

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ФЕНОТИПА МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

© 2020 г. И. Г. Капица¹, *, Е. А. Иванова¹, Т. А. Воронина¹, С. Б. Середенин¹

¹Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

*E-mail: ingakap73@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2019 г.

После доработки 19.11.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

Выявлено и подтверждено наличие у мышей линии BALB/c специфических особенностей поведения, которые можно рассматривать как расстройства аутистического спектра (РАС): низкий уровень взаимодействия с социально значимыми стимулами и даже избегание этого взаимодействия, нарушение распознавания и, особенно, узнавания запахов, усиление тревожного и стереотипного поведения. Мыши линии BALB/c могут служить в качестве экспериментальной идиопатической модели РАС для изучения патогенеза заболевания и его фенотипических проявлений, а также для оценки возможных средств коррекции РАС.

Ключевые слова: мыши линии BALB/c, расстройства аутистического спектра, социальный дефицит, стереотипия, нарушения обоняния, тревожность

DOI: 10.31857/S0869813920020053

Расстройства аутистического спектра (РАС) – психические заболевания, возникающие в результате нарушений развития головного мозга, характеризующиеся высокой наследуемостью при значительной как генетической, так и клинической гетерогенности. Основными критериями РАС являются дефициты социальной и коммуникативной сфер, узконаправленные интересы и стереотипии, причем не только моторные, но и мыслительные. Распространенность заболевания по современным данным составляет от 0.5 до 2.0% и неуклонно нарастает по всему миру [1].

Для экспериментального изучения РАС применяются генетически модифицированные грызуны, которые, однако, позволяют анализировать лишь отдельные дисфункции. Наряду с этим используются модели идиопатического РАС – отобранные по фенотипу мыши инбредных линий с хорошо воспроизводимыми социальными дефицитами и стереотипным поведением, а также рядом сопряженных с РАС симптомов [2]. Среди последних рассматриваются мыши линии BALB/c, демонстрирующие признаки поведения, схожие с РАС, в числе которых низкий уровень социальных взаимоотношений, снижение различных аспектов материнского поведения, высокий уровень тревожности, межсамцовой агрессии, и, кроме того, большая восприимчивость к амфетамин- или метамфетамин-индуцированной аутоагрессии, которая уменьшается при лечении рisperидоном [3].

Согласно другим данным у мышей линии BALB/c не обнаружено дефектов в социальной памяти или социальном познании, отсутствует нарушение обонятельных функций [3], но выявлено слабо выраженное стереотипное поведение (груминг, рытье подстилки, жевание) [1].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей поведения мышей линии BALB/c в сравнении с мышами линии C57Bl/6 или аутбредными мышами SHK в некоторых поведенческих тестах, применяемых для оценки симптомов PAC.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на 62 самцах мышей линии BALB/c 5 недельного возраста и массой 13–15 г, на 18 самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 5 нед., массой 20–22 г и на 31 самцах аутбредных мышей SHK в возрасте 5 нед., массой 22–26 г на начало эксперимента, полученных из питомника филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России”. Животных рандомизировано распределяли по группам (численность групп указана в таблицах) и содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29 августа 2014 г. № 51. Работа выполнялась в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и была одобрена комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова” протокол № 1 от 18.02.2019. Животные содержались в стандартных условиях вивария при постоянном доступе к корму (гранулированный корм ГОСТ Р 50258-92) и отфильтрованной водопроводной воде (фильтр Барьер Гранд НЕО) *ad libitum*, при температурном режиме 20–22°C, при световом режиме – 12 ч свет/12 ч темнота; в полипропиленовых клетках с решеткой из цинкохромовой стали (Т/ЗС), с обеспыленной подстилкой из деревянной стружки по 8–10 мышей в каждой клетке. Адаптация к условиям вивария проводилась в течение 14–16 дней. Все эксперименты проводились с 9.00 до 14.00.

Тест нарушения социального взаимодействия применяли в модифицированном варианте, разработанном в лаборатории J.N. Stawley [4] и широко используемом во многих экспериментах [3, 5–12]. Исследование проводили в акриловой установке длиной 60, шириной 24 и высотой 30 см, разделенной прозрачными перегородками на три равных отсека, сообщающихся между собой. Мышь помещали в центральный отсек установки и оставляли на 10 мин при поднятых перегородках между отсеками. Затем, в момент, когда тестируемая мышь находилась в центральном отсеке, перегородки опускали и в крайние отсеки помещали цилиндры из металлической сетки (11 см в высоту, 9 см в диаметре). В одном из цилиндров находилась незнакомая мышь той же линии, пола и возраста, что и тестируемая (социальный объект), а в другом – ранее не предъявлявшаяся пластмассовая игрушка высотой 8 и шириной 4 см (несоциальный объект). Тестирование проводили в течение 6 мин, регистрируя продолжительность нахождения тестируемой мыши в отсеке с социально значимым или незначимым объектами; продолжительность обнюхивания социального объекта (подход тестируемой мыши на 1 см и ближе к цилиндру с новой мышью); число заходов мыши в отсеки и число “контактных” подходов тестируемой мыши к социально значимому объекту. Мыши, у которых время, проведенное в отсеках с разными по социальной значимости объектами, статистически не отличалось, или время, проведенное в отсеке с несоциальным объектом, было больше, чем в отсеке с социальным объектом, определялись как мыши с утратой общительности и дефицитом социального взаимодействия, что характерно для PAC.

У лиц с PAC отмечают нарушения походки и обоняния, которые могут быть отражением патологии мозжечка и нервных узлов, связанных с обонянием, например, обонятельной луковицы и вентральной височной обонятельной коры, имеющих место при этих расстройствах [13]. Поэтому предиктором социального дефицита рассматривается обонятельная диссоциация [14].

Тест на откапывание еды (Buried food-finding test) выполнялся согласно К. Radyushkin с соавт. [15]. Животным в качестве корма на протяжении 4 дней давали шоколадное печенье (2 г/животное) при свободном доступе к воде. Опыт проводили на фоне 12-часовой пищевой депривации. Мышь помещали в один из концов стандартной домашней клетки, пол которой застилали чистыми опилками высотой 3 см, и с закопанным на другом конце клетки на глубину 1.5 см кусочком шоколадного печенья. Регистрировали латентное время нахождения еды (начало ее раскапывания). Продолжительность поиска не должна превышать 2 мин. Для оценки моторной активности и уровня мотивации животного тест повторяли, но кусочек печенья оставляли на поверхности опилок.

Тест обонятельной дискриминации (Olfactory discrimination test). В данном тесте исследуется поведение животных, направленное на поиск гнезда в условиях предъявления двух обонятельных стимулов [16]. Установка представляет собой стандартную клетку длиной 35, шириной 20 и высотой 15 см, в центре которой проведена линия, а в боковых концах установлены стеклянные чашки Петри диаметром 10 см, одна из которых заполнена опилками из домашней клетки, смена опилок в которой не проводилась в течение 3 дней (запах гнезда), а другая — чистыми опилками (нейтральный запах). Животных индивидуально помещали в центр клетки и измеряли латентное время первого выбора одного из стимулов, определяемое по моменту захода мыши обеими передними лапами в чашку с опилками.

Тест обонятельной габитуации/дисгабитуации (Olfactory habituation/dishabituation) позволяет изучать обонятельное распознавание, предпочтение и привыкание к несоциальным и социальным запахам при их повторном предъявлении [10, 17, 18]. Исследование проводили согласно методике, предложенной В.С. Руан и соавт. [18]. Мышь перед началом тестирования помещали в стандартную клетку с чистыми опилками на 30 мин. Ватный тампон длиной 15 см смачивали в воде и пропускали через крышку клетки так, чтобы он располагался на высоте 5 см от выстилающих дно клетки опилок. Выполняли по 3 предъявления каждого запаха: нейтральный стимул — дистиллированная вода; несоциальный — разбавленный цветочный запах (экстракт апельсина, 100% натуральное эфирное масло апельсина сладкого (ООО Аспера Лтд), разбавленное дистиллированной водой в соотношении 1 : 100); социальный — моча мышей линии C57Bl/6. Продолжительность каждого предъявления составляла 2 мин. Регистрировали суммарное число реакций животных, которые включали подходы к тампону и взаимодействие с ним, а именно, повороты головы мыши в сторону стимула при нахождении на расстоянии не более 2 см от него, обнюхивание, залезание, жевание тампона. Кроме того, фиксировали число вставаний мыши на задние лапы и закапываний в подстилку.

Тест обследования отверстий (Hole-board exploration) проводили согласно методике S. Moy и соавт. [7]. Тестирование проводили в инфракрасном актометре фирмы Panlab, Испания (модель LE 8825 IR Motor Activity Monitor V 08/05/120). Установка представляет собой квадрат, пол которой разделен на 16 квадратов с 16 одинаковыми отверстиями. Отверстия были пронумерованы и подразделены на угловые, пристенные и центральные. В течение 10 мин регистрировали: общее число перемещений мыши в установке, число заглядываний (Nose poke) в отверстия, а также продолжительность её пребывания в угловой и в пристенной зоне установки.

Тест “Открытое поле” является моделью слабого стресса у грызунов [19]. В исследовании использовали установку “Открытое поле” (TS0501-М, ООО НПК Открытая Наука, Россия). Мышь помещали в центр поля и регистрировали ее поведение в течение 5 мин в условиях сменной освещенности: 3 мин — ярко освещенное поле (источник света: лампа накаливания общего назначения напряжением 230 В, мощностью 40 Вт, расположенная над центром поля на высоте 95–100 см), 1 мин — тем-

нота (включали красную светодиодную ленту, 12 В, закрепленную по верхнему борту установки) и 1 мин – вновь ярко освещенное поле.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica V. 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальных группах либо отсутствовало нормальное распределение, либо межгрупповое равенство дисперсий не соблюдалось, дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна–Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Результаты в таблицах представлены как среднее \pm ошибка среднего (Mean \pm SEM). Различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В тесте социального взаимодействия мыши инбредной линии C57Bl/6, служившие контролем для мышей BALB/c, характеризовались как общительные, демонстрирующие высокий уровень социального взаимодействия, животные. Так, у мышей C57Bl/6 средняя длительность нахождения в отсеке с незнакомой мышью (социально значимым объектом – аутобредная мышь-самец), была на 61.3% больше, чем в отсеке с социально незначимым объектом; а продолжительность обнюхивания незнакомой мыши было на 32.0% дольше, чем в группе животных линии BALB/c (табл. 1). При этом мыши линии C57Bl/6 в 1.54 раза чаще посещали отсек с социально значимым объектом, чем противоположный отсек, и совершали в 1.25 раз больше подходов к социальному объекту на расстоянии менее 1 см, чем мыши BALB/c (табл. 1). Оценка уровня социального взаимодействия (общительности), вычисленная по соотношению времени, проведенному мышами группы C57Bl/6 в отсеке, содержащем незнакомую мышью, ко времени в 2-х различных по социальной значимости отсеках, выявила предпочтение мышами этой линии социального объекта несоциальному.

Мыши линии BALB/c предпочитали отсек с несоциальным объектом, находясь в нем на 12.0% дольше, чем в отсеке с социальным объектом (табл. 1). Время обнюхивания незнакомой мыши было в 1.5 раза меньше, чем в группе мышей C57Bl/6. Мыши линии BALB/c осуществляли достоверно меньше заходов в отсеки с объектами по сравнению с животными другой линии, что, по-видимому, объясняется их повышенной тревожностью по сравнению с мышами C57Bl/6. Однако число заходов в отсек с социально значимым объектом у мышей BALB/c было в 2.2 раза больше, чем в отсек с социально незначимым объектом, хотя эти заходы были непродолжительными (табл. 1). Показатель общительности в группе мышей BALB/c составил 46.0%, что указывает на отсутствие предпочтения к социальному стимулу.

Таким образом, по результатам данного теста, мыши линии BALB/c определяются как “малообщительные” животные, демонстрирующие низкий уровень социального взаимодействия, что характерно для аномалий поведения при аутизме. Полученные данные находят подтверждение в исследованиях других авторов [5, 17].

В тесте “Откапывание еды” мыши линии BALB/c в 1.7 раза дольше искали запертую под опилками еду в сравнении с мышами SHK. При этом, в условиях визуализации еды латентное время подхода к еде у животных разных линий не отличалось, что свидетельствует о равном уровне мотивации и отсутствии двигательных различий (рис. 1). Полученные данные коррелируют с клиническими наблюдениями, демонстрирующими нарушение обоняния и вкуса у пациентов с РАС, у которых способность идентификации запахов снижена по сравнению со здоровыми людьми [15].

В тесте обонятельной дискриминации мыши линии BALB/c затрачивали в 1.6 раз больше времени на поиск “гнезда”, при этом к опилкам с нейтральным за-

Таблица 1. Поведение мышей линий BALB/c и C57Bl/6 в тесте социального взаимодействия
Table 1. Behavior of BALB/c and C57Bl/6 mice in the social interaction test

Параметры Parameters		Группа мышей, число животных Group of mice, number of animals	
		BALB/c, <i>n</i> = 12	C57Bl/6, <i>n</i> = 10
Продолжительность нахождения в отсеке, с Duration of stay in the compartment, s	Центральном Central	96.8 ± 6.9	70.0 ± 2.3*
	С социальным объектом With social object	124.9 ± 12.1	179.6 ± 12.3*
	С несocциальным объектом With a non-social object	141.9 ± 15.7	110.7 ± 8.6 [#]
Длительность обнюхивания социального объекта, с The duration of sniffing of the social object, s		40.4 ± 5.1	59.8 ± 8.1*
Предпочтение отсека с социальным объектом по времени нахождения: $[T_{co}/(T_{co} + T_{nco})] \times 100$ Preference of the compartment with a social object (by time of stay): $[T_{co}/(T_{co} + T_{nco})] \times 100$		46.0%	62.0%
Число заходов в отсек, ед Number of visits in the compartment	С социальным объектом With social object	16.6 ± 0,9	24.8 ± 3.3*
	С несocциальным объектом With a non-social object	7.7 ± 0.8 [#]	13.5 ± 1.1*, [#]
Число подходов к социальному объекту, ед. Number of approaches to the social object		11.8 ± 0.7	14.7 ± 1.2*

* $p < 0.05$ по сравнению с группой мышей BALB/c; # $p < 0.05$ по сравнению с показателем отсека с социальным объектом (внутригрупповое сравнение); T – продолжительность нахождения в отсеке; co – социальный объект; nco – несocциальный объект.

* $p < 0.05$ compared to BALB/c mice; # $p < 0.05$ compared to the index of the compartment with a social object (intra-group comparison); T – time of staying in the compartment; co – social object; nco – non-social object.

пахом они подходили в 1.4 раза быстрее, чем мыши SHK. Различий между латентным временем выбора нейтральных опилок и опилок из домашней клетки у мыши линии BALB/c не обнаруживалось, тогда как у мышей SHK отмечалось значимое предпочтение опилок “из гнезда” – скорость подхода к ним была в 1.8 раза больше, чем к опилкам с нейтральным запахом (табл. 2).

Кроме того, примерно третья часть мышей линии BALB/c при предоставлении на выбор двух обонятельных стимулов предпочитала нейтральные опилки, тогда как в группе мышей SHK этот выбор имел прямо противоположный характер (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о возможном нарушении способности распознавания запахов у мышей линии BALB/c и, особенно, о стойком избегании социальных стимулов, включая запах домашней клетки.

В тесте обонятельной габитуации/дисгабитуации характерной чертой поведения интактных аутбредных мышей SHK было четкое распознавание нового запаха, что выразилось в повышенной реакции мышей на тампон с нанесенным на него запахом при первом предъявлении каждого обонятельного стимула и в быстром привыкании к запаху при его повторном предъявлении. Так, при первом тестировании запаха “Апельсин” у аутбредных мышей отмечено увеличение на 66.0% реакций на обонятельный стимул по сравнению с предшествующим третьим предъявлением нейтрального запаха “Вода”. Еще более выраженной была реакция аутбредных мышей при первом предъявлении социального обонятельного стимула относительно предшествующего запаха “Апельсин”: увеличение комплекса реакций мышей на ватный тампон, пропитанный новым социальным запахом, составило 84.7% (табл. 3).

У мышей линии BALB/c при предъявлении незнакомого несocциального цитрусового запаха реакция на новый стимул была ниже, чем на третье предъявление

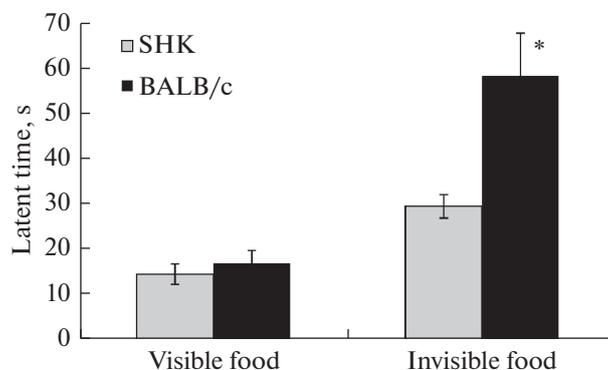


Рис. 1. Продолжительность поиска еды у мышей BALB/c ($n = 10$) и SHK ($n = 12$) в тесте “Откапывание еды”.
Fig. 1. Duration of food search in BALB/c ($n = 10$) and SHK ($n = 12$) mice in the food digging test. * $p < 0.05$ по сравнению с группой мышей SHK. * $p < 0.05$ compared to SHK mice.

нейтрального запаха “Вода” (табл. 3), что, возможно, связано с некоторым нарушением процесса распознавания запахов и с повышенной тревожностью мышей при реакции на новизну. Однако предъявление стимула “Запах мышей C57Bl/6” вызвало повышение активности тестируемых животных, хотя и в меньшей степени, чем в группе аутбредных животных.

Анализ динамики реагирования мышей SHK на повторное предъявление одинаковых запахов показал достоверное снижение реакции на них, тогда как у мышей линии BALB/c выраженность адаптации к обонятельным стимулам уменьшалась. Так, при третьем предъявлении запаха “Вода” снижение реакции мышей линии BALB/c относительно первого его предъявления составило 36.0%, тогда как в группе аутбредных мышей – 86.8%. Реакция мышей BALB/c на цитрусовый запах при последующих предъявлениях относительно его первой демонстрации практически не менялась. Уменьшение ответной реакции на стимул “Моча мышей C57Bl/6” у мышей линии BALB/c относительно первого его предъявления также было незначительным и составило при его третьем предъявлении всего 27.8% против 69.5% в группе мышей SHK (табл. 3).

Таким образом, у мышей BALB/c выявлена выраженная обонятельная дисгабитация как на социально значимые, так и незначимые запахи.

Таблица 2. Поведение мышей линии BALB/c и мышей SHK в тесте обонятельной дискриминации

Table 2. Behavior of BALB/c and SHK mice in the olfactory discrimination test

Группа, число животных Group of mice, number of animals	Латентное время выбора обонятельного стимула, с The latent time of selection of the olfactory stimulus, s		Число мышей, выбравших обонятельный стимул, % Number of mice that chose the olfactory stimulus, %	
	нейтральный запах neutral smell	запах “гнезда” the smell of “nests”	нейтральный запах neutral smell	запах “гнезда” the smell of “nests”
BALB/c, $n = 29$	$70.0 \pm 8.6^*$	$86.2 \pm 8.9^*$	$65.5 \pm 8.9^{**}$	$34.5 \pm 8.9^{**,\#}$
SHK, $n = 31$	98.4 ± 7.0	$54.0 \pm 8.5^{\#\#}$	32.3 ± 8.5	$67.7 \pm 8.5^{\#\#}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ достоверность различий относительно группы мышей SHK. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ достоверность различий относительно параметров “нейтрального запаха” (внутригрупповое сравнение). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to SHK mice. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ compared to the parameters of “neutral smell” (intra-group comparison).

Таблица 3. Реакции на обонятельные стимулы у мышей линии BALB/c и мышей SHK
Table 3. Responses to olfactory stimuli in BALB/c and SHK mice

Обонятельный стимул Olfactory stimulus	Предъявление запаха The presentation of the odor	Реакция на обонятельный стимул, ед. The response to the olfactory stimulus, units	
		SHK, <i>n</i> = 9	BALB/c, <i>n</i> = 16
Нейтральный запах, вода Neutral smell, water	1	12.9 ± 1.5	10.0 ± 0.9
	2	4.0 ± 0.8*	8.0 ± 1.1
	3	1.7 ± 0.5#	6.4 ± 0.7
Апельсин Orange	1	5.3 ± 1.3	3.5 ± 0.9
	2	2.0 ± 0.4*	3.2 ± 0.8
	3	2.0 ± 0.7	2.10 ± 0.81
Моча мышей C57Bl/6 Urine of C57Bl/6 mice	1	13.1 ± 2.7	10.8 ± 1.4
	2	3.9 ± 1.2*	6.9 ± 0.8
	3	4.0 ± 1.5	7.8 ± 1.3

* $p < 0.05$ достоверность различий относительно значений при 1-м предъявлении того же стимула; # $p < 0.05$ достоверность различий относительно значений при 2-м предъявлении того же стимула.

* $p < 0.05$ compared to the parameters at the 1st presentation of the same stimulus; # $p < 0.05$ compared to the parameters at the 2nd presentation of the same stimulus.

Одним из проявлений тревожного и стереотипного поведения мышей, регистрируемого в данном тесте, является число актов закапываний в подстилку. Установлено, что показатель числа актов закапываний в подстилку при предъявлении всех видов обонятельных стимулов был выше в группе мышей линии BALB/c по сравнению с интактными аутбредными мышами SHK (табл. 4). Исходя из того, что различий между реакциями мышей BALB/c (акты закапывания) на предъявление разных по значимости стимулов не было, и, кроме того, реакция на наиболее значимый стимул — социальный запах, была менее всего выражена — в 2 раза меньше, чем при контакте с нейтральным запахом и, в то же время, значимо не отличалась от соответствующей реакции мышей SHK, подобное поведение следует рассценивать как повышенную стереотипию и отсутствие интереса к социальному стимулу, а возможно, и как неспособность его распознавания. Нарушение распознавания специфических сигналов, связанных с “дружелюбием”, у мышей BALB/c, проявляющееся в отсутствие реакции у мышей, содержащихся в изоляции, на особой той же линии, возраста и пола, но содержащихся в группе, указывающее на низкую социальную активность этой линии мышей, наблюдалось и в других исследованиях [20].

В тесте обследования отверстий мыши линии BALB/c демонстрировали дефицит исследовательской активности, проявляющийся в уменьшении на 17.4% общего количества заглядываний в отверстия установки по сравнению с группой мышей SHK, при отсутствии различий в общей двигательной активности (табл. 5). Анализ продолжительности нахождения мышей линии BALB/c в угловой, пристенной и центральной зонах установки выявил статистически значимое снижение на 41.4% регистрируемого показателя только в центральной зоне установки по сравнению с группой аутбредных мышей (табл. 5).

Общее число заглядываний в отверстия установки в группе мышей линии BALB/c значимо не отличалось от показателя группы мышей SHK, за исключением снижения в 3.1 раза числа заглядываний в центральные отверстия (табл. 5).

Таким образом, в тесте обследования отверстий существенные отличия поведения мышей разных линий заключались в уменьшении продолжительности нахождения в центре установки и числа заглядываний в центральные отверстия у мышей линии BALB/c как у высокотревожных животных. Признаков повышенной стереотипии в данном тесте обнаружено не было.

Таблица 4. Поведение мышей линии BALB/c и мышей SHK в тесте обонятельной габитуации/дисгабитуации (число закапываний в подстилку)**Table 4.** Behavior of BALB/c and SHK mice in the olfactory habituation/dishabitation test (number of digging in their bedding)

Группа, количество животных Group of mice, number of animals	Число закапываний в подстилку при предъявлении обонятельного стимула, ед. The number of instillations in the litter at the presentation of the olfactory stimulus		
	вода water	апельсин orange	моча мышей C57Bl/6 urine of mice C57Bl/6
BALB/c, <i>n</i> = 16	6.8 ± 1.1	5.3 ± 0.6	3.4 ± 0.9
SHK, <i>n</i> = 9	3.0 ± 0.9 [#]	1.4 ± 0.6 [#]	1.0 ± 0.6

p < 0.05 достоверность различий относительно значений в группе мышей BALB/c.# *p* < 0.05 compared to BALB/c mice.**Таблица 5.** Поведение мышей линии BALB/c и мышей SHK в условиях теста обследования отверстий**Table 5.** Behavior of BALB/C and SHK mice in the hole-board test

Параметры Parameters	BALB/c, <i>n</i> = 15	SHK, <i>n</i> = 10
Локомоторная активность, ед. Locomotor activity	1483.5 ± 107.9	1482.5 ± 80.2
Общее число заглядываний в отверстия, ед. The total number of peeks into the holes	65.9 ± 3.7	79.8 ± 6.5
Время нахождения в зонах, с Time spent in areas, s	Угловая Corner area	278.1 ± 12.5
	Пристенная Wall area	288.4 ± 12.1
	Центральная Central zone	33.5 ± 6.7
Количество заглядываний в отверстия, ед. Number of peeks into the holes	Угловые Corner holes	31.3 ± 2.1
	Пристенные Wall holes	32.1 ± 2.1
	Центральные The center hole	2.5 ± 0.7

p < 0.05 достоверность различий относительно группы мышей BALB/c.# *p* < 0.05 compared to BALB/c mice.

В тесте “Открытое поле” мыши линии BALB/c, независимо от предъявляемых условий освещенности установки, демонстрировали низкую двигательную активность как на периферии установки, так и в прецентральной и центральной ее части по сравнению с группой мышей линии C57Bl/6 (*p* < 0.05) (табл. 6). Полученные данные свидетельствуют о малоактивном, пассивном поведении мышей линии BALB/c и о наличии у них ярко выраженной тревожности.

При сравнении показателей группы мышей линии BALB/c, регистрируемых при ярком освещении установки и в его отсутствие, отмечался рост числа перемещений (в среднем на 66.7%) на периферии и в прецентральной части поля (табл. 6). Однако возвращение к яркому освещению установки приводило к снижению на 33.0% активности животных на периферии и к уменьшению числа посещений “опасных” зон (табл. 6).

Согласно данным литературы, у мышей BALB/c, так же как и при PAC у человека, обнаружено снижение концентрации серотонина в мозге, увеличение объема и

Таблица 6. Поведение мышей линии BALB/c и C57Bl6 в условиях теста “Открытое поле со сменой освещенности”**Table 6.** Behavior of BALB/c and C57Bl6 mice in the open field test with light change

Показатели Parameters		BALB/c, n = 9	C57Bl6, n = 8
		Яркий свет, 3 мин Bright light, 3 min	
Латентное время начала движения The latent time of the beginning of the movement		17.9 ± 4.7	3.8 ± 0.8*
Горизонтальная активность Horizontal activity	Периферия Periphery	5.1 ± 1.0	18.6 ± 1.9**
	2/3 поля 2/3 of the field	0.6 ± 0.1	5.8 ± 0.7**
	Выходы в центр Exits to the center	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1**
Количество заглядываний в отверстия Number of peeks in the holes		4.1 ± 0.4	7.3 ± 0.5**
		Темнота. 1 мин Darkness. 1 min	
Горизонтальная активность Horizontal activity	Периферия Periphery	9.2 ± 1.8 [#]	19.0 ± 2.1**
	2/3 поля 2/3 of the field	1.0 ± 0.5	7.5 ± 1.4**
	Выходы в центр Exits to the center	0.1 ± 0.1	1.5 ± 0.4**
Количество заглядываний в отверстия Number of peeks in the holes		4.5 ± 0.5	6.5 ± 0.2*
		Яркий свет. 1 мин Bright light. 1 min	
Горизонтальная активность Horizontal activity	Периферия Periphery	6.2 ± 1.3	14.0 ± 1.7**
	2/3 поля 2/3 of the field	0.3 ± 0.2	4.7 ± 1.0**
	Выходы в центр Exits to the center	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.6**
Количество заглядываний в отверстия Number of peeks in the holes		4.3 ± 0.5	4.5 ± 1.2

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению с мышами BALB/c; # $p < 0.06$ по сравнению аналогичным параметром при предъявлении яркого света (внутригрупповое сравнение).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to BALB/c mice; # $p < 0.06$ compared to the same parameter when presenting bright light (intra-group comparison).

массы головного мозга, прежде всего, размеров гиппокампа, мозжечка, изменение размеров амигдалы, недоразвитость крупных структур белого вещества мозга – мозолистого тела и капсулы интерна [1, 3, 5], уменьшение лобных и теменно-височных долей [21]. Установлено, что у мышей BALB/c реакция страха сопровождается падением связывающей способности бензодиазепинового участка ГАМК_A-рецептора [22], и также показано длительное снижение уровня BDNF в структурах мозга при стрессовом ответе, что подтверждает недостаточность адаптивных механизмов у мышей данной линии [23]. У эмбрионов мышей BALB/c замедлен рост гиппокампальной комиссуры, которая, однако, достигает нормальных размеров во взрослом возрасте [3, 5]. Указанные фенотипические признаки мышей BALB/c в определенной степени сходны с таковыми у мышей линии BTBR, широко используемых в качестве модели PAC [6, 21, 24].

На основании структурной магнитно-резонансной томографии головного мозга у больных с РАС выявлено увеличение объема и толщины коры, отражающее незрелость, с атипичными зонами в лобной, височной и теменной долях; двустороннее увеличение объема миндалина у маленьких детей; увеличение общего объема мозжечка, гипоплазия червя, уменьшение объемов серого вещества в дольках червя и в ножках мозжечка; увеличение объемов хвостатого ядра, ненормальные формы структур базальных ядер; уменьшенный общий объем мозолистого тела или увеличенный размер мозолистого тела (особенно при макроцефалии) и другие [25].

Наличие поведенческих и нейроанатомических признаков у мышей BALB/c, сходных с проявлениями РАС у человека [3, 5], позволяет полагать, что данная линия мышей может служить моделью для изучения патогенеза заболевания, по крайней мере определенного его подтипа, и его фенотипических проявлений, а также для оценки действия возможных средств коррекции различных проявлений РАС.

Таким образом, поведенческими особенностями мышей линии BALB/c являются низкий уровень взаимодействия с социально значимыми стимулами и даже избегание этого взаимодействия, нарушение распознавания и, особенно, узнавания запахов, усиление тревожного и стереотипного поведения. Полученные данные подтверждают возможность использования мышей линии BALB/c для моделирования РАС и оценки эффективности терапевтических средств для уменьшения симптомов РАС.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 0521-2019-0007.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Avraham Y., Berry E.M., Donskoy M., Ahmad W.A., Vorobiev L., Albeck A., Mankuta D. Beta-carotene as a novel therapy for the treatment of "Autistic like behavior" in animal models of Autism. *Behav. Brain Res.* 364: 469–479. 2019.
2. Kazdoba T.M., Leach P.T., Yang Mu, Silverman J.L., Solomon M., Crawley J.N. Translational Mouse Models of Autism: Advancing Toward Pharmacological Therapeutics. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 28: 1–52. 2016.
3. Brodtkin E.S. BALB/c mice: Low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. *Behav. Brain Res.* 176: 53–65. 2007.
4. Moy S.S., Nadler J.J., Perez A., Barbaro R.P., Johns J.M., Magnuson T.R., Piven J., Crawley J.N. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3(5): 287–302. 2004.
5. Moy S.S., Nadler J.J., Young N.B., Perez A., Holloway L.P., Barbaro R.P., Barbaro J.R., Wilson L.M., Threadgill D.W., Lauder J.M., Magnuson T.R., Crawley J.N. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav. Brain Res.* 176(1): 4–20. 2007.
6. Silverman J.L., Yang M., Lord K., Crawley J.N. Behavioral phenotyping assay for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 11(7): 490–502. 2010.
7. Moy S.S., Nadler J.J., Poe M.D., Nonneman R.J., Young N.B., Koller B.H., Crawley J.N., Duncan G.E., Bodfish J.W. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. *Behav. Brain Res.* 188(1): 178–194. 2008.
8. Crawley J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* 17: 448–459. 2007.
9. Crawley J.N., Chen T., Puri A., Washburn R., Sullivan T.L., Hill J.M., Young N.B., Nadler J.J., Moy S.S., Young L.J., Caldwell H.K., Young W.S. Social approach behaviors in oxytocin knock-out mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides.* 41(3): 145–163. 2007.
10. Chadman K.K., Gong S., Scattoni M.L.S., Boltuck S.E., Gandhi S.U., Heintz N., Crawley J.N. Minimal aberrant behavioral phenotypes of neuroligin-3 R451C knockin mice. *Autism Res.* 1: 147–158. 2008.
11. Rouillet F.I., Crawley J.N. Mouse models of autism: testing hypotheses about molecular mechanisms. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 7: 187–212. 2011.
12. Shah C.R., Forsberg C.G., Kang J., Veenstra-Vanderweele J. Letting a typical mouse judge whether mouse social interactions are atypical. *Autism Res.* 6(3): 212–220. 2013.
13. Burket J.A., Young C.M., Green T.L., Benson A.D., Deutsch S.I. Characterization of gait and olfactory behaviors in the BALB/c mouse model of autism spectrum disorders. *Brain Res. Bull.* 122: 29–34. 2016.

14. *Muratori F., Tonacci A., Billeci L., Catalucci T., Iglizzi R., Calderoni S., Narzisi A.* Olfactory processing in male children with autism: atypical odor threshold and identification. *J. Autism Dev. Disord.* 47(10): 3243–3251. 2017.
15. *Radyushkin K., Hammerschmidt K., Boretius S., Varoqueaux F., El-Kordi A., Ronnenberg A., Winter D., Frahm J., Fischer J., Brose N., Ehrenreich H.* Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav.* 8: 416–425. 2009.
16. *Gregory E.H., Pfaff D.W.* Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiol. Behav.* 6(5): 573–576. 1971.
17. *Yang M., Crawley J.N.* Simple behavioral assessment of mouse olfaction. 24. *Curr. Protoc. Neurosci.* 48(1): 8.24.1–8.24.12. 2009.
18. *Ryan B.C., Young N.B., Crawley J.N., Bodfish J.W., Moy S.S.* Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behav. Brain Res.* 208: 178–188. 2010.
19. *Коплик Е.В., Салиева Р.М., Горбунова А.В.* Тест “открытого поля” как прогностический критерий устойчивости крыс линии “Вистар” к эмоциональному стрессу. *Журн. высш. нерв. деят.* 45(4): 775–781. 1995. [*Koplik E.V., Salieva R.M., Gorbunova A.V.* The open-field test as a prognostic criterion of resistance to emotional stress in Wistar rats. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat.* 45(4): 775–781. 1995. (In Russ)].
20. *Arakawa H.* Involvement of serotonin and oxytocin in neural mechanism regulating amicable social signal in male mice: Implication for impaired recognition of amicable cues in BALB/c strain. *Behav. Neurosci.* 131(2): 176–191. 2017.
21. *Ellegood J., Crawley J.N.* Behavioral and neuroanatomical phenotypes in mouse models of autism. *Neurotherapeutics.* 12: 521–533. 2015.
22. *Yarkova M.A., Seredenin S.B.* Temporal characteristics of stress-induced decrease in benzodiazepine reception in C57BL/6 and BALB/c mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 157(6): 733–735. 2014.
23. *Melkumyan D.S., Seredenina T.S., Yarkova M.A., Valdman E.A., Seredenin S.B.* Analysis of BDNF in Brain Structures of Inbred Mice with Different Phenotypes of Mental and Stress Reaction. *Bull. Exp. Biol. Med.* 140(11): 549–551. 2005.
24. *Scattoni M.L., Martire A., Cartocci G., Ferrante A., Ricceri L.* Reduced social interaction, behavioural flexibility and BDNF signalling in the BTBR T + tf/J strain, a mouse model of autism. *Behav. Brain Res.* 251: 35–40. 2013.
25. *Григоренко Е.Л.* Расстройства аутистического спектра. Вводный курс. Учебное пособие для студентов. М. Практика. 2018. [*Grigorenko E.L.* Rasstrojstva autisticheskogo spektra. Vvodnyj kurs. Uchebnoe posobie dlya studentov. [Autism spectrum disorders. Introductory course. Textbook for students] Moscow. Praktika. 2018].

Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of BALB/c Mice

I. G. Kapitsa^{a,*}, E. A. Ivanova^a, T. A. Voronina^a, and S. B. Seredenin^a

^a*Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia*

**e-mail: ingakap73@mail.ru*

BALB/c mice were used as idiopathic model of autism spectrum disorders (ASD). According to specific tests for evaluation of ASD symptoms, BALB/c mice demonstrate low level of interaction with socially significant stimuli and even avoidance of this interaction, violation of recognition and, especially, recognition of odors, strengthening of disturbing and stereotypical behavior. Therefore, BALB/c mice might be used to study pathogenesis of ASD and its phenotypic manifestations as well as correction treatment.

Keywords: BALB/c mice, autism spectrum disorders (ASD), social deficit, stereotypy, olfaction disorder, anxiety

ЦИТИРОВАТЬ:

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Серединин С.Б. Особенности поведенческого фенотипа мышей линии BALB/C. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 106(2): 373–383. DOI: 10.31857/S0869813920020053

TO CITE THIS ARTICLE:

Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. Autism-Relevant Behavioral Traits in Inbred Strain of Balb/C Mice. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 373–383. DOI: 10.31857/S0869813920020053