014. 47 (3): 189–199.
- Ouchi Y., Banno Y., Shimizu Y., Ando S., Hasegawa H., Adachi K., Iwamoto T. Reduced adult hippocampal neurogenesis and working memory deficits in the Dgcr8-deficient mouse model of 22q11.2 deletion-associated schizophrenia can be rescued by IGF2. *J. Neurosci.* 2013. 33 (22): 9408–9419.
- Rodgers A.B., Morgan C.P., Bronson S.L., Revello S., Bale T.L. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprogramming offspring HPA axis stress regulation. *J. Neurosci.* 2013. 33 (21): 9003–9012.
- Sárvár M., Kalló I., Hrabovsz, E., Solymosi N., Rodoloss A., Vastag C., Auer H., Liposits Z. Hippocampal gene expression is highly responsive to estradiol replacement in middle-aged female rats. *Endocrinology.* 2015. 156: 2632–2645.
- Shahmoradi A., Radyushkin K., Rossne, M.J. Enhanced memory consolidation in mice lacking the circadian modulators Sharp1 and -2 caused by elevated IGF2 signaling in the cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. 112: E3582–3589.
- Short A.K., Fennell K.A., Perreau V.M., Fox A., O'Bryan M.K., Kim J.H., Bredy T.W., Pang T.Y., Hannan A.J. Elevated paternal glucocorticoid expo-

- sure alters the small noncoding RNA profile in sperm and modifies anxiety and depressive phenotypes in the offspring. *Transl. psychiatry*. 2016. 6 (6): e837–e837.
- Spry E.A., Wilson C.A., Middleton M., Moreno-Betancur M., Doyle L.W., Howard L.M., Hannan A.J., Wlodek M.E., Cheong J.L.Y., Hines L.A., Coffey C., Brown S., Olsson C.A., Patton G.C.* Parental mental health before and during pregnancy and offspring birth outcomes: A 20-year preconception cohort of maternal and paternal exposure. *EClinical Medicine*. 2020. 27: 100564.
- Steen E., Terry B.M., Rivera E.J., Cannon J.L., Neely T.R., Tavares R., Xu X.J., Wands J.R., de la Mont S.M.* Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease- is this type3 diabetes? *J. Alzheimer Dis.* 2005. 7 (1): 63–80.
- Stern S.A., Chen D.Y., Alberini C.M.* The effects of insulin and insulin-like growth factors on hippocampus- and amygdale-dependent long-term memory formation. *Learn. Memory*. 2014. 21: 556–563.
- Takeo C., Ikeda K., Horie-Inoue K., Inoue S.* Identification of IGF2, Igfbp2 and Enpp2 as estrogen-responsive genes in rat hippocampus. *Endocr. J.* 2009. 56 (1):113–120.
- White V., Jawerbaum A., Mazzucco M.B., Gauster M., Desoye G., Hiden U.* IGF2 stimulates fetal growth in a sex- and organ-dependent manner. *Pediatr. Res.* 2018. 83 (1): 183–189.
- Ye X., Kohtz A., Pollonini G., Riccio A., Alberini C.M.* Insulin like growth factor 2 expression in the rat brain both in basal condition and following learning predominantly derives from the maternal allele. *PLoSOne*. 2015. 10: e0141078.
- Yeshurun S., Rogers J., Short A.K., Hannana A.J.* Elevated paternal glucocorticoid exposure modifies memory retention in female offspring. *Psychoneuroendocrin.* 2017. 83 (1): 9–18.
- Yu X.-W., Pandey K., Katzman A.C., Alberini C.M.* A role for CIM6P/IGF2 receptor in memory consolidation and enhancement. *eLife*. 2020. 9: e54781.

SEX-DEPENDENT INFLUENCE OF MALE RAT STRESS ON THE MEMORY AND EXPRESSION OF THE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 2 GENE IN THE OFFSPRING BRAIN

N. E. Ordyan^{a,#}, O. V. Malysheva^{a,b}, G. I. Holova^a, V. K. Akulova^a, and S. G. Pivina^a

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^b D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: neo@infran.ru

The consequences of preconception of paternal stress in the “stress-restress” paradigm (the model of post-traumatic stress disorder, PTSD) on memory and expression of the insulin-like growth factor 2 gene (*Igf2*) in some brain structures of their adult offspring of both sexes were studied. The expression of the *Igf2* was additionally investigated in newborn offspring. It has been shown that paternal stress causes a memory deficit in passive avoidance test and recognition of a novel object, mainly in the male offspring. In the female offspring, memory deficit was found only in relation to object recognition memory. Only the male offspring showed a decrease in the expression of the *Igf2* in the hippocampus and neocortex in adult, but not newborn males. The results obtained indicate sex-specific effects of the PTSD-like symptoms of male fathers on memory and expression of the *Igf2* in the brains of adult offspring.

Keywords: paternal stress, offspring, passive avoidance, novel object recognition, insulin-like growth factor 2, brain, male, female, rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.64, 57.024

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОГО ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА САМОК КРЫС ДО И ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ НА СЕНСОМОТОРНОЕ РАЗВИТИЕ, УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ПОТОМСТВА

© 2021 г. О. В. Яковлева^{1,*}, К. С. Богатова¹, В. В. Скрипникова¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹ Кафедра физиологии человека и животных, ИФМиБ, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: a-olay@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020 г.

После доработки 23.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

В нашей работе исследовали влияние умеренного непредсказуемого хронического стресса у самок крыс в течение двух недель до наступления и двух недель во время беременности на развитие потомства в период от рождения до 3 месяцев жизни. Воздействие прегестационного стресса приводило к повышению тревожности самок уже к началу беременности, которая сохранялась и в первую неделю лактации. Пренатальный стресс приводил к уменьшению размера помета, снижению массы тела детенышей, отставанию в физическом развитии и созревании некоторых сенсомоторных рефлексов в первые две недели после рождения. Сниженная в первые две недели двигательная активность восстанавливалась к 26-му дню жизни (P), изменений мышечной силы и двигательной координации у крыс не выявили. Во всех анализируемых возрастах (P16, 26, 80) наблюдали снижение исследовательской активности и повышение уровня тревожности. Нарушение процессов обучения, пространственной и непространственной памяти было показано в тесте водный лабиринт Морриса (P21–22) и тесте на распознавание нового объекта (P72–90). Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что умеренный стресс самок до и во время беременности приводит не только к нарушениям физического и неврологического развития в раннем онтогенезе, но также и повышению уровня тревожности и когнитивным дисфункциям, сохраняющимся во взрослом периоде жизни потомства.

Ключевые слова: хронический пренатальный стресс, сенсомоторное развитие, двигательная и исследовательская активность, координация движений, обучение, память, тревожность

DOI: 10.31857/S0044467721030138

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия большое внимание уделяется проблеме воздействия стресса, переживаемого матерью, на потомков. Значительный объем эпидемиологических данных и экспериментальных исследований показал, что стресс матери во время беременности приводит к нарушению поведения, психическим и когнитивным расстройствам у несовершеннолетних и взрослых потомков (Weinstock, 2005; 2008; Ордян, 2006; Meyers, 2018; Стратилев и др., 2020). Так, показано, что материнский стресс приводит к преждевременным родам (до 37-й недели), рождению детей с низкой массой тела (менее 2.5 кг) (Rondo et al., 2003), беспокойству де-

тей в первые полгода жизни (Davis et al., 2007), замедлению развития ходьбы, речи, приучения к туалету (Meyers, 2018). Ряд исследователей связывают материнский стресс с появлением у детей эмоциональных проблем, гиперактивности, дефицита внимания и синдрома Тауретта (Davis, Sandman, 2012, Meyers, 2018; Стратилев и др., 2020). Кроме того, пренатальный стресс ассоциируют с более высоким риском заболевания шизофренией, инсультом и болезнью Паркинсона (Shrīga, 2019), депрессиями и злоупотреблением наркотиками в поздний постнатальный период (Стратилев и др., 2020) и сердечно-сосудистыми заболеваниями (Czarzasta et al., 2019).

Для моделирования пренатального стресса у животных часто используют инъекции гидрокортизона, воздействие одного стрессора (иммобилизация) (Ордян и др., 2006; Czarzasta et al., 2019) или комбинацию двух стрессоров (иммобилизация и инъекция, иммобилизация и яркий свет) (Fride, Weinstock, 1984; Holubova et al., 2017). Однако воздействие одного и того же фактора может приводить к привыканию животных (Fride, Weinstock, 1984). Поэтому для создания хронического умеренного непредсказуемого стресса применяют различные меняющиеся стрессоры, которые характеризуются небольшой силой и действуют в течение длительного времени, не вызывая адаптации (Willner, 2017; Huang et al., 2010).

Как правило, моделирование стресса у самок начинается со второй/третьей недели беременности, что исключает развитие стресса в начальный период беременности, а кроме того, такие исследования в основном фокусируются на отдельных возрастных периодах развития потомства (Hougaard et al., 2005; 2011; Николаева, Белолобская, 2012; Jafari et al., 2019). При этом только несколько работ посвящены изучению прегестационного стресса самок на развитие потомства. В одном из таких исследований оценивали влияние умеренного хронического непредсказуемого стресса в течение трех недель до беременности на когнитивные функции взрослых потомков (Huang et al. 2010), а в другой использовали иммобилизационный стресс в прегестационный период для оценки депрессии у самок и развитие потомства (Czarzasta et al., 2019).

Целью нашей работы было проанализировать влияние умеренного хронического непредсказуемого стресса самок до и во время беременности на физическое и сенсомоторное развитие, силу мышц и координацию движений, уровень тревожности и когнитивные способности их потомства в ранний и отсроченный постнатальный периоды. Мы также оценили уровень тревожности самок до и во время беременности, а также в период лактации.

МЕТОДИКА

Объектом исследования были крысы линий Wistar обоего пола в возрасте от 2 до 90 дней жизни (P). Животные содержались в условиях вивария КФУ в полипропиленовых клетках (32 × 40 × 18 см) при стабильной ком-

натной температуре, 12-часовом режиме дня/ночи и свободном доступе к корму и воде. Эксперименты проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU для проведения экспериментов на животных и одобрены Локальным этическим комитетом КФУ.

Самок крыс Wistar содержали по 2–3 особи в клетке в стандартных условиях вивария. Самок разделили на две группы – контрольную ($n = 8$) и с моделью хронического стресса ($n = 9$). До начала эксперимента самки были протестированы на уровень тревожности с помощью тестов темно-светлая камера и открытое поле. Для формирования умеренного хронического стресса крысы подвергались воздействию непредсказуемых стимулов с ежедневным тестированием на уровень тревожности в течение 14 дней. Затем в каждую клетку подсаживали самца для спаривания на одну неделю (Czarzasta et al., 2019), и через неделю после отсадки воздействие стресса повторялось еще 14 дней (рис. 1 (а)). У 7 самок из контрольной группы и 6 самок из группы животных, подвергающихся хроническому стрессу, наступила беременность. Уровень тревожности самок оценивали каждую неделю во время беременности и через неделю после родов во время лактации согласно схеме (рис. 1 (а–в)). За 1–2 дня до родов беременных самок рассаживали в индивидуальные клетки. После рождения крысят находились с матерью 30 дней без ограничения доступа к воде и пище.

Умеренный хронический непредсказуемый стресс формировали путем воздействия следующих факторов: белый шум, наклон клетки под углом 30°, искусственная освещенность в течение темного периода суток и затемненность в течение светлого периода суток, пищевая депривация, отсутствие подстилки в клетке. Время действия каждого стрессора составило 12 ч в сутки в течение 6 дней. При этом один и тот же стрессор не повторялся в течение недели для того, чтобы не возникло привыкание (Ragan et al., 2013).

Потомство было разделено на 2 группы: 1) контрольная – крысята ($n = 61$, $N = 7$, где n – количество крысят в эксперименте, N – количество пометов), рожденные контрольными самками; 2) Стресс – крысята ($n = 36$, $N = 6$), рожденные от самок, находящихся 14 дней до и 14 дней во время беременности в условиях хронического умеренного непредсказуемого стресса (рис. 1 (а)). У животных всех групп определяли вес при рождении и

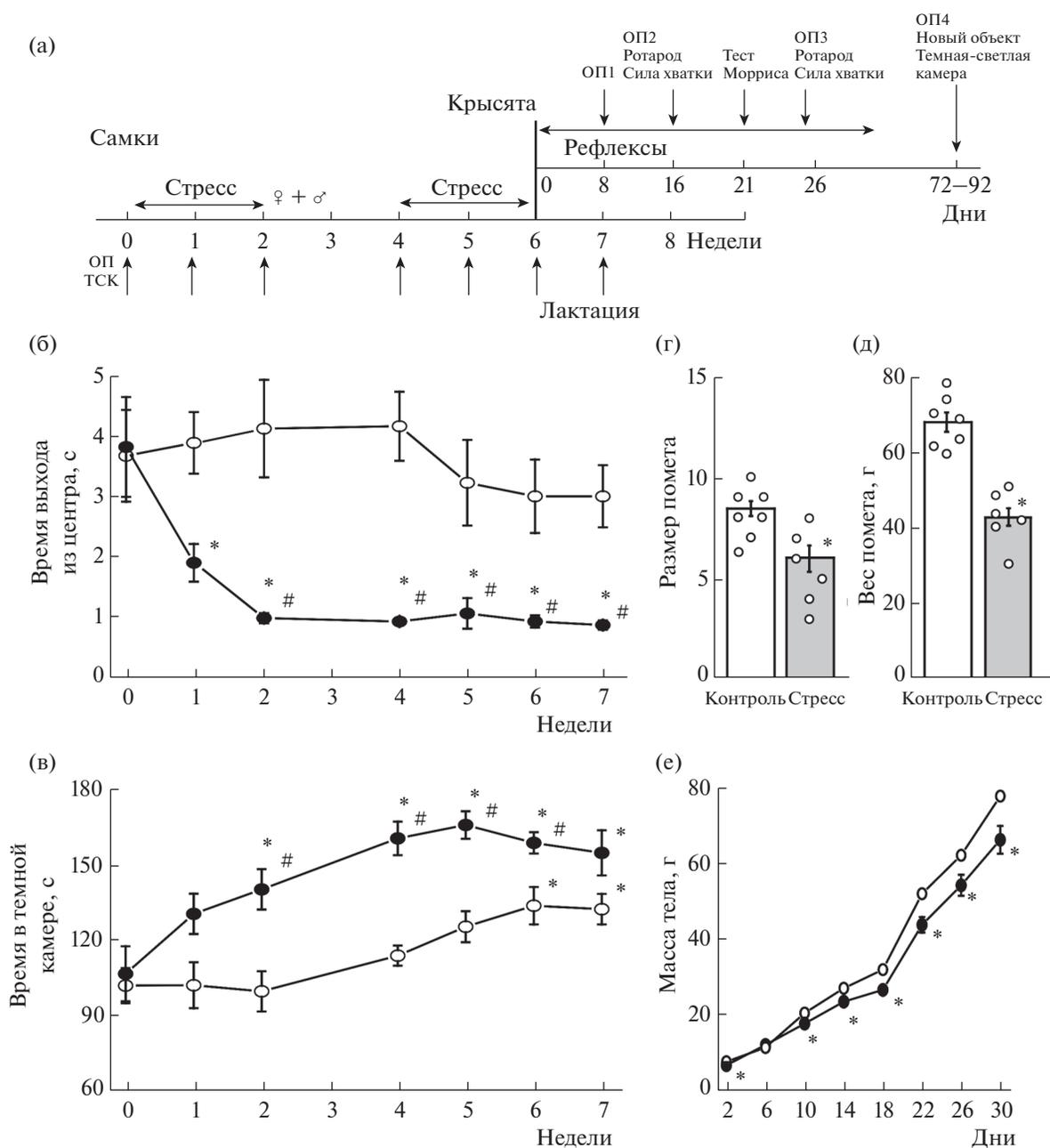


Рис. 1. Влияние непредсказуемого хронического умеренного стресса на уровень тревожности самок крыс, на размер и вес их помета. (а) – схема эксперимента (ОП 1–4 – открытое поле в возрастах 8, 16, 26, 80 дней жизни, соответственно, НО – тест новый объект, ТСК – тест темно-светлая камера, ♀ + ♂ – подсадка самца). (б) – время выхода из центра открытого поля и (в) – время нахождения в темной камере в тесте темно-светлая камера самок крыс до, во время беременности и в первую неделю лактации группы Контроля (белый круг) и группы Стресс (черный круг). По оси Х указаны недели эксперимента, где 0 – это исходные показатели. * $p < 0.05$ относительно исходного уровня, # $p < 0.05$ относительно контрольной группы. Размер (г) и вес помета (д), рожденного от самок группы Контроль (белый столбик) и самок группы Стресс (серый столбик). Результаты представлены в виде среднего значения и ошибки среднего, белые кружки – оригинальные данные размера и веса помета в группах. * – $p < 0.05$ относительно контрольной группы. (е) – масса крыс, рожденных от самок группы Контроль (белый круг) и самок группы Стресс (серый круг) в первый месяц жизни. * – $p < 0.05$ относительно контрольной группы. Результаты представлены в виде среднего значения и ошибки среднего.

Fig. 1. The effect of unpredictable mild chronic stress on the anxiety level of female rats, the size and weight of their litter. (а) – experimental design (OP 1–4 – open field at the ages of 8, 16, 26, 80 days of life, NO – test new object,

DLCh – test dark-light chamber, ♀ + ♂ – mating. (б) the time of leaving the center of the open field and (в) – the time spent in the dark chamber Dark-light chamber test of female rats before, during pregnancy and in the first week of lactation of the control group (white circle) and stress group (black circle). The X-axis indicates the weeks of the experiment, where 0 is the initial values. * $p < 0.05$ compared to initial value, # $p < 0.05$ compared to the control group. Size (r) and weight of litter (д) born from control females (white bar) and females from the stress group (gray bar), Results are presented as mean and error of mean, white circles are original data on litter size and weight in groups. * – $p < 0.05$ compared to the control group. (e) – weight of rats born from females of the control group (white circle) and females of the stress group (gray circle) in the first month of life. * – $p < 0.05$ compared to the control group. Results are presented as mean and SEM.

количество животных в помете, регистрировали день отлипания ушной раковины, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов и открытия глаз.

Для исследования созревания соматосенсорной системы использовали стандартную батарею тестов, которая позволяет оценить поведенческий фенотип крыс в период вскармливания и включает следующие тесты: переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, реакция на акустический стимул, обонятельная реакция, визуальное избегание обрыва, переворот в свободном падении, маятник (Миронов, Бунатян, 2012; Gerasimova et al., 2017; Яковлева и др., 2019). Тесты проводили за 2 дня до возраста формирования рефлекса в контроле согласно методическим указаниям (Миронов, Бунатян, 2012) и литературным данным (Gerasimova et al., 2017). Регистрировали возраст крысят, в котором впервые появлялся наблюдаемый рефлекс. Тесты проводили до полного формирования рефлекса во всех пометах. Тестирование проводили в одно и то же время суток в тихой затемненной комнате под нагреваемой лампой. Для снижения времени отделивания от матери на выполнение теста крысятам давалось от 10 до 60 сек. Параллельно с опытным проводилось тестирование помета от контрольной самки. Анализ половых различий потомства проводили у животных, достигших половой зрелости, в тестах открытое поле, темно-светлая камера и распознавание нового объекта.

Тест открытое поле позволяет оценить динамику и выраженность элементарных поведенческих актов у грызунов в стрессовых условиях (Naik et al., 2015). Тест проводили на самках и потомстве возраста P8, 16, 26 и 80. Крыс помещали в центр круглой арены диаметром 30 см (P8), 60 см (P16, P26) или в центр квадратного поля (P80) площадью 100×100 см, которые разлинованы на квадраты размером 5×5 см, 10×10 см, 20×20 см, соответственно (Open Science, Россия). Оце-

нивали вертикальную и горизонтальную двигательную активность, исследование отверстий, время выхода из центра поля, акты груминга. Каждый тест записывался с помощью цветной видеокамеры Sony SSC-G118 (Китай), захватывающей приставки и программы Pinnacle Studio (Corel Corporation, Ottawa, Canada) на персональном компьютере и обсчитывался после проведения эксперимента независимым исследователем. Тест проводили в течение 1 или 3 мин в зависимости от возраста. После каждой пробы манеж очищали от продуктов дефекации/урикации и тщательно протирали 70% этиловым спиртом.

Тест темно-светлая камера основан на врожденной неприязни грызунов к ярко освещенным областям, поэтому применяется для оценки уровня тревожности (Bourin, Hascoet, 2003). Исследование эмоционального состояния проводилось при помощи аппаратно-программного комплекса “Шелтер” (Нейроботикс, Москва, Россия) у самок и потомства возраста P72-90. Испытательная установка представляет собой замкнутое пространство размером $40 \times 20 \times 20$ см (Ширина \times Высота \times Глубина), состоящее из двух камер, разделенных перегородкой, в которой имеется проход. Тест проводили в течение 3 мин, регистрировали длительность пребывания в светлой камере.

Тест удержание на горизонтальной сетке проводился для оценки развития мышечной силы в возрастах P8, P16 и P26. Животное помещалось на проволочной сетке, которая мягко встряхивалась, чтобы дать крысе возможность зацепиться за проволоку (Weydt et al., 2003). Сетка переворачивалась на 180° и удерживалась на высоте 45 см над дном клетки. Записывалось время в секундах, проведенное на сетке. Для анализа использовалось наибольшее значение из трех попыток в течение одного подхода.

Тест на координацию движений проводили на аппарате Ротарод (Neurobotix, Россия) в возрастах P16 и P26. Данный тест показывает

общую моторную функцию конечностей, а также двигательнo-координационные нарушения (Karl, 2003). Регистрировали время удержания животного (в секундах) и расстояние (в см) на цилиндре, вращающемся со скоростью 5 об/мин. Проводили три сессии с интервалом 20–30 мин. Лучший результат записывался.

Тест на распознавание нового объекта используется для анализа непространственной памяти, который основан на естественной потребности животных исследовать новые объекты, и не требует внешней мотивации, награды или наказания (Antunes, Biala, 2012; Lueptow, 2017). Исследование проводили на крысах P72–90. Тест представляет собой две 10-минутные сессии, которые проводят в домашней клетке. Первую сессию проводили для адаптации и запоминания крысой двух одинаковых объектов, помещенных в противоположные углы клетки. По истечении 10 минут крысу вынимали, заменяли один из знакомых объектов на незнакомый. В ходе второй 10-минутной сессии проводили запись эксперимента на камеру. При обработке видеозаписи регистрировали время (в секундах), потраченное на исследование нового и знакомого объектов (Lueptow, 2017).

Тест водный лабиринт Морриса является одной из основных моделей для изучения пространственной памяти и процесса обучения у лабораторных грызунов (Terry, 2009; Ивлиева и др., 2016, Yakovleva et al., 2020). Исследование проводили на крысах возраста P21–22. Тест проводили в цилиндрической емкости диаметром 1 м и высотой 0.4 м (Open Science, Россия), которая была заполнена водой (температура 26–28°C), подкрашенной нежирным молоком. По периметру емкости располагались ориентиры для навигации различной формы и цвета. Устанавливали спасательную платформу так, чтобы уровень платформы был ниже уровня воды (Terry, 2009).

Крыс осторожно опускали в воду и позволяли искать платформу в течение 180 с (Terry, 2009). Обучение включало 6 подходов с перерывами в 15 с для оценки кратковременной памяти. Через 1 ч и через 24 ч после окончания обучения проводилась проверка запоминания положения платформы для оценки долговременной памяти. Каждый тест записывался с помощью цветной видеокамеры Sony SSC-G118 (Китай), захватывающей приставки и программы Pinnacle Studio (Corel Corporation, Ottawa, Canada) на персональ-

ном компьютере, и обсчитывался после проведения эксперимента независимым исследователем.

Траектория плавания была проанализирована вручную у 15 животных из каждой группы, и были определены четыре основных типа стратегии поиска: тигмотаксис, когда животное проводит большую часть времени у стены (некогнитивная форма); вторжение (случайный поиск), когда животное плавает вдоль стены, но также двигается и в центральные области; сканирование, при котором исследуются центральные области arenas; и сканирование цели (направленный поиск) – плавание вблизи платформы (Terry, 2009; Ивлиева и др., 2016, Yakovleva et al., 2020).

Статистическую обработку проводили при помощи непараметрических и параметрических методов с использованием пакета прикладных программ Origin Pro software (Origin-Lab Corp, USA). Для проверки выборки на нормальное распределение применяли тест Колмогорова–Смирнова и F-тест для равных дисперсий. При нормальном распределении групповые данные сравнивались с использованием однофакторного дисперсионного анализа (One Way ANOVA) с последующим анализом Бонферрони для оценки достоверных различий. При ненормальном распределении групповые данные сравнивались при помощи ANOVA по Kruskal–Wallis test с последующим анализом U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$ для параметрического и $P < 0.05$ для непараметрических методов анализа; n – количество животных. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего либо $M (Q1–Q2)$, где M – медиана, Q – квартиль.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние умеренного непредсказуемого стресса до и во время беременности на уровень тревожности самок

Время выхода из центра открытого поля в группе контроля не изменялось в течение всего периода наблюдений и составило 3.8 ± 0.8 с ($n = 8$) в начале эксперимента, 4.1 ± 0.6 с ($n = 7, p > 0.05$) во время беременности и 3.0 ± 0.5 с ($n = 7, p > 0.05$) в первую неделю после родов (рис. 1 (б)). В группе самок, подвергшихся влиянию стресса, время выхода из центра снизилось с 3.6 ± 0.7 с ($n = 9$) до $1.9 \pm$

± 0.3 с ($n = 6, p < 0.05$) через одну неделю воздействия умеренного непредсказуемого стресса, через две недели – до 1.0 ± 0.1 с ($p < 0.05, n = 6$), и далее не изменялось как во время беременности, так и после родов (0.9 ± 0.1 с, $p < 0.05, n = 6$, рис. 1 (б)).

Количество актов груминга в открытом поле в группе контроля не изменялось в течение всего периода наблюдений и составило 1.9 ± 0.8 ($n = 8$) в начале эксперимента, 2.2 ± 0.4 ($n = 7, p > 0.05$) во время беременности и 2.4 ± 0.8 ($n = 7, p > 0.05$) в первую неделю после родов. При действии стресса у самок в прегестационный период груминг не менялся: 1.7 ± 0.3 актов ($n = 9$) до начала и 1.1 ± 0.4 ($n = 8, p > 0.05$) через две недели воздействия, но с наступлением беременности количество актов груминга увеличивалось до 2.7 ± 0.5 ($n = 6, p < 0.05$) и далее не изменялось во время беременности и после родов ($2.9 \pm 0.9, p < 0.05, n = 6$).

В тесте темно-светлая камера у контрольных крыс время, проведенное в темной камере, достоверно повысилось к концу беременности (с 102.3 ± 7.1 с, $n = 8$ до 134.2 ± 8.4 с, $n = 7, p < 0.05$) и сохранялась на высоком уровне после родов (рис. 1 (в)). У самок, подвергающихся действию стрессовых факторов, время, проведенное в темной камере, увеличилось уже в прегестационный период с 107.2 ± 11.4 с до 140.3 ± 8.2 с, $n = 9, p < 0.05$, рис. 1 (в)) и сохранялось на высоком уровне в период беременности и лактации, достоверно отличаясь от значений контрольной группы ($n = 6$, рис. 1 (в)).

Размер помета и вес крысят. Размер помета у крыс с хроническим умеренным стрессом оказался меньше (6.0 ± 1.0 крысят, $n = 6, p < 0.05$), чем у контрольных самок 8.6 ± 1.2 ($n = 7$, рис. 1 (г)). Масса тела при рождении, являющаяся важным показателем соматического развития, была достоверно снижена в группе Стресс и составила 7.0 ± 0.1 г ($n = 36, p < 0.05$), а в группе Контроль 7.9 ± 0.6 г ($n = 61$, рис. 1 (д)). В результате суммарный вес всего помета в группе Стресс составил 42.5 ± 2.3 г ($n = 6, p < 0.05$), что достоверно меньше, чем в группе Контроль – 67.5 ± 2.6 г ($n = 7$). Сниженная масса тела потомства группы Стресс сохранялась в течение 4 нед после рождения (рис. 1 (е)). Смертность крысят группы Стресс (16.6%) не отличалась от контрольных значений (16%).

Таблица 1. Параметры физического развития крысят
Table 1. Physical development of pups

Параметр, день после рождения	Группа Контроль	Группа Стресс
Отлипание ушной раковины	2 (2–2), $n = 61$	4 (2–4), $n = 36^*$
Появление первичного волосяного покрова	4 (4–4), $n = 57$	6 (6–6), $n = 36^*$
Прорезывание резцов	8 (8–8), $n = 53$	8 (8–10), $n = 35$
Открытие глаз	14 (12–14), $n = 53$	14 (14–16), $n = 32$

Примечание. * – $p < 0.05$ относительно контрольной группы, n – количество крысят. Результаты представлены в виде медианы и квартиля.

Note. * – $p < 0.05$ compared to the control group, n – the number of pups. Results are presented as median and quartile.

Оценка физического развития крысят в группе Стресс выявила отставание во времени отлипания ушной раковины и появления первичного волосяного покрова ($p < 0.05$, табл. 1). Более поздно регистрируемые показатели, такие как прорезывание резцов и открытие глаз не отличались от контрольных значений ($p > 0.05$, табл. 1).

Развитие сенсомоторных рефлексов. Рефлексы новорожденных необходимы для выживания после родов и адаптации к новым условиям среды. Слабовыраженные или поздно сформированные рефлексы свидетельствуют о различных патологиях ЦНС (Миронов, Бунатян, 2012; Gerasimova et al., 2017; Яковлева и др., 2019; Yakovleva et al., 2018) (табл. 2). В тестах избегание обрыва и отрицательный геотаксис отличий в дне формирования рефлекса выявлено не было. День формирования рефлекса переворачивание на плоскости не отличался в обеих группах, однако увеличивалось время переворота у крысят группы Стресс (табл. 2). Кроме того, наблюдали замедление созревания рефлекса реакция на акустический стимул у крысят группы Стресс (12.9 ± 0.2 день, $p < 0.05, n = 32$) по сравнению с контрольной группой животных (9.5 ± 0.2 день, $n = 53$). В возрасте 14 сут и выше наблюдались значительные различия во времени формирования таких рефлексов, как визуальный обрыв, обонятельная реакция и переворот в свободном падении (табл. 2).

Анализ поведенческих реакций в тестах открытое поле и темно-светлая камера. В тесте открытое поле у животных группы Стресс наблюдалось снижение горизонтальной двига-

Таблица 2. Эффекты материнского хронического стресса на формирование рефлексов у потомства
Table 2. Effects of maternal chronic stress on the formation of the offspring reflexes

Регистрируемые параметры	Контроль	Стресс
Переворот на плоскости, день формирования	6 (4–7), $n = 57$	4 (4–6), $n = 36$
Время, потраченное на выполнение, с	1.40 ± 0.09 , $n = 57$	$2.41 \pm 0.24^*$, $n = 36$
Избегание обрыва, день формирования	6 (5–7), $n = 57$	4 (4–8), $n = 36$
Отрицательный геотаксис, день формирования	6 (5–7), $n = 57$	6 (4–6), $n = 35$
Реакция на акустический стимул, день формирования	10 (8–10), $n = 53$	12 (12–14)*, $n = 32$
Маятниковый рефлекс проводится на 8-й день, количество поворотов головы	7 (5–11), $n = 53$	8 (4–11), $n = 32$
Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом, день формирования	14 (12–15), $n = 53$	16 (14–16)*, $n = 32$
Переворот в падении, день формирования	12 (12–16), $n = 53$	14 (14–16)*, $n = 32$
Обоняние, день формирования	14 (12–15), $n = 53$	16 (14–17)*, $n = 32$

Примечание: * – $p < 0.05$ относительно контрольной группы, n – количество крысят. Результаты представлены в виде медианы и квартиля.

Note. * – $p < 0.05$ compared to the control group, n – the number of pups. Results are presented as median and quartile.

тельной активности на 8-й и 16-й дни жизни (7.6 ± 0.9 и 31.0 ± 3.6 квадратов, $n = 33$ и $n = 30$ соответственно, $p < 0.05$) относительно контрольных значений (12.9 ± 1.1 и 45.4 ± 3.2 квадратов, $n = 53$ и $n = 53$ соответственно, рис. 2 (а)). В старших возрастных группах (P26 и P80) этот параметр достоверно не отличался от контроля (рис. 2 (а)).

У животных группы Стресс наблюдалось снижение исследовательской активности, показателем которой являются поднятие головы, вертикальные стойки и исследуемые норки. Количество поднятий головы в группе Стресс на 8-й день жизни было достоверно ниже (0.2 ± 0.1 , $n = 32$, $p < 0.05$) по сравнению с контролем (1.9 ± 0.2 , $n = 53$), а к 16-му дню жизни количество поднятий головы 15.2 ± 2.3 не отличалось от контрольных значений (12.6 ± 0.7 , $p > 0.05$). Снижение вертикальных стоек у животных группы Стресс наблюдалось только в младшей возрастной группе (P16, рис. 2 (б)), тогда как у животных P26 и P80 этот параметр достоверно не отличался от контроля (рис. 2 (б)). В то же время у животных с пренатальным хроническим стрессом во всех возрастных группах количество исследуемых норок было ниже ($p < 0.05$, $n = 29$) по сравнению с контрольной группой ($n = 53$, рис. 2 (в)).

Уровень тревожности был достоверно повышен у животных группы Стресс во всех возрастных периодах (рис. 2 (г, д)). Количество актов груминга было достоверно выше во всех исследуемых возрастах (рис. 2 (г)), а

время выхода из центра поля снижалось у животных P26 и P80 (рис. 2 (д)). Нами не было выявлено достоверных отличий у животных разного пола в параметрах ОП, отражающих тревожность животного. Количество актов груминга составило у самок 3.3 ± 0.6 ($n = 14$), у самцов 2.3 ± 0.7 ($n = 15$, $p > 0.05$), время выхода из центра 1.2 ± 0.3 и 2.2 ± 0.4 ($p > 0.05$) соответственно.

Результаты, указывающие на повышение уровня тревожности, подтвердились и в тесте темно-светлая камера, где снижалось время, проведенное в светлой камере у животных группы Стресс (P72–90, рис. 2 (е)). В данном тесте также не было выявлено гендерных отличий во времени пребывания в светлой камере и количестве переходов между камерами. Время пребывания в светлой камере составило у самок 107.5 ± 7.9 с ($n = 15$) и у самцов – 103.3 ± 7.4 с ($n = 17$, $p > 0.05$), а количество переходов 4.0 ± 0.6 ($n = 15$) и 3.8 ± 0.4 ($n = 17$, $p > 0.05$) соответственно.

Исследование мышечной силы и двигательной координации. В контрольной группе в тесте удержание на горизонтальной сетке с возрастом увеличивалось время пребывания крысы на сетке: с 14.9 ± 1.9 с (P16) до 106.4 ± 6.1 с (P26, $n = 53$). В группе Стресс время пребывания крысят на горизонтальной сетке соответствовало контрольным значениям (17.9 ± 2.9 с и 110.3 ± 20.1 с, соответственно, $n = 29$, $p > 0.05$).

В тесте ротарод не было выявлено достоверных различий между группами как по вре-

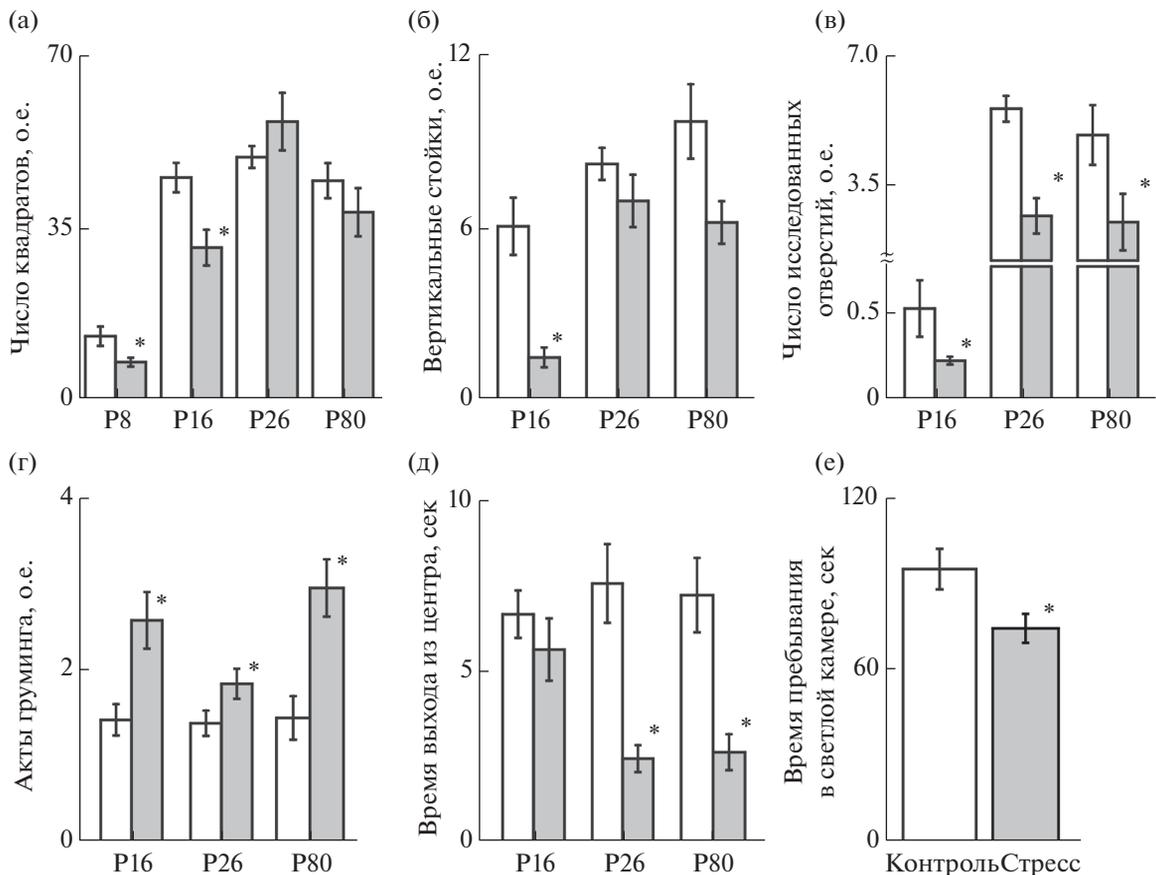


Рис. 2. Влияние хронического пренатального стресса на двигательную и исследовательскую активность, уровень тревожности в тестах открытое поле и темно-светлая камера. Количество пересеченных квадратов (а) вертикальных стоек (б), исследованных отверстий – норок (в), актов груминга (г) и время выхода из центра открытого поля (д) в тесте открытое поле. (е) – время пребывания в светлой камере в тесте темно-светлая камера. P8, P16, P26, P80 – возрастные периоды. Белый столбик – контрольная группа, серый столбик – группа Стресс. * – $p < 0.05$ относительно контрольной группы. Результаты представлены в виде среднего значения и ошибки среднего.

Fig. 2. Effects of the chronic prenatal stress on motor and exploratory activity, level of anxiety in the open field and light/dark transition test. The number of quadrat crosses (a), rearing (б), dips (в), grooming acts (г) and time spent in the central zone (д) in the open field test. Time spent in the light chamber (е) in the light/dark transition test. P8, P16, P26, P80 – age periods. White column – control group, gray column – Stress group. * – $p < 0.05$ compared to the control group. Results are presented as mean and SEM.

мени пребывания на вращающемся цилиндре, так и по пройденному расстоянию. Время пребывания на вращающемся цилиндре у животных P16 и P26 составило 17.9 ± 5.9 с и 102.4 ± 6.3 с в контроле ($n = 53$) и 17.6 ± 1.4 с и 121.3 ± 12.7 с в группе Стресс ($n = 29$, $p > 0.05$). Пройденное расстояние составило 0.4 ± 0.1 см и 2.8 ± 0.1 см в контроле и 0.4 ± 0.1 см и 2.9 ± 0.3 см в группе Стресс ($p > 0.05$).

Анализ когнитивных функций. Коэффициент отношения времени исследования нового объекта к старому снижался в группе Стресс ($548 \pm 81\%$, $n = 30$) по сравнению с контролем ($754 \pm 81\%$, $n = 45$, $p < 0.05$, рис. 3 (а)).

Достоверных различий у животных разного пола в тесте на распознавание нового объекта не было выявлено.

Анализ обучения в тесте Морриса выявил снижение времени поиска платформы у животных обеих групп, однако в группе Стресс время поиска было достоверно больше по сравнению с группой контроля. В группе Контроль время поиска платформы снизилось с 30.5 ± 1.8 с в первом подходе до 9.6 ± 1.5 с ($n = 45$) в третьем, а в группе Стресс – с 39.5 ± 3.5 с до 13.8 ± 1.3 с, соответственно ($n = 30$, $p < 0.05$, рис. 3 (б)). К концу обучения у крыс групп Контроль и Стресс время поиска плат-

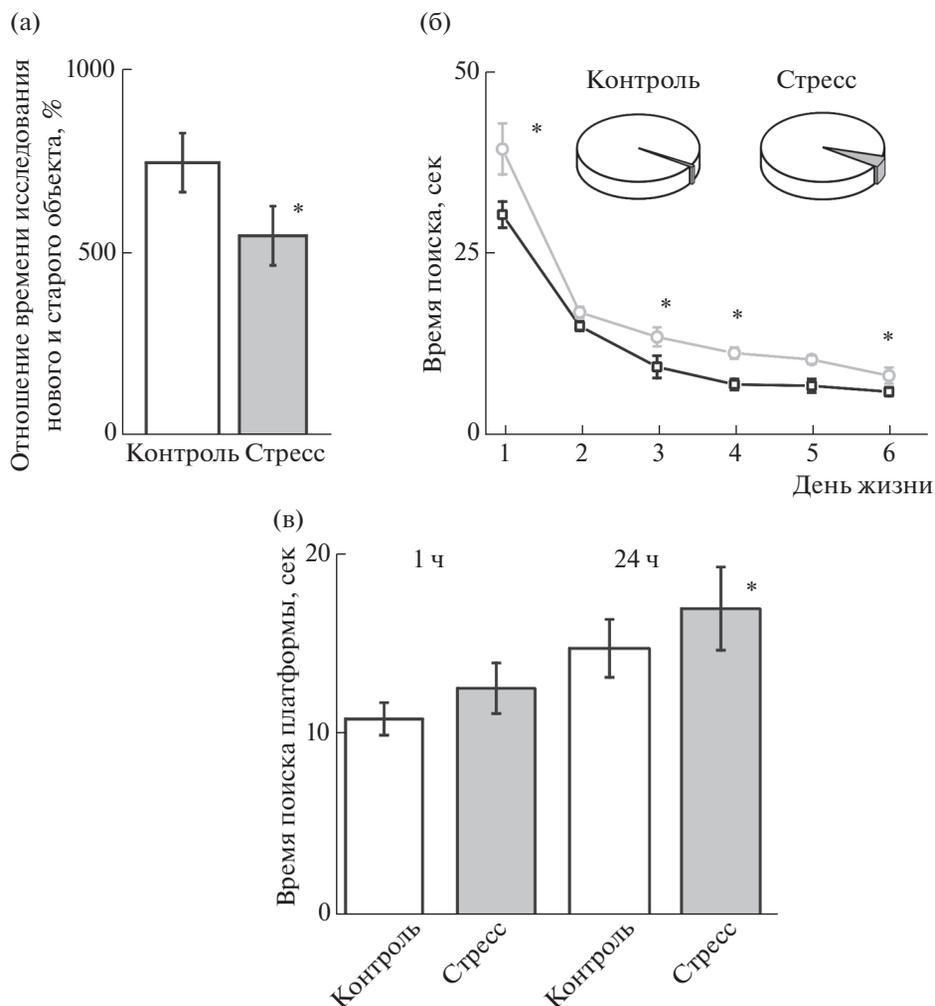


Рис 3. Эффект пренатального стресса на когнитивные функции крыс в тестах новый объект и водный лабиринт Морриса.

(а) – Отношение времени исследования нового объекта к старому у крыс групп Контроль (белый столбик) и Стресс (серый столбик), (б) – Изменение времени поиска платформы в ходе обучения в тесте водный лабиринт Морриса у крыс групп Контроль (белые круги) и Стресс (черные круги). Во вкладке показан процент обучившихся крыс (белый сектор диаграммы), (в) – Процент животных групп Контроль и Стресс, нашедших (белый сектор диаграммы) и не нашедших (серый сектор диаграммы) платформу через 1 и 24 ч после обучения. (г) – Время поиска платформы через 1 и 24 ч после обучения крысами групп Контроль (белый столбик) и Стресс (серый столбик) групп. * – $p < 0.05$ относительно контроля. Результаты представлены в виде среднего значения и ошибки среднего.

Fig. 3. Effect of prenatal stress on the cognitive function of rats in the new object and water maze tests.

(a) – The ratio of the research time of a new object to an old one of rats from the control (white column) and Stress (gray column) groups, (б) – Latency to find the platform during training in the Morris water maze test in rats from the control (white circles) and stress (black circles) groups. Insert: the white sectors of the circles show the percentage of trained rats, (в) – the percentage of animals in the control and stress groups who found (white sector of the circle) and did not find (gray sector of the circle) the platform location in 1 and 24 hours after training. (г) – Latency to find the platform in 1 and 24 hours after training in the control (white column) and Stress (gray column) groups. * – $p < 0.05$ compared to the control group. Results are presented as mean and SEM.

формы составило 6.2 ± 0.6 с и 8.4 ± 1.1 с ($p < 0.05$, рис. 3 (б)) соответственно. Расстояние, пройденное животными в начале обучения, составило 201.8 ± 25.7 см в контрольной группе и 301.2 ± 23.1 см в группе Стресс ($p <$

< 0.05) и к концу обучения 44.2 ± 5.3 см и 76.0 ± 7.3 см соответственно ($p < 0.05$).

Анализ стратегии поиска платформы показал, что у животных контрольной группы в первых подходах наблюдались три базовых

стратегии поиска платформы в равной степени всеми крысами: тигмотаксис, случайный поиск и сканирование (у 14 из 15 анализируемых животных). В группе Стресс наблюдались такие же стратегии поиска, и 13 из 15 животных использовали стратегии тигмотаксис и случайный поиск, а более выгодная в поиске стратегия сканирование встречалась лишь у 8 животных. К концу обучения (5–6 подходы) основной стратегией контрольной группы стал направленный поиск, который является наиболее эффективным для поиска платформы (10 животных), а также применялись стратегии сканирования (7 животных) и случайный поиск (5 животных из 15), тигмотаксис не применялся ни одним животным. В группе Стресс соотношение стратегий к концу обучения также изменилось: у 6 животных из 15 появилась стратегия направленный поиск, у 4 – сканирование, у 8 – случайный поиск и у 8 животных сохранилась стратегия тигмотаксис. Процент обучившихся крыс не отличался в группах Контроль и Стресс (рис. 3 (б), вкладка).

В ходе проверки запоминания положения платформы было выявлено, что через 1 ч после обучения время поиска платформы в контрольной группе увеличилось до 10.9 ± 0.9 с, а в группе Стресс – до 12.6 ± 1.4 с ($p > 0.05$, рис. 3 (г)). Через 24 ч крысы контрольной группы тратили на поиск платформы 14.6 ± 1.7 с, а крысы группы Стресс достоверно больше – 17.4 ± 1.6 с ($p < 0.05$, рис. 3 (г)). Расстояние, пройденное животными группы Стресс при поиске платформы, оказалось больше (93.1 ± 9.9 см через 1 ч и 146.4 ± 16.9 см через 24 часа, $p < 0.05$), чем в группе Контроль (63.3 ± 6.2 см через 1 ч и 92.3 ± 12.1 см через 24 часа). Процент животных, которые помнили расположение платформы, в группе Стресс составил 71% через 1 ч и 45% через 24 ч что значительно меньше контрольных значений (99 и 70% соответственно, рис. 3 (в)).

Анализ стратегий поиска платформы, применяемой через 1 и 24 ч после обучения, показал, что животные контрольной группы использовали все четыре стратегии в равной степени. У животных группы Стресс через 1 и 24 ч после обучения преобладали стратегии тигмотаксис (у 13 и 12 животных из 15 соответственно) и случайный поиск (у 9 и 12 животных соответственно); одновременно снижалось использование стратегий сканирование (у 7 и 3 животных соответственно) и

направленный поиск (у 5 и 0 животных соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы использовали модель депрессии матери во время беременности для оценки вклада в развитие потомства. Несмотря на то что пренатальный стресс является одним из интенсивно исследуемых факторов, вызывающих нарушения развития на различных этапах онтогенеза, большая часть исследований сосредоточена на моделировании стресса у самок крыс, начиная со второй недели беременности (Hougaard et al., 2005; 2011; Николаева, Белолобская, 2012; Jafari et al., 2019; Ордян, 2006), в то время когда первая неделя беременности является наиболее критическим и чувствительным периодом для развития плода (St-Pierre et al., 2016). Поэтому в нашей работе мы подвергали самок крыс хроническому стрессу как до наступления, так и во время беременности, что приводило к повышению тревожности уже до начала беременности, которая сохранялась и в первую неделю лактации.

Известно, что последствия материнского стресса на развитие потомства зависят как от вида стрессовой стимуляции, так и периода стрессового воздействия (Fride, Weinstock, 1984; Willner, 2017, Luo et al., 2017). В нашей модели непредсказуемый умеренный хронический стресс, действующий как до, так и во время беременности, приводил к уменьшению размера и веса помета, а также снижению массы тела новорожденных крысят, что может быть обусловлено увеличением смертности плодов и/или снижением имплантаций (Hougaard et al., 2005). Известно, что одним из последствий стресса у самок крыс является нарушение фолликулогенеза, уменьшение фертильности и ановуляторные циклы (Николаева, Белолобская, 2012). У женщин депрессия также может приводить к ановуляции, аменорее и другим нарушениям менструального цикла (Allsworth et al., 2007). Известно, что стресс матери приводит к рождению детей массой ниже 2.5 кг (Weinstock, 2005). Подобное действие пренатального стресса наблюдали и у грызунов, и низших приматов (Gong et al, 2012; Amugongo et al., 2014), однако, в других работах значительных изменений веса потомства не наблюдали (Fride, Weinstock, 1984; Colomina et al., 2005; Fatima, 2017). В нашей модели стресс у матери

сформировался уже к моменту зачатия, и, как результат, высокие уровни гормонов стресса, и в том числе кортикостерона, влияли на потомство уже в период раннего эмбрионального развития (Huang, 2012). Высокие уровни кортикостерона не только вызывают внутриутробную гипоксию, ухудшение плацентарного кровоснабжения, но и, проникая через плацентарный барьер, приводят к нарушению развития мозга плода (Charil et al., 2006; Weinstock, 2008; Статилон и др., 2020).

Комплексная оценка развития рефлексов у новорожденных крысят (Миронов, Буна-тян, 2012) в нашей модели показала, что ранние безусловные рефлексы формируются согласно возрастной норме (отрицательный геотаксис, избегание обрыва и переворот на плоскости). В то же время рефлексы, связанные с функционированием отдельных сенсорных систем, формировались достоверно позже контрольной группы. Это может быть связано как с отставанием животных группы Стресс в физическом развитии (более позднее отлипание ушной раковины приводит к задержке акустического рефлекса вздрагивания), так и неврологическими нарушениями (отставание в формировании обонятельного рефлекса). Подобная задержка в развитии стартл-рефлекса была также показана у потомства, полученного от крыс при использовании стресса до беременности (Czarzasta et al., 2019). Интересно, что в моделях стресса в период беременности наблюдалось как отставание в созревании некоторых сенсомоторных рефлексов, так и ускорение развития ранних двигательных способностей у потомства (Fride, Weinstock, 1984; Gong et al., 2012). Пренатальный стресс может тормозить моторное развитие за счет действия кортикостерона на мозжечок, характеризующийся высокой экспрессией рецепторов глюкокортикоидов (Bennett et al., 2017). Действительно, мы наблюдали отставание в развитии рефлекса, связанного с координацией движений – переворота в падении, а также снижение горизонтальной и вертикальной активности у крыс 8- и 16-дневного возраста. Однако уже к 21-м суткам жизни двигательная активность в тесте открытое поле не отличалась от контрольных значений, а такие тесты, как сила хвата и ротарод, не выявили нарушений в силе мышц и координации движений. По-видимому, ранние патологические изменения в развивающемся мозжечке, такие как снижение количества и активности олигодендро-

цитов и астроцитов (Sudarov, Joyner, 2007), восстанавливаются в ходе взросления (Bennett et al., 2017). Ранее было показано, что материнский стресс также не влиял на двигательную активность взрослых детенышей (P120) в тесте открытое поле (Hougaard et al., 2005).

Гипоталамо-гипофизарная система, гиппокамп, префронтальная кора, миндалина вовлечены в ответ на острый и хронический стресс, подвергаясь структурному ремоделированию, которое изменяет поведенческие и физиологические реакции (Николаева, Белолубская, 2012; Graignic-Philippe et al., 2014). В нашей модели повышение тревожности наблюдалось у животных всех возрастных групп, в отличие от действия пренатального стресса во время беременности, где тревожность усиливалась только у взрослых потомков (P80) (Bennett et al., 2017). Подобный эффект пренатального стресса наблюдался у потомства возраста P9-10, где тревожность оценивали по времени и частоте вокализации (Harmon et al., 2009). Хронический стресс в течение 21 дня до беременности также приводил к депрессии у двухмесячного потомства за счет снижения фосфорилирования CREB (Cyclic AMP responsive element-binding protein) в гиппокампе (Huang 2010; Li et al., 2010). Эти особенности поведения, по-видимому, связаны с долговременными изменениями в уровне дофамина, серотонина и норадреналина, а также нарушениями в ГАМК-ергической системе (Weinstock, 2008; Решетников и др., 2018).

Ухудшение умственных способностей у детей, матери которых во время беременности подвергались воздействию стрессовых факторов, наблюдалось от младенческого до подросткового возраста (Raikkonen et al., 2011). В нашей модели нарушение когнитивных функций было выявлено во всех возрастных группах. На ранних этапах развития было показано снижение исследовательской активности крыс группы Стресс в тесте открытое поле (P16, 26), ухудшение способности к обучению, выбору наиболее успешной стратегии поиска и долговременной пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (P22). В возрасте 80–90 дней у крыс уменьшалось время исследования нового объекта, что свидетельствует о нарушении непространственной памяти.

Активные манипуляции с потомством в ранний постнатальный период могут приво-

дуть к изменениям поведения у взрослых животных. Однако анализ сенсомоторного развития проводился одновременно и в контрольной, и в экспериментальной группах. Кроме того, имеются данные о том, что кратковременное отделение детенышей от матери в возрасте от 2-го до 21-го дня не только не влияет, но может даже улучшать отдельные виды памяти у взрослых потомков (Решетников и др., 2018). Более того, сходные нарушения когнитивных функций и повышенная тревожность у взрослых особей наблюдались и в других работах по анализу пренатального стресса, где воздействий на потомство в ранний постнатальный период не проводилось (Hougaard et al., 2005; 2011; Николаева, Белолобская, 2012; Jafari et al., 2019; Guan et al., 2016; Fatima, 2017, 2020). Поэтому можно думать, что полученные нами изменения являются результатом именно пренатального стресса.

Молекулярные механизмы повреждения нейронов и, как следствие, когнитивных и других дисфункций в результате пренатальных стрессорных воздействий включают такие факторы, как развитие окислительного стресса, изменение уровня нейротрофинов, экспрессии рецепторов к гормонам и нейромедиаторам, эпигенетические процессы, включающие метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, регуляцию микроРНК (Ордян и др., 2006; Guan et al., 2016; Yakovleva et al., 2018, 2020; Lin, Wang, 2014; Fatima, 2017; Fatima et al., 2020). Снижение экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF, Brain-derived neurotrophic factor) и NR2B субъединицы НМДА-рецепторов глутамата в гиппокампе было обнаружено и в модели прегестационного стресса, и эти изменения коррелировали с нарушениями памяти у взрослых животных (Huang et al., 2010).

В нашей модели мы не выявили гендер-зависимых эффектов пренатального стресса. Данные литературы по влиянию пренатального стресса на поведение самцов и самок неоднозначны (Bowman et al., 2004; Zagron, Weinstock, 2006; Brunton et al., 2006; Salomon et al., 2011; Benoit et al., 2015). Дефицит обучения преимущественно наблюдался у самцов, а уровень тревожности у самок, однако, эти проявления зависели от времени, вида и интенсивности стресса и возраста тестирования потомков (Brunton et al., 2006; Salomon et al., 2011). Подобные эффекты наблюдались при использовании пренатального иммобилиза-

ционного стресса (Bowman et al., 2004; Zagron, Weinstock, 2006). При этом влияние пренатального стресса на память самок сильно коррелировало с возрастом: нарушения памяти наблюдались у молодых крыс обоих полов, но с возрастом у самок память улучшалась, что объясняется снижением нейрональной пластичности в гиппокампе у самцов и ее повышением – у самок (Darnaudeau, Mascari, 2008). С другой стороны, в модели умеренного стресса до и во время беременности у мышей нарушения обучения и памяти не зависели от пола потомков (Benoit et al., 2015). В недавнем исследовании эффектов хронического умеренного непредсказуемого стресса на уровень тревожности и депрессивноподобное поведение у взрослых потомков авторы не выявили гендерных различий в поведенческих тестах, а также в структурных и нейрохимических изменениях мозга (Soares-Cunha et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что последствия непредсказуемого умеренного хронического стресса самок до и во время беременности наблюдаются не только в раннем онтогенезе, но сохраняются и во взрослом периоде жизни потомства, проявляясь многочисленными нарушениями высшей нервной деятельности. В связи с тем, что на протяжении последних десяти лет отмечается непрекращающийся рост патологий центральной нервной системы у детей, данный аспект исследований представляет не только теоретический, но и практический интерес.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0059 в сфере научной деятельности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ивлиева А.Л., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А., Демин В.А. Методические особенности применения водного лабиринта Морриса для оценки когнитивных функций у животных. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2016. 102 (1): 3–17.
- Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.

- Николаева И.В., Белолобская Д.С.* Влияние пренатального эмоционального стресса на развитие головного мозга, надпочечников и гонад крыс в постнатальном онтогенезе. Вестник СВФУ. 2012. 9 (1): 68–73.
- Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Акулова В.К., Галеева А.Ю.* Влияние пренатального стресса на активность гипоталамо-гипофизарно-адренортикарной системы крыс: роль глюкокортикоидных рецепторов мозга. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. 92 (9): 1100.
- Решетников В.В., Лепешко А.А., Рябушкина Ю.А., Студеникина А.А., Меркулова Т.И., Бондарь Н.П.* Отсроченные эффекты раннего постнатального стресса на когнитивные способности и экспрессию генов глутаматергической системы у мышей. Нейрохимия. 2018. 35 (2): 140–150.
- Стратилов В.А., Толькова Е.И., Ветровой О.В.* Пренатальный стресс как фактор развития аддиктивных состояний. Журн. эволюц. биохим. и физиол. 2020. 56 (6): 413–429.
- Яковлева О.В., Зиганшина А.Р., Герасимова Е.В., Арсланова А.Н., Ярмиев И.З., Зефирова А.Л., Ситдикова Г.Ф.* Влияние витаминов группы В на раннее развитие крысят с пренатальной гипергомоцистеинемией. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2019. 105 (10): 1247–1261.
- Allsworth J.E., Clarke J., Peipert J.F., Hebert R., Cooper A., Boardman L.A.* The influence of stress on the menstrual cycle among newly incarcerated women. Womens Health Issues. 2007. 17: 202–209.
- Amugongo S.K., Hlusko L.J.* Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. Aging Dis. 2014. 5 (1): 1–16.
- Antunes M., Biala G.* The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn. Process. 2012. 13 (2): 93–110.
- Bennett G.A., Palliser H.K., Shaw J.C., Palazzi K.L., Walker D.W., Hirst J.J.* Maternal stress in pregnancy affects myelination and neurosteroid regulatory pathways in the guinea pig cerebellum. Stress. 2017. 20 (6): 580–588.
- Benoit J.D., Rakic P., Frick K.M.* Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. Behav. Brain Res. 2015. 281: 1–8.
- Bourin M., Hascoet M.* The mouse light/dark box test. Eur. J. Pharmacol. 2003. 463 (1–3): 55–65.
- Bowman R., MacLusky N., Sarmiento Y., Frankfurt M., Gordon M., Luine V.* Sexually dimorphic effects of stress on cognition, hormonal responses and central neurotransmitters. Endocrinology. 2004. 45: 3778–3787.
- Brunton P.J., Russell J.A.* Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. J. Neuroendocrinol. 2010. 22 (4): 258–271.
- Charil A., Laplante D.P., Vaillancourt C., King S.* Prenatal stress and brain development. Brain Res. Rev. 2010. 65 (1): 56–79.
- Soares-Cunha C., Coimbra B., Borges S., Domingues A.V., Silva D., Sousa N., Rodrigues A.J.* Mild Prenatal Stress Causes Emotional and Brain Structural Modifications in Rats of Both Sexes. Front Behav Neurosci. 2018. 12: 129.
- Czarczasta K., Makowska-Zubrycka M., Kasarello K., Skital V.M., Tyszkowska K., Matusik K., Jesion A., Wojciechowska M., Segiet A., Wrzesien R., Biały M., Krzascik P., Wisłowska-Stanek A., Sajdel-Sulkowska E.M.* A rat model to study maternal depression during pregnancy and postpartum periods, its comorbidity with cardiovascular diseases and neurodevelopmental impact in the offspring. Physiol. Behav. 2019. 199: 258–264.
- Darnaudery M., Maccari S.* Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. Brain Res. Rev. 2007. 57 (2): 571–585.
- Davis E.P., Glynn L.M., Schetter C.D., Hobel C., Chicz-Demet A., Sandman C.A.* Prenatal exposure to maternal depression and cortisol influences infant temperament. J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry. 2007. 46 (4): 737–746.
- Davis E.P., Sandman C.A.* Prenatal psychobiological predictors of anxiety risk in preadolescent children. Psychoneuroendocrinol. 2012. 37 (3): 1224–1233.
- Fatima M., Srivastav S., Mondal A.C.* Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. Int. J. Dev. Neurosci. 2017. 60: 1–7.
- Fatima M., Ahmad M.H., Srivastav S., Rizvi M.A., Mondal A.C.* A selective D2 dopamine receptor agonist alleviates depression through upregulation of tyrosine hydroxylase and increased neurogenesis in hippocampus of the prenatally stressed rats. Neurochem. Int. 2020. 136: 104730.
- Fride E., Weinstock M.* The effects of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. Dev. Psychobiol. 1984. 17 (6): 651–660.
- Gao Y., Bezchlibnyk Y.B., Sun X., Wang J.-F., McEwend B.S., Young L.T.* Effects of restraint stress on the expression of proteins involved in synaptic vesicle exocytosis in the hippocampus. Neurosci. 2006. 141: 1139–1148.
- Gerasimova E., Yakovleva O., Burkhanova G., Ziyatdinova G., Khaertdinov N., Sitdikova G.* Effects of maternal hyperhomocysteinemia on the early physical development and neurobehavioral maturation of rat offspring. BioNanoScience. 2017. 7: 155–158.
- Gong Y., Sun X.-L., Wu F.-F., Su Ch.-J., Ding J.-H., Hu G.* Female Early Adult Depression Results in

- Detrimental Impacts on the Behavioral Performance and Brain Development in Offspring. *CNS Neurosci. Ther.* 2012. 18: 461–470.
- Graignic-Philippe R., Dayan J., Chokron S., Jacquet A.Y., Tordjman S.* Effects of prenatal stress on fetal and child development: A critical literature review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014. 43: 137–162.
- Guan S.Z., Ning L., Tao N., Lian Y.L., Liu J.W., Ng T.B.* Effects of maternal stress during pregnancy on learning and memory via hippocampal BDNF, Arc (Arg3.1) expression in offspring. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016. 46: 158–167.
- Harmon K.M., Greenwald M.L., Mcfarland A., Beckwith T., Cromwell H.C.* The effects of prenatal stress on motivation in the rat pup. *Stress.* 2009. 12(3): 250–258.
- Holubova A., Sevcikova M., Macuchova E., Hrebickova I., Pometlova M., Slamberova R.* Effects of perinatal stress and drug abuse on maternal behavior and sensorimotor development of affected progeny. *Physiol. Res.* 2017. 66 (Suppl. 4): S481–S491.
- Hougaard K.S., Andersen M.B., Hansena A.M., Hassc U., Wergeb T., Lund S.P.* Effects of prenatal exposure to chronic mild stress and toluene in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 2005. 27 (1): 153–167.
- Hougaard K.S., Mandrup K.R., Kjaer S.L., Bogh I.B., Rosenberg R., Wegener G.* Gestational chronic mild stress: effects on acoustic startle in male offspring of rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2011. 29 (4): 495–500.
- Huang Y., Shi X., Xu H., Yang H., Chen T., Chen S., Chen X.* Chronic unpredictable stress before pregnancy reduce the expression of brain-derived neurotrophic factor and N-methyl-D-aspartate receptor in hippocampus of offspring rats associated with impairment of memory. *Neurochem. Res.* 2010. 35 (7): 1038–1049.
- Jafari Z., Kolb B.E., Mohajerani M.H.* Life-course contribution of prenatal stress in regulating the neural modulation network underlying the prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in male Alzheimer's disease Mice. *Cereb. Cortex.* 2019. 30 (1): 311–325.
- Karl T.* Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp. Toxic. Pathol.* 2003. 55 (1): 69–83.
- Li H., Zhang L., Fang Z., Lin L., Wu C., Huang Q.* Behavioral and neurobiological studies on the male progeny of maternal rats exposed to chronic unpredictable stress before pregnancy. *Neurosci. Lett.* 2010. 469 (2): 278–282.
- Lin Y.L., Wang S.* Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behav. Brain Res.* 2014. 259: 24–34.
- Lueptow L.M.* Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J. Vis. Exp.* 2017. 126: 55718.
- Luo L., Sun T., Guan X., Ni Y., Yang L., Zhao Q., Kong X., Chen Y., Zhang J.* Advanced parental age impaired fear conditioning and hippocampal LTD in adult female rat offspring. *Neurochem. Res.* 2017. 42 (10): 2869–2880.
- Meyers T.* Stress: The health epidemic of the 21st century. *Community.* 2018. 15: 61–65.
- Naik A.A., Patro I.K., Patro N.* Slow physical growth, delayed reflex ontogeny, and permanent behavioral as well as cognitive impairments in rats following intra-generational protein malnutrition. *Front. Neurosci.* 2015. 9: 446.
- Pani L., Porcella A., Gessa G.L.* The role of stress in the pathophysiology of the dopaminergic system. *Mol. Psychiatry.* 2000. 5: 14–21.
- Ragan A.R., Lesniak A., Bochynska-Czyz M., Kosson A., Szymanska H., Pysniak K., Gajewska M., Lipkowska A.W., Sacharczuk M.* Chronic mild stress facilitates melanoma tumor growth in mouse lines selected for high and low stress-induced analgesia. *Stress.* 2013. 16: 572–578.
- Raikkonen K., Seckl J.R., Pesonen A.-K., Simons A., Van den Bergh B.R.H.* Stress, glucocorticoids and liquorice in human pregnancy: programmers of the offspring brain. *Stress.* 2011. 14 (6): 590–603.
- Rondo P.H., Ferreira R.F., Nogueira F., Ribeiro M.C., Lobert H., Artes R.* Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003. 57: 266–272.
- Salomon S., Bejar C., Schorer-Apelbaum D., Weinstock M.* Corticosterone mediates some but not other behavioural changes induced by prenatal stress in rats. *J. Neuroendocrinol.* 2011. 23 (2): 118–128.
- Shrira A.* Parental PTSD, health behaviors and successful aging among offspring of Holocaust survivors. *Psychiatry Res.* 2019. 271: 265–271.
- St-Pierre J., Laurent L., King S., Vaillancourt C.* Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta.* 2016. 48 (Suppl. 1): S66–S71.
- Sudarov A., Joyner A.L.* Cerebellum morphogenesis: The foliation pattern is orchestrated by multi-cellular anchoring centers. *Neural Dev.* 2007. 2: 26.
- Terry A.V.* Spatial navigation (water maze) tasks. *Methods of behavior analysis in neuroscience.* 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2009. Chapt. 13. 267–280 pp.
- Weinstock M.* The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008. 32 (6): 1073–1086.
- Weinstock M.* The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav. Immun.* 2005. 19 (4): 296–308.
- Weydt P., Hong S.Y., Kliot M., Moller T.* Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse

- model of ALS. *Neuroreport*. 2003. 14 (7): 1051–1054.
- Willner P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiol. Stress*. 2017. 6: 68–77.
- Yakovleva O., Bogatova K., Mukhtarova R., Yakovlev A., Shakhmatova V., Gerasimova E., Ziyatdinova G., Hermann A., Sitdikova G. Hydrogen sulfide alleviates anxiety, motor, and cognitive dysfunctions in rats with maternal hyperhomocysteinemia via mitigation of oxidative stress. *Biomolecules*. 2020. 10 (7): 995.
- Yakovleva O.V., Ziganshina A.R., Dmitrieva S.A., Arslanova A.N., Yakovlev A.V., Minibayeva F.V., Khaertdinov N.N., Ziyatdinova G.K., Giniatullin R.A., Sitdikova G.F. Hydrogen sulfide ameliorates developmental impairments of rat offspring with prenatal hyperhomocysteinemia. *Oxid. Med. Cel. Long.* 2018. 2018: 2746873.
- Zagron G., Weinstock M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav. Brain Res.* 2006. 175 (2): 323–328.

EFFECTS OF MILD CHRONIC STRESS OF FEMALE RATS BEFORE AND DURING PREGNANCY ON SENSORIMOTOR DEVELOPMENT, ANXIETY AND COGNITIVE FUNCTIONS OF THE OFFSPRING

O. V. Yakovleva^{a,#}, K. S. Bogatova^a, V. V. Skripnikova^a, and G. F. Sitdikova^a

^a Department of human and animal physiology, IFM&B, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

[#]e-mail: a-olay@yandex.ru

Effects of mild unpredictable chronic stress of female rats during two weeks before and two weeks during pregnancy on sensorimotor development, muscle strength and coordination of movements, cognitive abilities and the level of anxiety in offspring from birth to 3 months of life were investigated. Exposure to pregestational stress led to an increase of anxiety in females by the beginning of pregnancy, which persisted during first week of lactation. Prenatal stress led to a decrease in litter size, body weight of pups, a delay in physical development, and maturation of some sensorimotor reflexes in the first two weeks after birth. Motor activity reduced in the first two weeks was restored by the 26th day of life (P); no changes in muscle strength and motor coordination were observed in P16 and P26 rats. At all analyzed ages (P16, 26, 80), a decrease in exploratory activity and an increase in the level of anxiety were observed. Impairments of learning processes, spatial and nonspatial memory were shown in Morris water maze (P21–22) and the test for recognizing a new object (P72–90). Thus, our results indicate that moderate stress in females before and during pregnancy induced not only the impaired physical and neurological development in early ontogenesis, but also an increase in the level of anxiety and cognitive dysfunctions that persist in the adult period of the offspring.

Keywords: chronic prenatal stress, sensorimotor development, motor and exploratory activity, motor coordination, learning, memory, anxiety

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 591.3: 591.5: 612.86:612.273

Статья посвящается памяти д.б.н. Игоря Александровича Журавина

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ НАРУШАЕТ ОБОНЯТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ КРЫС

© 2021 г. Н. М. Дубровская^{1,*}, Д. С. Васильев¹, Н. Л. Туманова¹,
О. С. Алексеева¹, Н. Н. Наливаева^{1,**}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ndub@mail.ru

**e-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk

Поступила в редакцию 08.02.2021 г.

После доработки 02.03.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

Анализ возрастной динамики обонятельного поведения в тестах предпочтения запахов и поиска пищи показал, что все самцы крыс линии Вистар, независимо от возраста, из 8 запахов эфирных масел предпочитают запах валерианы, компоненты которого обладают свойствами феромонов у грызунов, а молодые крысы демонстрируют лучшую результативность поиска пищи, чем взрослые и старые животные. Острая пренатальная гипоксия (ПГ) на E14 (7% O₂, 3 ч) приводила к нарушению предпочтения запаха валерианы во всех исследованных возрастных группах крыс, а также к снижению результативности поиска пищи. После ПГ в пириформной коре крыс наблюдались процессы нейродегенерации, снижения числа нейронов и увеличение глиальных элементов. Подобные изменения были обнаружены нами ранее в энторинальной коре и гиппокампе, но не в обонятельных луковицах. Это позволяет предположить, что снижение обонятельной функции у крыс, вызванное ПГ, может быть результатом нарушений формирования центральных звеньев обонятельного анализатора в ходе первых месяцев постнатального онтогенеза.

Ключевые слова: постнатальный онтогенез, пренатальная гипоксия, нейродегенерация, обоняние, пириформная кора, обонятельные луковицы, предпочтение запахов, поиск пищи

DOI: 10.31857/S0044467721030035

ВВЕДЕНИЕ

Обонятельная функция является одной из основных сенсорных модальностей животных, обеспечивая им возможность выживания и точной ориентации в окружающей среде, а также осуществления разных форм социальной коммуникации. При этом определенные запахи могут изменять поведенческие реакции животных (Беляков и др., 2015). Различные запаховые стимулы воспринимаются большим числом обонятельных рецепторов, входящих в состав одного из наиболее представительных мультигенных семейств у млекопитающих (Niimura, 2009). Восприятие обонятельных сигналов начинается в обонятельном эпителии, где расположены обонятельные рецепторы, откуда их сигналы пере-

даются в обонятельные луковицы и далее в кортикальные отделы мозга, где осуществляются их анализ и запоминание (Mori, Sakano, 2011; Suzuki, Osumi, 2015; Takahashi et al., 2018).

Развитие обонятельной системы животных и человека начинается еще в эмбриональный период и к рождению она достаточно хорошо сформирована, обеспечивая новорожденному организму быструю ориентацию вне материнского организма (Sarnat, Flores-Sarnat, 2019). Обонятельная чувствительность и восприятие запахов подвержены онтогенетической динамике (Apfelbach et al., 1991) и могут изменяться в зависимости от физиологического состояния животного (Brennan, Kendrick, 2006), а также в зависимости от окружающей запаховой среды или

предшествующей истории обонятельных контактов (Соколов, Вознесенская, 1996). Нарушение обоняния приводит к существенным изменениям в поведении животных. Так, удаление обонятельных луковиц влияет как на моторные реакции животных, вызывая гиперлокомоцию, так и на их психоэмоциональное состояние (Недогреева и др., 2020). Исследования бульбэктомированных животных выявили широкий спектр морфологических и биохимических изменений мозга, которые также наблюдаются при развитии нейродегенеративных заболеваний человека (для обзора см. Гуляева и др., 2017).

Ранее в работах нашей лаборатории было показано, что пренатальная гипоксия (ПГ) на 14-й день эмбрионального развития приводит у крыс к нарушениям формирования и морфофункциональных свойств теменной и энторинальной коры, а также гиппокампа, которые в ходе постнатального онтогенеза сопровождаются снижением плотности дендритных шипиков и отставанию нейрогенеза и формирования пластичности нервной ткани (Васильев и др., 2020; Туманова и др., 2021; Vasilev et al., 2016). ПГ также существенным образом изменяет молекулярные характеристики нервной ткани, приводя к нарушениям в холинэргической (Mogozova et al., 2020) и пептидэргической системах. В частности, у крыс, перенесших ПГ, снижаются экспрессия и активность нейропептидазы неприлизина (НЕП) (Nalivaeva et al., 2012; Vasilev et al., 2021), которая расщепляет один из медиаторов ольфакторной передачи соматостатин (Barnes et al., 1995; Nosera et al., 2019). На поведенческом уровне ПГ приводит к нарушению когнитивных функций у крыс в постнатальном онтогенезе (Дубровская, Журавин, 2009), однако исследований влияния ПГ на обонятельное поведение крыс в ходе постнатального развития, а также на формирование структур, обеспечивающих проведение обонятельных стимулов, не проводилось.

Целью данного исследования являлось изучение обонятельного поведения крыс (предпочтение запахов и поиск пищи по запаху) на разных этапах онтогенеза (препубертатный период, период половозрелости, старение) в ходе нормального постнатального развития и после острой ПГ на 14-й день беременности. Также проводился анализ структуры пириформной коры крыс, являющейся важным звеном их обонятельного анализатора.

МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали крыс линии Вистар из питомника “Рапполово”. Животных содержали в стандартных условиях вивария ИЭФиБ РАН при световом режиме (12 час день/12 часов ночь) по 4–5 особей в клетках со свободным доступом к воде и пище за исключением условий, особо оговоренных в тексте. Эксперименты осуществляли согласно протоколу использования лабораторных животных ИЭФиБ им. И.М. Сеченова РАН, основанного на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Модель пренатальной острой нормобарической гипоксии. Для получения потомства, отвечающего требованиям эксперимента, виргильных самок в возрасте 3–4 мес весом 250–260 г ссаживали с самцами попарно в клетках вивария. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках. Оплодотворенных самок размещали по 4–5 особей в клетках вивария. На 14-е сутки беременности (E14) самок экспериментальной группы (пренатальная гипоксия – ПГ) подвергали действию нормобарической гипоксии в специальной камере (7% O₂, 3 ч) как описано ранее (Дубровская, Журавин, 2009). Беременные самки контрольной группы (К) находились такое же время в камере при нормальном содержании кислорода. На 20-е сутки беременности самок экспериментальной и контрольной групп рассаживали по отдельным клеткам. Считая нулевым день появления крысят на свет, на 2-е сутки после рождения (P2) в каждом выводке оставляли по 8 особей. Крысят отлучали от матерей на P25, разделяли по полу и помещали по 4–5 особей в отдельные клетки при стандартных условиях, при этом в одной клетке могли содержаться самцы из разных выводков. В процессе проведения экспериментов летальности в потомстве животных не наблюдалось. Исследования крыс (самцов) обеих групп (К и ПГ) проводили на разных этапах онтогенеза в возрасте: 1 мес – препубертатный период (“молодые”), 3 мес – период половозрелости (“взрослые”) и 1.5 года – старение (“старые”). Количество животных в каждой группе указано в подписях к рисункам.

Тест на предпочтение запахов. В парадигме “предпочтение запаха” животным один раз в

течение 8 дней предъявляли одновременно образцы запахов в восьми открытых стеклянных плошках ($\varnothing = 30$, $h = 30$ мм), содержащих эфирные масла апельсина, гвоздики, жасмина, мяты, эвкалипта, полыни, лаванды или валерианы в объеме 0.1 мл. Плошки располагались по кругу на равном расстоянии друг от друга и от стенок специальной камеры $500 \times 500 \times 200$ мм (для молодых животных) или $1000 \times 1000 \times 400$ мм (для взрослых и старых крыс). Животное сажали в центр камеры и в течение 15 мин регистрировали количество подходов/принюхиваний к каждой плошке. При каждом новом предъявлении расположение плошек с образцами запахов не повторялось. После каждого животного пол камеры протирали 50% раствором этилового спирта. Привлекательность для каждого запаха выражали в процентах от общего числа принюхиваний, усредняя их по всем дням тестирования. Из всего набора запахов только валериана обладала функционально значимым феромональным эффектом для грызунов (Мельник и др., 2009).

Тест результативности поиска пищи. В парадигме “поиск пищи” использовали модифицированную нами методику поиска корма (Sun et al., 2016). Тестирование животных проводили в специальной камере площадью 100×100 см с 16 отверстиями диаметром 2 см и непрозрачными стенками высотой 30 см. Во время эксперимента в два отверстия в полу закладывали по одному кусочку овсяного печенья диаметром 0.5 см. Кусочки печенья находились под слоем опилок ниже поверхности пола камеры на 0.5 см, и их расположение меняли при каждом новом тестировании. Перед тестированием крысы проходили 2-суточную пищевую депривацию. В ходе ежедневного 15-мин тестирования (один раз в течение 6 сут) оценивали в баллах количество добытых кусочков корма (0, 1 или 2) и регистрировали время, затраченное на их нахождение. Кроме того, за цикл тестирования подсчитывали общее число обнюхиваний всех отверстий в полу экспериментальной камеры. После нахождения второго кусочка печенья тестирование прекращалось. Перед каждым предъявлением пол камеры протирали 50% раствором этилового спирта и меняли верхний слой опилок.

Световая микроскопия. Светооптическое исследование проводили на крысах в возрасте P20, 1 мес (P35) и 3 мес (P90) контрольной ($n = 8$ в каждой возрастной группе) и экспери-

ментальной групп ($n = 9$ в каждой возрастной группе). Мозг после транскардиальной перфузии раствором параформальдегида (4% в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4) фиксировали в том же растворе в течение 4 сут, а затем помещали на сутки в 20%-й раствор сахаразы. Замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Germany). Для исследования отбирали срезы пирiformной коры мозга (2.3–4.5 мм от брегмы) (Paxinos, Watson, 2007) и проводили окрашивание по Нислю. С использованием микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия) оценивали состояние нервной ткани на серии срезов толщиной 20 мкм, выбирая первый срез серии случайно. Расстояние между последующими срезами в серии составляло 40 мкм. При проведении анализа использовали программу VideoTest Master-Morphology (VideoTest, Санкт-Петербург, Россия). Для каждого животного по шести срезам вычисляли средние величины общего количества клеток на участке ткани площадью 10000 мкм^2 , как описано нами ранее (Васильев и др., 2008). При подсчете учитывали только клетки в случае прохождения среза через клеточное ядро. В группу пирамидных нейронов включали клетки с вытянутыми телами, площадью профильного поля тела клетки более 25 мкм^2 и соотношением длинной и короткой осей тела клетки более 2. В группу непиримидных нейронов включали округлые клетки с площадью тела более 25 мкм^2 и соотношением длинной и короткой осей тела клетки менее 2. Клетки с площадью окрашенной области профильного поля менее 25 мкм^2 считали как глиальные.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS SigmaStat 3,0 или GraphPad Prism 9, используя однофакторную ANOVA (one-way ANOVA) с последующим Fisher LSD post hoc тестом для поведенческих экспериментов или U-тест Манна–Уитни для морфологических экспериментов. Для анализа значений с нормальным распределением использовались методы параметрической статистики. Значимыми считались различия при $p \leq 0.05$. Все данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, кроме случаев, специально оговоренных в тесте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование предпочтения запахов в постнатальном онтогенезе контрольных крыс. Сравнительный анализ поведения молодых, взрослых и старых крыс в тесте предпочтения запахов показал, что всех интактных крыс, независимо от их возраста, больше всего привлекало валериановое масло (рис. 1 (а)), число подходов к которому преобладало над остальными и составляло: у молодых животных – $19.9 \pm 2.0\%$ ($F_{7; 127} = 11.1, p < 0.001$); у взрослых – $20.0 \pm 0.04\%$ ($F_{7; 103} = 11.8, p < 0.001$); и у старых животных – $25.5 \pm 0.02\%$ ($F_{7; 103} = 8.3, p < 0.001$). У взрослых крыс особым предпочтением также пользовался запах эвкалипта со средним числом подходов к площадке с этим запахом $16.5 \pm 0.02\%$ ($F_{7; 103} = 11.8, p < 0.05$). Статистически значимых различий в количественном выражении предпочтения запаха валерианы у животных разного возраста выявлено не было.

Изменение результативности поиска пищи в постнатальном онтогенезе крыс. В контрольной группе животных наблюдалась возрастная динамика результативности поиска пищи ($F_{2; 41} = 4.5, p = 0.017$) (рис. 1 (б)). Сравнение среднего балла результативности поиска пищи в разных возрастных группах показало, что молодые крысы демонстрировали лучшие результаты, чем взрослые ($p = 0.013$) и старые животные ($p = 0.014$). При этом среди молодых животных преобладали особи, выполнявшие поиск корма с результативностью 100% ($F_{2; 16} = 9.9, p < 0.01$) и было меньше животных с нулевым результатом поиска ($p < 0.05$) (рис. 1 (в)). Взрослые и старые животные не различались по среднему баллу результативности (рис. 1 (б)), однако среди старых крыс было примерно в два раза больше ($F_{2; 16} = 7.6, p < 0.01$) особей, выполнявших поиск с 50%-м результатом, по сравнению с молодыми и взрослыми крысами (рис. 1 (в)), в то время как среди взрослых крыс было больше особей, выполнявших безрезультатный поиск корма ($F_{2; 16} = 11.4, p < 0.05$) (рис. 1 (в)).

Для оценки поисковой активности рассчитывали отношение суммарного числа обнюхиваний всех отверстий ко времени тестирования, выраженном в секундах, и рассматривали его в качестве индекса, отражающего мотивацию поиска пищи у животных. У молодых контрольных крыс индекс поисковой активности был в 3.7 и 2.3 раза выше этого

показателя у взрослых и старых животных, соответственно ($F_{2; 41} = 22.2; p < 0.01$) (рис. 1 (г)).

Влияние ПГ на предпочтение запахов в постнатальном онтогенезе крыс. У ПГ крыс наблюдалось существенное изменение поведения в тесте на предпочтение запахов. Так, молодые (рис. 2 (а)) и старые (рис. 2 (в)) ПГ крысы не отдавали предпочтения ни одному из предъявляемых запахов, а у взрослых крыс наблюдалось предпочтение ($F_{7; 111} = 11.0, p < 0.001$) к запахам апельсина и эвкалипта по сравнению с другими запахами (рис. 2 (б)). При этом предпочтение к запаху валерианы у ПГ крыс было ниже на 45% у молодых ($F_{15; 203} = 5.6, p < 0.001$); на 23% у взрослых ($F_{15; 215} = 10.8, p < 0.001$) и на 38% у старых крыс ($F_{15; 191} = 4.5, p < 0.001$) по сравнению с контролем. Также по сравнению с контролем молодые ПГ животные больше интересовались запахами полыни и лаванды ($F_{15; 203} = 5.6, p < 0.001$), а для старых животных наиболее привлекательным был запах мяты ($F_{15; 191} = 4.5, p < 0.033$). Нарушение предпочтения запаха валерианы среди прочих индифферентных одорантов интерпретировалось как свидетельство нарушения нормальной работы обонятельного анализатора.

Влияние пренатальной гипоксии на результативность поиска пищи в постнатальном онтогенезе крыс. Анализ поведения ПГ животных выявил отсутствие возрастной динамики по результативности поиска пищи ($F_{2; 32} = 0.3, p = 0.758$). В среднем ПГ крысы из разных возрастных групп набирали меньше баллов, чем их контрольные сверстники ($F_{5; 74} = 7.2, p < 0.001$). У молодых животных наблюдалось снижение этого показателя на 43% ($p < 0.01$), у взрослых – на 40% ($p = 0.018$) и у старых – на 41% ($p < 0.01$) (рис. 3 (а)). Более детальный анализ показал, что в ПГ группе отсутствовали различия по количеству крыс, выполнявших безуспешный или 100% поиск (рис. 3 (б, г)). Однако по количеству крыс, находивших только 1 кусок печени, были выявлены возрастные изменения ($F_{2; 16} = 3.7, p = 0.05$) и число молодых животных с таким результатом было меньше по сравнению со старыми животными ($p < 0.01$) (рис. 3 (в)). На всех исследуемых этапах онтогенеза при сопоставлении с контрольными сверстниками ПГ крысы чаще ($F_{5; 33} = 11.7, p < 0.001$) демонстрировали безуспешный поиск с нулевым результатом (рис. 3 (б)) и реже ($F_{5; 33} = 10.5, p < 0.001$) находили оба куска печени (рис. 3 (г)).

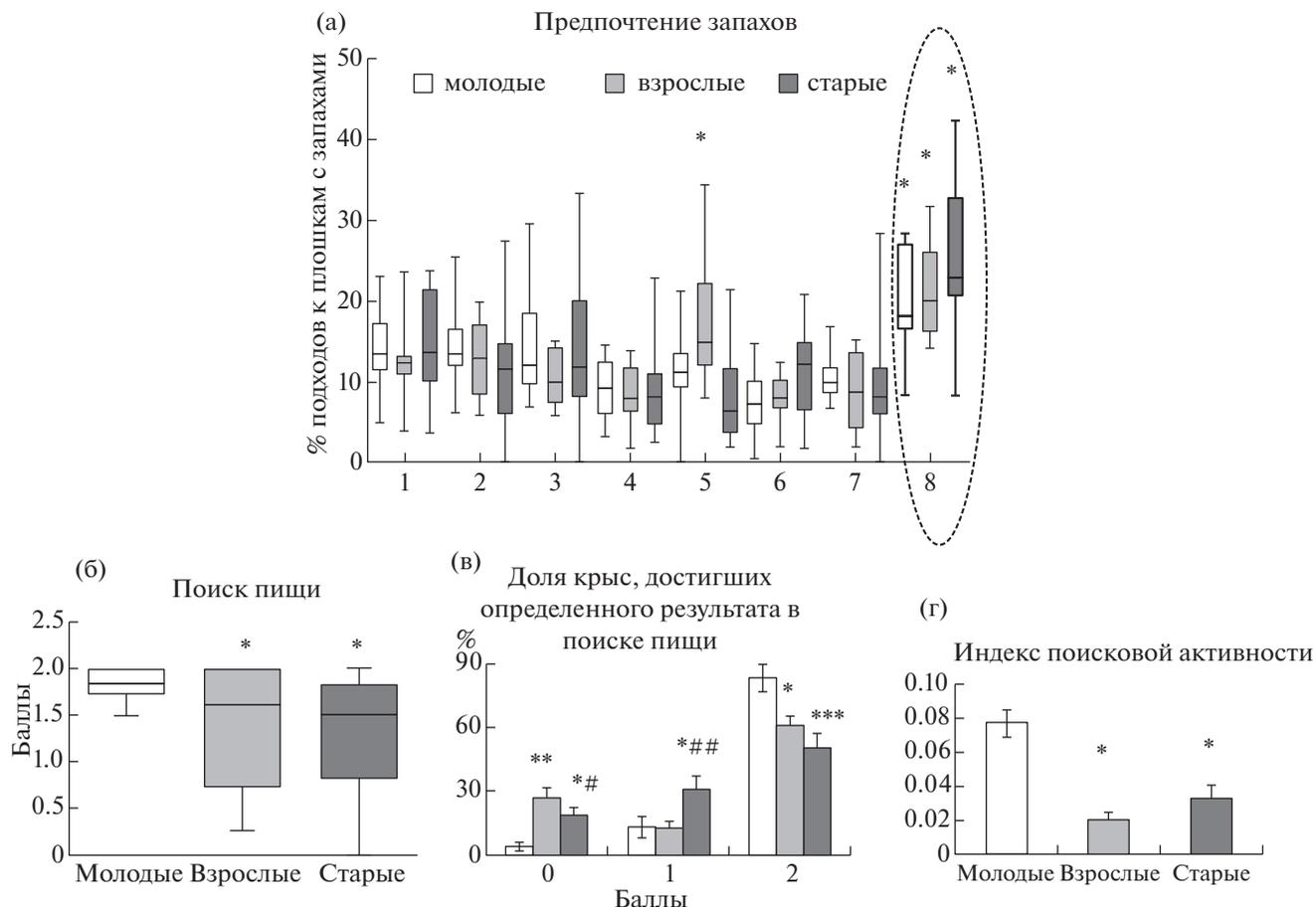


Рис. 1. Возрастная динамика обонятельного поведения крыс.

(а) – Поведение в тесте предпочтения запахов молодых ($n = 16$), взрослых ($n = 13$) и старых ($n = 13$) крыс контрольной группы. Ось ординат: число подходов к каждой площадке с запахом, выраженное в % от суммарного числа подходов ко всем площадкам, взятого за 100%. Ось абсцисс: запахи 1 – апельсина, 2 – гвоздики, 3 – жасмина, 4 – мяты, 5 – эвкалипта, 6 – полыни, 7 – лаванды, 8 – валерианы. * – $p < 0.001$ – различия между запахом валерианы и другими запахами в каждой возрастной группе. (б–г) – Поведение в тесте поиска пищи молодых ($n = 15$), взрослых ($n = 13$) и старых ($n = 14$) крыс контрольной группы. (б) – Средняя результативность поиска пищи, выраженная в баллах (ось ординат) для каждой возрастной группы (ось абсцисс), * – $p < 0.05$ – различия между группами; (в) – доля крыс в % от общего количества крыс в каждой группе (ось ординат), достигших результата от 0 до 2 (ось абсцисс). (а–б) – Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов, с указанием разбросов между минимальным и максимальным значениями. (в–г) – Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – различия между молодыми и взрослыми или молодыми и старыми крысами; # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – различия между взрослыми и старыми крысами. (г) – Индекс поисковой активности (ось ординат). * – $p < 0.001$ – различия между молодыми и взрослыми или молодыми и старыми животными.

Fig. 1. Age dynamics of olfactory behavior in rats. (a) Behavior in the odor preference test of young ($n = 16$), adult ($n = 13$) and old ($n = 13$) rats of the control group. Ordinate: the number of approaches to each vial with a specific odor, expressed as % of the total number of approaches to all vials during the testing period. Abscissa: the numbers indicate the corresponding odors – 1 – orange, 2 – carnations, 3 – jasmine, 4 – mint, 5 – eucalyptus, 6 – wormwood, 7 – lavender, 8 – valerian. * – $p < 0.001$ – statistically significant differences between valerian and other odors in each age group. (б–г) – Behavior in the food search test of young ($n = 15$), adult ($n = 13$) and old ($n = 14$) control rats. (б) – averaged food search performance in score points (ordinate) for each age group (abscissa), * – $p < 0.05$ – differences between age groups; (в) – the number of rats that achieved a certain search result, expressed in % of the total number of rats in each group (ordinate) achieved the score from 0 to 2 (abscissa). (а–б) – data presented as medians and interquartile ranges with the spreads indicating the minimum and maximum values. (в–г) – data presented as mean \pm SEM. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – differences between young and old rats; # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – differences between adult and old rats. (г) Index of search activity (ordinate). * – $p < 0.001$ – differences between young and adult or between young and old rats.

По индексу поисковой активности ПГ животные не отличались от контрольных сверстников и у них наблюдалась сходная с ними онтогенетическая динамика этого по-

казателя ($F_{5,74} = 16.9; p < 0.01$). У молодых ПГ крыс этот параметр был в 3.1 и 3.7 раза выше, чем у взрослых и старых крыс соответственно (рис. 3 (д)).

Анализ структуры пириформной коры крыс в ходе постнатального онтогенеза. Изучение светооптическим методом Ниссля клеточной организации пириформной коры крыс, являющейся центром, куда направлены обонятельные пути из обонятельных луковиц, показало, что на P20 у крыс после ПГ по сравнению с контролем имеются признаки деструкции нервных клеток, в частности, вздутые нейроны с отежными отростками. В цитоплазме этих нейронов появлялись вакуоли и наблюдался лизис органоидов (хроматолиз) (рис. 4 (д)). На этой стадии также отмечалось большое количество глиальных клеток, расположенных вблизи набухших нейронов. На P35 количество глиальных клеток увеличивалось, а количество нейронов снижалось (рис. 4 (и)). На P90 в пириформной коре ПГ крысят имело место затухание нейродегенеративных процессов и исчезали скопления глиальных клеток, однако еще встречались отдельные нейроны в состоянии хроматолиза (рис. 4 (г, ж)).

Морфометрическое исследование клеточного состава ткани пириформной коры крыс после ПГ. Анализ клеточного состава пириформной коры ПГ крыс на P35 показал снижение на 19.3% общего числа клеток по сравнению с контролем (критерий Манна–Уитни, $U = 12.4, p = 0.03$) (рис. 4 (з, и)). У ПГ крыс отмечалось также снижение количества пирамидных нейронов на 25.2% от уровня контроля (критерий Манна–Уитни, $U = 8.2, p < 0.01$), при отсутствии статистически различий в количестве непиримидных нейронов (критерий Манна–Уитни, $U = 21.0, p < 0.08$). Это свидетельствует о гибели проекционных пирамидных нейронов в пириформной коре ПГ крыс в ходе первого месяца развития. В то же время среднее количество глиальных кле-

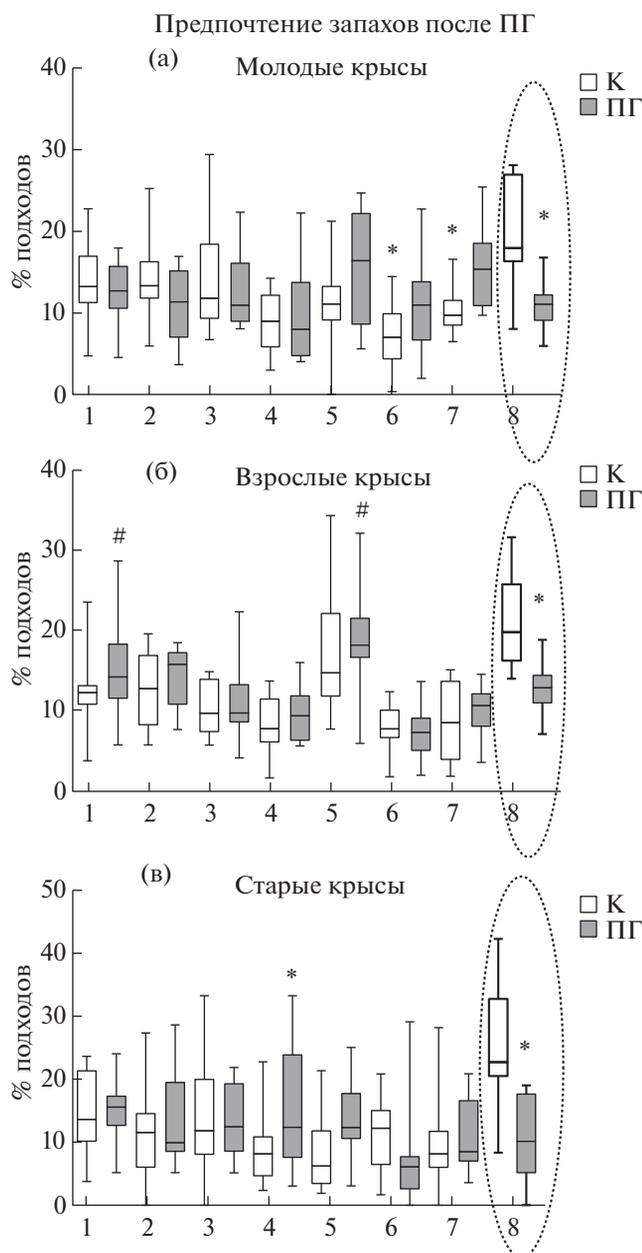


Рис. 2. Сравнительный анализ предпочтения запахов на разных этапах онтогенеза между контрольными и ПГ крысами. (а) – Сравнение молодых контрольных ($n = 16$) и ПГ ($n = 10$) животных. (б) – Сравнение взрослых контрольных ($n = 13$) и ПГ ($n = 14$) животных. (в) – Сравнение старых контрольных ($n = 13$) и ПГ ($n = 11$) животных. Остальные обозначения как на рис. 1. # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – различия между запахом валерианы и другими запахами в группе взрослых ПГ животных. * – $p < 0.05$ ** – $p < 0.001$ – различия между контрольной и ПГ группами.

Fig. 2. Comparative analysis of odor preferences at different stages of ontogenesis between control and PH rats. (a) – Comparison of young control ($n = 16$) and PH ($n = 10$) rats. (б) – Comparison of adult control ($n = 13$) and PH ($n = 14$) rats. (в) – Comparison of old control ($n = 13$) and PH rats. All indication as in Fig. 1. # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – differences between preference to valerian and other odors in the group of adult PH rats. * – $p < 0.05$ ** – $p < 0.001$ – differences between the control and PH groups.

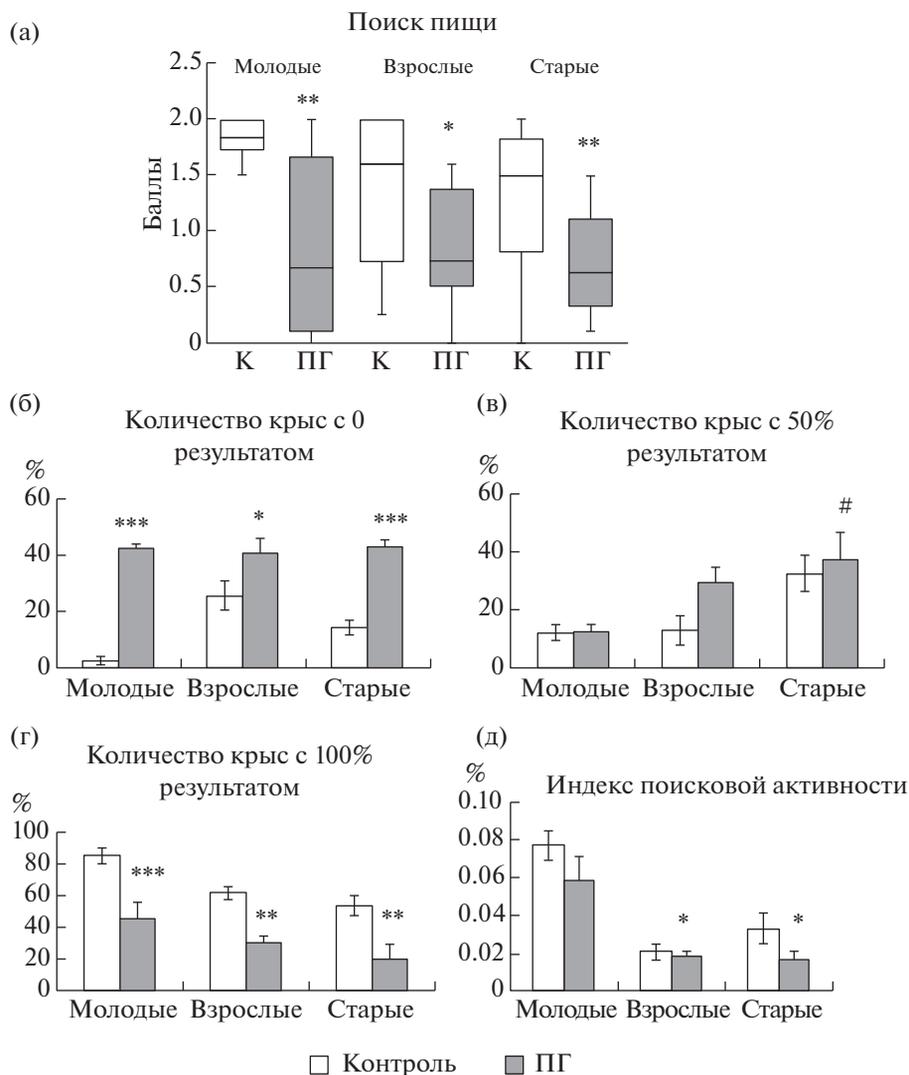


Рис. 3. Сравнительный анализ эффективности поиска пищи у контрольных и ПГ крыс. (а) – Ось ординат: усредненная по возрастным группам результативность поиска в баллах. Остальные обозначения как на рис. 1. * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$ – различия между контрольной и ПГ группами. (б–г) – Ось ординат: доля крыс (%), достигших определенного результата в поиске пищи от общего количества крыс в каждой возрастной группе, принятого за 100%. (б) – молодые контрольные ($n = 16$) и ПГ ($n = 10$) крысы; (в) – взрослые контрольные ($n = 13$) и ПГ ($n = 14$) крысы; (г) – старые контрольные ($n = 13$) и ПГ ($n = 11$) крысы. Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего. # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – различия между молодыми и старыми ПГ крысами; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – различия между контрольной и ПГ группами. (д) – По оси ординат: индекс поисковой активности. * – $p < 0.001$.

Fig. 3. Comparative analysis of food search efficacy in control and PH rats. (а) – Ordinate: averaged food search performance in each age group expressed in score points. All indications as in Fig. 1. * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$ – statistically significant differences between the control and hypoxic groups. (б–г) – Ordinate: number of rats (%) that achieved a certain search result in each age group from the total number of rats in the group taken as 100%. (б) – young control ($n = 16$) and PH ($n = 10$) rats; (в) – adult control ($n = 13$) and PH ($n = 14$) rats; (г) – old control ($n = 13$) and PH ($n = 11$) rats. Data are presented as mean \pm SEM. # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ – differences between young and old PH rats; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – differences between control and PH groups. (д) – Ordinate: index of search activity. * – $p < 0.001$.

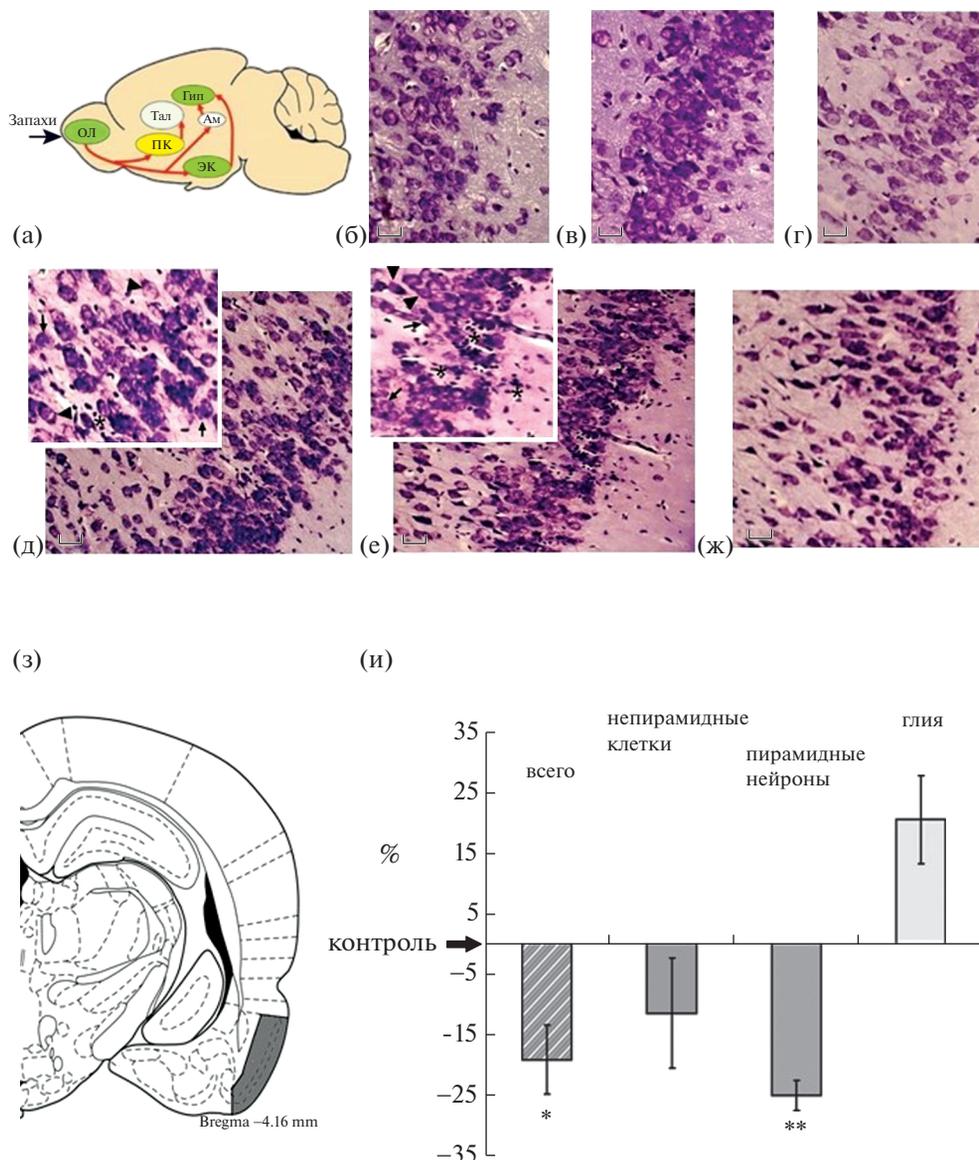


Рис. 4. Структурные изменения в пириформной коре в постнатальном онтогенезе крыс в норме и после ПГ. (а) – схема связей в обонятельном анализаторе крыс. ОЛ – обонятельные луковицы, Тал – таламус, Гип – гиппокамп, ЭК – энторинальная кора, ПК – пириформная кора. (б)–(ж) – микрофотографии участка пириформной коры крыс, окраска по Нисслю, масштаб 30 мкм. (б–г) – микрофотография участков пириформной коры контрольных крыс на P20 (б), P35 (в) и P90 (г). (д–ж) – микрофотография участков пириформной коры ПГ крысы на P20 (д), P35 (е) и P90 (ж). В левом верхнем углу рисунков (д) и (е) – увеличенные фрагменты микрофотографий со скоплениями глиальных элементов и дегенерирующими нейронами. Тонкие черные стрелки – непиримидные нейроны, черные треугольники – пирамидные нейроны, * – скопления глиальных клеток. (з) – схема расположения исследуемой области пириформной коры, взятой для морфометрического анализа. (и) – изменение числа разных популяций клеток (ось абсцисс) на исследуемом участке пириформной коры крыс на P35. Ось ординат – результаты изменений после ПГ в % от уровня контроля, принятого за 0%, выраженные в виде среднее \pm ошибка среднего. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fig. 4. Structural changes in the piriform cortex in postnatal ontogenesis of rats under normal conditions and after PH. (a) – diagram of connections of the olfactory bulb with the piriform cortex. ОЛ – olfactory bulbs, Тал – thalamus, Гип – hippocampus, ЭК – entorhinal cortex, ПК – piriform cortex. (б–ж) – microphotographs of the sections of the rat piriform cortex, Nissl staining, scale 30 μ m. (б–г) – microphotographs of the piriform cortex in control rats on P20 (б), P35 (в) and P90 (г). (д–ж) – microphotographs of the piriform cortex in rats subjected to prenatal hypoxia. Animal age is: P20 (д), P35 (е) and P90 (ж). In the upper left corner of the figures (д) and (е), enlarged fragments of microphotographs with shown glial elements and degenerating neurons. Thin black arrows – non-pyramidal neurons, black triangles – pyramidal neurons, * – conglomerates of glial cells. (з) – schematic presentation of piriform cortex area taken for the morphometric analysis. (и) – changes in the number of different cell populations (abscissa) in the piriform cortex of rats on P35. Ordinate – changes in cell number after PH in % of the control levels taken as 0% expressed as mean \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ток у таких животных было в среднем на 20.4% выше, чем в контроле (рис. 4 (б)), однако в силу неоднородности распределения этих клеток статистической значимости различий выявить не удалось (рис. 4 (д–е)).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение обонятельной функции животных и человека наблюдается как в ходе нормального старения, так и в более раннем возрасте при развитии вирусных инфекций, что особенно ярко проявилось в ходе пандемии COVID-19 (Koralnik, Tayler, 2020), а также нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера (БА) (Murphy, 2019), Паркинсона (Doty, 2012) и других патологий нервной системы (Barresi et al., 2012, Bsteh et al., 2019; Carnemolla et al., 2020). Расстройства обоняния в патогенезе нейродегенеративных заболеваний проявляются намного раньше, чем когнитивные или двигательные нарушения (Bsteh et al., 2019). Существует мнение, что в их основе лежат отличные от нормального старения молекулярно-клеточные механизмы (Parvand, Rankin, 2020), что делает исследования на животных моделях важным направлением в данной области нейробиологии.

Поскольку формирование обонятельной системы начинается уже в эмбриональный период, повреждающие пренатальные воздействия на организм могут приводить к существенным перестройкам в развитии нейрональных сетей, принимающих участие в проведении обонятельных стимулов (Akers et al., 2011; Liu et al., 2013) и нарушению обонятельной функции в последующем онтогенезе (Franks, Isaacson, 2005). Проведенное нами исследование показало, что пренатальная гипоксия существенным образом изменяет обонятельное поведение крыс. Используемые в нашей работе методики тестирования обонятельного поведения крыс были основаны как на их способности распознавать физиологически значимые одоранты, так и на целенаправленном поиске пищи по запаху. Было показано, что среди восьми запахов натуральных эфирных масел наиболее привлекательным для всех интактных крыс, независимо от возраста, является валериановое масло. Такой результат вполне закономерен в связи с тем, что компоненты валерианового масла, в частности, изовалериановая кислота, имеют феромональное значение для этого вида животных и широко используются при

исследовании обонятельной функции у грызунов (Борякова и др., 2007; Мельник и др., 2009; Мельник и др., 2012). ПГ существенно влияла на предпочтения запахов во всех возрастных группах. Примечательно, что после ПГ молодые и старые крысы не отдавали предпочтения ни одному из предъявляемых запахов, и только взрослые животные обнаруживали предпочтение к запахам апельсина и эвкалипта. Таким образом, ПГ нивелировала предпочтение к физиологически значимому для нормальных животных запаху валерианы, что может пагубно влиять на их половое поведение.

Анализ обонятельного поведения крыс по поиску пищи, на результативность которого может влиять как мотивация животного, так и состояние его обонятельной системы (Roesch et al., 2007; Bianchi et al., 2014), показал, что эффективность поиска пищи у контрольных животных, также как и индекс поисковой активности, снижаются с возрастом. Поэтому можно предположить, что снижение поисковой мотивации у взрослых и старых крыс обуславливает и более низкую их результативность. ПГ не изменяла возрастную динамику индекса поисковой активности крыс, однако результативность поиска пищи у ПГ животных была значительно ниже, чем у интактных сверстников, и результат поиска у них чаще оказывался нулевым и реже 100%-ным. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ПГ нарушает у животных именно обонятельную функцию, а не мотивацию пищевого поиска. Это согласуется с немногочисленными данными литературы о том, что ПГ и другие патологические воздействия нарушают более сложные формы обонятельного поведения, связанные с ассоциативным обучением и памятью (Тюлькова и др., 2010; Akers et al., 2011).

Работа обонятельного анализатора затрагивает многие отделы головного мозга, однако наиболее значимыми считаются обонятельные луковицы, где происходит начальная обработка сигналов, поступающих от рецепторных клеток обонятельного эпителия носовой полости и вомероназального органа, пириформная и энторинальная области коры, в которых расположены проекционные нейроны, передающие сигналы в таламические ядра и гиппокамп, а также гипоталамические ядра и миндалина, осуществляющие модуляцию поступающей информации (Arzi, Sobel, 2011; Ghosh et al., 2011; Sosulski et al.,

2011) (рис. 4 (а)). К сожалению, информация о влиянии пренатальной гипоксии на данные отделы головного мозга в литературе крайне скудна. Ранее нами было показано, что ПГ на E14 вызывает нарушение генерации и миграции нейробластов при формировании энторинальной области коры мозга крыс, а также гибель нейронов в первый месяц постнатального онтогенеза (Васильев и др., 2020; Туманова и др., 2021). В ходе настоящего исследования на той же модели показано, что ПГ приводит к гибели нейронов и в пириформной области коры мозга крыс. Это свидетельствует в пользу существования общих молекулярно-клеточных механизмов нарушения формирования кортикальной пластинки в различных областях коры головного мозга грызунов в ходе эмбрионального развития. Во всех случаях изменения в структурной организации коры после ПГ наиболее сильно выражены во второй половине первого месяца постнатального развития крысят (P20-30). В это время у них также наблюдаются наиболее выраженные моторные и когнитивные дисфункции (Дубровская, Журавин, 2009), а также нарушения поиска пищи по запаху и изменение предпочтения к одорантам, что показано в данной работе. Тем не менее при всей схожести характера структурных изменений в кортикальной пластине, паттерны изменения клеточного состава в различных отделах коры головного мозга после ПГ различаются. Так, в теменной коре наиболее чувствительными к действию ПГ являются проекционные пирамидные нейроны, особенно в V-VI слоях, при отсутствии выраженного глиоза (Vasilev et al., 2016), а в энторинальной коре отмечается заметное снижение числа непирамидных клеток (Васильев и др., 2020; Туманова и др., 2021). В пириформной области коры, согласно данному исследованию, ПГ также приводит к снижению численности проекционных пирамидных нейронов, однако для нее характерно наличие локальных скоплений глиальных клеток (Туманова и др., 2021).

Полученные нами ранее результаты также свидетельствуют о том, что ПГ вызывает патологические изменения не только в пириформной и энторинальной коре, но и в гиппокампе (Туманова и др., 2021), т.е. в отделах мозга, участвующих в процессе обработки обонятельной информации. В то же время ПГ не вызывала существенных изменений в составе обонятельных луковиц, характеризу-

ющихся высокой степенью нейрогенеза в ходе всего постнатального развития (Bianchi et al., 2014). Можно предположить, что гибель проекционных нейронов в кортикальных отделах и является одной из причин нарушений поиска пищи по запаху и различения одорантов, которые наблюдались в ходе данного исследования.

Еще одним важным звеном в проведении обонятельных стимулов является нейропептидаза неприлизин (НЕП), расщепляющая соматостатин – важный медиатор пептидэргической передачи в разных отделах мозга, включая обонятельные луковицы (Barnes et al., 1995; Nocera et al., 2019). В мозге развивающегося эмбриона крыс НЕП начинает экспрессироваться еще до рождения именно в структурах обонятельных луковиц (Dutriez et al., 1992). Как было показано нами ранее, в этой части обонятельного анализатора крыс уровень экспрессии НЕП намного превышает экспрессию в кортикальных структурах мозга в ходе всего постнатального периода и снижается только у старых крыс, коррелируя со снижением остроты их обонятельной функции (Vasilev et al., 2021). ПГ на E14 существенно снижала уровень экспрессии НЕП в энторинальной и теменной коре, а также в гиппокампе крыс в первые месяцы после рождения, но при этом не влияла на уровень экспрессии НЕП в обонятельных луковицах (Vasilev et al., 2021). Эти данные подтверждают нашу гипотезу о том, что ПГ в основном изменяет свойства центральных звеньев обонятельного анализатора. Поскольку НЕП является одним из основных амилоид-деградирующих ферментов в ткани мозга, а дефицит его содержания и активности играет важную роль в патогенезе БА (см. обзор: Nalivaeva, Turner, 2019), снижение его экспрессии в обонятельных структурах мозга индивидуумов, перенесших пренатальный стресс, а также в ходе нормального старения, может способствовать накоплению в них β -амилоидного пептида, гибели нервных клеток и нейродегенерации, увеличивая риск развития БА и способствуя снижению обонятельной функции (Saiz-Sanchez et al., 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе постнатального развития крыс наблюдается снижение эффективности обонятельной функции, проявляющееся в более низкой результативности поиска пищи. Ги-

поксия в пренатальный период приводит к снижению эффективности поиска пищи, начиная с ранних этапов онтогенеза и до старости, при этом на всех исследованных этапах нарушается распознавание запаха валерианы, имеющего феромональное значение. Вызванные ПГ нарушения коррелируют с изменениями структуры и клеточного состава пирформной коры, являющейся важной составной частью обонятельного анализатора, а также энторинальной коры и гиппокампа, но не обонятельных луковиц. Это позволяет сделать вывод, что ПГ в период активного формирования корковых структур мозга крыс существенно нарушает процессы развития и биохимические характеристики центральных отделов обонятельного анализатора, не затрагивая существенным образом его периферические отделы, приводя к нарушению реализации обонятельного поведения животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00232) и частично в соответствии с Госзаданием ИЭФиБ им. И.М. Сеченова РАН № АААА-А18-118012290373-7.

Авторы выражают глубокую благодарность Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) ИЭФБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляков В.И., Макеева Ю.В., Грибанов И.А.* Влияние различных одорантов на особенности поведенческих реакций крыс. *Евразийский Союз Ученых.* 2015. 4 (13): 6–11. <https://doi.org/10.31618/esu.2411-6467.8.53.1>
- Борякова Е.Е., Гладышева О.С., Крылов В.Н.* Возрастная динамика обонятельной чувствительности у самок лабораторных мышей и крыс к запаху изовалериановой кислоты. *Сенс. сист.* 2007. 21 (4): 341–346.
- Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Калинина Д.С.* Пренатальная гипоксия приводит к нарушению формирования нервной ткани энторинальной области коры мозга крыс. *Росс. физиол. ж.* 2020. 106 (10.): 1278–1288. <https://doi.org/10.31857/S086981392010012X>
- Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А.* Структурные изменения нервной ткани новой коры в онтогенезе крыс после гипоксии на разных сроках онтогенеза. *Ж. эвол. биох. физиол.* 2008. 44 (3): 258–266.
- Гуляева Н.В., Бобкова Н.В., Колосова Н.Г., Самохин А.Н., Степаничев М.Ю., Стефанова Н.А.* Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза спорадической формы болезни Альцгеймера: исследования *in vivo* на моделях грызунов. *Биохимия.* 2017. 82: 1427–1443.
- Дубровская Н.М., Журавин И.А.* Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2009. 58 (5): 616–625. <https://doi.org/10.1007/s11055-009-9235-2>
- Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н.* Возрастные изменения обонятельной чувствительности самцов мышей к запаху изовалериановой кислоты. *Сенсорные системы.* 2009. 23 (2): 151–155.
- Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н.* Влияние предварительного воздействия паров изовалериановой кислоты на обонятельную чувствительность самцов домовых мыши. *Сенсорные системы.* 2012. 26 (1): 52–56.
- Недогреева О.А., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В.* 2020. Удаление обонятельных луковиц у мышей приводит к изменениям эмоционального поведения. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 70 (1): 104–114. <https://doi.org/10.31857/S0044467720010116>
- Туманова Н.Л., Васильев Д.С., Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Журавин И.А.* Влияние пренатальной гипоксии на цитоархитектонику и ультраструктурную организацию отделов мозга, связанных с обонятельной функцией у крыс. *Цитология.* 2021. 71 (2) 71 (2): 163–175. <https://doi.org/10.31857/S0041377121020085>.
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А.* Механизмы формирования реакций мозга на действие гипербарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2010. 59 (4): 99.
- Соколов В.Е., Вознесенская В.В.* Роль раннего ольфакторного опыта в индивидуальном распознавании серой крысы. 1996. *Докл. Акад. наук.* 348 (5): 140–142.
- Akers K.G., Kushner S.A., Leslie A.T., Clarke L., van der Kooy D., Lerch J.P., Frankland P.W.* Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice. 2011. *Mol. Brain.* 4: 29. <http://www.molecularbrain.com/content/4/1/29>
- Apfelbach R., Russ D., Slotnick B.M.* Ontogenetic changes in odorsensitivity, olfactory receptor area

- and olfactory receptor density in the rat. *Chem. Senses*. 1991.16: 209–218.
<https://doi.org/10.1093/chemse/16.3.209>
- Arzi A., Sobel N.* Olfactory perception as a compass for olfactory neural maps. *Trends Cogn. Sci.* 2011. 15: 537–545.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.09.007>
- Barnes K., Doherty S., Turner A.J.* Endopeptidase-24.11 is the integral membrane peptidase initiating degradation of somatostatin in the hippocampus. *J. Neurochem.* 1995. 64: 1826–1832.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64041826.x>
- Barresi M., Ciurleo R., Giacoppo S., FotiCuzzola V., Celi D., Bramanti P., Marino S.* Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.* 2012. 323 (1–2): 16–24.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.08.028>
- Bianchi P., Bettini S., Guidi S., Ciani E., Trazzi S., Stagni F., Ragazzi E., Franceschini V., Bartesaghi R.* Age-related impairment of olfactory bulb neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Exp. Neurol.* 2014. 251: 1.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.018>
- Brennan P.A., Kendrick K.M.* Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006. 361 (1476): 2061–2078.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1931>
- Bsteh G., Hegen H., Ladstätter F., Berek K., Amprosi M., Wurth S., Auer M., Di Pauli F., Deisenhammer F., Reindl M., Berger T., Lutterotti A.* Change of olfactory function as a marker of inflammatory activity and disability progression in MS. *Mult. Scler.* 2019. 25 (2): 267–274.
<https://doi.org/10.1177/1352458517745724>
- Carnemolla S.E., Hsieh J.W., Sipione R., Landis B.N., Kumfor F., Piguet O., Manuel A.L.* Olfactory dysfunction in frontotemporal dementia and psychiatric disorders: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020. 118: 588–611.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.08.002>
- Doty R.L.* Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2012. 8: 329.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>
- Dutriez I., Salès N., Fournié-Zaluski M.C., Roques B.P.* Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24-11 (“enkephalinase”) studied by in vitro autoradiography in the rat. *Experientia.* 1992. 48: 290.
<https://doi.org/10.1007/BF01930479>
- Franks K.M., Isaacson J.S.* Synapse-specific downregulation of NMDA receptors by early experience: a critical period for plasticity of sensory input to olfactory cortex. *Neuron.* 2005.47: 101–114.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.024>
- Ghosh S., Larson S.D., Hefzi H., Marnoy Z., Cutforth T., Dokka K., Baldwin K.K.* Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. *Nature.* 2011. 472: 217.
<https://doi.org/10.1038/nature09945>
- Koralnik I.J., Tyler K.L.* COVID-19: A Global Threat to the Nervous System. *Ann. Neurol.* 2020. 88: 1.
<https://doi.org/10.1002/ana.25807>
- Liu Y.-H., Lai W.-S., Tsay H.-J., Wang T.-W., Yu J.-Y.* Effects of maternal immune activation on adult neurogenesis in the subventricular zone—olfactory bulb pathway and olfactory discrimination. *Schiz. Res.* 2013. 151 (1–3): 1–11.
- Morozova A.Yu., Arutyunyan A.V., Morozova P.Yu., Kozina L.S., Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N.* Effect of Prenatal Hypoxia on Activity of the Soluble Forms of Cholinesterases in Rat Brain Structures during Early Postnatal Ontogenesis. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2020. 56 (6): 531–540.
<https://doi.org/10.1134/S002209302006006X>
- Mori K., Sakano H.* How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 2011. 34: 467–499.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>
- Murphy C.* Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2019. 15: 11–24.
<https://doi.org/10.1038/s41582-018-0097-5>
- Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R., Makova N.Z., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J.* Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. *J. Mol. Neurosci.* 2012. 46: 569–577.
<https://doi.org/10.1007/s12031-011-9644-x>
- Nalivaeva N.N., Turner A.J.* Targeting amyloid clearance in Alzheimer’s disease as a therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* 2019. 176: 3447–3463.
<https://doi.org/10.1111/bph.14593>
- Niimura Y.* Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents. *Hum Genomics.* 2009. 4 (2):107–118.
<https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-2-107>
- Nocera S., Simon A., Fiquet O., Chen Y., Gascuel J., Datiche F., Schneider N., Epelbaum J., Viollet C.* Somatostatin Serves a Modulatory Role in the Mouse Olfactory Bulb: Neuroanatomical and Behavioral Evidence. *Front. Behav. Neurosci.* 2019. 13: 61.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061>
- Parvand M., Rankin C.H.* Is There a Shared Etiology of Olfactory Impairments in Normal Aging and Neurodegenerative Disease? *J. Alzheimers Dis.* 2020. 73: 1–21.
<https://doi.org/10.3233/JAD-190636>
- Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th Edition. Amsterdam: Academic Press-Elsevier Inc., 2007, 456 p.

- Roesch M.R., Stalnaker T.A., Schoenbaum G. Associative encoding in anterior piriform cortex versus orbitofrontal cortex during odor discrimination and reversal learning *Cereb. Cortex*. 2007. 17 (3): 643–652.
https://doi.org/10.1093/cercor/bhk009
- Saiz-Sanchez D., Ubeda-Bañon I., de la Rosa-Prieto C., Argandoña-Palacios L., Garcia-Muñozguren S., Insausti R., Martínez-Marcos A. Somatostatin, Tau, and β -amyloid within the anterior olfactory nucleus in Alzheimer disease. *Exp. Neurol*. 2010. 223: 347.
https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.06.010
- Sarnat H.B., Flores-Sarnat L. Development of the human olfactory system *Handb. Clin. Neurol*. 2019. 164: 29–45.
https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00003-4
- Sosulski D.L., Lissitsyna Bloom M., Cutforth T., Axel R., Datta S.R. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature*. 2011. 472: 213.
https://doi.org/10.1038/nature09868
- Sun S., Li T., Davies H., Li W., Yang J., Li S., Ling S. Altered Morphologies and Functions of the olfactory bulb and hippocampus induced by miR-30c. *Front. Neurosci*. 2016. 10: 207.
https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00207
- Suzuki J., Osumi N. Neural crest and placode contributions to olfactory development. *Curr. Top. Dev. Biol*. 2015. 111: 351–74.
https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2014.11.010
- Takahashi H., Yoshihara S., Tsuboi A. The Functional Role of Olfactory Bulb Granule Cell Subtypes Derived From Embryonic and Postnatal Neurogenesis. *Front. Mol. Neurosci*. 2018.11: 229.
https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00229
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A. Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity, and rat behavior in postnatal ontogenesis *Front. Neurosci*. 2016. 10: 126.
https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00126
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N. Developmental Profile of Brain Neprilysin Expression Correlates with Olfactory Behaviour of Rats. *J. Mol. Neurosci*. 2021.
https://doi.org/10.1007/s12031-020-01786-3

This paper is dedicated to the memory of Dr Igor A. Zhuravin

PRENATAL HYPOXIA IMPAIRS OLFACTORY FUNCTION IN POSTNATAL ONTOGENESIS OF RATS

N. M. Dubrovskaya^{a, #}, D. S. Vasilev^a, N. L. Tumanova^a, O. S. Alekseeva^a, and N. N. Nalivaeva^{a, ##}

^a I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

[#]e-mail: ndub@mail.ru

^{##}e-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk

Analysis of age-dependent dynamics of olfactory behavior in the tests of odor preference and food search demonstrated that all Wistar male rats, regardless of age, out of 8 essential oil smells prefer the smell of valerian, the components of which have pheromonal properties in rodents, and young rats demonstrate better food search results than adults and old animals. Acute prenatal hypoxia (PH) on E14 (7% O₂, 3 h) led to an impairment of the odor preference to valerian in all rat age groups, as well as to a decrease in the effectiveness of food search. After PH in the piriform cortex of rats there were processes of neurodegeneration, reduction of the number of neurons and an increase in glial cells. Similar changes were observed by us earlier in the entorhinal cortex and hippocampus but not in the olfactory bulbs. This suggests that the decrease in the olfactory function in rats caused by PH may result from the disturbances in the formation of the central parts of the olfactory system during the first months of postnatal ontogenesis.

Keywords: postnatal ontogenesis, prenatal hypoxia, neurodegeneration, olfaction, piriform cortex, olfactory bulbs, odor preference, food search

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ
ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 612.825

АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВОЗРАСТОМ ИЗМЕНЕНИЯ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ АКТИВНОСТИ В ТЕСТЕ “ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ”
У КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

© 2021 г. В. А. Стратилев¹, О. В. Ветровой^{1,2}, Л. А. Ватаева³, Е. И. Тюлькова^{1,*}

¹ ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия

³ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: etylkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.11.2020 г.

После доработки 27.01.2021 г.

Принята к публикации 03.02.2021 г.

Многочисленные исследования показывают, что стресс во время беременности может оказывать неблагоприятное влияние на развитие мозга и являться причиной нарушения поведения и способности к обучению у потомства. Последствия влияния стрессовых факторов в пренатальный период проявляются на протяжении всей жизни, усугубляясь с возрастом и ведя к преждевременному старению и смертности. Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм перинатального стресса. Целью настоящей работы было выявление возрастных особенностей поведения 3-месячных взрослых и 18-месячных стареющих самцов крыс в тесте “Открытое поле” в норме и после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза (пренатальная гипоксия, ПГ). Показано, что у взрослых крыс ПГ приводит к изменениям ориентировочно-исследовательского поведения и снижению двигательной активности в первый день тестирования. У старых ПГ-крыс наблюдается еще большее угнетение ориентировочно-исследовательского поведения. При повторном тестировании у ПГ-животных не обнаруживается снижения исследовательской активности, что свидетельствует о нарушениях памяти. Таким образом, пренатальная гипоксия вызывает прогрессирующие с возрастом изменения ориентировочно-исследовательского поведения и обстановочной памяти.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, онтогенез, ориентировочно-исследовательское поведение

DOI: 10.31857/S0044467721030102

Эмбриональный период является чувствительным периодом, во время которого происходит долговременная “настройка” контроля активности генов под определенную среду. Согласно концепции раннего эпигенетического “программирования” в эмбриональный период факторы внешней и внутренней среды при участии эпигенетических механизмов способны оказывать модифицирующие влияния на процесс реализации генетических программ, тем самым обеспечивая долговременные изменения в развитии организма. Эпигенетические процессы, происходящие в эмбриональный период, могут закрепиться и сохраняться в течение длитель-

ного времени и стать причиной развития различных патологических состояний в дальнейшем (Li et al., 2012).

Многочисленные исследования показали, что последствия воздействия стрессовых факторов в период пренатального онтогенеза, проявляясь уже в младенчестве, сохраняются у взрослых и усугубляются с возрастом, приводя к преждевременному старению и ранней смертности (Dudley et al., 2011; Xiong, Zhang, 2013; Warner, Ozanne, 2010; Langley-Evans, McMullen, 2010; Vetrovoy, 2021a). Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм пренатального стресса (Zhang, 2013; Vetrovoy, 2021b). Гипоксия плода воз-

можно при различных условиях, включая пребывание в условиях высокогорья при беременности, беременность с анемией, плацентарной недостаточностью, сдавлением пуповины, преэклампсией, заболеваниями сердца, легких и почек, а также при гемоглобинопатиях (Tomalski, Johnson, 2010; Li et al., 2012; Piešová, Mach, 2020). Нарушения развития мозга, вызванные гипоксией и асфиксией, встречаются примерно у 2% доношенных и почти у 60% недоношенных новорожденных детей. В процессе взросления эти нарушения проявляются в проблемах с обучением, нарушениях памяти и внимания, приводя к формированию неврологических и нейропсихологических заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера, биполярного расстройства и шизофрении (Graham et al., 2008; Kurinczuk et al., 2010; Berridge, 2013, 2014; Piešová, Mach, 2020).

Одним из наиболее актуальных вопросов для современного общества является тенденция демографического старения населения вследствие роста продолжительности жизни и снижения рождаемости. Старение изменяет физиологические и патологические состояния организма, при этом конкретные проявления нарушений, вызванные воздействием различных стрессовых факторов в раннем онтогенезе, также могут меняться с возрастом. Изучение такого рода нарушений требует модельных экспериментов на животных (Панкова, Латанов, 2019).

Тест “Открытое поле” позволяет исследовать особенности двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, а также эмоционального состояния (тревожности) животных. Цель данной работы: выявить возрастные особенности поведения 3-месячных взрослых и 18-месячных стареющих самцов крыс в тесте “Открытое поле” в норме и после воздействия тяжелой гипобарической гипоксии в пренатальный период (пренатальная гипоксия, ПГ).

МЕТОДИКА

В работе использовали крыс линии Вистар из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. При проведении экспериментов соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследо-

ваний. Протоколы экспериментов были утверждены Комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Модель пренатальной гипоксии. Животные были рождены интактными самками и самцами, которых на 14–16-е сутки беременности подвергали действию тяжелой гипобарической гипоксии (пренатальная гипоксия, ПГ). Для создания тяжелой гипоксии беременных самок помещали в барокамеру проточного типа при температуре от 20° до 25°С и ступенчато понижали давление до 180 мм рт.ст. (продолжительность воздействия – по 3 ч в течение 3 сут с интервалом 24 ч между сеансами).

Крысят отлучали от кормившей их матери в возрасте 30 сут. После отлучения крысы находились в клетках размером 60 × 30 × 20 см, максимальное количество животных в клетке составляло 6 особей. Животные отбирались из разных пометов и комбинировались случайным образом. В течение всего периода проведения экспериментов крысы содержались при режиме свет/темнота 12:12 ч, температуре 20–23°С и при постоянном доступе к воде и пище. В настоящей работе эксперименты были поставлены на 3-месячных молодых половозрелых самцах с активным сперматогенезом и 18-месячных стареющих самцах контрольных и ПГ-крыс. Для каждой временной точки были использованы животные из разных пометов. Воспроизводимость результатов была оценена в двух независимых экспериментах.

Тестирование в “Открытом поле”. Эксперименты проводили в помещении, ограниченном от поступления посторонних шумов. “Открытое поле”, изготовленное ООО “НПК Открытая Наука” (OpenScience Ltr), представляло собой круглую арену диаметром 97 см с высотой стенок 42 см. Область арены поделена на 12 секций периферической зоны и 7 секций центральной зоны. Длительность теста 5 мин. Тестирование осуществлялось в течение двух дней подряд. Оценивали: 1) ориентировочно-исследовательскую реакцию по числу пересеченных квадратов в центре (центральная активность) и по периферии (латеральная активность) и по числу вертикальных стоек с упором и без упора (вертикальная двигательная активность); 2) уровень тревожности оценивали по частоте выходов в

центр поля, времени груминга и количеству болюсов.

Тестирование проводилось на 10 контрольных и 8 переживших ПГ 3-месячных самцах, а также на 8 контрольных и 8 переживших ПГ 18-месячных самцах.

Статистическая обработка. Полученные результаты обработаны количественно с применением двухфакторного дисперсионного анализа посредством программного пакета для статистической обработки “Prism 9”. Нормальность распределения каждой выборки оценивалась критерием Д’Агостино-Пирсона и построением графиков квантиль-квантиль (QQ plot). В случае наличия у сравниваемых групп нормального распределения использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA для факторов группы и дня (День 1/День 2). Однородность дисперсий оценивалась построением графиков гомоскедастичности. В случае статистически значимого эффекта фактора группы для дальнейшей оценки различий между группами при post-hoc анализе использовали тест Тьюки. Для post-hoc сравнения между днями в пределах групп в случае статистически значимого эффекта фактора дня использовали тест Сидака. В случае отсутствия у сравниваемых групп нормального распределения использовался непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом Данна (для оценки центральной активности у всех исследуемых групп) и тест Манна–Уитни для оценки вертикальной активности у старых животных. Различия между группами признавались достоверными при $p < 0.05$. Данные на рисунках представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Данные в тексте представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, на рисунках – в виде среднего \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1 представлены данные, характеризующие влияние воздействия гипоксии в пренатальный период на поведение 3-месячных крыс в “Открытом поле”. В первый день тестирования у ПГ-крыс выявлено достоверное снижение по сравнению с контролем латеральной (36.37 ± 7.24 и 68.3 ± 10.64 пересечений периферических квадратов для групп ПГ и контроль соответственно; $p < 0.05$, $n = 8-10$, тест Тьюки) (рис. 1 (а)) и вертикаль-

ной двигательной активности (3.13 ± 0.58 и 7 ± 1.26 стоек с упором для групп ПГ и контроль соответственно; $p < 0.01$, $n = 8-10$, тест Сидака) (рис. 1 (б)). Было также показано, что крысы независимо от группы на 2-й день тестирования проявляют более низкий уровень вертикальной активности, чем в 1-й (для контрольной группы $p < 0.005$, $n = 10$; для группы ПГ $p < 0.05$, $n = 8$, тест Сидака) (рис. 1 (б)). Снижение латеральной активности на 2-й день было достоверно только у контрольной группы ($p < 0.01$, $n = 10$, тест Сидака). У ПГ-крыс изначально низкий уровень латеральной активности достоверно не изменялся (рис. 1 (а)). По количеству стоек без упора и пересеченных квадратов в центре, актов груминга и количеству оставленных на поле болюсов (дефекаций) достоверных различий между взрослыми контрольными и ПГ-крысами выявлено не было.

На рис. 2 представлены данные, характеризующие влияние воздействия гипоксии в пренатальный период на поведение стареющих 18-месячных крыс в “Открытом поле”. В первый день тестирования не было выявлено достоверных различий в центральной активности между ПГ-крысами и контролем (1.25 ± 0.16 и 1.75 ± 0.31 пересечений центральных квадратов для групп ПГ и контроль соответственно; $p > 0.05$, $n = 8$, тест Манна–Уитни) (рис. 2 (а)). На 2-й день тестирования для ПГ-крыс также показано отсутствие изменений центральной активности относительно контроля (1.12 ± 0.12 и 2.37 ± 0.53 пересечений центральных квадратов для групп ПГ и контроль соответственно; $p > 0.05$, $n = 8$, тест Манна–Уитни) (рис. 2 (а)). При исследовании латеральной активности 18-месячных животных не выявлено достоверных различий между ПГ и контролем ни на 1-й, ни на 2-й дни тестирования (на 1-й и 2-й дни тестирования $p = 0.48$ и $p = 0.91$ соответственно, $n = 8$, тест Тьюки) (рис. 2 (а)). На 1-й, но не на 2-й день эксперимента, стареющие ПГ-крысы продемонстрировали сниженную вертикальную активность по сравнению с контролем (1.87 ± 1.31 и 3.75 ± 0.45 стоек с упором для групп ПГ и контроль на 1-й день тестирования соответственно; $p < 0.005$, $n = 8$, тест Манна–Уитни) (рис. 2 (б)).

У 18-месячных контрольных крыс было выявлено достоверное снижение латеральной ($p < 0.01$, $n = 8$, тест Сидака) и вертикаль-

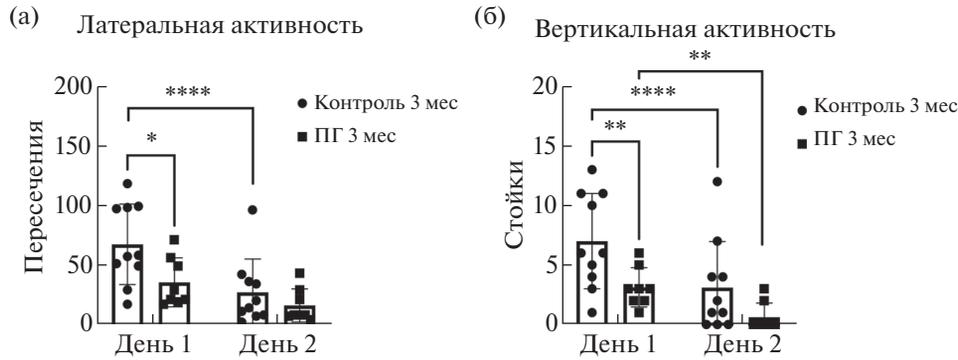


Рис. 1. Влияние пренатальной гипоксии на поведение 3-месячных крыс в тесте “Открытое поле”. На рисунке представлены результаты измерения (а) латеральной (выражено в количестве пересечений периферических квадратов) и (б) вертикальной (выражено в количестве стоек с упором) активности взрослых 3-месячных контрольных и ПГ-крыс на протяжении двух последовательных дней эксперимента в “Открытом поле”. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, тест Тьюки для сравнения между группами, тест Сидака для сравнения между днями внутри группы.

Fig. 1. Influence of prenatal hypoxia on the behavior of 3-month-old rats in the “open field” test. The figure shows the results of measuring (a) lateral (expressed in the number of intersections of peripheral squares) and (б) vertical (expressed in the number of racks with support) activity of adult 3-month-old control and PH rats during two consecutive days of the experiment in the “open field” test. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, Tukey’s test for comparison between groups, Sidak’s test for comparison between days within a group.

ной активности ($p < 0.005$, $n = 8$, тест Вилкоксона) на 2-й день тестирования по сравнению с первым днем (рис. 2 (а); 2 (б)). У ПГ-крыс достоверных изменений показателей латеральной и вертикальной активности между днями не выявлено ($p = 0.98$, $n = 8$, тест Сидака, и $p > 0.9999$, $n = 8$, тест Вилкоксона, соответственно) (рис. 2 (а); 2 (б)). По центральной активности, количеству стоек без упора, актов груминга и количеству оставленных на поле болюсов (дефекаций) достоверных различий между стареющими контрольными и ПГ-крысами выявлено не было.

На рис. 3 представлены результаты сравнения поведения взрослых 3-месячных и стареющих 18-месячных крыс. Было выявлено снижение уровня латеральной и вертикальной активности в 1-й день тестирования 18-месячных контрольных крыс по сравнению с контролем 3-месячного возраста (для всех сравнений $p < 0.05$, тест Тьюки) (рис. 3 (а); 3 (б)). В группе 18-месячных ПГ-крыс не выявлено изменений латеральной и вертикальной активности по сравнению с 3-месячными животными этой группы (для латеральной и вертикальной активности $p = 0.55$ и $p = 0.14$ соответственно, $n = 8$, тест Тьюки) (рис. 3 (а); 3 (б)).

По количеству оставленных на поле болюсов (количеству актов дефекации) были выявлены достоверные различия между 18-месячными и 3-месячными крысами экспериментальной группы в первый день тестирования ($p < 0.05$, тест Тьюки) (рис. 3 (в)).

При проведении двухфакторного дисперсионного анализа было выявлено влияние фактора группы ($F(3, 30) = 5.117$, $p = 0.0056$) и фактора дня тестирования ($F(1, 30) = 32.24$, $p < 0.0001$) на латеральную активность для всех сравниваемых групп (3 и 18 мес), а также фактора группы ($F(1, 16) = 5.553$, $p = 0.0315$) и дня тестирования ($F(1, 16) = 29.45$, $p < 0.0001$) на вертикальную активность у 3-месячных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Последствия пренатального стресса изучаются в различных аспектах. Целый ряд исследований был посвящен изучению последствий стресса, перенесенного матерью во время беременности, для ребенка. Многочисленные работы были проведены на беременных экспериментальных животных. Благодаря этим исследованиям становится все более очевидной роль пренатального стресса в развитии нарушений эмоциональной сфе-

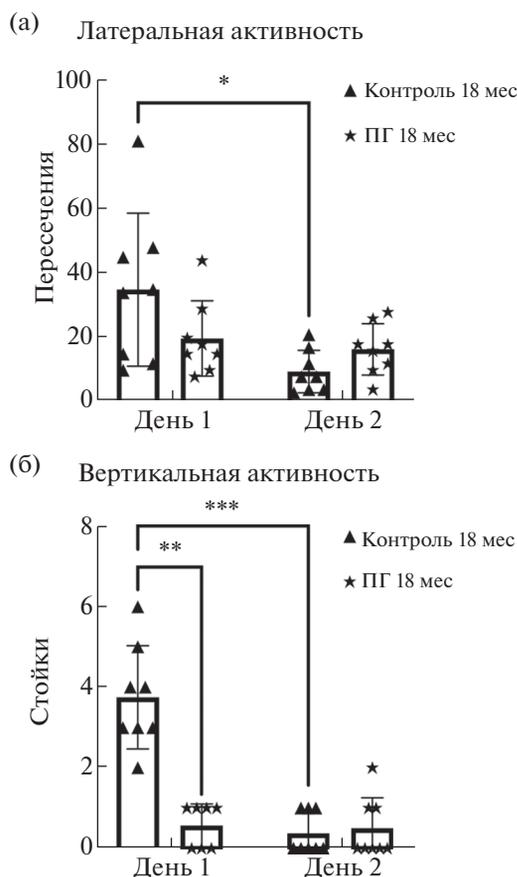


Рис. 2. Влияние пренатальной гипоксии на поведение 18-месячных крыс в тесте “Открытое поле”. На рисунке представлены результаты измерения (а) латеральной (выражено в количестве пересечений периферических квадратов) и (б) вертикальной (выражено в количестве стоек с упором) активности стареющих 18-месячных контрольных и ПГ-крыс на протяжении двух последовательных дней эксперимента в “Открытом поле”. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, тест Тьюки для сравнения латеральной активности между группами, тест Сидака для сравнений латеральной активности между днями внутри группы, тест Манна–Уитни для сравнения вертикальной активности между группами, тест Вилкоксона для сравнения вертикальной активности между днями внутри групп.

Fig. 2. Influence of prenatal hypoxia on the behavior of 18-month-old rats in the “open field” test. The figure shows the results of measuring (a) the lateral (expressed in the number of intersections of the peripheral squares) and (б) vertical (expressed in the number of postures with support on walls) activity of aged 18-month-old control and PH rats during two consecutive days of the experiment in the “open field” test. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, Tukey’s test for comparison between groups in lateral activity, Sidak’s test for comparison between days within a group in lateral activity, Mann–Whitney test for comparison of vertical activity between groups, Wilcoxon test for comparison of vertical activity between days within a group.

ры и поведения. Тест “Открытое поле” активно применяется для оценки уровня тревожности, исследовательской активности и локомоции животных в незнакомой обстановке. Поэтому в настоящей работе было сочтено целесообразным использовать тест “Открытое поле” для исследования проявления возрастных особенностей поведения крыс, переживших пренатальную гипоксию.

На протяжении нескольких лет, занимаясь изучением последствий влияния пренатальной гипоксии на крысах, особое внимание мы уделяли зависимости выраженности возможных нарушений от срока беременности в период стрессового воздействия. Как в неокортексе, так и в гиппокампе крыс на 14–16-е сутки гестации происходит активное деление клеток-предшественников и их миграция (Vasilev et al., 2016). В этот период закладываются все области гиппокампа (Bayer, 1980a, 1980b) и формируются V, VI слои неокортекса (Dehay, Kennedy, 2007). У потомков крыс, испытавших воздействие гипоксии на третьей неделе беременности, были выявлены связи между воздействием стрессовых факторов в различные сроки пренатального онтогенеза и конкретными изменениями как на поведенческом, так и на молекулярном уровне у взрослых животных (Тюлькова и др., 2010; 2015a, 2015b, Vetrovoy, 2021a, 2021b). При этом наиболее значимые изменения развития мозга происходят, если гипоксия предьявляется на 14–16-е сутки гестации. 14–16-е сутки гестации крыс соответствуют 5–7-й неделе беременности человека (Bayer et al., 1993; Golan, Huleihel, 2006).

В настоящем исследовании было показано, что пренатальная гипоксия приводит к изменениям ориентировочно-исследовательского поведения у 3-месячных взрослых крыс. При повторном тестировании у экспериментальных животных не обнаруживается снижения исследовательской активности, что, возможно, может свидетельствовать о нарушениях памяти. Мы наблюдали не только снижение двигательной активности в первый день тестирования, но и отсутствие научения при повторном тестировании, что можно характеризовать как отсутствие привыкания. Нарушения ориентировочно-исследовательского поведения отражают изменения функциональной активности нейронов в результате

воздействия тяжелой гипоксии в пренатальном периоде развития (Vetrovoy et al., 2021a).

В представленной работе показано, что пренатальная гипоксия вызывает снижение ориентировочно-исследовательского поведения у 18-месячных крыс. При повторном тестировании у экспериментальных животных не обнаруживается снижение исследовательской активности, что свидетельствует о нарушениях памяти.

Одним из общих механизмов, с помощью которого материнский стресс может быть связан с фенотипическими изменениями в дальнейшей жизни, является эпигенетическое программирование, которое играет центральную роль в определении функционального выхода информации, хранящейся в геноме. Достаточно доказательств участия эпигенетической регуляции в реакции плода на внутриутробный стресс, приводящий к долгосрочным изменениям профилей экспрессии генов, которые потенциально приводят к заболеваниям в более позднем возрасте (Gluckman et al., 2008; Egger et al., 2004; Chen, Zhang, 2011; Ducsay et al., 2018). Ранее нами было показано, что воздействие гипоксии, а также введение синтетических глюкокортикоидов с целью моделирования пренатального стресса на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза, вызывают долгосрочные эпигенетические модификации, а именно: метилирование ДНК, гистона H3 по лизину 4 и 9, ацетилирование гистона H3 по лизину 24 (Тулюкова et al., 2020; Tyulkova et al., 2017; Ветровой и др., 2020a). Оказалось, что основные изменения проявляются в основном в отдаленные сроки после воздействия, а именно в гиппокампе и неокортексе мозга 18-месячных старых крыс. Обнаруженные эпигенетические модификации в гиппокампе и неокортексе после тяжелой гипобарической гипоксии на 14–16-е сутки пренатального он-

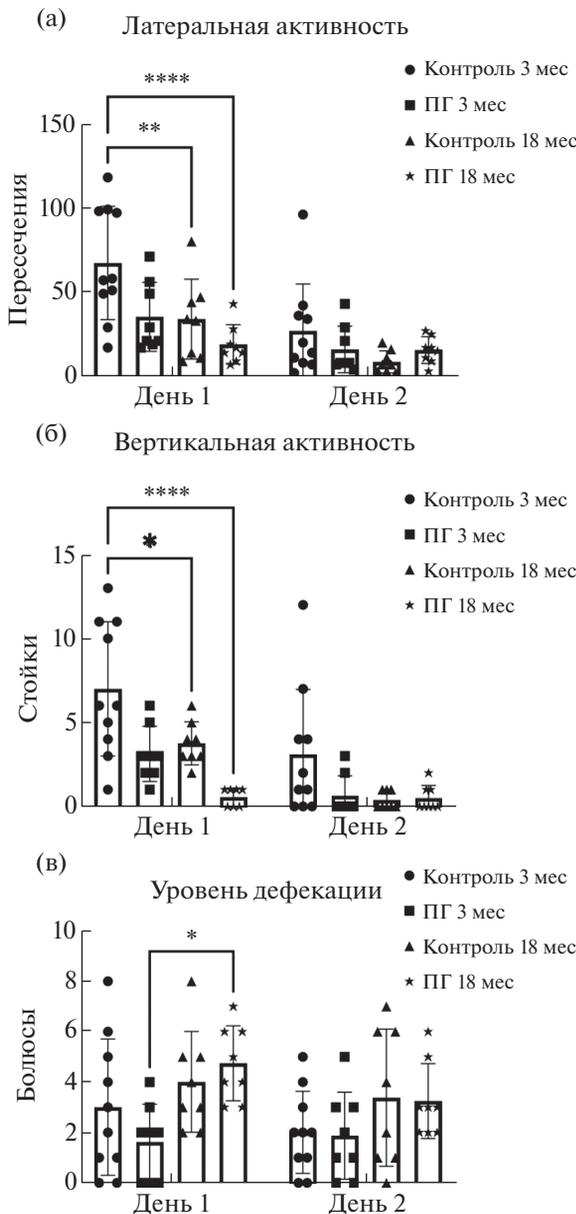


Рис. 3. Сравнение показателей поведения 3- и 18-месячных крыс в тесте “Открытое поле”. На рисунке представлены результаты сравнения (а) латеральной (выражено в количестве пересечений периферических квадратов), (б) вертикальной (выражено в количестве стоек с упором на стены) активности, а также (в) уровня дефекации (выражено в количестве болюсов) взрослых 3-месячных и стареющих 18-месячных контрольных и ПГ-крыс на протяжении двух последовательных дней эксперимента в “Открытом поле”. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, тест Тьюки для сравнения между группами.

Fig. 3. Comparison of the behavioral indicators of 3- and 18-month-old rats in the “open field” test. The figure shows the results of comparison of (a) lateral (expressed in the number of intersections of peripheral squares), (б) vertical (expressed in the number of postures with support on walls) activity, as well as (в) the level of defecation (expressed in the number of boluses) of 3-month-old adults and aged 18-month-old control and PH rats during two consecutive days of the experiment in the “open field” test. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, Tukey’s test for comparison between groups.

тогенеза коррелируют с показанными нами ранее нарушениями экспрессии глюко- и минералокортикоидных рецепторов, регулирующих экспрессию генов-мишеней, в том числе транскрипционных факторов NIF1 α , снижение уровня которого у старых животных (Тюлькова и др., 2018, Ветровой и др., 2020б) говорит об ослаблении способности к адаптации. Отсроченные изменения степени метилирования гистона H3 могут обуславливать усиливающиеся с возрастом нарушения функциональной активности мозга, приводящие к ослаблению памяти и способности к обучению животных, подвергавшихся действию тяжелой гипобарической гипоксии. Кроме того, снижение ориентировочно-исследовательского поведения и памяти у стареющих ПГ-крыс может отражать обнаруженное нами уменьшение количества нейронов в гиппокампе 18-месячных экспериментальных, но не контрольных крыс (Vetrovoy et al., 2021a).

В предыдущих работах показано, что воздействие гипоксии в пренатальном периоде, в отличие от воздействия дексаметазона, не влияет на формирование следа памяти взрослых крыс на страх (Vataeva et al., 2018), но приводит к нарушениям пространственного обучения в лабиринте Морриса (Тюлькова и др., 2015а). Отмечалось, что, в отличие от введения синтетического гормона дексаметазона на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза, гипоксия в те же сроки не влияла на эмоциональную сферу животных (Vataeva et al., 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные в тесте “Открытое поле” свидетельствуют о том, что гипобарическая гипоксия, предъявляемая в пренатальном онтогенезе, вызывает длительные модификации в поведении потомства. При этом нарушения поведения взрослых крыс вследствие гипоксии, предъявляемой на 14–16-е сутки гестации, усиливаются в старости. Повреждающие воздействия в период формирования гиппокампа и неокортекса могут служить причиной раннего старения мозга.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-315-90003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ветровой О.В., Тюлькова Е.И., Стратилов В.А., Ватаева Л.А.* Пренатальное введение дексаметазона вызывает нарушение глюкокортикоидной обратной связи, ассоциированное с изменением количества кортикостероидных рецепторов в экстрагипоталамических структурах мозга взрослых крыс. *Цитология*. 2020а. 62 (7): 511–521.
- Ветровой О.В., Нимирицкий П.П., Тюлькова Е.И., Рыбникова Е.А.* Увеличение содержания гипоксия-индуцируемого фактора NIF1 α и интенсивности NIF1-зависимой транскрипции сохраняются у новорожденных крысят, переживших пренатальную гипоксию на 14–16-е сутки эмбриогенеза. *Нейрохимия*. 2020б. 37 (3): 228–232.
- Панкова Н.Б., Латанов Л.В.* Развивающийся мозг как мишень экспериментального воздействия при моделировании патологических процессов. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2019. 69 (4): 413–436.
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Ветровой О.В.* Воздействия повреждающих факторов в пренатальном онтогенезе могут приводить к раннему старению. *Детская медицина Северо-Запада*. 2018. 7 (1): 319–320.
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Ветровой О.В., Романовский Д.Ю.* Пренатальная гипоксия модифицирует рабочую память и активности полифосфоинозитидной системы гиппокампа крыс. *Журн. эволюц. биохим. и физиол. им. И.М. Сеченова*. 2015а. 51 (2): 115–121.
- Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А.* Механизмы формирования реакций мозга на действие гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2010. 59 (4): 99–110.
- Тюлькова Е.И., Кислин М.С., Ватаева Л.А.* Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на уровень перекисного окисления липидов в неокортексе и гиппокампе крыс. *Нейрохимия*. 2015б. 32 (1): 64–70.
- Bayer S.A.* Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life *J. Comp. Neurol.* 190 (1–2): 115–134. 1980а.
- Bayer S.A.* Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography *J. Comp. Neurol.* 190 (1–2): 87–114. 1980б.
- Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X.* Timetables of neurogenesis in the human brain based on ex-

- perimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 1993. 14 (1): 83–144.
- Berridge M.J.* Calcium signalling and psychiatric disease: bipolar disorder and schizophrenia. *Cell Tissue Res*. 2014. 357 (2): 477–92.
- Berridge M.J.* Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia. *Prion*. 2013. 7 (1): 2–13.
- Chen M., Zhang L.* Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug Discov. Today*. 2011. 16: 1007–1018.
- Dehay C., Kennedy H.* Cell-cycle control and cortical development. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007. 8: 438–450.
- Ducsay C.A., Goyal R., Pearce W.J., Wilson S., Hu X.Q., Zhang L.* Gestational Hypoxia and Developmental Plasticity. *Physiol Rev*. 2018. 98 (3): 1241–1334.
- Dudley K.J., Li X., Kobor M.S., Kippin T.E., Bredy T.W.* Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011. 35: 1544–1551.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004. 429: 457–463.
- Gluckman P.D., Hanson M.A., Cooper C., Thornburg K.L.* Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N. Engl. J. Med*. 2008. 359: 61–73.
- Golan H., Huleihel M.* The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Developmental Science*. 2006. 9 (4): 338–349.
- Graham E.M., Ruis K.A., Hartman A.L., Northington F.J., Fox H.E.* A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol*. 2008. 199: 587–595.
- Kurinczuk J.J., White-Koning M., Badawi N.* Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Devel*. 2010. 86: 329–338.
- Langley-Evans S.C., McMullen S.* Developmental origins of adult disease. *Med. Princ. Pract*. 2010. 19: 87–98.
- Li Y., Gonzalez P., Zhang L.* Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog Neurobiol*. 2012. 98 (2): 145–165.
- Piešová M., Mach M.* Impact of perinatal hypoxia on the developing brain. *Physiol Res*. 2020. 69 (2): 199–213.
- Tomalski P., Johnson M.H.* The effects of early adversity on the adult and developing brain. *Curr Opin Psych*. 2010. 23: 233–238.
- Tyul'kova E.I., Vataeva L.A., Stratilov V.A., Barysheva V.S., Vetrovoy O.V.* Peculiarities of DNA and Histone H3 Methylation in the Hippocampus and Neocortex of Rats Subjected to Pathological Treatments during the Prenatal Period. *Neurochemical Journal*. 2020. 14 (1): 64–72.
- Tyulkova E.I., Vetrovoy O.V., Sarieva K.V., Vataeva L.A., Glushchenko T.S.* The characteristics of acetylation of histone H3 at Lys24 in the hippocampus and neocortex of rats that were exposed to hypoxic stress at different stages of prenatal development. *Neurochemical Journal*. 2017. 11 (4): 309–314.
- Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A.* Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity and rat behavior in postnatal ontogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 2016. 10: 126.
- Vataeva L.A., Tyulkova E.I., Alekhin A.N., Stratilov V.A.* Effects of Hypoxia or Dexamethasone at Different Gestation Periods on Fear Conditioning in Adult Rats. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2018. 54 (6): 442–448.
- Vetrovoy O., Stratilov V., Nimiritsky P., Makarevich P., Tyulkova E.* Prenatal hypoxia induces premature aging accompanied by disturbed function of glutamatergic system in rat hippocampus. *Neurochemical Research*. 2021a. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03191-z>
- Vetrovoy O., Tyulkova E., Stratilov V., Baranova K., Nimiritsky P., Makarevich P., Rybnikova E.* Long-term effects of the prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats. *Developmental Neuroscience*. 2021b. <https://doi.org/10.1159/000512223>
- Warner M.J., Ozanne S.E.* Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J*. 2010. 42: 333–347.
- Xiong F., Zhang L.* Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2013. 34: 27–46.
- Yong Li, Pablo Gonzalez, Lubo Zhang.* Fetal Stress and Programming of Hypoxic/Ischemic-Sensitive Phenotype in the Neonatal Brain: Mechanisms and Possible Interventions. *Prog Neurobiol*. 2012. 98 (2): 145–165.

THE “OPEN FIELD” TEST REVEALS AGE-ASSOCIATED ALTERATIONS IN EXPLORATORY ACTIVITY OF RATS EXPOSED TO PRENATAL HYPOXIA

V. A. Stratilov^a, O. V. Vetrovoy^{a,b}, L. A. Vataeva^c, and E. I. Tyulkova^{a,#}

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

^b Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

^c The Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg, Russia

[#]e-mail: etyulkova@yandex.ru

The effects of negative influence of stress factors during prenatal ontogenesis can manifest themselves already in infancy, persist in adults and worsen with age, leading to premature aging and early mortality. Hypoxia is one of the most common forms of perinatal stress. The aim of this work is to identify the age-related behavior characteristics of 3-month-old adult and 18-month-old aged male rats in the “open field” test in normal pregnancy and after exposure to severe hypobaric hypoxia on days 14–16 of prenatal ontogenesis (prenatal hypoxia, PH). It has been shown that in adult rats PH leads to alterations in orientation and exploratory behavior, and a decrease in motor activity on the first day of testing, as well as a lack of learning with repeated testing. In aged PH rats, an even greater suppression of orientational and exploratory behavior is observed. With repeated testing, the PH animals did not show a decrease in exploratory activity, which indicates memory impairments. Thus, prenatal hypoxia causes alteration in as well orientation and exploratory behavior as spatial memory that are progressive with age.

Keywords: prenatal hypoxia, ontogenesis, orientation and exploratory behavior