

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ПО ГЕНУ *Sip1*

DOI: 10.17691/stm2018.10.2.02

УДК 575.224.22:616.8–009

Поступила 23.11.2017 г.



И.И. Белоусова, к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования ЦНИЛ¹; старший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
Н.М. Жидкова, аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
 младший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
Е.В. Борисова, младший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
Е.А. Епифанова, младший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
В.А. Салина, младший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
С.А. Тутукова, младший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
Р.Д. Лапшин, к.б.н., доцент, зав. отделом экспериментального моделирования ЦНИЛ¹;
А.А. Бабаев, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
 старший научный сотрудник лаборатории генетики развития мозга НИИ нейронаук²;
И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ¹; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹; профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины²;
 руководитель Центра трансляционных технологий²;
V.S. Tarabykin, DSc, Professor, Director, Institute of Cell Biology and Neurobiology CCM³;
 Head of Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

³Charité — Universitätsmedizin Berlin, 1 Charitéplatz, Berlin, 10117, Germany

Цель исследования — поведенческое фенотипирование мышей, гомо- и гетерозиготных по гену *Sip1*, играющему важнейшую роль в развитии коры головного мозга млекопитающих.

Материалы и методы. Исследование выполнено на гетеро- и гомозиготных по гену *Sip1* мышах, полученных методом Cre-рекомбинации. В 20–30-дневном возрасте все животные из пометов подвергались стимуляции высокоинтенсивным звуком с целью выявления предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. В двухмесячном возрасте у самцов проводили оценку общего физического здоровья и поведенческое фенотипирование: неврологическое и сенсомоторное исследование; изучение тревожности в тесте «свет–темнота»; двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «открытое поле»; акустической реакции вздрагивания и престаимпульного ингибирования; исследование социальной активности и направленности животного на получение нового социального опыта в тесте Кроули; а также способности к обучению при формировании условной реакции пассивного избегания.

Результаты. Мыши, гомозиготные по гену *Sip1*, не доживали до двухмесячного возраста. Для гетерозиготных мышей характерны увеличение частоты встречаемости нарушений рефлекса разведения задних лап, рост уровня тревожности в тесте «свет–темнота», снижение социальной активности в тесте Кроули.

Заключение. Наличие мутантного аллеля гена *Sip1* приводит к неврологическим нарушениям, увеличению тревожности и снижению социальной активности животных.

Ключевые слова: фенотипирование; нокаут; неокортекс; *Sip1*; престаимпульное ингибирование; тест Кроули.

Как цитировать: Belousova I.I., Zhidkova N.M., Borisova E.V., Epifanova E.A., Salina V.A., Tutukova S.A., Lapshin R.D., Babaev A.A., Mukhina I.V., Tarabykin V.S. Phenotypic variations in the behavior of *Sip1* knockout mice. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(2): 20–30, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.02>

English

Phenotypic Variations in the Behavior of *Sip1* Knockout Mice

I.I. Belousova, PhD, Senior Researcher, Experimental Modeling Department, Central Scientific Research Laboratory¹; Senior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;

Для контактов: Белоусова Ирина Игоревна, e-mail: ira.belousova@gmail.com

N.M. Zhidkova, PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²; Junior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;
E.V. Borisova, Junior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;
E.A. Epifanova, Junior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;
V.A. Salina, Junior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;
S.A. Tutukova, Junior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;
R.D. Lapshin, PhD, Associate Professor, Head of Experimental Modeling Group, Central Scientific Research Laboratory¹;
A.A. Babaev, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²; Senior Researcher, Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²;
I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of Central Scientific Research Laboratory¹;
 Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹; Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine²; Head of the Center for Translational Technology²;
V.S. Tarabykin, DSc, Professor, Director, Institute of Cell Biology and Neurobiology CCM³;
 Head of Brain Development Genetics Laboratory, Institute of Neuroscience²

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

³Charité — Universitätsmedizin Berlin, 1 Charitéplatz, Berlin, 10117, Germany

The aim of the study was the behavioral phenotyping of mice homo- and heterozygous for the *Sip1* gene, which plays an important role in the development of the mammalian cerebral cortex.

Materials and Methods. The study was performed on mice hetero- and homozygous for the *Sip1* gene; these animal models were developed using the Cre recombination method. At an age of 20–30 days, all animals were exposed to a high-intensity sound to identify predisposition to audiogenic epilepsy. At an age of two months, the males were tested for their general physical health and behavioral phenotypes. The tests included a neurological and sensorimotor assessment, an evaluation of anxiety using the light-dark test, a study on locomotion and general exploration in the open field test, the acoustic startle response and prepulse inhibition, social activity in the Crawley's test and the learning ability as scored by the conditioned reflex of passive avoidance.

Results. Mice homozygous for the *Sip1* gene never reached the age of two months. In heterozygous mice, a higher occurrence of hind limb extension reflex abnormalities, an increased level of anxiety in the light-dark test, and a decrease in social activity in the Crawley's test were found.

Conclusion. The presence of a mutant allele of the *Sip1* gene leads to neurologic disorders, an increase in anxiety and a decrease in the social activity of the animals.

Key words: phenotyping; knockout; neocortex; *Sip1*; prepulse inhibition; Crawley's test.

Введение

Пороки развития головного мозга в настоящее время все чаще стали исследоваться в качестве причины эпилепсии, задержки в развитии, неврологического дефицита и умственной отсталости у человека [1]. В последнее время значительный прогресс достигнут в определении генов, которые контролируют различные аспекты развития коры [2, 3]. Поэтому выявление и характеристика мутантных мышей с пороками развития коры, идентификация и характеристика генов, отвечающих за эти мутации, а также изучение влияния этих генов на поведение позволят значительно улучшить понимание генетической регуляции развития коры и последующих нарушений в работе мозга.

Ген *Sip1* кодирует важный транскрипционный фактор в организме млекопитающих. Показано, что он играет критическую роль в регуляции процессов эпителиально-мезенхимального перехода во время эмбриогенеза и при развитии опухолей [4], в процессах миграции эктодермальных маркеров при развитии

хрусталика глаза [5]. Нокаут по *Sip1* приводит к гиперчувствительности кожи, атрофическим рубцам и гипермобильности суставов, связанной с нарушением процесса коллагенового фибрилlogenеза [6]. Кроме того, *Sip1* является важнейшим транскрипционным фактором, регулирующим основные аспекты развития ЦНС. Установлено, что мутации в человеческом гене *Sip1* вовлечены в патогенез синдрома Мовата–Вильсона, характеризующегося тяжелой умственной отсталостью и агенезией мозолистого тела [7]. Ген *Sip1* необходим для формирования внутрикортикальных, межкорковых и кортико-подкорковых связей в переднем мозге мышей. Удаление его из всех постмитотических нейронов в неокортексе приводит к нарушению формирования мозолистого тела, передней комиссуры и образования кортикоспинального тракта [8].

Нокаут по определенному гену является удобной моделью для исследования роли продукта данного гена в живом организме. Известно, что частичная мутация гена *Sip1* приводит к изменению NMDA- и AMPA-рецепторов в нейронах неокортекса *in vitro*. Такие нейроны более чувствительны к воздействию

NMDA- и AMPA-агонистов в сравнении с данными мышей дикого типа (WT) [9]. В нашей работе исследования проводились на кондициональном мутанте с удалением гена *Sip1* из постмитотических клеток коры головного мозга. Поведенческое фенотипирование является необходимым этапом для дальнейшего исследования данной линии мышей и вклада гена *Sip1* в реализацию сенсомоторных функций и функционального состояния нервной системы.

Цель исследования — поведенческое фенотипирование мышей, гомо- и гетерозиготных по гену *Sip1*, играющему важнейшую роль в развитии коры головного мозга млекопитающих.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе SPF вивария Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. При работе с животными руководствовались «Правилами для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010) и «Международными рекомендациями (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012), при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение Этического комитета Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Животные. Для создания линии мышей, мутантных по гену *Sip1*, использовали метод Cre-рекомбинации, в ходе которой ген *Sip1*, фланкированный loxP-сайтами, при экспрессии Cre-белка в нейроне вырезался из ДНК. Мышиная линия с фланкированным геном *Sip1* впервые была получена Y. Higashi с соавт. [10]. Экзон 7 гена *Sip1* длиной 2 Кбайта содержит примерно половину белковой кодирующей последовательности. Делеция экзона 7 приводит к преждевременной терминации трансляции, вызванной сдвигом рамки считывания в следующем экзоне 8. В данной мышинной линии экзон 7 фланкирован loxP-сайтами, что ведет к инактивации белка после Cre-опосредованного удаления этого экзона. Для генерации кондиционального мутанта с удаленным геном *Sip1* из постмитотических клеток коры головного мозга мыши *Sip1* fl/fl были скрещены с мышами NexCre [11–13]. У этих мышей Cre-рекомбиназа экспрессируется под Nex-промотором, который обеспечивает экспрессию только в постмитотических клетках неокортекса. При этом формируются две группы мутантных животных: гомозиготные (ген *Sip1* не представлен в обоих аллелях) и гетерозиготные (ген *Sip1* не представлен в одном аллеле) — по данному гену.

Все исследования проводили на мышах, гетеро- (+/–) и гомозиготных (–/–) по гену *Sip1*, их поведение сравнивали с поведением животных дикого типа.

Все мыши были в возрасте 20–30 дней при проведении аудиогенной стимуляции и 2 мес (массой 21–25 г) — при проведении остальных тестов. С момента отсадки от матерей животные содержались группами в индивидуально вентилируемых клетках (Techniplast, Италия) при 12-часовом цикле день/ночь, температуре 22°C и влажности воздуха 65%; доступ к пище и воде был свободным. Все поведенческие исследования проводили в течение световой фазы цикла — с 10 до 15 ч дня.

Тестирование поведения животных

Аудиогенная стимуляция. В 20–30-дневном возрасте все самцы и самки мышей из пометов подвергались аудиогенной стимуляции. Их помещали в стеклянную круглую колбу, которая располагалась в звукоизолирующем боксе с двойными стенками, изготовленном из пенополистирола. После одноминутной адаптации в боксе включался электромеханический звонок с интенсивностью звука 110 дБ. Звук подавался однократно и выключался сразу после возникновения судорожного припадка или через 60 с после включения [14]. Фиксацию поведения проводили с помощью видеокамеры Microsoft LifeCam MSCR-LC-Cinema (Microsoft, США). Степень проявления аудиогенных судорог в ответ на звуковую стимуляцию оценивали по следующей шкале [15]:

0 баллов — отсутствие реакции на звук в течение 60 с;

1 балл — фаза «манежного бега», или двигательного возбуждения, когда животные совершали неконтролируемые движения в камере после начала стимуляции;

2 балла — начало клонических судорог с падением животного на брюшко (начало судорог);

3 балла — падение на бок, клонические судороги передних и задних конечностей;

4 балла — тонические судороги передних конечностей, клонус задних конечностей;

5 баллов — тонические судороги передних и задних конечностей, сопровождающиеся ригидностью всего тела животного.

Далее для исследования поведения взрослых животных в различных тестах были взяты только двухмесячные самцы, поскольку известно о влиянии половых гормонов и фазы эстрального цикла на поведение и способность к обучению у самок [16]. Оценивали следующие показатели: масса тела, наличие на теле проплешин, присутствие физических аномалий, вздыбливание шерсти, повреждение вибрисс [17]. После чего проводили поведенческое фенотипирование в следующей последовательности: неврологическое и сенсомоторное исследование (координации, лазания, локомоторных и ориентировочных реакций); тест «свет–темнота» (изучение тревожности); тест «открытое поле» (изучение двигательной и ориентировочно-

исследовательской активности); акустическая реакция вздрагивания и престаимпульное ингибирование — PPI (исследование сенсомоторной фильтрации); тест Кроули (исследование социальной активности и направленности животного на получение нового социального опыта); формирование условной реакции пассивного избегания (способность к обучению).

Сенсомоторное исследование. Тест включал в себя оценку моторных функций и некоторых рефлексов. Для проверки рефлекса разведения задних конечностей мышшь подвешивали за хвост в течение 1 мин. Нормальная реализация данного рефлекса предполагает разведение задних конечностей в разные стороны от средней линии живота, а сокращение одной конечности в сторону средней линии живота или сцепление конечностей (hind limb clasping) рассматривается как патология [17].

Для выявления дефицита моторной координации и равновесия использовали набор сенсомоторных тестов «прогулка по приподнятой перекладине». В течение эксперимента фиксировали время, затраченное животным на выполнение каждой из поставленных задач. Максимальное время выполнения задачи составляло 120 с. Мыши были подвергнуты тестированию по следующим критериям:

1. Способность к движению. Животное помещали на ровную поверхность, фиксировали время, за которое данная особь выходила из круга диаметром 30 см.

2. Движение по перекладинам. Использовали плоские перекладины шириной 1, 2 и 3 см и круглые — диаметром 3 и 0,5 см. Мышь помещали на середину перекладины 50 см длиной, концы которой находились на двух платформах высотой 50 см над мягким основанием. Фиксировали латентный период достижения платформы. Если животное падало, время считалось равным 120 с.

3. Удерживание за провод. Мышь подвешивали передними лапами за горизонтальный провод, расположенный между двумя платформами на высоте 50 см над мягким основанием. Фиксировали время до падения.

4. Поворот в цилиндре. Мышь помещали в замкнутый цилиндр (3 см диаметром и 13 см длиной) носом к закрытой стенке цилиндра. Фиксировали время до разворота в противоположную сторону.

5. Поворот на наклонном экране. Мышь помещали мордочкой вниз в центр наклонного экрана (платформа из проволочной сетки размером 20×20 см) на высоте 50 см над столом под углом 45°. Фиксировали время до разворота вверх на 180°.

Тест «свет–темнота». Поведенческая модель исследования тревожности в данном тесте основана на изучении ситуативной тревожности [18]. Исследование поведения проходило в установке, состоящей из светлого (25×25×24 см) и темного (19×11×12 см) отсеков, соединенных между собой перегородкой с отверстием (Panlab/Harvard Apparatus,

Испания). Мышь помещали в светлый отсек спиной к темному отсеку и в течение 10 мин автоматически фиксировали следующие показатели: латентный период первого захода в темный отсек, время нахождения мыши в светлом и темном отсеках, а также количество переходов между отсеками.

Тест «открытое поле». Для изучения двигательной и ориентировочно-исследовательской активности при помещении в новое открытое пространство использовали тест «открытое поле», который проводили в инфракрасном актиметре (Panlab/Harvard Apparatus, Испания) с программным обеспечением ActiTrack. Установка представляет собой квадратную арену 40×40 см с бортиками высотой 20 см и включает две квадратные рамы и систему инфракрасных лучей для определения местонахождения животного. Животное помещали в центр арены, наблюдение за поведением осуществляли в течение 5 мин. Для анализа поведения установка виртуально была поделена на две зоны: центральную (20×20 см) и периферическую. Автоматически регистрировались следующие показатели: общее пройденное расстояние; расстояние, пройденное в каждой зоне; общее количество вертикальных стоек; количество вертикальных стоек в каждой зоне; средняя скорость движения (см/с); а также количество актов дефекации и мочевых точек, что является показателем, характеризующим уровень «эмоциональности» животного.

Акустическая реакция вздрагивания и престаимпульное ингибирование. Установка для исследования стартл-рефлекса (Panlab/Harvard Apparatus, Испания) создает любые комбинации звуков, шумов и белого шума. Экспериментальное животное помещали в эту установку в специальном боксе для фиксации правильного положения мыши в ней. Вздрагивание животного регистрировали при помощи измерения изменения силы давления животного на решетку под ним. Регистрация велась автоматически с использованием компьютерного обеспечения Packwin (Panlab/Harvard Apparatus, Испания), в котором реализовывался протокол эксперимента. После трехминутного периода привыкания животному на фоне белого шума (60 дБ) подавался следующий набор сигналов:

отсутствие звукового стимула — 5 раз;

престимул (80 дБ) — 5 раз;

стимул (100 дБ) — 5 раз;

последовательное предъявление престимула и стимула с интервалом 60 мс — 5 раз.

Данные сигналы подавались в случайном порядке, при этом измерялось вздрагивание животного в ответ на звуковой стимул. Величину PPI рассчитывали по формуле:

$$PPI = (P - PP) / P \cdot 100\%$$

где P — реакция вздрагивания на стимул, PP — реакция вздрагивания на последовательное предъявление престимула и стимула.

Исследование социального взаимодействия в тесте Кроули. Рабочая установка представляет

собой прямоугольный бокс с высокими прозрачными стенками, разделенный на три отсека прозрачными перегородками (Panlab/Harvard Apparatus, Испания). В крайних отсеках располагаются одинаковые проволочные цилиндры. Над установкой закреплена видеочамера Smart (Panlab/Harvard Apparatus, Испания) для регистрации перемещений и скорости животного в режиме реального времени.

Эксперимент проводили в три этапа.

1-й этап — экспериментальное животное помещается в центральный отсек и в течение 5 мин находится в установке; данный этап направлен на ознакомление животного с установкой.

2-й этап — в цилиндр 1 помещается незнакомое животное (партнер 1), экспериментальное животное в течение 8 мин находится в установке в центральном отсеке; данный этап направлен на исследование социального интереса животного.

3-й этап — в цилиндр 2 помещается другое незнакомое животное (партнер 2), экспериментальное животное в течение 8 мин находится в центральном отсеке установки; данный этап направлен на исследование социальной памяти и направленности животного на получение нового опыта.

Регистрировали время нахождения животного в каждом из трех отсеков установки и количество входов в каждый отсек [19, 20].

Условная реакция пассивного избегания. Поведенческая модель условной реакции (рефлекса) пассивного избегания (УРПИ) напоминает обусловленный контекстом страх и является базисной моделью для оценки влияния различных факторов на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях его нарушения (амнезия). Условный рефлекс вырабатывали в камере Shuttle Box LE918 (Panlab/Harvard Apparatus, Испания), состоящей из освещенного и темного отсеков (каждый размером 25×40×25 см) с полом из металлических прутьев, разделенных гильотинной дверцей.

Эксперимент проводили в два этапа.

1-й этап — выработка УРПИ: экспериментальное животное помещается в освещенный отсек хвостом к закрытой двери, через 120 с гильотинная дверца от-

крывается, и животное в силу врожденного норкового рефлекса переходит в темную часть камеры (регистрируется время этого перехода — латентный период 1, ЛП1). Сразу после этого дверца между отсеками закрывается и через металлические прутья пола камеры животному наносится электрокожное раздражение (0,3 мА; 3 с).

2-й этап — воспроизведение: через 24 ч проводится тестирование выработанного навыка, для чего экспериментальное животное помещается в освещенный отсек при открытой дверце и фиксируется время перехода животного в темную камеру (латентный период 2, ЛП2). Время наблюдения составляет 180 с.

О степени запоминания животными электрошока судят по разности латентных периодов до перехода в темную камеру при выработке УРПИ и при тестировании его сохранности (ΔЛП).

Статистика. Результаты представляли в виде среднего ± ошибка среднего и сравнивали с помощью одно- и двухфакторного ANOVA (F) с последующим *post/hoc* сравнением выборочных средних (тест Ньюмена–Кеулса).

Результаты

Аудиогенная стимуляция. На протяжении эксперимента было протестировано всего 79 самцов и самок мышей в возрасте 20–30 дней (табл. 1). После аудиогенной стимуляции всего выявлено 2 животных с «манежным бегом» (1 балл), 1 животное с асимметричными тоническими судорогами передних конечностей и клоническими судорогами задних конечностей с падением на бок (4 балла) (рис. 1). Влияния наличия мутантного аллеля гена *Sip1* на предрасположенность животных к аудиогенным припадкам не обнаружено ($F_{2,73}=0,24$; $p=0,79$).

Показатели общего здоровья, рефлексы. При исследовании показателей общего здоровья мышей группы *Sip1*(+/-) не выявлено физических аномалий, изменений в массе тела животных, состоянии шерсти, однако у 14% самцов обнаружилось отсутствие вибрисс. Кроме того, нарушение рефлекса разведения задних лап встречалось в этой группе чаще (21%)

Таблица 1

Результаты аудиогенной стимуляции мышей, мутантных по гену *Sip1* и WT

Генотип животных	Частота от общего числа испытаний, %			Количество животных
	Двигательное возбуждение	Судорожные припадки	Летальные исходы	
Самцы (n=29)	WT	0	0	9
	<i>Sip1</i> (+/-)	0	0	17
	<i>Sip1</i> (-/-)	0	0	3
Самки (n=50)	WT	6,5±4,5	3,2±3,2	31
	<i>Sip1</i> (+/-)	0	0	15
	<i>Sip1</i> (-/-)	0	0	4

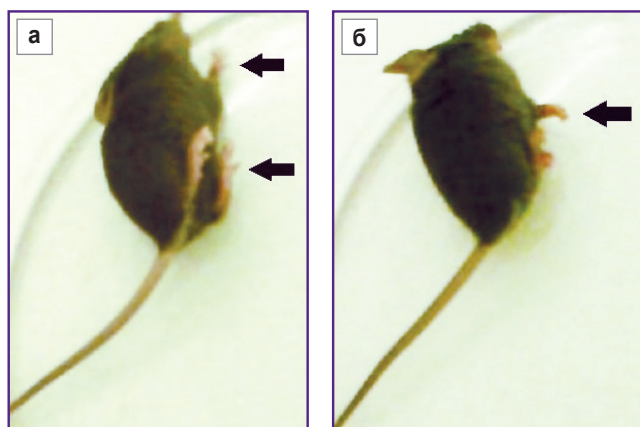


Рис. 1. Этапы аудиогенных судорог у мышей:
а — 3 балла, падение животного на бок, клонические судороги передних и задних конечностей (*стрелки*); б — 4 балла, асимметричные тонические судороги передних конечностей (*стрелка*) и клонические судороги задних конечностей с падением животного на бок

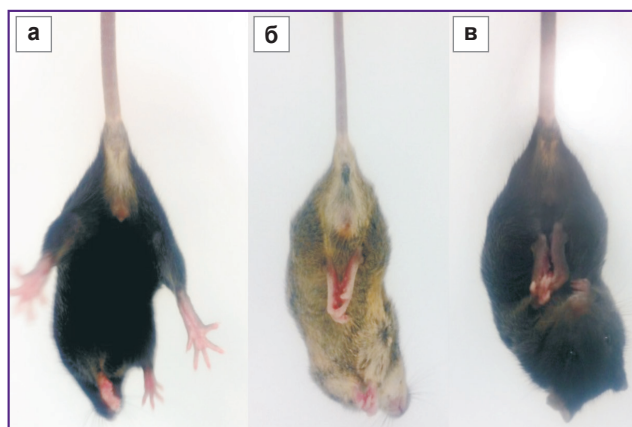


Рис. 2. Нарушение рефлекса разведения задних конечностей у мышей, гетерозиготных по гену *Sip1(+/-)* (hindlimb clasping):
а — норма; б, в — варианты нарушения рефлекса разведения конечностей

по сравнению с группой WT (0%) (рис. 2, табл. 2).

Мыши, гомозиготные по гену *Sip1*, не доживали до двухмесячного возраста: средняя продолжительность их жизни составила 39 ± 13 дней, поэтому дальнейшее исследование поведения проводилось только в группе самцов с генотипом *Sip1(+/-)* в сравнении с WT.

Исследование способностей животных к выполнению сенсомоторных задач показало отсутствие разницы между генотипами в тестах: время выхода из круга ($F_{1,28}=1,72$; $p=0,19$), скорость прохождения плоских перекладин шириной 3 см ($F_{1,28}=1,16$; $p=0,29$), 2 см ($F_{1,28}=0,07$; $p=0,78$), 1 см ($F_{1,28}=0,56$; $p=0,46$), скорость прохождения круглых перекладин диаметром 3 см ($F_{1,28}=0,09$; $p=0,76$) и 0,5 см ($F_{1,28}=0,68$; $p=0,42$), способность удержаться за провод ($F_{1,28}=0,25$; $p=0,62$), скорость поворота на наклонном экране ($F_{1,28}=1,27$; $p=0,27$) и разворот в цилиндре ($F_{1,28}=1,56$; $p=0,22$).

Тест «свет–темнота». Исследование поведения животных в этом тесте выявило отсутствие различий между самцами групп *Sip1(+/-)* и WT по показателям латентного времени перехода в темный отсек ($F_{1,12}=0,23$; $p=0,64$) и количеству переходов между отсеками ($F_{1,12}=2,48$; $p=0,14$). Однако при исследовании

Т а б л и ц а 2

Показатели общего здоровья и результаты сенсомоторного тестирования мышей, мутантных по гену *Sip1* и WT

Показатели	Генотип	
	WT	<i>Sip1(+/-)</i>
<i>Показатели общего здоровья</i>		
Масса тела, г	25,1±0,6	23,4±0,7
Плохое состояние шерсти, %	0	0
Лысины, %	0	0
Отсутствие вибрисс, %	0	14
Вздыбливание шерсти, %	0	0
Физические аномалии, %	0	0
Нарушение рефлекса разведения задних конечностей, %	0	21
<i>Сенсомоторные тесты</i>		
Способность и инициатива выйти из круга диаметром 30 см, с	3,6±0,3	4,4±0,5
Способность двигаться по перекладине, с:		
плоской, шириной 3 см	11,9±1,6	20,3±8,2
плоской, шириной 2 см	9,1±1,4	9,8±1,9
плоской, шириной 1 см	10,4±2,2	16,3±8,1
круглой, диаметром 3 см	21,2±9,7	17,2±8,0
круглой, диаметром 0,5 см	98,7±11,5	84,1±13,5
Удержание за провод, с	114,5±3,8	110,0±8,6
Поворачивание в цилиндре, с	12,8±2,1	22,1±7,7
Поворот на наклонном экране, с	10,5±1,9	19,1±7,9

времени, проводимого в светлом и темном отсеках, обнаружено, что самцы *Sip1(+/-)* проводили больше времени в темном отсеке ($276,1 \pm 15,2$ с) по сравнению с группой WT ($204,7 \pm 15,2$ с) ($F_{1,12}=5,66$; $p=0,03$).

Тест «открытое поле». Животные *Sip1(+/-)* не отличались от животных группы WT по показате-

Таблица 3

Показатели поведения мышей в тесте социального взаимодействия

Исследование	Отсек	Время, проводимое в отсеке, с		Количество входов в отсек	
		WT	<i>Sip1</i> (+/-)	WT	<i>Sip1</i> (+/-)
Социальный интерес	Пустой	188,6±30,9	206,2±43,4	84,6±13,4	131,9±37,9
	Партнер 1	127,6±11,9	74,5±27,5*	55,5±8,3	36,1±11,1#
Социальная новизна	Партнер 1	132,6±20,8	126,9±30,4	36,0±5,3	51,1±10,1
	Партнер 2	213,9±32,2	213,1±23,3	59,3±4,8	140,2±50,5

* — статистически значимая разница значений с группой WT; # — с пустым отсеком, $p < 0,05$.

лям двигательной активности: общему пройденному расстоянию ($F_{1,48}=1,65$; $p=0,21$), средней скорости передвижения ($F_{1,48}=1,7$; $p=0,19$), а также по ориентировочно-исследовательской активности — общему количеству вертикальных стоек ($F_{1,48}=2,3$; $p=1,14$). Кроме того, не выявлено разницы в эмоциональном поведении этих животных, о чем свидетельствует равное количество дефекаций ($F_{1,48}=3,50$; $p=0,07$) и мочевых точек ($F_{1,48}=1,03$; $p=0,32$). Однако более детальный анализ поведения показал снижение числа вертикальных стоек в центре поля у мышей *Sip1*(+/-) ($0,3 \pm 0,1$) по сравнению с группой WT ($2,7 \pm 0,8$) ($F_{1,48}=6,18$; $p=0,02$).

Стартл-рефлекс. Мыши *Sip1*(+/-) не отличались от группы WT по выраженности акустической реакции вздрагивания ($F_{1,20}=0,14$; $p=0,07$), при этом значение PPI у них также не менялось ($F_{1,20}=0,35$; $p=0,56$).

Социальное взаимодействие. При исследовании социального интереса у животных обнаружено влияние наличия незнакомого партнера на время, проводимое в отсеке ($F_{1,26}=8,67$; $p=0,007$), и количество входов в отсек ($F_{1,26}=7,53$; $p=0,01$) (табл. 3). При этом самцы *Sip1*(+/-) проводили меньше времени в отсеке

с незнакомым партнером (партнер 1) по сравнению с животными группы WT ($p=0,03$) и совершали большее количество входов в пустой отсек, чем в отсек с незнакомым партнером. Исследование социальной памяти не обнаружило различий между генотипами ($F_{1,26}=0,01$; $p=0,91$): самцы *Sip1*(+/-) и WT проводили больше времени в отсеке с новым незнакомым партнером (партнер 2), чем в отсеке с уже известным партнером (партнер 1) ($p=0,005$).

Условная реакция пассивного избегания. Анализ поведения мышей при выработке рефлекса пассивного избегания выявил увеличение латентного периода перехода в темный отсек на 2-й день по сравнению с 1-м у животных обеих групп ($F_{1,86}=68,11$; $p < 0,001$) (рис. 3). При этом не обнаружено разницы латентных периодов перехода в темный отсек у мышей *Sip1*(+/-) и WT ($F_{1,43}=0,02$; $p=0,89$), что свидетельствует о равной способности к обучению.

Обсуждение результатов

Данная работа посвящена выявлению влияния наличия мутантного аллеля гена *Sip1* на показатели здоровья и функциональное состояние ЦНС мышей. Современный протокол по поведенческому фенотипированию мутантных линий мышей (SHIRPA-протокол) включает более 40 пунктов и позволяет выполнять скрининг с выявлением различных нарушений в нервной-мышечной, сенсорной и вегетативной системах организма [21].

На 1-м этапе проводилась предварительная оценка общего здоровья животных, моторных и сенсорных функций, которая позволяет избежать ложной интерпретации результатов более сложных поведенческих задач. У всех исследуемых мышей наблюдалось хорошее состояние шерстного покрова, отсутствие лысин и вздыбливания шерсти.

В отсутствие патологии поднятые за хвост взрослые грызуны, которых медленно опускают к горизонтальной поверхности, разводят все четыре конечности в ожидании контакта [22]. Наличие одного мутантного аллеля исследуемого нами гена *Sip1* приводило к нарушению у животных рефлекса разведения конечностей (см. рис. 2). Такая же картина отмечена у мышей с поражениями мозжечка, базальных ганглиев и неокортекса,

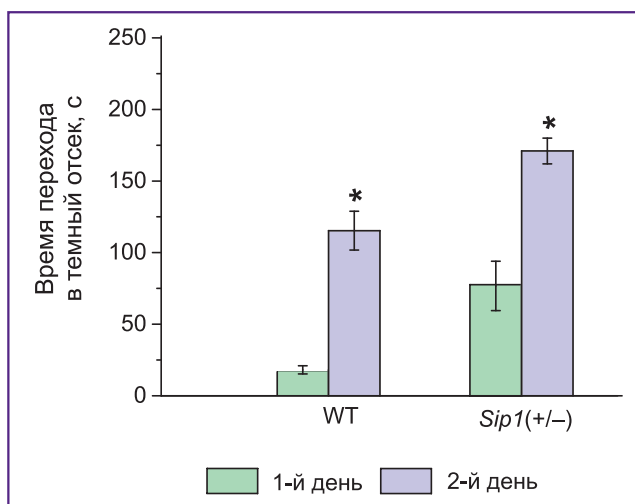


Рис. 3. Время перехода в темный отсек при выработке условной реакции пассивного избегания у мышей *Sip1*(+/-) и WT; * — статистически значимая разница значений в 1-й и 2-й дни; $p < 0,05$

а также у трансгенных моделей болезни Альцгеймера [22]. Исследователи полагают, что лежащий в основе этих нарушений механизм, который включает церебелло-кортикоретикулярные и кортико-стриато-паллидо-ретикулярные пути, может быть связан с изменениями в передаче норадреналина и серотонина. Кроме того, для мышей с отсутствием гена *Atg7*, демонстрирующих нарушение рефлекса разведения конечностей, был показан специфический дефицит ЦНС, обусловленный дегенерацией неокортекса и мозжечка [23]. Сцепленность конечностей и позу летучей мыши демонстрировали трансгенные мыши с экспрессией цитоплазматического прионного белка Prp, у которых было обнаружено уменьшение толщины неокортекса [24].

Нельзя исключить, что обнаруженное нами отсутствие вибрисс у мышей *Sip1(+/-)* могло повлиять на результаты поведенческого тестирования животных. Известно, что дефицит сенсорной информации в раннем возрасте способен оказать влияние на реализацию поведения во взрослом состоянии. Для крыс, у которых была произведена обрезка вибрисс с 0-го по 3-й постнатальные дни, были характерны аномальные структура и функция соматосенсорной системы, а поведение отличалось более высокой исследовательской активностью и частыми социальными взаимодействиями [25]. Однако другой группой ученых показано, что исследовательская активность взрослых крыс линии Wistar, у которых были обрезаны вибриссы в период с 9-го по 20-й постнатальный день, характеризовалась более низкой внутригрупповой изменчивостью по сравнению с контрольными крысами [26], а выстригание вибрисс со 2-го по 9-й день жизни не вызывало подобных изменений [27]. Следовательно, именно с отсутствием вибрисс может быть связано обнаруженное нами снижение количества вертикальных стоек в центральной части поля у мышей *Sip1(+/-)* в тесте «открытое поле».

Как уже было сказано, пороки развития головного мозга в настоящее время стали чаще исследоваться в качестве причины эпилепсии, задержки в развитии, неврологического дефицита и умственной отсталости у человека [1]. Аудиогенные судороги, развивающиеся рефлекторно у грызунов в ответ на звуковую стимуляцию, считаются одной из наиболее популярных и адекватных экспериментальных моделей генерализованной конвульсивной эпилепсии у человека [15, 28]. В нашей работе мы не обнаружили влияния наличия мутантного аллеля гена *Sip1* на предрасположенность животных к аудиогенным припадкам.

Для оценки уровня тревожности животных использовали тест «свет–темнота», где основными показателями являются время нахождения в светлом и темном отсеках, а также количество переходов между ними [29]. Исследуемые самцы *Sip1(+/-)* проводили больше времени в темном отсеке, что свидетельствует о повышенной тревожности животных.

Тест «открытое поле» является широко используемым для исследования двигательной активности

(пройденное расстояние), исследовательской активности (количество вертикальных стоек) и тревожности (время, проведенное в центре поля) в условиях мягкого стресса [30, 31]. Мыши *Sip1(+/-)* совершали достоверно меньше вертикальных стоек в центре поля по сравнению с животными группы WT, что косвенно свидетельствует об их повышенной тревожности и согласуется с данными, полученными нами в тесте «свет–темнота».

Исследование реакции вздрагивания используется для изучения многих свойств ЦНС, в том числе привыкания к звуку и престаимпульного торможения (снижение амплитуды вздрагивания после предварительного подпорогового стимула, что отражает функцию фильтрации сенсорных входов в ЦНС), которые нарушаются при шизофреноподобных состояниях. Исследование PPI предполагает, что вздрагивание животного в ответ на последовательное предъявление престаимула и стимула с интервалом 60 мс будет меньше, чем вздрагивание животного в ответ на одиночный стимул. Рефлекс вздрагивания — это относительно простой рефлекс скелетной мускулатуры, который является следствием испуга и, по-видимому, служит для предотвращения потенциального повреждения организма [32, 33]. Отсутствие изменений величины реакции вздрагивания и PPI у мышей *Sip1(+/-)* свидетельствует о нормальном слуховом восприятии и отсутствии изменений выраженности эмоционального состояния страха у данных животных.

Для оценки влияния мутантного аллеля гена *Sip1(+/-)* на когнитивные функции и способность животных к обучению проанализировано сохранение следов памяти при выработке условного рефлекса пассивного избегания. Полученные результаты различия латентных периодов перехода в темный отсек в 1-й и 2-й день исследования свидетельствуют о равной способности мышей групп *Sip1(+/-)* и WT к обучению.

Следующий этап поведенческого фенотипирования представлял собой оценку более тонких функциональных особенностей нервной системы, связанных с индивидуальным и социальным поведением животных.

Социальное поведение — это поведение, требующее для своей реализации по крайней мере еще одного представителя своего вида. Сюда относят все варианты межсамцовых взаимодействий, репродуктивное (половое) и родительское поведение [34]. Понятие «социальное узнавание» как феномен и экспериментальная парадигма было введено в употребление в 1980-е гг. [35]. Оно основано на безусловном поведенческом ответе (интересе) животного при подсадке незнакомого партнера. При исследовании социального интереса и социального распознавания нового объекта нами обнаружено снижение реакции социальной активности у мышей *Sip1(+/-)* по сравнению с WT: при наличии незнакомого социального партнера мыши предпочитали находиться в пустом

отсеке. Исследование направленности животных на получение нового социального опыта не выявило отличий группы *Sip1(+/-)* от контрольной. Поведение экспериментальных животных соответствовало норме: мышь стремилась больше времени провести с новым животным, чем с уже знакомым ей по предыдущему этапу. Это говорит об отсутствии нарушений социальной памяти.

К похожим результатам пришла группа японских ученых при попытке создания модели синдрома Мовата–Вильсона, обнаружив, что мыши *Sip1* демонстрируют повышенную тревожность и нарушение коммуникативных способностей [36], но, в отличие от наших результатов, эта группа показала снижение двигательной активности у мышей. Скорее всего, такое различие связано с тем, что время тестирования в тесте «открытое поле» у данных авторов составило 1 ч.

Проведенное исследование позволяет предположить, что молекулярный механизм участия гена *Sip1* в регуляции сенсомоторных функций и тревожности мышей может заключаться в следующем. Транскрипционный фактор *Sip1* имеет высокий уровень экспрессии в постмитотических нейронах неокортекса. Кондициональная делеция *Sip1* в молодых нейронах вызывает преждевременную генерацию нейронов верхних слоев за счет нейронов нижних слоев, преждевременную и усиленную генерацию глиальных предшественников и усиленный постнатальный астроцитогенез. Преждевременное образование нейронов верхних слоев сопровождается повышенной экспрессией нейротрофина-3. Ген *Sip1* сдерживает образование сигнальных факторов в постмитотических нейронах, что дает обратный сигнал предшественникам регулировать время переключения клеточной судьбы, количество нейронов и усиление глиального кортикогенеза [12]. Кроме того, экспрессия *Sip1* наблюдается в высококодифференцированных клетках ЦНС, таких как серотонинергические и дофаминергические нейроны [37], с нарушением работы которых связывают развитие патологической тревожности [38, 39].

Таким образом, нарушение процессов своевременной нейрональной миграции и дифференцировки, регулируемых фактором *Sip1*, способно привести к повышенной эмоциональной лабильности и нарушению сенсомоторных реакций у взрослых животных.

Заключение

Наличие мутантного аллеля гена *Sip1* не влияло на двигательную активность, способность к обучению, реакцию вздрагивания и величину престаимпульного ингибирования у мышей, однако имело определенное влияние на неврологические функции, тревожность и социальный интерес животных. Полученные данные позволяют предположить, что мутация в гене *Sip1* приводит к нарушению нейрофункциональных взаи-

модействий, ведущих к неврологическому дефициту и изменению поведенческого ответа в условиях мягкого стресса.

Финансирование исследования. Статья подготовлена при поддержке Российского научного фонда (грант №15-14-10021) по приоритетному направлению деятельности «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований с привлечением молодых исследователей».

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Fernández V., Llinares-Benadero C., Borrell V. Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J* 2016; 35(10): 1021–1044, <https://doi.org/10.15252/embj.201593701>.
2. Elsen G.E., Hodge R.D., Bedogni F., Daza R.A.M., Nelson B.R., Shiba N., Reiner S.L., Hevner R.F. The protomap is propagated to cortical plate neurons through an Eomes-dependent intermediate map. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(10): 4081–4086, <https://doi.org/10.1073/pnas.1209076110>.
3. De Juan Romero C., Borrell V. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia* 2015; 63(8): 1303–1319, <https://doi.org/10.1002/glia.22827>.
4. Goossens S., Janzen V., Bartunkova S., Yokomizo T., Drogat B., Crisan M., Haigh K., Seuntjens E., Umans L., Riedt T., Bogaert P., Haenebalcke L., Bex G., Dzierzak E., Huylebroeck D., Haigh J.J. The EMT regulator *Zeb2/Sip1* is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization. *Blood* 2011; 117(21): 5620–5630, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-300236>.
5. Manthey A.L., Lachke S.A., FitzGerald P.G., Mason R.W., Scheiblin D.A., McDonald J.H., Duncan M.K. Loss of *Sip1* leads to migration defects and retention of ectodermal markers during lens development. *Mech Dev* 2014; 131: 86–110, <https://doi.org/10.1016/j.mod.2013.09.005>.
6. Teraishi M., Takaishi M., Nakajima K., Ikeda M., Higashi Y., Shimoda S., Asada Y., Hijikata A., Ohara O., Hiraki Y., Mizuno S., Fukada T., Furukawa T., Wakamatsu N., Sano S. Critical involvement of ZEB2 in collagen fibrillogenesis: the molecular similarity between Mowat-Wilson syndrome and Ehlers-Danlos syndrome. *Sci Rep* 2017; 7: 46565, <https://doi.org/10.1038/srep46565>.
7. Garavelli L., Mainardi P. Mowat-Wilson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2(1): 42, <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-42>.
8. Srivatsa S., Parthasarathy S., Molnár Z., Tarabykin V. *Sip1* downstream Effector ninein controls neocortical axonal growth, ipsilateral branching, and microtubule growth and stability. *Neuron* 2015; 5(5): 998–1012, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.018>.
9. Turovskaya M.V., Babaev A.A., Zinchenko V.P., Epifanova E.A., Borisova E.V., Tarabykin V.S., Turovsky E.A. *Sip-1* mutations cause disturbances in the activity of NMDA- and AMPA-, but not kainate receptors of neurons in the cerebral cortex. *Neurosci Lett* 2017; 650: 180–186, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.048>.

10. Higashi Y., Maruhashi M., Nelles L., Van de Putte T., Verschueren K., Miyoshi T., Yoshimoto A., Kondoh H., Huylebroeck D. Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* 2002; 32(2): 82–84, <https://doi.org/10.1002/gene.10048>.
11. Goebbels S., Bormuth I., Bode U., Hermanson O., Schwab M.H., Nave K.-A. Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 2006; 44(12): 611–621, <https://doi.org/10.1002/dvg.20256>.
12. Seuntjens E., Nityanandam A., Miquelajauregui A., Debruyne J., Stryjewska A., Goebbels S., Nave K.A., Huylebroeck D., Tarabykin V. Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* 2009; 12(11): 1373–1380, <https://doi.org/10.1038/nn.2409>.
13. Gorski J.A., Talley T., Qiu M., Puelles L., Rubenstein J.L., Jones K.R. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6309–6314.
14. Chabrol E., Navarro V., Provenzano G., Cohen I., Dinocourt C., Rivaud-Péchox S., Fricker D., Baulac M., Miles R., Leguern E., Baulac S. Electroclinical characterization of epileptic seizures in leucine-rich, glioma-inactivated 1-deficient mice. *Brain* 2010; 133(9): 2749–2762, <https://doi.org/10.1093/brain/awq171>.
15. Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И. Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова 2006; 56(3): 298–316. Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. Rats of Krushinsky-Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology and behavior. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti imeni I.P. Pavlova* 2006; 56(3): 298–316.
16. Silva A.F., Sousa D.S., Medeiros A.M., Macêdo P.T., Leão A.H., Ribeiro A.M., Izídio G.S., Silva R.H. Sex and estrous cycle influence diazepam effects on anxiety and memory: Possible role of progesterone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; 70: 68–76, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.05.003>.
17. Kiryk A., Aida T., Tanaka K., Banerjee P., Wilczynski G.M., Meyza K., Knapska E., Filipkowski R.K., Kaczmarek L., Danyś W. Behavioral characterization of GLT1 (+/–) mice as a model of mild glutamatergic hyperfunction. *Neurotox Res* 2008; 13(1): 19–30, <https://doi.org/10.1007/bf03033364>.
18. Rosen J.B., Schulkin J. From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev* 1998; 105(2): 325–350, <https://doi.org/10.1037/0033-295x.105.2.325>.
19. Crawley J.N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004; 10(4): 248–258, <https://doi.org/10.1002/mrdd.20039>.
20. Kaidanovich-Beilin O., Lipina T., Vukobradovic I., Roder J., Woodgett J.R. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp* 2011; 48: 2473, <https://doi.org/10.3791/2473>.
21. Crawley J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 2008; 57(6): 809–818, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.001>.
22. Lalonde R., Strazielle C. Motor performance and regional brain metabolism of spontaneous murine mutations with cerebellar atrophy. *Behav Brain Res* 2001; 125(1–2): 103–108, [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00276-5](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00276-5).
23. Komatsu M., Waguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J., Tanida I., Ueno T., Koike M., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441(7095): 880–884, <https://doi.org/10.1038/nature04723>.
24. Wang X., Bowers S.L., Wang F., Pu X., Nelson R.J., Ma J. Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(6): 555–563, <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2009.02.014>.
25. Lee L.-J., Chen W.-J., Chuang Y.-W., Wang Y.-C. Neonatal whisker trimming causes long-lasting changes in structure and function of the somatosensory system. *Exp Neurol* 2009; 219(2): 524–532, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.07.012>.
26. Шишелова А.Ю., Алиев Р.Р., Раевский В.В. Ранний сенсорный опыт определяет разнообразие исследовательского поведения в зрелом возрасте. Экспериментальная психология 2015; 8(1): 73–84. Shishelova A.Yu., Aliev R.R., Raevsky V.V. Early sensory experience determines variety of exploratory behavior in adult age. *Ekspериментальная psikhologiya* 2015; 8(1): 73–84.
27. Shishelova A.Y., Raevskii V.V., Aliev R.R. Effect of early sensory experience on the exploratory activity in adult animals. *Doklady Biological Sciences* 2016; 468(1): 101–103, <https://doi.org/10.1134/s0012496616030029>.
28. Крушинский Л.В. Новое в изучении экспериментальной эпилепсии и физиологических механизмов, лежащих в ее основе. Успехи современной биологии 1949; 28: 108–133. Krushinskiy L.V. The new in the study of experimental epilepsy and its underlying physiological mechanisms. *Uspekhi sovremennoi biologii* 1949; 28: 108–133.
29. Hascoët M., Bourin M., Nic Dhonnchadha B.Á. The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001; 25(1): 141–166, [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(00\)00151-2](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(00)00151-2).
30. Denenberg V.H. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 1969; 159(3): 852–859, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1969.tb12983.x>.
31. Bailey K.R., Rustay N.R., Crawley J.N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: practical concerns and potential pitfalls. *ILAR J* 2006; 47(2): 124–131, <https://doi.org/10.1093/ilar.47.2.124>.
32. Попова Н.К., Барыкина Н.Н., Плюснина И.З., Алехина Т.А., Колпаков В.Г. Экспрессия реакции испуга у крыс, генетически предрасположенных к разным видам защитного поведения. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова 1999; 1: 99–104. Popova N.K., Barykina N.N., Pliusnina I.Z., Alekhina T.A., Kolpakov V.G. Manifestation of fear response in rats genetically predisposed to various kinds of defense behavior. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova* 1999; 1: 99–104.
33. Тибейкина М.А. Генетико-физиологические особенности акустической реакции вздрагивания: взаимосвязь с другими формами поведения. Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск; 2008. Tibeykina M.A. *Genetiko-fiziologicheskie osobennosti akusticheskoy reaktsii vzdragivaniya: vzaimosvyaz' s drugimi formami povedeniya*. Dis. ... kand. biol. nauk [Genetic and physiological properties of acoustic startle response: relationship with other forms of behavior. PhD dissertation]. Novosibirsk; 2008.
34. Амикишиева А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование. Информационный вестник ВОГиС 2009; 13(3): 529–542. Amikishieva A.V.

Behavioral phenotyping: up-to-date methods and equipment. *Informatsionnyy vestnik VOGiS* 2009; 13(3): 529–542.

35. Thor D.H., Holloway W.R. Anosmia and play fighting behavior in prepubescent male and female rats. *Physiol Behav* 1982; 29(2): 281–285, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90016-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90016-6).

36. Takagi T., Nishizaki Y., Matsui F., Wakamatsu N., Higashi Y. De novo inbred heterozygous *Zeb2/Sip1* mutant mice uniquely generated by germ-line conditional knockout exhibit craniofacial, callosal and behavioral defects associated with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mol Genet* 2015; 24(22): 6390–6402, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv350>.

37. Nishizaki Y., Takagi T., Matsui F., Higashi Y. SIP1 expression patterns in brain investigated by generating a SIP1-

EGFP reporter knock-in mouse. *Genesis* 2013; 52(1): 56–67, <https://doi.org/10.1002/dvg.22726>.

38. Overstreet D.H., Commissaris R.C., De La Garza R., File S.E., Knapp D.J., Seiden L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. *Stress* 2003; 6(2): 101–110, <https://doi.org/10.1080/1025389031000111311>.

39. Науменко В.С., Понимаскин Е.Г., Попова Н.К. 5-HT_{1A} рецептор: роль в регуляции различных видов поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции 2016; 20(2): 180–190. Naumenko V.S., Ponimaskin E.G., Popova N.K. 5-HT_{1A} receptor: its role in the regulation of different kinds of behavior. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii* 2016; 20(2): 180–190.