
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СОЗРЕВАНИЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ РЕФЛЕКСОВ И ОСОБЕННОСТИ
ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ 5xFAD – МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

© 2025 г. И. Н. Рожкова¹, Е. Ю. Брусенцев¹, Т. А. Рахманова^{1,2}, В. С. Козенева^{1,2},
Н. В. Хоцкин¹, С. Я. Амстиславский^{1,*}

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

*E-mail: amstis@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.07.2025 г.

После доработки 11.08.2025 г.

Принята к публикации 20.08.2025 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) является прогрессирующей возрастной нейродегенеративной патологией, приводящей к деменции. Для изучения механизмов возникновения данной патологии и для поиска возможных путей ее коррекции созданы генетические модели БА на мышах. Трансгенные мыши линии 5xFAD с двумя человеческими трансгенами *App* и *Psen1* и пятью мутациями являются популярной моделью для изучения БА. Целью данной работы было исследование созревания неонатальных рефлексов и увеличения массы тела в раннем постнатальном онтогенезе, а также особенностей поведения в возрасте трех месяцев у мышей линии 5xFAD. В качестве контроля были использованы мыши дикого типа (WT) того же пола и возраста из тех же пометов. Полученные результаты показывают, что мыши 5xFAD не отличаются от сибсов WT по увеличению массы тела и формированию неонатальных рефлексов в период вскармливания. В возрасте трех месяцев у самцов линии 5xFAD были обнаружены половые различия в поведении: у самцов была ниже общая локомоторная активность, чем у самок, и наблюдались признаки начала развития депрессивно-подобного поведения. У самцов 5xFAD был снижен уровень тревожности, а у самок повышена исследовательская активность в сравнении с сибсами WT того же пола. В результате исследования охарактеризованы особенности поведения молодых мышей 5xFAD в возрасте трех месяцев. Впервые изучено созревание неонатальных рефлексов в период вскармливания на данной трансгенной модели БА.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, мыши 5xFAD, неонатальные рефлексy, поведение, двигательная активность, тревожность, память

DOI: 10.7868/S2658655X25100016

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) – неизлечимая нейродегенеративная патология, которая приводит к деменции, что ложится тяжелым бременем на общество, бюджет и медицину и существенно снижает качество жизни заболевших [1–3]. К факторам

риска возникновения БА относят возраст, генетическую предрасположенность, общее состояние здоровья и образ жизни [2, 3]. Данная патология характеризуется прогрессирующим нарушением когнитивных способностей, в частности ухудшением памяти [2, 3]. При БА возникают атрофические изменения в центральной нервной системе, что связано с накоплением в коре головного мозга и в подкорковом сером веществе бляшек бета-амилоида и нейрофибриллярных клубков, состоящих из гиперфосфорилированного тау-белка, что сопровождается гибелью нейронов и снижением функциональных способностей мозга [1, 4, 5].

Исследование механизмов возникновения БА, а также поиск новых способов коррекции данной патологии осуществляют на экспериментальных моделях, созданных преимущественно на мышах [6–9]. Одной из наиболее перспективных моделей для исследования механизмов, приводящих к данной патологии, являются мыши 5xFAD с двумя человеческими трансгенами *App* (amyloid precursor – предшественник бета-амилоида) и *Psen1* (presenilin-1 – пресенилин-1), а также пятью мутациями, связанными с БА [10–12]. У гомозиготных мышей линии 5xFAD амилоидная патология начинает проявляться в первые недели жизни, о чем свидетельствует обнаружение предшественника бета-амилоида в пирамидных нейронах уже в возрасте 16 дней, а внутринейронального бета-амилоида – в возрасте 1.5 месяцев [7]. Внеклеточные амилоидные бляшки обнаружены в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе у двухмесячных животных [7]. У мышей 5xFAD были установлены снижение уровня тревожности и нарушение памяти, которые начинают появляться в возрасте от 2 до 6 месяцев [6, 8, 13]. Кроме того, у мышей данной линии было установлено депрессивно-подобное поведение в возрасте 6 и 12 месяцев [14]. В возрасте 5 месяцев были обнаружены патологические нарушения рефлекторной активности, в частности в тесте сжимания задних и передних конечностей [7], а в 9 месяцев были показаны сенсомоторные нарушения [6].

Важным аспектом экспериментального дизайна является выбор подходящего контроля, поскольку это позволяет выровнять факторы, оказывающие влияние на анализируемые параметры. К таким факторам может относиться материнская среда, которая влияет на фенотип будущего потомства, в частности через эпигенетические механизмы [15, 16]. Дизайн исследования с использованием в качестве контрольной группы сибсов, отличающихся от исследуемых животных лишь по одному показателю (экспрессии трансгенов), позволяет нивелировать материнские эффекты. Именно такого рода экспериментальный дизайн рекомендован для современных работ на лабораторных животных при исследовании генетически модифицированных линий мышей [15].

Перспективным направлением исследований БА является изучение раннего неонатального развития, связанного с нейропластичностью и другими характеристиками головного мозга, которые имеют отдаленные последствия в более позднем онтогенезе [9, 17]. Ранее были проведены исследования, показавшие изменения в профиле экспрессии белков в мозге новорожденных мышей линии 5xFAD, которые в основном были связаны с морфологией и организацией клеток, а также процессом нейровоспаления [9, 17]. Между тем созревание неонатальных рефлексов у мышей линии 5xFAD до сих пор не исследовано. Кроме того, результаты изучения поведения взрослых мышей 5xFAD в молодом возрасте весьма противоречивы [6–8, 13, 14, 18]. Целями данной работы было исследование у мышей линии 5xFAD: 1) неонатальных рефлексов и массы тела в период вскармливания; 2) особенностей поведения в возрасте 3 месяцев.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и дизайн эксперимента. В эксперименте использовали мышей SPF-статуса (specific pathogen free). Животных содержали в SPF-виварии Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) в индивидуально

вентилируемых клетках OptiMice (Animal Care, США) размером $34.3 \times 29.2 \times 15.5$ см, при температуре 22–24 °C и влажности 40–50%, с инвертированным циклом дня–ночи 12 : 12 ч (рассвет в 3 ч утра). В качестве подстилки использовали стерильную березовую щепу фракционную для лабораторных животных (ТУ 16.10.23-001-0084157135-2019). Все животные имели свободный доступ к стандартизированному автоклавированному комбикорму для лабораторных мышей и крыс “Дельта Фидс” (“БиоПро”, Россия) и очищенной воде “Северянка” (“Экопроект”, Россия), обогащенной минеральными добавками. В эксперименте были исследованы потомки-сибсы двух линий мышей, полученные после спаривания самок C57BL/6 (9 самок) и самцов линии 5xFAD (6 самцов). Всего было получено 9 пометов (от 6 до 9 мышат в каждом). В ходе периода вскармливания производили взвешивание потомков на 7-, 14- и 21-й день жизни, а также изучали созревание неонатальных рефлексов. Всем животным на 6-й день жизни была сделана метка на одной из лап при помощи тату-машинки для микроблейдинга (Aimoosi, Китай), что позволило после генотипирования мышей разделить их ретроспективно на две группы: 5xFAD и WT. По достижении возраста 21-го дня потомков отсаживали от матерей; в возрасте одного месяца проводили генотипирование, по результатам которого было сформировано две группы: опытная – мыши 5xFAD, у которых обнаружены трансгены, и контрольная – потомки тех же выводов, у которых трансгенов обнаружено не было (дикий тип, wild type – WT). Опытную группу 5xFAD составили 17 самцов и 19 самок, контрольную – 20 самцов и 13 самок. Самцов и самок 5xFAD и WT содержали в однополых группах до начала поведенческих экспериментов. В возрасте 3 месяцев поведение самцов и самок 5xFAD и WT сравнивали в тестах “подвешивание за хвост”, “открытое поле” (ОП), “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) и “распознавание нового объекта” (РНО). Для проведения поведенческих тестов были сформированы группы по 12 животных, отбор которых проводили с учетом принципа рандомизации. Графический дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

Генотипирование потомков. Генотипирование потомков проводили согласно протоколу, рекомендованному Джексонской лабораторией (США). По достижении месячного возраста у исследуемых потомков был взят кусочек уха для генотипирования. Его помещали в пробирку с 400 мкл лизирующего буфера (10% SDS и 20 мг/мл протеиназы К) и инкубировали при 52 °C со встряхиванием на центрифуге-вортексе FVL-2400N Combi-spin (BioSan, Латвия) в течение 1.5 ч до полного растворения. Пробирку с лизатом помещали в холодильник при 4 °C на 10–15 мин. Затем к раствору добавляли 120 мкл 6М NaCl с последующим встряхиванием на центрифуге-вортексе и центрифугировали в течение 15 мин при 13 000 об/мин на центрифуге Sigma 4-16K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия). Супернатант повторно центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 об/мин. Собирали 100 мкл супернатанта, добавляли 200 мкл холодного 96%-ного этанола и перемешивали. После серии циклов охлаждения, перемешивания, центрифугирования, растворения в этаноле и высушивания общее содержание ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы хранили в морозильной камере при –20 °C.

Для проведения ПЦР на льду в ПЦР-пробирки добавляли по 9 мкл MasterMix (дистиллированная вода, PCR-буфер $x10/5/2$, соответствующие праймеры, а также dNTP, Mg^{2+} и TaqPol), амплификацию проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (BioRad, США). После амплификации в ПЦР-пробирки добавляли по 3 мкл Green буфера для окрашивания. В каждую первую лунку в ряду было добавлено 3.5 мкл маркера, в остальные лунки добавлялось по 10 мкл окрашенной пробы. После этого источник тока выставляли на 60 мин на 130 В. Электрофорез был проведен с маркером 100 п. н. (трансген – 129 п. н., внутренний положительный контроль – 216 п. н.). Результат амплификации был оценен при помощи системы гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad, США).

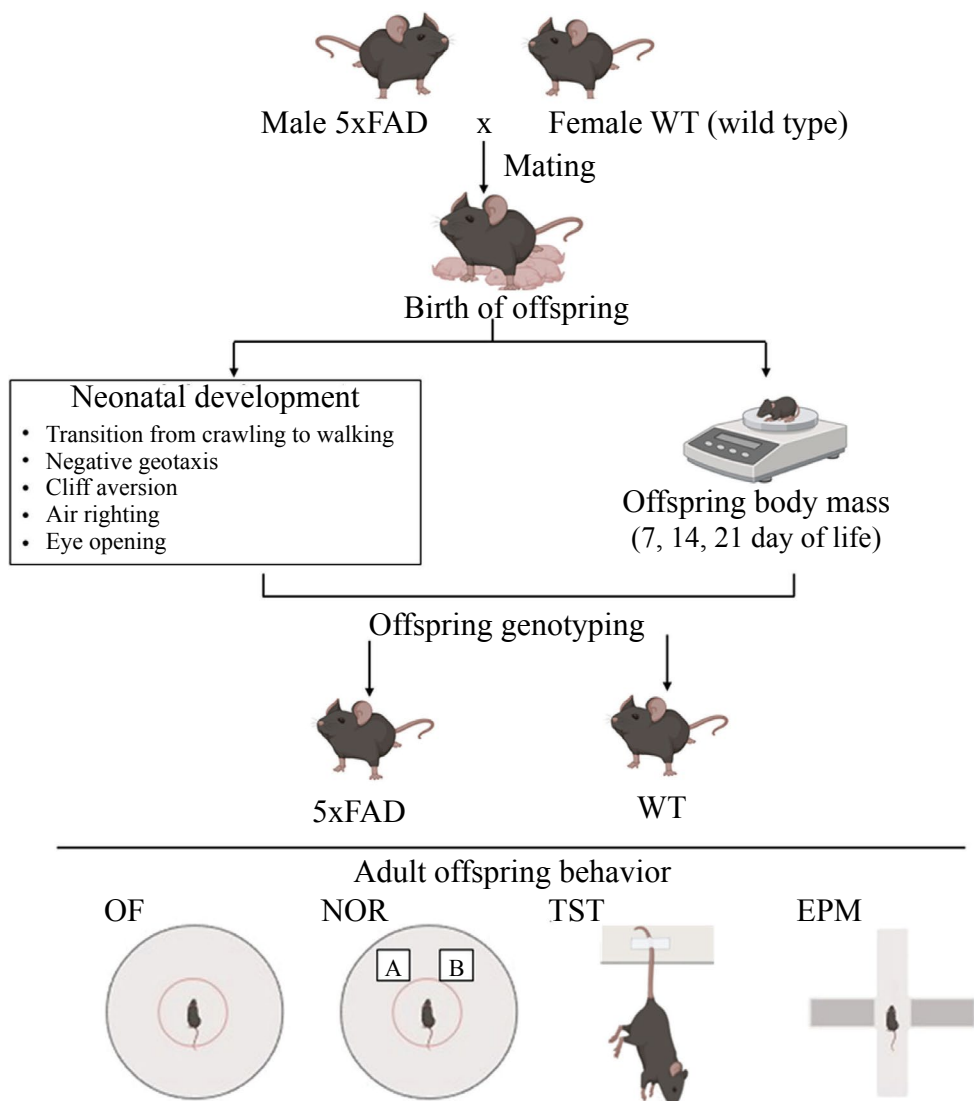


Рис. 1. Графический дизайн эксперимента. WT – wild type (дикий тип); OF – open field (тест “открытое поле”); NOR – novel object recognition (тест “распознавание нового объекта”); TST – tail suspension test (тест “подвешивание за хвост”); EPM – elevated plus maze (тест “приподнятый крестообразный лабиринт”).

Измерение массы тела. Общее физиологическое развитие животных оценивали по возрастанию массы тела в течение периода вскармливания. День родов считали первым днем постнатального развития (Д1). Детенышей взвешивали на 7-, 14-, 21-й день отсадки от матери при помощи цифровых весов ScoutPro SPS2001F (Ohaus Corporation, США) с точностью 0.01 г.

Оценка созревания неонатальных рефлексов. У потомков 5xFAD и WT была проведена оценка созревания неонатальных рефлексов и открытия глаз, как описано ранее [19–23]. Мышат исследовали в период с 7-го (Д7) по 21-й (Д21) дни после рождения без разделения по полу. После проведения генотипирования (в возрасте 1 месяца)

ретроспективно определяли генетическую принадлежность каждого исследованного мышонка. Изучали созревание следующих рефлексов.

1. Рефлекс переворачивания тела в воздухе. Тестирование проводили ежедневно с Д10 по Д15 по протоколу, описанному ранее [20, 22–24]. Мышонка, удерживая за конечности, поднимали на высоту 30 см и отпускали на мягкую поверхность вниз спиной, оценивали способ приземления животного. Тест считали выполненным при падении на все четыре конечности.

2. Реакция отрицательного геотаксиса. Животных исследовали ежедневно с Д10 по Д21 по протоколу, описанному ранее [20–22, 25]. Мышонка помещали на наклонную сетчатую поверхность под углом в 45 градусов вниз головой и оценивали время, необходимое животному для разворачивания и доползания до верха. Максимальное время теста – 180 с.

3. Реакция избегания края. Животных исследовали ежедневно с Д10 по Д17, как описано ранее [19, 21, 24, 25]. Мышонка помещали на край горизонтальной поверхности таким образом, чтобы передние конечности касались кромки поверхности, и оценивали время, необходимое животному для разворачивания тела на 180 градусов и отползания от края поверхности. Максимальное время теста – 180 с.

4. Тест на зрелость позы. Наблюдения проводили с Д7 по Д14 по протоколу, описанному ранее [19, 21, 23]. Мышонка помещали на горизонтальную поверхность и оценивали способность животного симметрично передвигаться, не касаясь животом поверхности; в этом случае позу считали зрелой.

5. Открывание глаз. Наблюдение проводили с Д10 по Д18 и оценивали, когда мышенок откроет оба глаза, как описано ранее [19, 23, 26].

Анализ поведения взрослых потомков. По достижении потомками возраста 3 месяцев была проведена панель поведенческих тестов. Общая двигательная активность, уровень тревожности, склонность к депрессивно-подобному поведению, а также характеристики памяти были изучены с помощью тестов “подвешивание за хвост”, “приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), “открытое поле” (ОП) и “распознавание нового объекта” (РНО). Именно эти тесты достаточно часто используют при исследовании поведения на мышах – генетических моделях БА [6, 8, 14]. Каждая мышь была помещена в чистую, индивидуально вентилируемую клетку за два дня до тестирования. Для устранения запахов все поверхности камер для тестирования очищали после каждого животного 6%-ным раствором перекиси водорода. Автоматическое отслеживание поведения мышей в тестах “подвешивание за хвост”, ПКЛ, ОП и РНО осуществляли и анализировали с помощью программно-аппаратного комплекса EthoVisionXT (Noldus, Нидерланды), как описано нами ранее [27]. Все поведенческие тесты проводили с 16:00 до 20:00, что совпадало с темной фазой в комнате содержания животных, т.е. в период их наибольшей активности.

Тест “подвешивание за хвост”. Данный тест был использован для оценки склонности к депрессивному поведению по протоколу, описанному ранее [14, 28, 29]. Двух мышей подвешивали за хвост с помощью клейкой ленты к горизонтальной пластине так, чтобы они не касались поверхностей и не могли дотянуться друг до друга. Подвешенные животные активно двигались, но периодически замирали. При проведении теста фиксировали общее время замирания мышей, которое отражает склонность к депрессивному поведению: чем больше время неподвижности, тем выше уровень депрессивного поведения; также оценивали латентное время до первого замирания и число замираний [14, 28, 29].

Тест “приподнятый крестообразный лабиринт”. Данный тест был использован для измерения уровня тревожности по протоколу, описанному ранее [6, 27]. Установка представляла собой классический крестообразный лабиринт из серого поливинилхлорида, состоящий из двух открытых (длина 30 см, ширина 5 см) и двух закрытых (длина 30 см, ширина 5 см, боковые стенки высотой 14.5 см) рукавов, разделенных

центральной ареной (5 × 5 см). Лабиринт располагался на высоте 50 см над поверхностью пола и освещался лампой накаливания (40 Вт), расположенной сверху на высоте 130 см. Продолжительность теста составляла 5 мин. Регистрировали следующие параметры: 1) пройденный путь, 2) доля времени нахождения в центре лабиринта, а также в открытых и закрытых рукавах, 3) число и общее время свешиваний с рукавов, 4) число и общее время вытягиваний.

Тест “открытое поле”. Данный тест был использован для измерения двигательной и исследовательской активности по протоколу, описанному ранее [27, 30]. Для проведения теста использовали круглую арену (OpenScience, Россия) диаметром 60 см из белого поливинилхлорида, огороженную стенкой высотой 30 см. Продолжительность теста составляла 5 мин. Регистрировали стандартные параметры: 1) пройденное расстояние, 2) время, проведенное в центре, 3) время, проведенное на периферии, 4) число вертикальных стоек и 5) число грумингов.

Тест “распознавание нового объекта”. Данный тест был использован для оценки работы памяти по протоколу, описанному ранее [18], с модификациями. Каждое животное было помещено в чистую индивидуально вентилируемую клетку за два дня до оценки поведения. Для теста РНО была использована установка, предназначенная для проведения теста ОП (OpenScience, Россия), которая представляет собой круглую арену диаметром 60 см из белого поливинилхлорида, огороженную стенкой высотой 30 см, на полу которой были размещены объекты, предоставляемые тестируемой мыши для исследования. Расстояние между объектами составляло 42 см. Помещение для проведения экспериментов было освещено лампой накаливания 100 Вт; при этом свет был направлен в сторону от поверхности арены для уменьшения уровня тревожности, испытываемой животным.

Исследование состояло из трех этапов:

1. “Адаптация” – для этого проводили тест ОП, описанный выше.
2. “Сессия 1” (запоминание объектов) – проводили на следующий день после теста ОП. На пол арены помещали два одинаковых объекта: темные стеклянные (размером 15 × 4 см) или светлые пластиковые (размером 12 × 3.5 см) цилиндры. Объекты находились на одинаковом (20 см) расстоянии как от боковых стенок арены, так и друг от друга. Тестируемое животное помещали в центр установки. Ознакомление животного с объектами продолжалось в течение 10 мин.
3. “Сессия 2” (распознавание нового объекта) – один из двух старых объектов заменяли на новый: если в “сессии 1” использовали пластиковые цилиндры, то один пластиковый цилиндр заменяли на стеклянный цилиндр, если в “сессии 1” использовали стеклянные цилиндры, то один стеклянный цилиндр заменяли на пластиковый цилиндр. Соответственно, в “сессии 2” тестируемому животному предъявляли как уже знакомый объект, так и новый, которого в “сессии 1” не было. При этом во избежание предпочтения животными правой или левой стороны расположение нового объекта чередовали у разных животных. В течение 10 мин регистрировали продолжительность и число контактов исследуемой мыши с объектами (нахождение животного не более чем в 2 см от объекта, что, как правило, сопровождалось его обнюхиванием) и оценивали следующие параметры: “время исследования объектов”, “число подходов к известному объекту”, “общее время у известного объекта”, “латентное время до первого подхода к известному объекту”, “число подходов к новому объекту”, “общее время у нового объекта”, “латентное время до первого подхода к новому объекту” и “индекс распознавания”. Индекс распознавания подсчитывали как время, потраченное на новый объект / общее время, потраченное на оба исследуемых объекта, умноженное на 100, как описано ранее [18].

Статистический анализ. Анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA v. 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки поведения

в возрасте 3 месяцев использовали двухфакторный дисперсионный (two-way ANOVA) анализ (факторы “линия”, “пол”). Для оценки неонатальных рефлексов в первые недели после рождения потомков применяли дисперсионный анализ с повторными измерениями (repeated measures ANOVA), в качестве факторов – линия и день тестирования. Для оценки массы тела потомков в период вскармливания применяли дисперсионный анализ с повторными измерениями (факторы “линия”, “пол”, “день тестирования”). Оценку эффектов влияния факторов сопровождали апостериорным сравнением (*post hoc*) отдельных групп при помощи критерия Fisher LSD. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверными отличия считали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка массы тела и неонатальных рефлексов в период вскармливания

Данные по массе тела мышей 5xFAD и их сибсов дикого типа представлены в табл. 1. Масса тела потомков обеих линий в период вскармливания в изучаемых группах увеличивалась сходным образом. Дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил значимое влияние фактора “день исследования” [$F_{(2, 130)} = 1662.80, p < 0.001$], но не показал значимого влияния фактора “линия” [$F_{(1, 65)} < 1$], “пол” [$F_{(1, 65)} < 1$] и взаимодействия этих факторов [$F_{(1, 65)} < 1$] на массу тела детенышей. Апостериорное сравнение не выявило межлинейных и половых различий по данному параметру.

Таблица 1. Масса тела потомков мышей 5xFAD в сравнении с сибсами дикого типа в ходе периода вскармливания (Д7, Д14, Д21)

День жизни	WT		5xFAD	
	самцы ($n = 17$)	самки ($n = 19$)	самцы ($n = 20$)	самки ($n = 13$)
Д7	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.1	4.2 ± 0.2
Д14	7.4 ± 0.2	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.2	7.1 ± 0.2
Д21	9.2 ± 0.2	8.7 ± 0.3	8.8 ± 0.2	9.2 ± 0.2

Данные по рефлексу переворачивания в воздухе представлены на рис. 2а. Дисперсионный анализ выявил значимое влияние фактора “день тестирования” [$F_{(4, 64)} = 19.63, p < 0.001$]. Однако не было показано значимого влияния фактора “линия” [$F_{(1, 16)} < 1$] и взаимодействия факторов “линия” и “день тестирования” [$F_{(4, 64)} < 1$]. Апостериорное сравнение не выявило межлинейных различий по данному параметру в отдельные дни теста. У всех потомков на Д15 наблюдали созревание этого рефлекса.

Данные по реакции отрицательного геотаксиса представлены на рис. 2б. Дисперсионный анализ выявил значимое влияние фактора “день исследования” [$F_{(10, 160)} = 32.58, p < 0.001$]. Однако не было значимого влияния фактора “линия” [$F_{(1, 16)} < 1$] и взаимодействия факторов “линия” и “день исследования” [$F_{(10, 160)} < 1$]. Апостериорное сравнение не выявило различий по данному параметру. У всех потомков на Д21 наблюдали созревание этого рефлекса.

Данные по реакции избегания края представлены на рис. 2с. Дисперсионный анализ выявил значимое влияние фактора “день исследования” [$F_{(7, 112)} = 32.30, p < 0.001$]. Однако не было показано влияния фактора “линия” [$F_{(1, 16)} < 1$] и взаимодействия факторов “линия” и “день исследования” [$F_{(7, 112)} < 1$] в отношении этого признака. Апостериорное сравнение не выявило межлинейных различий по данному параметру в отдельные дни теста. У всех потомков на Д18 наблюдали созревание этого рефлекса.

Данные по поддержанию позы представлены на рис. 2d. Дисперсионный анализ выявил значимое влияние фактора “день исследования” [$F_{(4, 64)} = 33.40, p < 0.001$] на формирование зрелой позы при движении. Однако не было показано значимого влияния фактора “линия” [$F_{(1, 16)} < 1$] и взаимодействия факторов “линия” и “день исследования” [$F_{(7, 112)} < 1$] в отношении этого признака. Апостериорное сравнение не выявило межлинейных различий по данному параметру в отдельные дни теста. К Д14 уже все мышата перешли к зрелой позе при движении.

В период с Д12 по Д18 оценивали открытие глаз у мышат. Дисперсионный анализ выявил значимое влияние фактора “день исследования” [$F_{(4, 64)} = 49.6, p < 0.001$] на процент мышат, у которых произошло открытие глаз. Однако не было показано значимого влияния фактора “линия” [$F_{(1, 16)} < 1$] и взаимодействия факторов “линия” и “день исследования” [$F_{(4, 64)} < 1$] в отношении этого признака. Апостериорное сравнение не выявило различий по данному параметру. Подавляющее большинство мышат 5xFAD и их сибсов дикого типа открывали глаза на 13–16-й дни жизни. На 13-й день развития еще все мышата обеих линий были с закрытыми глазами. На 16-й день жизни процент мышат с открытыми глазами достигал в среднем по выводкам $80.95 \pm 12.82\%$ у дикого типа и $68.89 \pm 13.28\%$ у мышей 5xFAD. У всех исследуемых потомков глаза были открыты на Д18.

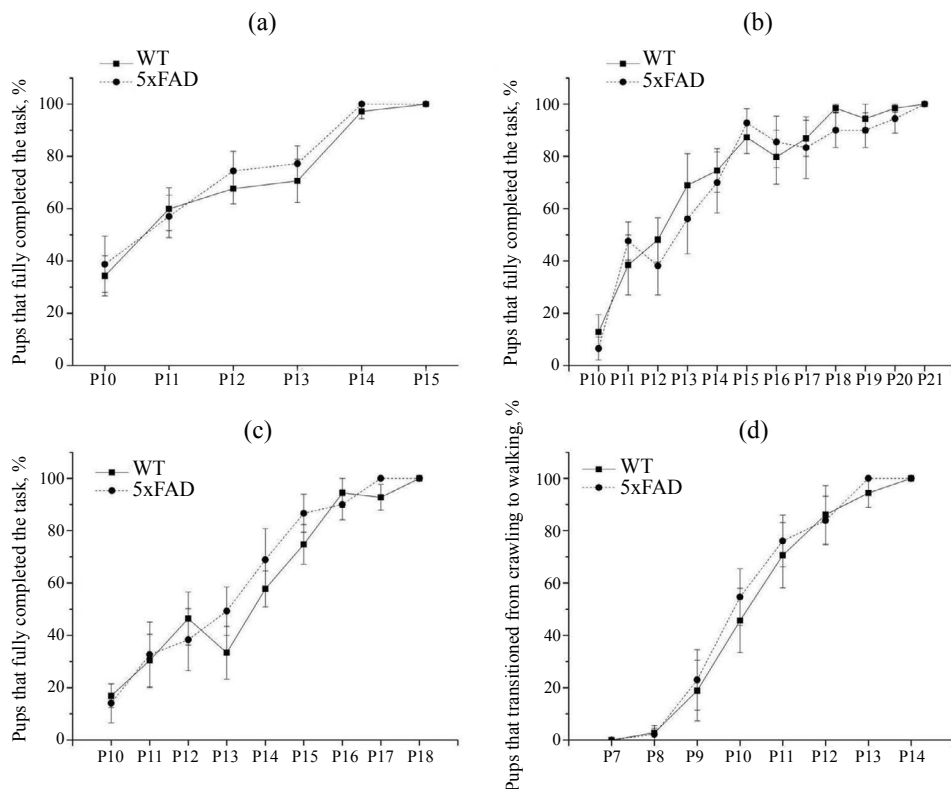


Рис. 2. Созревание неонатальных рефлексов в ходе периода вскармливания у детенышей 5xFAD в сравнении с сибсами дикого типа (WT – wild type). (a) – Рефлекс переворачивания тела в воздухе; (b) – отрицательный геотаксис; (c) – избегание края; (d) – зрелость позы. P7–P21 – возраст детенышей (дни жизни). Данные представлены как $M \pm SEM$.

Тест “подвешивание за хвост”

Результаты исследования мышей 5xFAD в тесте “подвешивание за хвост” в сравнении с сибсами дикого типа представлены в табл. 2. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект фактора “пол” [$F_{(1,44)} = 4.89, p < 0.05$] на параметр “общее время замираний”. Однако влияния фактора “линия” и взаимодействия между факторами на данный параметр обнаружено не было [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение при помощи критерия Fisher LSD показало, что самцы 5xFAD проводили больше времени ($p < 0.05$) в состоянии замираний по сравнению с самками той же линии.

По числу замираний и латентному времени до первого замираний двухфакторный дисперсионный анализ не показал значимого влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} = 0.52, p = 0.47$] и [$F_{(1,44)} = 0.40, p = 0.53$], “пол” [$F_{(1,44)} = 0.72, p = 0.40$] и [$F_{(1,44)} = 0.01, p = 0.93$], так же, как их взаимодействия [$F_{(1,44)} = 0.085, p = 0.83$] и [$F_{(1,44)} = 2.51, p = 0.12$] соответственно.

Таблица 2. Поведение в тесте “подвешивание за хвост” мышей 5xFAD в сравнении с сибсами дикого типа

Параметры	Группы			
	WT		5xFAD	
	самцы ($n = 12$)	самки ($n = 12$)	самцы ($n = 12$)	самки ($n = 12$)
Число замираний	29.8 ± 1.8	31.0 ± 1.9	30.8 ± 1.7	32.8 ± 2.4
Общее время замираний, с	150.7 ± 9.2	138.8 ± 9.8	$172.6 \pm 6.6^*$	138.8 ± 14.3
Латентное время до первого замираний, с	12.2 ± 2.2	16.4 ± 3.9	18.5 ± 2.0	13.8 ± 2.8

Примечание. * – $p < 0.05$ по сравнению с самками той же линии.

Тест “приподнятый крестообразный лабиринт”

Результаты изучения поведения мышей в тесте ПКЛ представлены в табл. 3. Дисперсионный анализ не выявил влияния факторов “линия” и “пол” на такой параметр, как “время в закрытых рукавах” [$F_{(1,44)} < 1$]. Между тем выявлено взаимодействие между этими факторами [$F_{(1,44)} = 6.40, p < 0.05$]. Апостериорное сравнение показало, что самцы дикого типа проводили больше времени ($p < 0.05$) в закрытых рукавах по сравнению с самками той же линии. Однако по числу заходов в закрытые рукава двухфакторный дисперсионный анализ не показал значимого влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} = 0.00, p = 1.0$] и “пол” [$F_{(1,44)} = 0.71, p = 0.40$], а также их взаимодействия [$F_{(1,44)} = 0.59, p = 0.45$]. Апостериорное сравнение не выявило различий между группами по этому показателю.

Дисперсионный анализ не выявил влияния факторов “линия” и “пол” на такой параметр, как “время в открытых рукавах” [$F_{(1,44)} < 1$]. Между тем был выявлен эффект взаимодействия между этими факторами [$F_{(1,44)} = 7.62, p < 0.01$]. Апостериорное сравнение показало, что самцы дикого типа проводили меньше времени ($p < 0.05$) в открытых рукавах по сравнению с самками той же линии. Самцы 5xFAD проводили больше времени ($p < 0.05$) в открытых рукавах, чем самцы дикого типа. По числу заходов в открытые рукава двухфакторный анализ не показал значимого влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} = 0.005, p = 0.95$], “пол” [$F_{(1,44)} = 0.07, p = 0.79$] и их взаимодействия [$F_{(1,44)} = 0.04, p = 0.45$]. Апостериорное сравнение не выявило различий между группами по этому показателю.

Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил влияния фактора “линия” и “пол”, а также взаимодействия между этими факторами [$F_{(1,44)} < 1$] на параметр “число свешиваний”. Однако апостериорное сравнение показало, что самцы WT реже свешивались ($p < 0.05$) по сравнению с самками той же линии. Самцы 5xFAD чаще свешивались ($p < 0.01$) с лабиринта по сравнению с самцами дикого типа. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект фактора “пол” [$F_{(1,44)} = 4.50, p < 0.05$] на общее время свешиваний. Однако влияния фактора “линия” и взаимодействия между факторами на данный параметр обнаружено не было [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение показало, что общее время свешиваний у самцов WT было меньше ($p < 0.001$) по сравнению с самками той же линии. У самцов 5xFAD время свешиваний было больше, чем у самцов дикого типа ($p < 0.01$).

По числу вытягиваний дисперсионный двухфакторный анализ не показал значимого влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} = 0.01, p = 0.90$], “пол” [$F_{(1,44)} = 2.72, p = 0.11$], как и их взаимодействия [$F_{(1,44)} = 0.08, p = 0.78$]. Апостериорное сравнение не выявило различий между группами по этому показателю. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект фактора “пол” [$F_{(1,44)} = 13.10, p < 0.001$] на общее время вытягиваний. Однако влияния фактора “линия” и взаимодействия между факторами на данный параметр обнаружено не было [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение показало, что самцы линии 5xFAD, как и самцы дикого типа, проводят в состоянии вытягивания меньше времени ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно), чем самки этих же линий.

Таблица 3. Поведение в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа

Параметры	Группы			
	WT		5xFAD	
	самцы ($n = 12$)	самки ($n = 12$)	самцы ($n = 12$)	самки ($n = 12$)
Пройденный путь, см	1036.8 ± 154.1	907.4 ± 31.1	979.7 ± 80.2	1151.6 ± 87.3
Время в закрытых рукавах, % от общего	83.0 ± 3.8*	67.1 ± 4.0	64.6 ± 8.7	77.0 ± 3.3
Время в центре, % от общего	9.8 ± 2.2	15.7 ± 3.2	17.7 ± 4.4	12.7 ± 1.9
Время в открытых рукавах, % от общего	7.2 ± 1.9*	17.2 ± 3.2	17.7 ± 4.7 [#]	10.3 ± 1.9
Число заходов в закрытые рукава	5.0 ± 1.3	3.2 ± 0.7	4.2 ± 0.9	4.1 ± 1.4
Число заходов в открытые рукава	3.8 ± 1.3	4.4 ± 1.0	4.2 ± 1.3	4.3 ± 1.2
Число свешиваний	6.3 ± 1.3*	13.3 ± 1.5	14.7 ± 2.8 ^{##}	13.0 ± 2.9
Общее время свешиваний, с	4.1 ± 1.2***	14.1 ± 1.7	12.7 ± 2.5 ^{##}	10.7 ± 1.9
Число вытягиваний	14.0 ± 2.2	16.8 ± 1.9	13.2 ± 1.6	17.2 ± 2.5
Общее время вытягиваний, с	13.7 ± 2.7*	21.7 ± 2.4	13.0 ± 1.7**	25.0 ± 3.8

Примечание. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с самками той же линии, [#] – $p < 0.05$, ^{##} – $p < 0.01$ по сравнению с самцами дикого типа.

Тест “открытое поле”

Результаты исследования мышей в тесте ОП представлены в табл. 4. Дисперсионный анализ выявил влияние фактора “пол” [$F_{(1,44)} = 5.01, p < 0.05$] на параметр “пройденный путь”. Между тем влияния фактора “линия” и взаимодействия между факторами “пол” и “линия” на данный параметр обнаружено не было [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение показало, что самцы 5xFAD проходили меньшую дистанцию ($p < 0.05$) по сравнению с самками той же линии.

Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил влияния факторов “линия” и “пол” на параметр “число вертикальных стоек” [$F_{(1,44)} < 1$], однако показал эффект взаимодействия этих факторов [$F_{(1,44)} = 5.54, p < 0.05$]. Апостериорное сравнение показало, что самки 5xFAD делали больше стоек ($p < 0.05$) по сравнению с самками дикого типа.

Дисперсионный анализ не показал влияния факторов “линии” и “пол”, а также взаимодействия между этими факторами на число актов груминга [$F_{(1,44)} < 1$], однако апостериорное сравнение показало, что самцы WT совершали груминг чаще ($p < 0.05$) по сравнению с самками той же линии.

По параметрам “время, проведенное в центре арены” и “время, проведенное на периферии” дисперсионный анализ не показал влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} = 3.67, p = 0.06$] и “пол” [$F_{(1,44)} = 3.28, p = 0.08$], как и их взаимодействия [$F_{(1,44)} = 0.21, p = 0.65$]. Апостериорное сравнение не выявило различий между группами по этим параметрам.

Таблица 4. Поведение мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа в тесте “открытое поле”

Параметры	Группы			
	WT		5xFAD	
	самцы ($n = 12$)	самки ($n = 12$)	самцы ($n = 12$)	самки ($n = 12$)
Пройденный путь, см	2167.1 $\pm$ 170.7	2391.2 $\pm$ 333.1	1640.2 $\pm$ 176.1*	2557.3 $\pm$ 298.0
Время в центре, % от общего	5.7 $\pm$ 1.4	7.7 $\pm$ 1.8	2.3 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 1.6
Время на периферии, % от общего	94.3 $\pm$ 1.4	92.4 $\pm$ 1.8	97.7 $\pm$ 0.5	94.4 $\pm$ 1.6
Число вертикальных стоек	20.5 $\pm$ 3.2	14.3 $\pm$ 1.9	17.5 $\pm$ 2.4	23.6 $\pm$ 2.8 [#]
Число актов груминга	1.8 $\pm$ 0.5*	0.7 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.3

Примечание. * – $p < 0.05$ по сравнению с самками той же линии, [#] – $p < 0.05$ по сравнению с самками дикого типа.

Тест “распознавание нового объекта”

Результаты исследования мышей в тесте РНО представлены в табл. 5. Дисперсионный анализ не выявил влияния факторов “линия” и “пол”, а также взаимодействия между этими факторами [$F_{(1,44)} < 1$] на параметр “время исследования объектов”. Однако апостериорное сравнение показало, что время исследования объектов у самцов WT было достоверно больше ($p < 0.05$), чем у самок этой линии.

По параметрам “число подходов к известному объекту”, “общее время у известного объекта”, “латентное время до первого подхода к известному объекту” и “число подходов к новому объекту” дисперсионный анализ не показал влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} < 1$] и “пол” [$F_{(1,44)} < 1$], как и их взаимодействия [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение не выявило различий между группами по этим параметрам.

Дисперсионный анализ выявил эффект фактора “пол” [$F_{(1,44)} = 5.49, p < 0.05$] на параметр “общее время у нового объекта”. Однако влияния фактора “линия” и взаимодействия между факторами на данный параметр обнаружено не было [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение показало, что самцы WT проводили больше времени ($p < 0.05$) у нового объекта по сравнению с самками той же линии.

Дисперсионный анализ не выявил влияния фактора “линия” и фактора “пол”, а также взаимодействия между этими факторами [$F_{(1,44)} < 1$] на параметр “латентное время до первого подхода к новому объекту”. Между тем апостериорное сравнение показало, что латентное время до первого подхода к новому объекту у самцов линии 5xFAD было меньше ($p < 0.05$), чем у самок той же линии.

По параметру “индекс распознавания” дисперсионный анализ не показал влияния факторов “линия” [$F_{(1,44)} < 1$] и “пол” [$F_{(1,44)} < 1$], как и их взаимодействия [$F_{(1,44)} < 1$]. Апостериорное сравнение не выявило различий между группами по этому параметру.

Таблица 5. Поведение мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа в тесте “распознавание нового объекта”

Параметры	Группы			
	WT		5xFAD	
	самцы (n = 12)	самки (n = 12)	самцы (n = 12)	самки (n = 12)
Время исследования объектов (% от общего времени теста)	0.7 ± 0.1*	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Число подходов к известному объекту	8.3 ± 1.6	5.6 ± 0.9	11.0 ± 2.8	7.3 ± 2.3
Общее время у известного объекта, с	9.3 ± 2.1	3.9 ± 0.8	12.2 ± 5.6	6.4 ± 1.7
Латентное время до первого подхода к известному объекту, с	103.9 ± 29.7	79.2 ± 33.9	83.0 ± 38.7	190.2 ± 57.5
Число подходов к новому объекту	7.8 ± 1.6	3.6 ± 1.0	9.2 ± 2.9	7.6 ± 2.6
Общее время у нового объекта, с	9.0 ± 8.0*	2.1 ± 0.5	9.0 ± 3.2	5.3 ± 1.7
Латентное время до первого подхода к новому объекту, с	134.6 ± 30.5	169.9 ± 52.2	193.0 ± 58.1*	215.6 ± 55.0
Индекс распознавания	44.9 ± 7.5	58.9 ± 9.1	39.1 ± 7.9	39.9 ± 5.5

Примечание. * – $p < 0.05$ по сравнению с самками той же линии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для мышей характерно достаточно быстрое возрастание массы тела в первые недели жизни; в более позднем возрасте процесс продолжается, но медленнее, причем масса тела является количественным признаком, зависимым от вклада множества генов, а также среды обитания, в частности диеты [31, 32]. Ранее было показано, что для стареющих мышей линии 5xFAD характерна сниженная масса тела по сравнению с контрольными животными дикого типа [33, 34]. Более того, в исследовании Tremml с соавт. у мышат, несущих мутантный ген предшественника бета-амилоида, уже в течение периода

вскармливания было продемонстрировано отставание в росте [35]. Роль оси “кишечная микрофлора – метаболиты – мозг” активно исследуют в развитии признаков, характерных для болезни Альцгеймера у мышей линии 5xFAD [36]. Накопление бета-амилоида происходит у мышей этой линии не только в мозге, но и в различных отделах кишечника, начиная уже с месячного возраста [37], что может существенно сказываться как на кишечной микрофлоре, так и на массе тела мышей в разном возрасте [34].

Наше исследование показало, что на протяжении периода вскармливания происходило возрастание массы тела у гетерозиготных мышат 5xFAD и их сибсов дикого типа (контроль) в соответствии с возрастной динамикой, характерной для мышей [31]. При этом не было выявлено влияния факторов “пол” и “линия” на этот параметр. Отличие полученных нами результатов от результатов предшествующего исследования, в котором было отмечено отставание в росте у мышат, несущих мутантный ген предшественника бета-амилоида [35], может быть связано с существенным различием условий содержания животных, различием исследуемых моделей БА, а также с тем, что в нашем исследовании, в отличие от работы Tremml с соавт. [35], идентифицировали пол мышат. Следует отметить, что в другой работе, в которой, как и в нашей, идентифицировали пол потомков в ходе неонатального онтогенеза, не было обнаружено изменений массы тела мышат 5xFAD в период вскармливания в сравнении с контрольными животными дикого типа [37]. Между тем представляется весьма интересным отметить тенденцию к инверсии полового диморфизма у мышей 5xFAD. Если у сибсов дикого типа самцы были несколько тяжелее самок на 7-, 14- и 21-й дни жизни, то у сибсов 5xFAD была обратная ситуация – самки были несколько тяжелее самцов во всех трех возрастах, хотя ни в одном случае различия в массе тела между группами не были достоверно значимыми. Это наблюдение хорошо соотносится с недавней работой Campbell с соавт. [38], в которой было показано, что скорость увеличения массы тела в первые шесть недель жизни была у самок 5xFAD выше по сравнению с контрольными самками дикого типа.

Созревание неонатальных рефлексов характеризует развитие мозга и ЦНС [19, 23, 25]. Различные комбинации тестов, характеризующих неонатальные рефлексы, используют для анализа возможных нарушений нейроразвития, в том числе при изучении моделей различных нейропатологий [21, 22]. Ранее были обнаружены изменения экспрессии белков в мозге новорожденных мышат линии 5xFAD, в частности, принимающих участие в нейровоспалении [17], а также непосредственно связанных с БА [9]. Мы предполагали, что эти нарушения в мозге новорожденных мышат могли отразиться на созревании неонатальных рефлексов. Однако в ходе исследования наша гипотеза не подтвердилась. Наше исследование продемонстрировало, что созревание неонатальных рефлексов и открытие глаз происходит у гетерозиготных мышат 5xFAD без отклонений от сроков, характерных для данного вида лабораторных животных [19, 23, 26], при этом отличий от сибсов дикого типа обнаружено не было. Отсутствие нарушений в созревании рефлексов и открытии глаз у мышей линии 5xFAD может быть связано с тем, что в столь раннем возрасте нарушений развития мозга еще нет, поскольку бета-амилоид у гетерозиготных мышей 5xFAD накапливается в нейронах в более позднем возрасте [7].

Наряду с расстройствами памяти, склонность к депрессии является характерным признаком БА человека [39, 40]. Тест “подвешивание за хвост” применяют в работах, оценивающих поведение трансгенных мышей, моделирующих БА [14, 29]. В частности, время замирания в тесте “подвешивание за хвост” широко используют для оценки депрессивно-подобного поведения [14, 28, 29]. В нашей работе были установлены половые отличия в тесте “подвешивание за хвост” у мышей гетерозиготной трансгенной линии 5xFAD в возрасте 3-х месяцев. В отличие от контрольных животных дикого типа, самцы 5xFAD находились дольше в состоянии замирания по сравнению с самками, что может свидетельствовать о начальных стадиях развития депрессивно-подобного поведения. В настоящее время существует единственная работа, в которой мышей

5xFAD исследовали на склонность к депрессивно-подобному поведению [14]. Авторы данной работы продемонстрировали, что у мышей 5xFAD в возрасте 6 и 12 месяцев время замирания в тесте “подвешивание за хвост” значительно выше, чем у контрольных мышей дикого типа, что может свидетельствовать о нарастании у мышей этой линии склонности к депрессивно-подобному состоянию по мере взросления и старения [14]. Изменение поведения в тесте “подвешивание за хвост” отмечено и на других линиях мышей, моделирующих БА; эти изменения отмечают у стареющих животных в возрасте 8–10 месяцев [28, 29].

На другой модели БА – трансгенных мышцах с оверэкспрессией человеческого гена *tau* (*htau* + мыши) была также показана склонность к ангедонии в тесте предпочтения сахара у молодых животных в возрасте 4-х месяцев, но только у самцов [41], что может свидетельствовать о развитии у них депрессивно-подобного поведения [42]. На основании полученных нами результатов и анализа литературных данных можно предположить, что депрессивно-подобное поведение у мышей, моделирующих БА, начинается раньше проявляться у самцов. Отсутствие выраженных отличий в проявлении депрессивно-подобного поведения у молодых мышей 5xFAD и контрольных мышей дикого типа в возрасте 3-х месяцев может быть обусловлено тем, что в нашей работе были исследованы гетерозиготные животные. Показано, что у гомозиготных мышей 5xFAD уже в возрасте 1.5–2 месяцев в головном мозге накапливается бета-амилоид [7, 11], в то время как у гетерозиготных мышей 5xFAD эти нарушения в мозге возникают лишь в возрасте 4–5 месяцев [7, 33].

Тестирование мышей в ПКЛ применяют для оценки уровня тревожности, в том числе на моделях БА [6, 33]. В нашей работе с применением данного теста было установлено, что самцы 5xFAD в 3 месяца проводили больше времени в открытых рукавах, чаще и дольше свешивались с них по сравнению с самцами дикого типа, это может быть показателем снижения у них уровня тревожности уже в этом возрасте. Снижение уровня тревожности не характерно для людей с БА; напротив, повышенная тревожность, наряду с депрессивными состояниями, наблюдается у людей с БА достаточно часто [39]. Между тем снижение уровня тревожности, выявляемое в тесте ПКЛ, характерно для целого ряда трансгенных мышей, моделирующих БА [6, 20, 28, 33, 43]. На проявление различных отклонений в поведении влияет не только возраст, но и гомозиготность/гетерозиготность линии, моделирующей БА [7]. Наши данные о снижении уровня тревожности у самцов гетерозиготной линии 5xFAD в молодом возрасте соответствуют полученным ранее результатам, свидетельствующим о снижении уровня тревожности у мышей линии 5xFAD в более поздних возрастах [6, 33]. По другим трансгенным линиям, моделирующим БА, имеются достаточно противоречивые данные по изменению уровня тревожности в различных возрастах [20, 28, 43–45]. Исходя из полученных нами результатов, можно предположить, что снижение уровня тревожности у мышей линии 5xFAD происходит раньше у самцов, чем у самок.

Результаты нашего исследования показали половые отличия у мышей линии 5xFAD в тесте ОП. Самцы 5xFAD имели сниженную двигательную активность по сравнению с самками, однако межлинейных отличий самцов 5xFAD и самцов-сисбсов дикого типа по данному показателю обнаружено не было. В то же время самки 5xFAD в тесте ОП имели более высокий уровень исследовательской активности по сравнению с контрольными самками дикого типа, что выразилось в большем числе вертикальных стоек. Лишь в одном из исследований были обнаружены отличия в относительно молодом возрасте у мышей 5xFAD и контрольных мышей дикого типа по результатам тестирования в тесте ОП [18]. В других исследованиях не было отмечено существенной разницы по двигательной активности между мышцами 5xFAD и контрольными мышцами дикого типа в молодом возрасте [30, 33]. Отличия в общем уровне локомоции и в исследовательской активности начинали проявляться лишь в возрасте восьми месяцев и старше [30, 33, 46].

Нарушения памяти являются важнейшим симптомом при БА у человека [2, 3]. Тест РНО используют для оценки памяти у мышей [18, 46]. Результаты нашего исследования выявили половые различия в выполнении этого теста, проявляющиеся у мышей линии 5xFAD уже в возрасте 3 месяцев. Самцы 5xFAD имели меньшее латентное время до первого подхода к новому объекту по сравнению с самками. Ранее у молодых мышей 5xFAD были обнаружены признаки нарушения памяти и снижение способности к обучению [8, 13, 18]. Это состояние усугубляется с возрастом и коррелирует с демиелинизацией нервных волокон [6, 13, 46]. Нарушение памяти, которое прогрессирует с возрастом, было продемонстрировано на других трансгенных линиях мышей, моделирующих БА [47–49]. Кроме того, у мышей 5xFAD был показан дефицит перехода кратковременной памяти в долговременную, начиная с возраста 5 месяцев [50, 51]. Исходя из наших данных и данных литературы, можно предположить, что начальные проявления нарушения работы памяти у линии 5xFAD происходят уже в молодом возрасте и зависят от пола животного.

В заключение следует отметить, что в нашем исследовании впервые изучено созревание неонатальных рефлексов у мышей 5xFAD. Мы не наблюдали различий в созревании неонатальных рефлексов, возрастании массы тела и открытии глаз у мышат 5xFAD и их сибсов дикого типа, это свидетельствует о том, что в период вскармливания мышата 5xFAD развиваются в соответствии с возрастными характеристиками. Между тем в возрасте 3-х месяцев у мышей 5xFAD была обнаружена тенденция к развитию депрессивно-подобного поведения, снижению уровня тревожности и уменьшению общей локомоторной активности, но только у самцов.

Наши результаты, полученные на мышах 5xFAD, свидетельствуют о том, что, хотя выраженные изменения в поведении мышей 5xFAD в возрасте 3-х месяцев отсутствуют, уже в этом возрасте у гетерозиготных мышей данной линии имеются первые признаки поведенческих нарушений, характерные для БА, причем преимущественно у самцов. Изменения поведения у мышей 5xFAD, моделирующих БА, могут быть связаны с накоплением амилоидных бляшек в коре головного мозга и гиппокампе, а также с нарастающей с возрастом демиелинизацией нервных волокон [13, 14]. Данные литературы свидетельствуют о том, что у гетерозиготных мышей линии 5xFAD существенные поведенческие отклонения проявляются на более поздних стадиях онтогенеза [6, 14], чем регистрируются нарушения в головном мозге [7, 13].

Накопление бета-амилоидных бляшек является одним из первых признаков развития БА, которое начинается задолго до проявления основных симптомов [52]. Кроме того, у пациентов на ранних этапах БА было выявлено изменение объема некоторых областей гиппокампа [53], что позднее может приводить к отклонениям в поведении и к нарушениям памяти [2, 3]. У женщин БА встречается чаще, чем у мужчин [54]. Эстрогены оказывают нейропротективный эффект, и существенное возрастание частоты БА в постменопаузный период у женщин связывают со снижением уровня этих гормонов [55, 56]. Между тем имеется много свидетельств того, что тестостерон также оказывает нейропротекторный эффект и низкий уровень этого гормона может способствовать раннему развитию БА у мужчин [57, 58]. Эти и другие работы [54, 59, 60] привлекают внимание исследователей к выявлению роли половых различий в манифестации БА и подчеркивают роль половых гормонов в развитии данной патологии. Обнаруженные в нашей работе половые различия молодых мышей 5xFAD в начале проявления признаков, характерных для БА, могут представлять определенный интерес и стимулировать дальнейшие исследования в данном направлении.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ИЦиГ СО РАН.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – С. Я. А., И. Н. Р., Е. Ю. Б., проведение поведенческих экспериментов – И. Н. Р., Т. А. Р., В. С. К., Н. В. Х., обработка результатов – Е. Ю. Б., Т. А. Р., С. Я. А., написание и редактирование рукописи – С. Я. А., И. Н. Р., В. С. К., Е. Ю. Б.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (грант РНФ № 25-24-00153).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры и обращение с лабораторными животными соответствовали Директиве ЕС 2010/63/EU об экспериментах на животных (ETS № 123) и были одобрены Комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 215 от 25.02.2025 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bermejo-Pareja F, Del Ser T* (2024) Controversial past, splendid present, unpredictable future: a brief review of Alzheimer disease history. *J Clin Med* 13: 536.
<https://doi.org/10.3390/jcm13020536>
2. *Nasb M, Tao W, Chen N* (2024) Alzheimer's disease puzzle: Delving into pathogenesis hypotheses. *Aging Dis* 15: 43–73.
<https://doi.org/10.14336/AD.2023.0608>
3. *Perneczky R, Dom G, Chan A, Falkai P, Bassetti C* (2024) Anti-amyloid antibody treatments for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 31: e16049.
<https://doi.org/10.1111/ene.16049>
4. *Hardy J, Selkoe DJ* (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–356.
<https://doi.org/10.1126/science.1072994>
5. *Long JM, Holtzman DM* (2019) Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies. *Cell* 179: 312–339.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
6. *Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O* (2012) Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 196.e29–40.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.027>
7. *Richard BC, Kurdakova A, Baches S, Bayer TA, Weggen S, Wirths O* (2015) Gene dosage dependent aggravation of the neurological phenotype in the 5xfad mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 45: 1223–1236.
<https://doi.org/10.3233/JAD-143120>
8. *Gu L, Wu D, Tang X, Qi X, Li X, Bai F, Chen X, Ren Q, Zhang Z* (2018) Myelin changes at the early stage of 5xFAD mice. *Brain Res Bull* 137: 285–293.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.013>
9. *Uras I, Karayel-Basar M, Sahin B, Baykal AT* (2023) Detection of early proteomic alterations in 5xFAD Alzheimer's disease neonatal mouse model via MALDI-MSI. *Alzheimers Dement* 19: 4572–4589.
<https://doi.org/10.1002/alz.13008>
<https://www.alzforum.org/research-models/5xfad-c57bl6>

10. *Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R* (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26: 10129–10140.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
11. *Oblak AL, Lin PB, Kotredes KP, Pandey RS, Garceau D, Williams HM, Uyar A, O'Rourke R, O'Rourke S, Ingraham C, Bednarczyk D, Belanger M, Cope ZA, Little GJ, Williams SG, Ash C, Bleckert A, Ragan T, Logsdon BA, Mangravite LM, Sukoff Rizzo SJ, Territo PR, Carter GW, Howell GR, Sasner M, Lamb BT* (2021) Comprehensive evaluation of the 5xFAD mouse model for preclinical testing applications: A MODEL-AD study. *Front Aging Neurosci* 13: 713726.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.713726>
12. *Wu D, Tang X, Gu LH, Li XL, Qi XY, Bai F, Chen XC, Wang JZ, Ren QG, Zhang ZJ* (2018) LINGO-1 antibody ameliorates myelin impairment and spatial memory deficits in the early stage of 5XFAD mice. *CNS Neurosci Ther* 24: 381–393.
<https://doi.org/10.1111/cns.12809>
13. *Bhuiyan P, Zhang W, Liang G, Jiang B, Vera R, Chae R, Kim K, Louis LS, Wang Y, Liu J, Chuang DM, Wei H* (2025) Intranasal delivery of lithium salt suppresses inflammatory pyroptosis in the brain and ameliorates memory loss and depression-like behavior in 5xFAD mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 20: 26.
<https://doi.org/10.1007/s11481-025-10185-7>
14. *Holmdahl R, Malissen B* (2012) The need for littermate controls. *Eur J Immunol* 42: 45–47.
<https://doi.org/10.1002/eji.201142048>
15. *Wu D, Dean J* (2020) Maternal factors regulating preimplantation development in mice. *Curr Top Dev Biol* 140: 317–340.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.10.006>
16. *Mazi AR, Arzuman AS, Gurel B, Sahin B, Tuzuner MB, Ozansoy M, Baykal AT* (2018) Neonatal neurodegeneration in alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis Rep* 2: 79–91.
<https://doi.org/10.3233/ADR-170049>
17. *Chen H, Fang Z, Lin SL, Schachner M* (2025) L1CAM mimetic compound duloxetine improves cognitive impairment in 5xFAD mice and protects A β 1-42-damaged HT22 cells. *Eur J Pharmacol* 997: 177476.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2025.177476>
18. *Fox WM* (1965) Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 13: 234–241.
[https://doi.org/10.1016/0003-3472\(65\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0003-3472(65)90041-2)
19. *Lalonde R, Kim HD, Maxwell JA, Fukuchi K* (2005) Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett* 390: 87–92.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.028>
20. *Feather-Schussler DN, Ferguson TS* (2016) A battery of motor tests in a neonatal mouse model of cerebral palsy. *J Vis Exp*: 53569.
<https://doi.org/10.3791/53569>
21. *Lalonde R, Filali M, Strazielle C* (2022) SHIRPA as a neurological screening battery in mice. *Curr Protoc* 2: e554.
<https://doi.org/10.1002/cpz1.554>
22. *Okotrub SV, Rozhkova IN, Brusentsev EY, Gornostaeva AM, Ragaeva DS, Chuyko EA, Amstislavskiy SY* (2022) Effects of prenatal exposure to exogenous gonadotropin on brain development in mice. *Neurosci Behav Physiol* 52: 1073–1081.
<https://doi.org/10.1007/s11055-022-01335-y>
23. *Heyser CJ* (2004) Assessment of developmental milestones in rodents. *Current protocols in neuroscience*. Chapter 8: Unit 8.18.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0818s25>
24. *Roubertoux PL, Ghata A, Carlier M* (2018) Measuring preweaning sensorial and motor development in the mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 1: 54–78.
<https://doi.org/10.1002/cpmo.41>
25. *Rochefort NL, Garaschuk O, Milos RI, Narushima M, Marandi N, Pichler B, Kovalchuk Y, Konnerth A* (2009) Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15049–15054.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0907660106>

26. Рожкова ИИ, Окотруб СВ, Брусенцев ЕЮ, Рахманова ТА, Лебедева ДА, Козенева ВС, Хоцкин НВ, Амстиславский СЯ (2023) Анализ поведения и плотности нейронов в головном мозге мышей B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*^{A53T})23Mkle/J – модели болезни Паркинсона. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 109: 1199–1216. [Rozhkova IN, Okotrub SV, Brusentsev EY, Rakhmanova TA, Lebedeva DA, Kozeneva VS, Khotskin NV, Amstislavsky SY (2023) Analysis of behavior and brain neuronal density in B6.Cg-Tg(Prnp-SNCA*^{A53T})23Mkle/J mice, a Parkinson's disease model. Russ J Physiol 109: 1199–1216. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813923090091>
27. Varkonyi D, Torok B, Sipos E, Fazekas CL, Banrevi K, Correia P, Chaves T, Farkas S, Szabo A, Martinez-Bellver S, Hangya B, Zelena D (2022) Investigation of anxiety- and depressive-like symptoms in 4- and 8-month-old male triple transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Int J Mol Sci 23: 10816. <https://doi.org/10.3390/ijms231810816>
28. Wang Y, Wu LH, Hou F, Wang ZJ, Wu MN, Holscher C, Cai HY (2024) Mitochondrial calcium uniporter knockdown in hippocampal neurons alleviates anxious and depressive behavior in the 3xTg Alzheimer's disease mouse model. Brain Res 1840: 149060. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.149060>
29. O'Leary TP, Mantolino HM, Stover KR, Brown RE (2020) Age-related deterioration of motor function in male and female 5xFAD mice from 3 to 16 months of age. Genes Brain Behav 19: e12538. <https://doi.org/10.1111/gbb.12538>
30. Cheverud JM, Routman EJ, Duarte FA, van Swinderen B, Cothran K, Perel C (1996) Quantitative trait loci for murine growth. Genetics 142: 1305–1319. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.4.1305>
31. Wright KM, Deighan AG, Di Francesco A, Freund A, Jojic V, Churchill GA, Raj A (2022) Age and diet shape the genetic architecture of body weight in diversity outbred mice. Elife 11: e64329. <https://doi.org/10.7554/eLife.64329>
32. Forner S, Kawauchi S, Balderrama-Gutierrez G, Kramar EA, Matheos DP, Phan J, Javonillo DI, Tran KM, Hingco E, da Cunha C, Rezaie N, Alcantara JA, Baglietto-Vargas D, Jansen C, Neumann J, Wood MA, MacGregor GR, Mortazavi A, Tenner AJ, LaFerla FM, Green KN (2021) Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. Sci Data 8: 270. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01054-y>
33. Kamenko K, Hasegawa Y, Hayashi K, Takemoto Y, Uchikawa H, Mukasa A, Kim-Mitsuyama S (2022) Loss of body weight in old 5xFAD mice and the alteration of gut microbiota composition. Exp Gerontol 166: 111885. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111885>
34. Trembl P, Lipp HP, Muller U, Ricceri L, Wolfer DP (1998) Neurobehavioral development, adult open field exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amiloid precursor protein gene. Behav Brain Res 95: 65–76. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00211-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00211-8)
35. Chen Y, Li Y, Fan Y, Chen S, Chen L, Chen Y, Chen Y (2024) Gut microbiota-driven metabolic alterations reveal gut-brain communication in Alzheimer's disease model mice. Gut Microbes 16: 2302310. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2302310>
36. Brandscheid C, Schuck F, Reinhardt S, Schafer KH, Pietrzik CU, Grimm M, Hartmann T, Schwietz A, Endres K (2017) Altered gut microbiome composition and tryptic activity of the 5xFAD Alzheimer's mouse model. J Alzheimers Dis 56: 775–788. <https://doi.org/10.3233/JAD-160926>
37. Campbell KJ, Jiang P, Olker C, Lin X, Kim SY, Lee CJ, Song EJ, Turek FW, Vitaterna MH (2024) The impacts of sex and the 5xFAD model of Alzheimer's disease on the sleep and spatial learning responses to feeding time. Front Neurol 15: 1430989. <https://doi.org/10.3389/fneur.2024.1430989>
38. Botto R, Callai N, Cermelli A, Causarano L, Rainero I (2022) Anxiety and depression in Alzheimer's disease: a systematic review of pathogenetic mechanisms and relation to cognitive decline. Neurol Sci 43: 4107–4124. <https://doi.org/10.1007/s10072-022-06068-x>

39. Huang YY, Gan YH, Yang L, Cheng W, Yu JT (2024) Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and treatment. *Biol Psychiatry* 95: 992–1005.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.10.008>
40. Khan KM, Balasubramanian N, Gaudencio G, Wang R, Selvakumar GP, Kolling L, Pierson S, Tadinada SM, Abel T, Hefti M, Marcinkiewicz CA (2023) Human tau-overexpressing mice recapitulate brainstem involvement and neuropsychiatric features of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 11: 57.
<https://doi.org/10.1186/s40478-023-01546-5>
41. Primo MJ, Fonseca-Rodrigues D, Almeida A, Teixeira PM, Pinto-Ribeiro F (2023) Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. *Eur Neuropsychopharmacol* 77: 80–92.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2023.08.496>
42. Faure A, Verret L, Bozon B, El Tannir El Tayara N, Ly M, Kober F, Dhenain M, Rampon C, Delatour B (2011) Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32: 407–418.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.009>
43. Lalonde R, Qian S, Strazielle C (2003) Transgenic mice expressing the PS1-A246E mutation: Effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. *Behav Brain Res* 138: 71–79.
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00230-9](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00230-9)
44. Lalonde R, Dumont M, Staufienbiel M, Sturchler-Pierrat C, Strazielle C (2002) Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res* 956: 36–44.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03476-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03476-5)
45. Son Y, Kim JS, Jeong YJ, Jeong YK, Kwon JH, Choi HD, Pack JK, Kim N, Lee YS, Lee HJ (2018) Long-term RF exposure on behavior and cerebral glucose metabolism in 5xFAD mice. *Neurosci Lett* 666: 64–69.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.042>
46. Lovasic L, Bauschke H, Janus C (2005) Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 4: 197–208.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00104.x>
47. Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: Similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115: 5–38.
<https://doi.org/10.1007/s00401-007-0312-8>
48. Wirths O, Bayer TA (2008) Motor impairment in Alzheimer's disease and transgenic Alzheimer's disease mouse models. *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1: 1–5.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00373.x>
49. Ohno M (2009) Failures to reconsolidate memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 92: 455–459.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.05.001>
50. Devi L, Ohno M (2010) Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *Eur J Neurosci* 31: 110–118.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07031.x>
51. Bermejo-Pareja F, Del Ser T (2024) Controversial past, splendid present, unpredictable future: A brief review of Alzheimer disease history. *J Clin Med* 13: 536.
<https://doi.org/10.3390/jcm13020536>
52. Hari I, Adeyemi OF, Gowland P, Bowtell R, Mougin O, Vesey P, Shah J, Mukaetova-Ladinska EB, Hosseini AA (2024) Memory impairment in Amyloid β -status Alzheimer's disease is associated with a reduction in CA1 and dentate gyrus volume: In vivo MRI at 7T. *Neuroimage* 292: 120607.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2024.120607>
53. Aggarwal NT, Mielke MM (2023) Sex differences in Alzheimer's disease. *Neurol Clin* 41: 343–358.
<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2023.01.001>
54. Rishabh, Rohilla M, Bansal S, Bansal N, Chauhan S, Sharma S, Goyal N, Gupta S (2024) Estrogen signalling and Alzheimer's disease: Decoding molecular mechanisms for therapeutic breakthrough. *Eur J Neurosci* 60: 3466–3490.
<https://doi.org/10.1111/ejn.16360>

55. Wang X, Feng S, Deng Q, Wu C, Duan R, Yang L (2025) The role of estrogen in Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic potential in women. *Mol Cell Biochem* 480: 1983–1998. <https://doi.org/10.1007/s11010-024-05071-4>
56. Holland J, Bandelow S, Hogervorst E (2011) Testosterone levels and cognition in elderly men: A review. *Maturitas* 69: 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.05.012>
57. Bianchi VE (2022) Impact of testosterone on Alzheimer's disease. *World J Mens Health* 40: 243–256. <https://doi.org/10.5534/wjmh.210175>
58. Barron AM, Pike CJ (2012) Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 976–997. <https://doi.org/10.2741/E434>
59. Pike CJ (2017) Sex and the development of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 95: 671–680. <https://doi.org/10.1002/jnr.23827>

Maturation of Neonatal Reflexes and Behavioral Features in 5xFAD Mice, a Model of Alzheimer's Disease

**I. N. Rozhkova^a, E. Yu. Brusentsev^a, T. A. Rakhmanova^{a,b}, V. S. Kozeneva^{a,b},
N. V. Khotskin^a, and S. Ya. Amstislavsky^{a,*}**

*^aInstitute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

**e-mail: amstis@yandex.ru*

Alzheimer's disease (AD) is a progressive age-related neurodegenerative pathology leading to dementia. Genetic models of AD in mice have been established aimed to elucidate the mechanisms of this pathology and to find possible ways of its correction. Transgenic mice of the 5xFAD strain with two human transgenes App and Psen1 and five mutations represent the popular model for investigating AD. The aim of this work was to evaluate the maturation of neonatal reflexes and the body mass increase during early postnatal ontogenesis in 5xFAD mice, as well as behavioral features of these mice at the age of three months. Wild type (WT) mice of the same sex and age from the same litters were used as controls. The results obtained indicate that 5xFAD mice do not differ from their WT sibs in body mass increase and the rate of neonatal reflexes maturation during weaning period. At the age of three months, 5xFAD males showed sex differences in behavior: males exhibited lower overall locomotor activity than females and showed signs of beginning to develop depressive-like behavior. Lower anxiety level in males as well as higher exploratory activity in females were revealed in the three-mo.-old 5xFAD mice compared to WT siblings of the same sex. As a result of this study, behavioral features of young 5xFAD mice were characterized at the age of three months. The maturation of neonatal reflexes during the weaning period was studied for the first time in this transgenic model of AD.

Keywords: Alzheimer's disease, 5xFAD mice, neonatal reflexes, behaviour, locomotor activity, anxiety, memory