

*На правах рукописи*



**Буренкова Ольга Владимировна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ  
В МОДИФИКАЦИИ ПОВЕДЕНИЯ, ОПРЕДЕЛЯЕМОЙ УСЛОВИЯМИ  
ВЫРАЩИВАНИЯ ПОТОМСТВА МЫШЕЙ ЛИНИИ 129SV**

03.03.01 – Физиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в ФГБУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» РАМН.

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук, доцент, заведующая лабораторией системогенеза поведения ФГБУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» РАМН

**Зарайская Ирина Юрьевна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

**Дубынин Вячеслав Альбертович**

член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией нейроиммунопатологии ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН

**Морозов Сергей Георгиевич**

**Ведущая организация:** ФГБУН Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН

Защита диссертации состоится «15» мая 2014 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» РАМН по адресу: 125009, г. Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» РАМН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Кубряк О.В.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность исследования**

Ранний постнатальный опыт оказывает долговременное влияние на формирование поведенческого фенотипа. Предполагается, что в основе этого лежат эпигенетические модификации генома нервных клеток (Colvis C.M. et al., 2005), играющие важную роль в пластичности нервной системы новорожденных и взрослых животных (Liu D. et al., 1997; Francis D. et al., 1999; Caldji C. et al., 2000; Liu D. et al., 2000; Bredy T.W. et al., 2003; Bredy T.W. et al., 2004; Weaver I.C.G. et al., 2004; Weaver I.C.G. et al., 2006; Pedersen C.A. et al., 2011; Lindeyer C.M. et al., 2013). К наиболее изученным эпигенетическим модификациям, возникающим в ответ на воздействия среды, относятся метилирование ДНК и посттранскрипционные модификации гистонов, определяющие транскрипционную активность генов (Dulac C., 2010). В связи с этим исследование эпигенетических механизмов модификаций поведения – актуальная проблема современной нейробиологии и физиологии ЦНС. Настоящее исследование направлено на изучение влияния средовых эпигенетических стимулов посредством модификации гистонов в мозге на долговременную модификацию поведения.

Поведение незрелорождающихся млекопитающих формируется под постоянным материнским контролем (Claessens S.E. et al., 2011). Закономерно, что отношения мать-детеныш определяют физическое развитие и формирование поведения у грызунов (Fleming A.S. et al., 1999; Cameron N.M. et al., 2005) и человека (Heim C., Nemeroff C.B., 2001; Hedges D.W., Woon F.L., 2011). Это было продемонстрировано с помощью моделей пре- и постнатального стресса, депривации потомства от матери, хэндлинга, вариации уровня материнского ухода за потомством у грызунов (Anisman H. et al., 1998; Francis D. et al., 1999; Caldji C. et al., 2000; Champagne F. et al., 2003; Cirulli F. et al., 2003; Colvis C.M. et al., 2005; Pryce C.R. et al., 2005; Champagne D.L. et al., 2008; Franklin T.B. et al., 2010).

Хэндлинг (3-15-минутное отсаживание детенышей от самки, сопровождающееся тактильной стимуляцией) в раннем постнатальном периоде оказывает благоприятное воздействие на эмоциональные и когнитивные характеристики взрослых животных (Levine S., 1956; Denenberg V.H., Halmeyer G.C., 1967; Levine S. et al., 1967; Meaney M.J. et al., 1988; Meerlo P. et al., 1999; Caldji C. et al., 2000; Kosten T.A. et al., 2007). Противоположное, отрицательное, действие оказывает длительная депривация потомства от самки (3-24 ч) (Huot R.L. et al., 2002; Kalinichev M. et al., 2002; Uysal N. et al., 2005; Aisa B. et al., 2007, 2008, 2009), приводящая к снижению уровня ацетилирования гистонов в мозге выросшего потомства (Tesone-Coelho C. et al., 2013).

Наблюдения за детско-материнскими отношениями лабораторных крыс и мышей в первую неделю жизни показали, что в их популяции имеют место естественные вариации

уровня материнского ухода за потомством (Meaney M.J., 2001; Champagne F. et al., 2003; Wei L. et al., 2010; Pedersen C.A. et al., 2011). Эти различия сильно сказываются на экспрессии генов и поведении потомства в будущем (Liu D. et al., 1997; Caldji C. et al., 1998; Francis D. et al., 1999; Champagne F. et al., 2001; Meaney M.J., 2001; Champagne F. et al., 2003; Pedersen C.A. et al., 2011). Показано, что механизмом, определяющим поведенческий фенотип потомства самок с различным уровнем материнского ухода, является различие в уровне метилирования ДНК промотора гена глюкокортикоидных рецепторов в нейронах гиппокампа и в уровне ацетилирования гистона H3 в области этого же промотора (Weaver I.C.G. et al., 2004). Экспериментальная модуляция молекулярных эпигенетических механизмов в этой модели приводит к изменению поведенческого фенотипа крыс (Weaver I.C.G. et al., 2004; Weaver I.C.G. et al., 2006).

Одним из методов вмешательства в эпигенетические механизмы является блокада гистондеацетилаз (HDAC – histone deacetylases), приводящая к увеличению уровня ацетилирования гистонов в мозге. К изученным и доступным ингибиторам HDAC относятся трихостатин А, бутират натрия, вальпроевая кислота и ряд других, каждый из которых обладает различной степенью селективности к классическим изоформам HDAC (Roth T.L., Sweatt J.D., 2009).

Таким образом, эпигенетические механизмы, в том числе ацетилирование гистонов, играют важную роль в пластичности нервной системы как новорожденных, так и взрослых животных, и одним из главных инструментов для исследования этих механизмов является блокада гистоновых деацетилаз.

Однако попытка исследования влияния введения блокаторов гистоновых деацетилаз в первую неделю жизни, являющуюся критическим периодом для формирования будущего эпигенетического статуса животных, на модификацию поведенческого фенотипа животных до сих пор не предпринималась. В литературе отсутствуют данные о роли эпигенетических стимулов в формировании поведенческого фенотипа в раннем постнатальном периоде, в частности, результативности обучения лабораторных мышат, о соотношении результатов этого обучения с поведенческим фенотипом взрослых животных в зависимости от условий выращивания в раннем онтогенезе, о влиянии эпигенетических стимулов на результаты обучения детенышей следующего поколения.

Удобным объектом для исследования долговременной модификации поведения, определяемой условиями выращивания потомства мышей, а также роли эпигенетических механизмов в этом процессе являются мыши линии 129Sv, поскольку в раннем постнатальном периоде они характеризуются высокой поведенческой пластичностью при изменении уровня материнского ухода (Александрова Е.А. с соавт., 2005).

## **Цель и задачи исследования**

Целью исследования явилось изучение влияния изменения уровня ацетилирования гистонов в мозге мышей линии 129Sv в первую неделю жизни на формирование их поведенческого фенотипа в двух поколениях

В соответствии с поставленной целью конкретными задачами работы были:

1. Исследование влияния блокады гистоновых деацетилаз у мышат линии 129Sv на фоне депривации от матери в первую неделю жизни на раннее обонятельное обучение мышат, непосредственно подвергавшихся воздействию, и мышат следующего поколения;
2. Исследование влияния блокады гистоновых деацетилаз и депривации от матери в первую неделю жизни самок мышей линии 129Sv на стиль их материнского поведения;
3. Исследование влияния блокады гистоновых деацетилаз и депривации от матери в первую неделю жизни самцов мышей линии 129Sv на их поведенческий фенотип во взрослом возрасте.

## **Научная новизна работы**

Впервые показано, что 45-60-минутная депривация от матери в раннем постнатальном периоде, сопровождающаяся тактильной стимуляцией, ухудшает результаты раннего обонятельного обучения. Установлено, что влияние эпигенетических стимулов на формирование поведенческого фенотипа лабораторных мышей, в том числе на раннее обучение, имеет зависящий от пола характер: под влиянием многократных инъекций вальпроата натрия избирательное улучшение результатов раннего обонятельного обучения наблюдается у самцов, а у самок к этому эффекту приводят многократные инъекции физиологического раствора. В работе впервые дана характеристика долговременного влияния блокатора гистоновых деацетилаз на формирование поведенческого фенотипа потомства: изменение уровня материнского ухода у самок и эмоционального профиля у самцов. Также впервые показано влияние введения блокатора гистоновых деацетилаз в раннем постнатальном возрасте на результаты раннего обонятельного обучения детенышей следующего поколения.

## **Научно-практическая значимость работы**

Результаты этой работы позволят расширить представления о механизмах долговременных модификаций поведения, обусловленных эпигенетическими воздействиями на организм. Исследование биологических механизмов, лежащих в основе долговременного влияния условий окружающей среды в раннем постнатальном периоде, имеет важное прикладное значение, поскольку их знание может быть использовано в терапевтических целях для профилактики и лечения последствий неблагоприятных событий в раннем возрасте. Так, поскольку исследуемые эпигенетические механизмы долговременной модификации поведения

могут лежать в основе различных форм заболеваний (формирование зависимости к алкоголю и наркотикам, невротические и постстрессорные состояния) и являться объектом для создания новых подходов к их коррекции, большое значение имеют показанные в данной работе гендер-зависимые особенности влияния эпигенетических стимулов, свидетельствующие о необходимости применения различных подходов при работе с особями каждого пола.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Ежедневная депривация от матери продолжительностью 45-60 мин в течение первой недели жизни приводит к изменению фенотипа животных. Наибольшее влияние этих условий выращивания на модификацию поведения показано в раннем онтогенезе. Долговременные эффекты депривации на поведенческий фенотип взрослых животных выражены слабее.
2. Вмешательство в эпигенетические механизмы модификации поведения путем блокады гистоновых деацетилаз в раннем постнатальном периоде развития мышей оказывает гендер-зависимое действие на раннее обонятельное обучение. Данная экспериментальная процедура также оказывает долговременные эффекты на фенотип взрослых животных обоих полов, как и на фенотип детенышей следующего поколения.
3. Воздействие блокады гистоновых деацетилаз приводит к коррекции модификаций поведенческого фенотипа детенышей и взрослых самок, вызванных такими манипуляциями в раннем постнатальном периоде, как депривация от матери и введение физраствора.

### **Апробация работы**

Результаты исследования доложены и обсуждены на XXI Съезде физиологического общества им. Павлова (Калуга, 2010); 8<sup>М</sup> Международном конгрессе по нейронаукам IBRO (Флоренция, 2011); Конференции молодых ученых «Экспериментальная и прикладная физиология» (Москва, 2011); V Всероссийской конференции по поведению животных (Москва, 2012); 8<sup>М</sup> Форуме FENS (Барселона, 2012); конференциях Отдела системогенеза НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина (2010-2013); Итоговых сессиях НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина (2011-2014).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методики экспериментов, изложения результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 155 страницах, содержит 27 рисунков, 5 таблиц и 11 приложений. Библиографический указатель содержит 217 источников, из них 12 на русском и 205 на иностранных языках.

## **Публикации**

Основное содержание диссертации отражено в 3 статьях, опубликованных в журналах, входящих в «Перечень российских рецензируемых научных журналов ...» ВАК РФ, и 13 тезисах.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследования выполнены в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (этическая комиссия НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАМН, протокол №1 от 03.09.2005г.).

В работе было использовано 540 детенышей обоих полов из 92 пометов и 60 взрослых самцов мышей инбредной линии 129Sv. Мышей содержали совместно по 2-3 особи (1 самец и 1-2 самки) в стандартных пластиковых клетках размером 18×24×14 см (Ш×Д×В) с подстилкой из древесных опилок, при свободном доступе к воде и корму, при естественном световом режиме и температуре 20-24°C. Самок с видимыми признаками беременности отсаживали в клетки размером 23×40×18 см. За несколько дней до ожидаемых родов ежедневно в одно и то же время проверяли наличие новорожденных мышат. День их обнаружения принимали за 1-е постнатальные сутки (ПС). Перед началом всех ежедневных манипуляций с потомством самку отсаживали от помета. На 2ПС определяли пол и массу мышат, наносили и затем поддерживали индивидуальные метки. В гнездовом периоде в экспериментах использовали мышат обоих полов.

### **Определение уровня ацетилирования гистона H3 в мозге мышей линии 129Sv после их выращивания в разных условиях на первой неделе жизни**

В качестве блокатора гистоновых деацетилаз был выбран вальпроат натрия, поскольку его подкожное введение в дозировке 50 мг/кг на 1ПС хорошо переносится мышатами и в то же время ведет к значимому повышению уровня ацетилирования гистона H3 в их мозге (Murray E.K. et al., 2009). Это вещество также известно как противосудорожный препарат, однако при введении малых доз, к которым относится и выбранная нами (50 мг/кг), эти эффекты не наблюдаются (Johannessen C.U., Johannessen S.I., 2003).

На 7ПС животные всех экспериментальных групп подвергались декапитации, мозг извлекали без мозжечка и немедленно замораживали в парах жидкого азота. Образцы мозга хранились при температуре -80°C.

Анализ уровня ацетилирования гистона H3 в мозге детенышей производили методом Вестерн Блоттинга по протоколу Мюррэй с коллегами (Murray E.K. et al., 2009).

Для анализа влияния производившихся экспериментальных процедур на уровень ацетилирования гистона H3 в мозге детенышей использовали следующие группы животных:

1. «интактные» – без экспериментального воздействия;
2. «депривация» – процедура депривации от матери, сопровождающаяся тактильной стимуляцией (непродолжительное выкладывание на гладкую поверхность, поглаживание в руках), с 3ПС по 6ПС общей продолжительностью 45 мин/сут;
3. «физраствор многократный» – процедура депривации от матери общей продолжительностью 60 мин/сут, сопровождающаяся инъекциями физраствора один раз в сутки подкожно в область спины с помощью микрошприца в объеме 25 мкл с 3ПС по 6ПС;
4. «вальпроат многократный» – процедура депривации от матери, сопровождающаяся инъекциями вальпроата натрия, растворенного в физрастворе в дозировке 50 мг/кг, по той же схеме.

### **Влияние депривации от матери, сопровождающейся тактильной стимуляцией, в раннем постнатальном периоде на результаты раннего обонятельного обучения**

Экспериментальная серия была проведена для выяснения влияния процедуры депривации от матери в первую неделю жизни на результаты раннего обонятельного обучения как раннего маркера запуска процесса изменения поведенческого фенотипа животных.

Процедура депривации от матери проводилась по вышеописанному протоколу.

Интактных мышат впервые брали в руки на 8ПС, до этого никаких манипуляций с ними не производили.

#### *Процедура обонятельного обучения с имитацией материнского подкрепления*

На 8ПС мышат, как подвергавшихся, так и не подвергавшихся процедуре депривации, включали в одну из 3-х экспериментальных групп: «обучение», «мятный контроль», «контроль без запаха». Обучение проводили в боксах с двойным дном размером 10×10 см и высотой бортика 6 см. Под перфорированным полом бокса находились опилки, смоченные спиртовой настойкой мяты перечной – источником нового запаха. Каждое животное группы «обучение» помещали в бокс и поглаживали кисточкой в течение 10-ти 30-секундных интервалов с перерывами в 30 сек, имитируя тактильную стимуляцию, получаемую при материнском груминге. Каждого мышонка из группы «мятный контроль» помещали в такой же бокс на 10 мин без поглаживания. Каждого мышонка из группы «контроль без запаха» на 10 мин помещали в бокс с чистыми опилками.

Спустя 24 часа проводили тестирование на обонятельную дискриминацию с помощью пластиковой камеры с двойным дном размером 20×20 см и высотой бортика 6 см. Под перфорированным полом камеры со сплошной («нейтральной») полосой шириной 10 мм по



центру находилось два равных отсека, один из которых был заполнен чистыми опилками, другой – опилками, смоченными настойкой мяты (тестовый отсек). Мышонка помещали на «нейтральную» полосу площадки и в пяти 60-секундных попытках с перерывами в 60 сек регистрировали время нахождения над каждым отсеком площадки. Рассчитывали процентную долю времени, проведенного каждым животным над тестовым отсеком в течение 300 секунд, составлявших 5 попыток.

### Влияние введения вальпроата натрия в раннем постнатальном периоде на долговременную модификацию фенотипа

На Рисунке 1 приведена общая схема экспериментов.

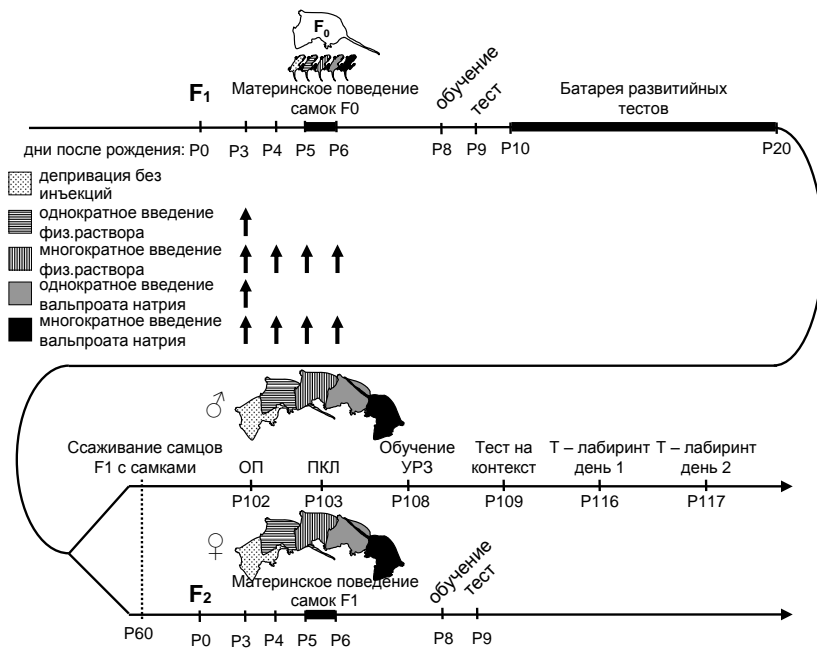


Рис. 1. Общая схема экспериментальной серии исследования влияния введения вальпроата натрия в раннем постнатальном периоде на долговременную модификацию поведенческого фенотипа. Стрелки указывают на дни, в которые были сделаны инъекции.

В одном экспериментальном помете, как правило, присутствовали детеныши всех групп: «физраствор многократный» и «вальпроат многократный» (см. вышеописанный протокол, Рисунок 1), «физраствор однократный» и «вальпроат однократный» (однократные инъекции на ЗПС), «депривация без инъекций» («депривация б/и») (отсаживание от самок одновременно с детенышами остальных групп до начала манипуляций с ними, но без инъекций). Инъекции физраствора как растворителя вальпроата натрия служили контролем к инъекциям вальпроата. Однократная инъекция вальпроата служила контролем к многократной, поскольку известно, что вызываемое введением вальпроата натрия увеличение уровня ацетилирования гистонов в мозге детенышей наблюдается в течение 24 ч (Murray E.K. et al., 2009).

На 5ПС, либо 6ПС через полчаса после проведения экспериментальных процедур часть мышат возвращали в гнездо, а часть помещали в наиболее удаленную от гнезда область домашней клетки. В клетку возвращали самку, начинали 30-минутную видеозапись, первые 5 мин которой занимал тест переноса: регистрировали длительность переноса самкой каждого детеныша в гнездо.

В программе «Segment Analyzer» на полученных видеозаписях выделяли отдельные поведенческие акты. Всего выделяли 21 акт, который относили к нескольким категориям, которые представлены в Таблице 1.

Табл. 1. Классификация поведенческих актов самок в домашней клетке с потомством.

Поведение, не связанное с потомством		Поведение, связанное с потомством		Другое	
Поведение вне гнезда, не связанное с потомством		Поведение в гнезде, не связанное с потомством	Поведение вне гнезда, связанное с потомством		
Исследовательское поведение	Поведение самообеспечения				
<p><i>Активное обследование</i> – самка перемещается по клетке.</p> <p><i>Рытье опилок</i> – самка роет опилки, не составляющие непосредственно гнездо.</p> <p><i>Стойки</i> – самка стоит только на задних лапах.</p> <p><i>Пассивное обследование</i> – самка сидит вне гнезда, обследование ограничивается поворотами головы.</p> <p><i>Лазание по решетке</i> – самка лазает по решетке клетки.</p>	<p><i>Чистка себя</i> – самка чистит себя.</p> <p><i>Еда, питье</i> – самка ест корм или пьет воду.</p> <p><i>Отдых</i> – самка лежит вне гнезда одна, глаза закрыты.</p>	<p><i>Вход в гнездо и выход из гнезда.</i></p> <p><i>Самка не делает ничего определенного в гнезде</i> – самка не вовлечена в контакт с потомством, осматривается, перемещается по гнезду, становится в стойки.</p> <p><i>Чистка себя в гнезде</i> – самка чистит себя.</p>	<p><i>Обследование детенышей в гнезде</i> – самка обследует детенышей, находящихся в гнезде, рассматривает и обнюхивает их.</p> <p><i>Груминг детенышей</i> – самка чистит детенышей.</p> <p><i>Кормление</i> – самка лежит почти неподвижно, детеныши в основном находятся под ней.</p> <p><i>Кормление с чисткой</i> – самка кормит детенышей и одновременно чистит их.</p>	<p><i>Краткие контакты с детенышами вне гнезда</i> – самка приближается к детенышам, выложенным из гнезда, обнюхивает их, но не чистит и не переносит.</p> <p><i>Перенос по клетке</i> – самка переносит детеныша.</p>	<p><i>Нахождение под опилками</i> – самка вместе с детенышами находится под опилками в гнезде, так что в ее поведении нельзя строго выделить какие-либо акты.</p> <p><i>Чистка себя или детенышей</i> – не понятно, себя или детенышей самка чистит.</p> <p><i>Занятие гнездом</i> – самка подгребает к гнезду опилки, находясь как внутри, так и вне гнезда, приносит опилки из других участков клетки.</p>

У каждой самки рассчитывали показатель процентной доли продолжительности каждого типа актов и каждой категории от общей продолжительности наблюдения, равной 30 минутам, и показатель числа актов (%) каждого типа и каждой категории от общего числа актов, наблюдавшегося у данной самки.

#### *Процедура обонятельного обучения с имитацией материнского подкрепления*

Процедура обучения мышат в этой экспериментальной серии была идентична процедуре, описанной ранее, за исключением отсутствия группы «мятный контроль». Дополнительно рассчитывали число животных (в процентах) в каждой группе, предпочитающих отсек с мятой (т.е. животных, у которых процент времени, проведенного над отсеком с мятой, суммарно по 5- и попыткам превышал 50%).

### Батарея развитийных тестов

Перед началом всех тестов самку отсаживали в отдельную клетку, а детенышей – в индивидуальные боксы на 30 мин. Сроки проведения тестов представлены на Рисунке 2.

Для проведения теста достижения гнезда часть помета отсаживали на противоположный от гнезда конец клетки, а остальных возвращали в гнездо. Регистрировали длительность достижения детенышами гнезда в течение 300 сек.

В тесте достижения опоры горизонтальной перекладины каждого детеныша помещали передними лапами на горизонтальную гладкую деревянную цилиндрическую перекладину диаметром 0,3 см и длиной 15,5 см, горизонтально закрепленную на двух вертикальных опорах на высоте 15,5 см от поверхности стола. В течение 120 сек регистрировали длительность достижения опоры.

Непосредственно после проведения этого теста проводили тест спуска в чистую клетку. На платформу размером 9×9 см и высотой 9,5 см, помещенную в чистую пустую клетку для мышей, высаживали каждого мышонка и в течение 120 сек регистрировали длительность спуска с платформы. Сразу после тестирования всего помета проводили тест спуска в домашнюю клетку. Тест был аналогичен предыдущему, но платформа располагалась в домашней клетке каждого помета.

У животных также отмечали степень открывания глаз: балл «1» присваивали, если оба глаза были полностью открыты, а балл «0» в остальных случаях.

На 21-22ПС пометы отсаживали от самок в клетки размером 18×24×14 см, на 30-35ПС животных рассаживали по полу в такие же клетки, а на 60-65ПС ссаживали в пары: всех самок ссаживали с самцами, не принадлежащими к вальпроатным группам, а самцов, принадлежащих к вальпроатным группам, ссаживали с самками, не принадлежащими к экспериментальной серии.



Рис. 2. Схема сроков проведения различных экспериментальных манипуляций.

## *Исследование поведения взрослых самцов, подвергавшихся в раннем постнатальном периоде различным экспериментальным воздействиям*

Взрослых самцов всех вышеописанных групп тестировали сначала в Открытом поле (ОП) (в возрасте 102-111ПС), на следующий день в Приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ), спустя неделю их обучали условнорефлекторному замиранию (УРЗ), на следующий день проводили тестирование условнорефлекторного замирания на обстановку, спустя еще неделю тестировали в Т-лабиринте.

### *Открытое поле*

Данный тест служил для оценки уровня тревожности животных (Prut L., Belzung C., 2003). Каждого самца помещали в центр установки, диаметр которой составлял 100 см, высота бортика 42 см. Сразу после помещения животного в установку с помощью программы «Easy Track Light» в течение 15 минут вели видеорегистрацию, сопровождавшуюся регистрацией траектории перемещения животного. Рассчитывали отношение длины траекторий в периферической (начиная от бортика и на расстоянии 10 см от него) и центральной зоне (радиусом 15 см от центра арены) к общей длине траектории.

### *Приподнятый крестообразный лабиринт*

Данный тест также служил для оценки уровня тревожности животных (Carobrez A.P., Bertoglio L.J., 2005). Длина каждого рукава составляла 28 см, ширина 5 см, высота стенок закрытых затемненных рукавов 16 см, высота бортика открытых рукавов 0,5 см, высота лабиринта над полом 55 см, размер центральной площадки 5×5 см. Самца помещали в центр установки ПКЛ и в течение 10 мин, как и в предыдущем тесте, вели регистрацию перемещения животного. Рассчитывали отношение длины траекторий в закрытых и открытых рукавах к общей длине траектории.

### *Обучение условнорефлекторному замиранию на обстановку*

Данная модель служила для исследования гиппокамп-зависимой долговременной ассоциативной памяти (Fanselow M.S., 1980; Rudy J.W. et al., 2004). Каждого самца помещали в пластмассовую экспериментальную камеру размером 25×32×30 см с тремя непрозрачными и одной прозрачной стенкой и электродным полом. Схема эксперимента представлена на Рисунке 3.

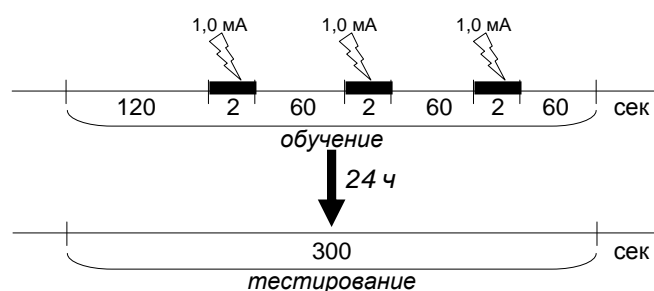


Рис. 3. Схема протокола обучения условнорефлекторному замиранию и тестирования условнорефлекторного замирания на обстановку.

### *T-лабиринт*

Модель спонтанного чередования рукавов T-лабиринта использовали для оценки рабочей пространственной памяти (Dudchenko P.A., 2004; Deacon R.M.J., Rawlins J.N.P., 2006). Высота T-образного лабиринта составляла 15 см, ширина всех рукавов – 10 см, длина стартового рукава – 32 см, боковых рукавов – по 30 см каждый. Самца помещали в стартовый отсек лабиринта и в течение 90 сек регистрировали время пересечения животным границ левого или правого тестовых рукавов, оставляя животного в выбранном рукаве на 30 сек. Через 60 сек после окончания попытки самца возвращали в стартовый отсек для второй попытки и вновь регистрировали латентный период входа в тот или иной тестовый рукав. В течение 2-х дней каждый самец проходил по три пробы по две попытки в каждой. По результатам шести проб рассчитывали процентную долю верного чередования – проб с последовательным посещением различных рукавов в двух попытках одной пробы.

### *Исследование поведения взрослых самок (F1), подвергавшихся в раннем постнатальном периоде различным экспериментальным воздействиям*

С соблюдением описанных выше правил от каждой самки F1 получали пометы, которые на 2-3ПС взвешивали и метили. На 5ПС, либо 6ПС проводили тест переноса и видеорегистрацию материнского поведения по описанной выше схеме.

### *Процедура обучения мышат второго поколения (F2)*

Процедура обучения и тестирования мышат второго поколения была аналогична процедуре обучения и тестирования мышат первого поколения.

### **Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «STATISTICA 6.0». Поскольку не все данные имели нормальное распределение, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и критерий Вальда-Вольфовитца (Wald-Wolfowitz Runs Test), а также анализ эмпирических и теоретических частот (observed vs expected frequency,  $\chi^2$ ). Показатели числа животных (в процентах), предпочитающих тестовый отсек, оценивали с помощью непараметрического критерия  $\chi^2$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В связи с растущим числом исследований, посвященных эпигенетическим механизмам влияния раннего опыта на формирование поведенческого фенотипа животных, нами была поставлена задача исследования влияния изменения уровня ацетилирования гистонов в мозге мышей линии 129Sv в первую неделю жизни путем блокады деацетилирования гистонов на модификацию поведенческого фенотипа животных как в раннем онтогенезе, так и во взрослом возрасте.

Манипуляции с детенышами в раннем постнатальном периоде сопряжены с вмешательством в отношения матери с потомством. Результирующий эффект таких манипуляций (в частности, введения блокатора гистоновых деацетилаз) определяется несколькими факторами: а) депривацией потомства от матери и хэндлингом потомства; б) влиянием изменения уровня материнского ухода в ответ на экспериментальные манипуляции и в) собственно эффектом вводимого вещества.

В нашем исследовании мы использовали протокол воздействия, промежуточный между протоколом хэндлинга (3-15 мин) и протоколом депривации (3-24 ч): продолжительность манипуляций с потомством во всех группах, за исключением «интактной», составляла 45-60 мин. Именно столько времени требовалось для проведения экспериментальных процедур в гнездовом периоде.

Использование нами данного протокола депривации привело к изменению поведенческого фенотипа детенышей уже на ранних этапах постнатального развития. Обучение предпочтению нового запаха, которое мы использовали как ранний маркер изменения поведенческого фенотипа, было нарушено у животных, подвергавшихся депривации от матери в раннем онтогенезе (Рисунок 4).

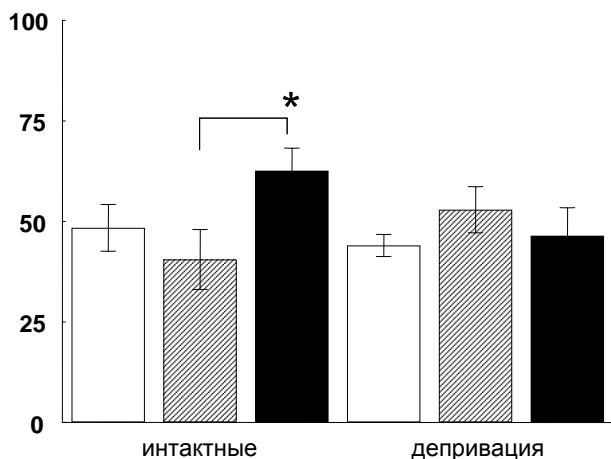


Рис. 4. Процентная доля времени, проведенного над тестовым отсеком (% от 300 сек) (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка). Белые столбики – «контроль без запаха», заштрихованные – «мятный контроль», черные – «обучение». \* –  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Определение уровня ацетилирования гистона H3 показало, что выявленное нами снижение его в мозге детенышей из группы «депривация» к концу первой недели могло быть причиной нарушения обучения (Рисунок 5). Это свидетельствует о модуляции эпигенетических молекулярных механизмов в мозге, вызванной нашей процедурой депривации. В работе 2013 г. (Tesone-Coelho C. et al., 2013) авторы продемонстрировали, что депривация крысят от матери с 1ПС по 14ПС также приводила к снижению уровня ацетилирования гистонов H3 и H4 в дорзальном стриатуме и сердцевине прилежащего ядра мозга животных во взрослом возрасте.

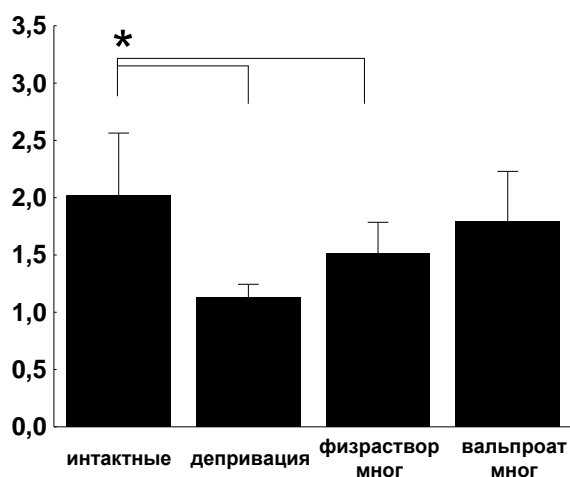


Рис. 5. Уровень ацетилирования гистона H3, пронормированный на содержание актина в мозге мышат (7ПИС) и усредненный по обоим полам.

\* –  $p < 0,05$  (критерий Вальда-Вольфовитца).

Известно, что повышение уровня ацетилирования гистонов в мозге при введении взрослым животным блокаторов гистоновых деацетилаз улучшает обучение (Levenson J.M. et al., 2004; Yeh S.-H. et al., 2004; Vecsey C.G. et al., 2007). К аналогичным результатам приводит высокий уровень материнского ухода в первую неделю жизни (Bredy T.W. et al., 2003). В гиппокампе взрослого потомства самок крыс с высоким уровнем материнского ухода наблюдается повышенный уровень ацетилирования гистона H3 (Weaver I.C.G. et al., 2004).

В нашей работе при многократных инъекциях вальпроата натрия была выявлена различная чувствительность самцов и самок потомства мышей к блокаде гистоновых деацетилаз в первую неделю жизни. Число предпочитающих запах мяты обученных самцов в группе «вальпроат многократный» было значимо выше, чем необученных (Рисунок 6А). Подобного различия у самок не наблюдалось. Эти результаты могли свидетельствовать о восстановлении вальпроатом уровня обучения у самцов до исходного значения, характерного для интактных мышат линии 129Sv и сниженного различными манипуляциями с детенышами в раннем постнатальном периоде (депривацией от матери, введением физраствора). У самок положительное влияние на раннее обонятельное обучение наблюдалось при многократном введении физраствора (Рисунок 6Б).

Эти результаты могли быть обусловлены половыми различиями в уровне ацетилирования гистонов и в эпигенетических процессах в мозге самцов и самок на раннем этапе развития (Tsai H. et al., 2009; Matsuda K.I. et al., 2012).

Полученные нами максимальные средние значения ацетилирования гистона H3 наблюдались в группах «интактные» и «вальпроат многократный». Эти данные соответствовали результатам раннего обонятельного обучения самцов. Максимальная результативность раннего обучения наблюдалась в группе «интактные» и у самцов в группе «вальпроат многократный» (Рисунки 4 и 6), что говорит о прямой связи уровня ацетилирования гистона H3 в мозге мышей в раннем онтогенезе и результативности раннего обонятельного обучения с материнским подкреплением. Такая закономерность была показана впервые.

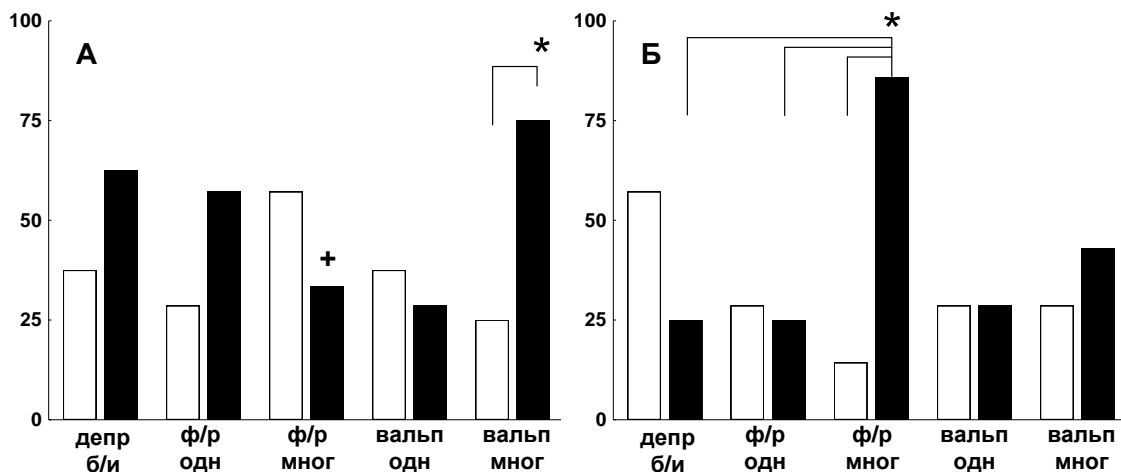


Рис. 6. Число мышат первого поколения (F1), предпочитающих тестовый отсек (%): А – самцы, Б – самки. Белые столбики – контроль, черные – обучение. \* –  $p < 0,05$ . Крестом обозначены межполовые различия ( $p < 0,05$ ) (непараметрический критерий  $\chi^2$ ).

Многочисленное введение вальпроата натрия благоприятно сказывалось также на координационных навыках при тестировании достижения опоры перекладины и поиска гнезда в тесте достижения гнезда (Рисунок 7). Это соответствует литературным данным о положительном влиянии вальпроата не только на когнитивные, но и на моторные функции. Известно, что использование блокаторов гистоновых деацетилаз ослабляет выраженность когнитивных и моторных нарушений, характерных для такого нейродегенеративного заболевания, как болезнь Хантингтона (Abel T., Zukin R.S., 2008).

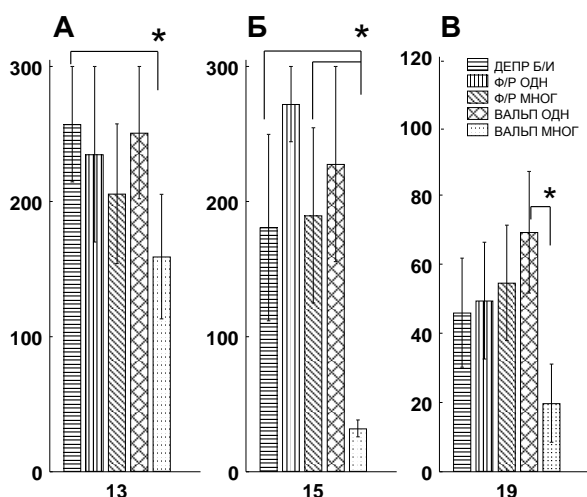


Рис. 7. Длительность достижения гнезда на 13ПС и 15ПС у самцов (А) и самок (Б) и достижения опоры перекладины на 19ПС у самцов (В) (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка) (сек). \* –  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Результаты теста переноса на 5-6ПС показали, что самки осуществляли перенос детенышей различных групп в гнездо с одинаковой скоростью. По-видимому, поведение самок в данном тесте принадлежало к наиболее консервативной форме материнского поведения, проявление которой не зависело от состояния детенышей, либо данный тест оказался недостаточно чувствителен к изменениям уровня материнского ухода, происходившим в ответ



на экспериментальные воздействия, производимые нами в раннем постнатальном периоде мышей первого поколения (F1).

Структура материнского поведения самок всех экспериментальных групп была организована сходным образом. После возвращения самок в домашнюю клетку с потомством и обследования ими клетки, в том числе детенышей в гнезде, самки возвращали выложенных из гнезда детенышей обратно, собирали их вместе, приводя в порядок гнездовой материал, и начинали вылизывать детенышей, после чего принимали практически неподвижную позу кормления, нависая над пометом. Кормление периодически сопровождалось непродолжительными эпизодами вылизывания потомства и занимало большую часть 30-минутного наблюдения.

Материнское поведение интактных самок соответствовало поведению, характерному для самок линии 129Sv, описанному в литературе. В работе Шампань (Champagne F. et al., 2007) продолжительность кормления составляет у самок 70% от общего времени наблюдения, а по нашим данным - 58,9%.

Депривация от матери (группа «депривация б/и») по нашему протоколу не оказывала долговременного влияния на поведенческий фенотип выросших самок. Их поведение не отличалось от поведения самок, не подвергавшихся в раннем постнатальном периоде депривации (интактных самок F0) (Рисунок 8).

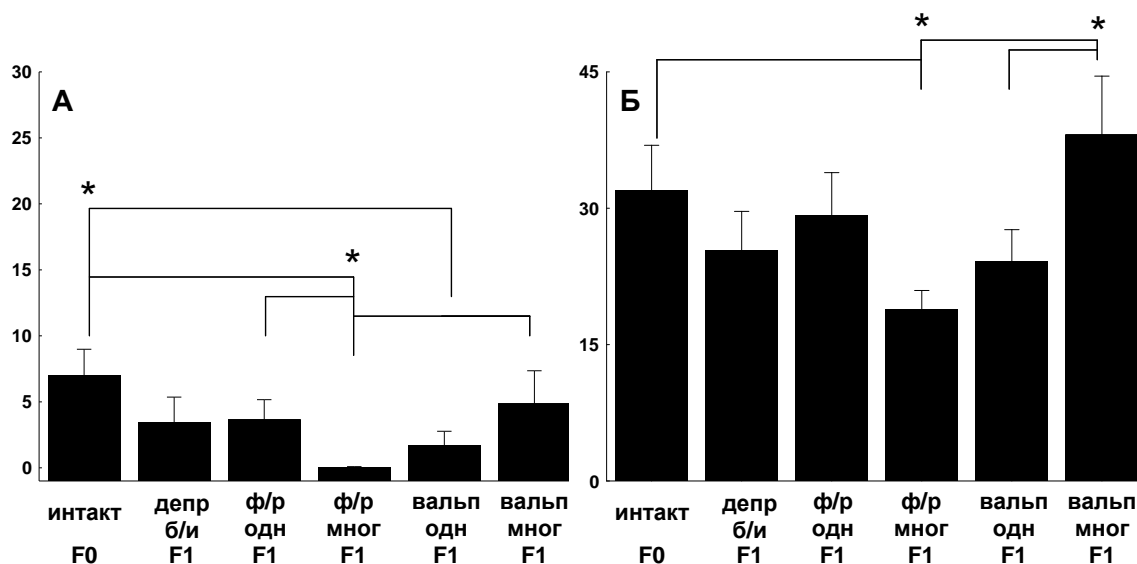


Рис. 8. Показатели актов и категорий поведения, связанного с потомством: А – продолжительность актов «кормление с чисткой» (%), Б – суммарное число актов из категории «поведение, связанное с потомством» (%) (среднее значение ± стандартная ошибка). \* –  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Несмотря на снижение уровня ацетилирования гистона H3 в мозге детенышей после депривации от матери, у них наблюдалось воспроизведение материнского поведенческого

фенотипа интактных самок. Это могло быть обусловлено недостаточной силой вмешательства, поскольку эффектом долговременной депривации от матери в раннем постнатальном периоде, как правило, является снижение уровня материнского ухода у выросших самок (Lovic V. et al., 2001).

Полученные результаты устойчивости материнского поведения выросших самок к ежедневной 60-минутной депривации, которой они подвергались в детстве, дают возможность сделать заключение о том, что наблюдаемые изменения в материнском поведении у выросших самок, подвергавшихся различным инъекциям, были обусловлены характером инъекций и вводимыми веществами. Анализ материнского поведения выявил долговременные изменения материнского поведенческого фенотипа в ответ на экспериментальные воздействия в раннем постнатальном периоде. Многократное введение физраствора с ЗПС по 6ПС привело к снижению уровня ацетилирования гистона H3 в мозге детенышей (Рисунок 5), а во взрослом возрасте – к снижению уровня материнского ухода у самок линии 129Sv по сравнению с интактными самками (Рисунки 8, 9).

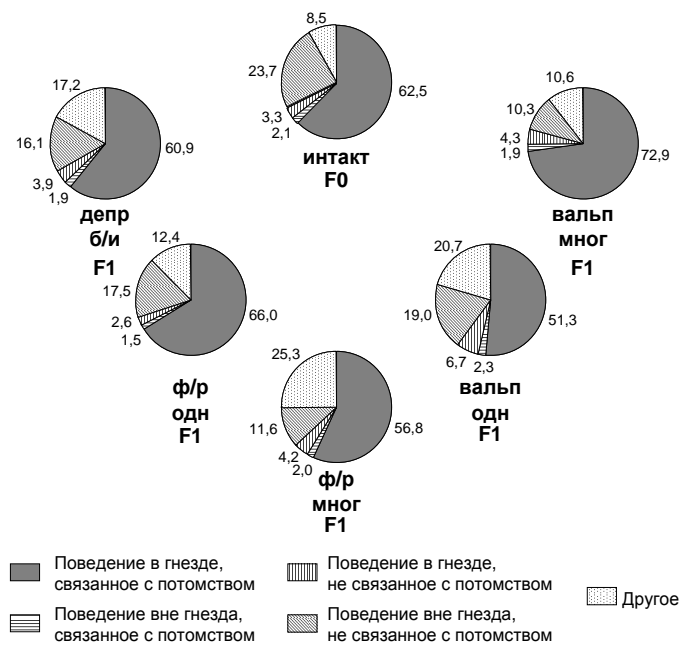


Рис. 9. Диаграммы процентной доли продолжительности актов категорий поведения самок (%) (среднее значение).

Многократное введение вальпроата натрия привело к компенсации снижения уровня материнского ухода и ацетилирования гистона H3 в мозге детенышей в результате депривации и инъекций физраствора до уровня, наблюдаемого у интактных животных (Рисунки 5, 8, 9). В частности, продолжительность актов поведения самок в гнезде, связанного с потомством, у интактных самок составляла 62,5%. У самок из группы «физраствор многократный» она снижалась и составляла 56,8%, а в группе «вальпроат многократный» она возростала и достигала 72,9% (Рисунок 9). Полученные нами результаты увеличения уровня материнского

ухода в ответ на многократные инъекции вальпроата натрия в раннем онтогенезе согласуются с литературными данными (Francis D. et al., 1999; Weaver I.C.G. et al., 2004).

Процедура депривации не повлияла на уровень тревожности самцов в тестах ОП и ПКЛ (Рисунок 10). Ранее было показано, что депривация потомства мышей от матери в течение 180 мин на 0-13ПС, как и процедура 15-минутного хэндлинга в эти же сроки не сказывается на уровне тревожности взрослых самцов потомства мышей линии 129Sv (Millstein R.A, Holmes A., 2007). Многократное введение вальпроата привело к формированию поведенческого фенотипа с повышенным уровнем тревожности (Рисунок 10).

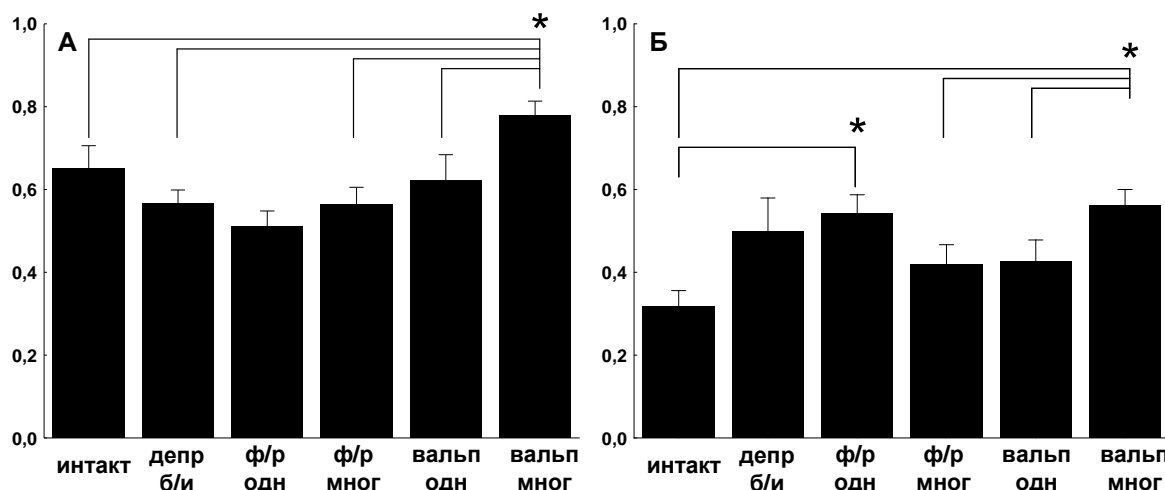


Рис. 10. Длина траектории, отнесенная к общей длине траектории (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка): А – в периферической зоне Открытого поля, Б – в закрытых рукавах Приподнятого крестообразного лабиринта. \* –  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Наши результаты свидетельствуют о том, что процедура депривации в детстве повлияла на результаты обучения взрослых самцов в модели УРЗ. Она приводила к снижению уровня замирания после обучения условнорефлекторному замиранию на обстановку во всех группах, кроме интактной, что может свидетельствовать о возможном нарушении обучения.

Эти результаты говорят также об отсутствии влияния введения вальпроата в 1-ю неделю жизни на данный вид обучения (Рисунок 11).

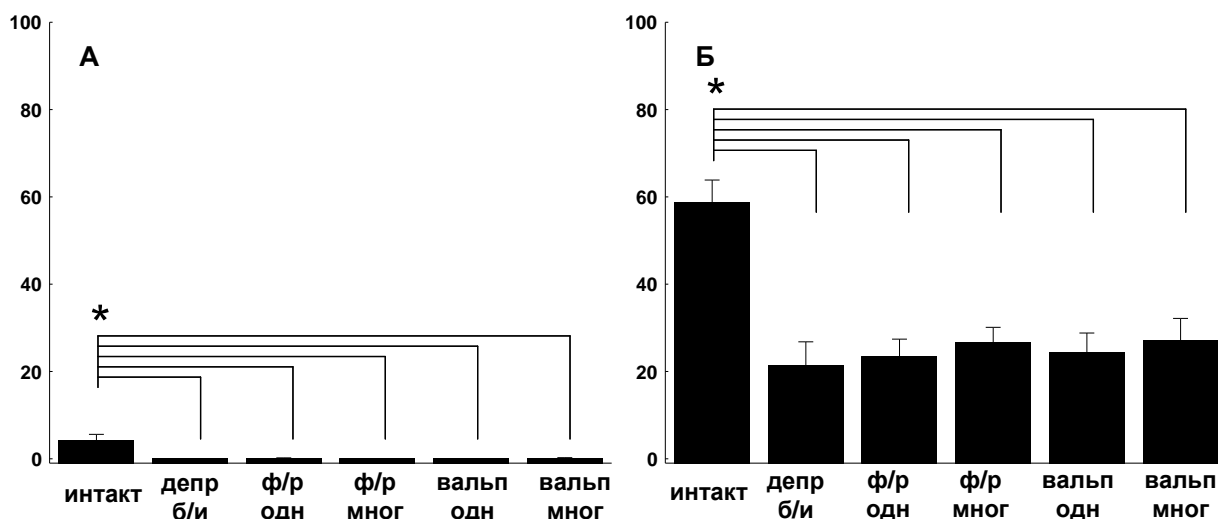


Рис. 11. Процент замирания (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка): А – в течение 30 сек после последнего удара током, Б – в течение 5 минут при тестировании на обстановку спустя 24 ч. \* –  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Отсутствие влияния в нашем исследовании введения вальпроата натрия в раннем онтогенезе на уровень обучения взрослых животных в модели УРЗ показано впервые и не противоречит литературным данным. Известно, что облегчающее действие блокаторов гистоновых деацетилаз на обучение наблюдается при небольшом интервале времени между введением блокатора и обучением (Yeh S.-H. et al., 2004; Vecsey C.G. et al., 2007; Kwon B., Hourpt T.A., 2010). В нашем же исследовании он составил более 3-х месяцев. Известно также, что повышенный уровень обучения, наблюдаемый у взрослого потомства самок с высоким уровнем чистки и вылизывания детенышей и пребывания в позе кормления, продемонстрирован в моделях, не связанных со значительным воздействием стресса (Liu D. et al., 2000), в отличие от использованной нами модели УРЗ, чем также могли быть обусловлены отличия от полученных нами данных.

Показатель верного чередования в Т-лабиринте не отличался достоверно у самцов, принадлежащих к разным группам. Таким образом, на кратковременную пространственную память, оценивавшуюся нами в Т-лабиринте, не влияло ни одно из производившихся нами в раннем онтогенезе воздействий.

Полученные нами результаты поведения взрослых самцов в батарее тестов говорят о долговременных изменениях эмоционального, но не когнитивного профиля животных в ответ на введение вальпроата натрия, которое усиливало тревожность взрослых животных. Эта манипуляция была в нашей модели аналогом воспитания детенышей самками с высоким уровнем материнского ухода, поскольку оба эти воздействия увеличивают уровень ацетилирования гистонов в мозге детенышей. Известно, что самцы крыс, потомки матерей с высоким уровнем ухода за потомством характеризуются сниженной тревожностью и

повышенным уровнем ацетилирования гистона H3 в области промотора гена глюкокортикоидных рецепторов (Weaver I.C.G. et al., 2006), поэтому мы предполагали, что под воздействием инъекций вальпроата натрия может произойти снижение уровня тревожности. Однако полученные нами результаты свидетельствовали о высокой тревожности животных из группы «вальпроат многократный», что не соответствовало этим литературным данным.

В связи с этим следует отметить, что в процитированном выше исследовании была использована модель вариации уровня материнского ухода о потомстве у крыс, в которой использовали матерей, принадлежащих по уровню материнского ухода (вылизывания/груминга и позы кормления) к крайним точкам нормального распределения. Однако в этой же модели, но с использованием мышей, было показано, что тревожность самцов, воспитываемых самками линии C57Bl/6 с высоким уровнем материнского ухода, либо с низким его уровнем, не различается, а изменения эмоционального профиля наблюдаются лишь у взрослых самок F1 (Pedersen C.A. et al., 2011).

В нашем исследовании были использованы животные линии 129Sv, не проходившие предварительный отбор по этим показателям. В работе, проведенной также без предварительного отбора самок по уровню их материнского ухода, было показано, что выращивание мышат линии 129Sv самками C57Bl/6, которые демонстрировали высокий уровень вылизывания и груминга, не приводит к изменению уровня тревожности взрослых мышей линии 129Sv обоих полов (Curley J.P. et al., 2010).

Наблюдаемое в нашем исследовании повышение уровня тревожности, вероятно, обусловлено не изменением уровня материнского ухода в раннем онтогенезе, поскольку скорость переноса детенышей различных групп в гнездо не отличалась, а непосредственным действием вальпроата натрия на механизмы, не связанные напрямую с увеличением уровня ацетилирования в мозге: в первую неделю жизни его введение не привело к увеличению уровня ацетилирования гистона H3 в мозге относительно уровня ацетилирования у интактных животных. Введение вальпроата натрия в первую неделю жизни помимо блокирующего действия на гистоновые деацетилазы, по-видимому, запускало другие механизмы, которые могли быть связаны с изменением как активности ГАМК-эргической системы (Johannessen C.U., Johannessen S.I., 2003), так и уровня метилирования ДНК (Detich N. et al., 2003; Milutinovic S. et al., 2007).

Результаты раннего обонятельного обучения мышат поколения F2 свидетельствуют о том, что экспериментальные воздействия, производившиеся в раннем постнатальном периоде с детенышами первого поколения (F1), оказывали отставленное действие на уровень раннего обучения детенышей в следующем поколении (Рисунок 12). Дизайн нашего исследования и анализ сравнения материнского поведения самок F0 и самок F1 после однократного введения

им вальпроата в детстве указывает на возможность влияния вальпроата на уровень ацетилирования гистона H3 в ооцитах самок F1, подвергавшихся его инъекциям. Косвенным образом в пользу этого говорят данные о значении уровня ацетилирования гистона H3 в постнатальном оогенезе у самок мышей (Kageyama S. et al., 2007). Однако эта гипотеза требует дальнейшего самостоятельного исследования.

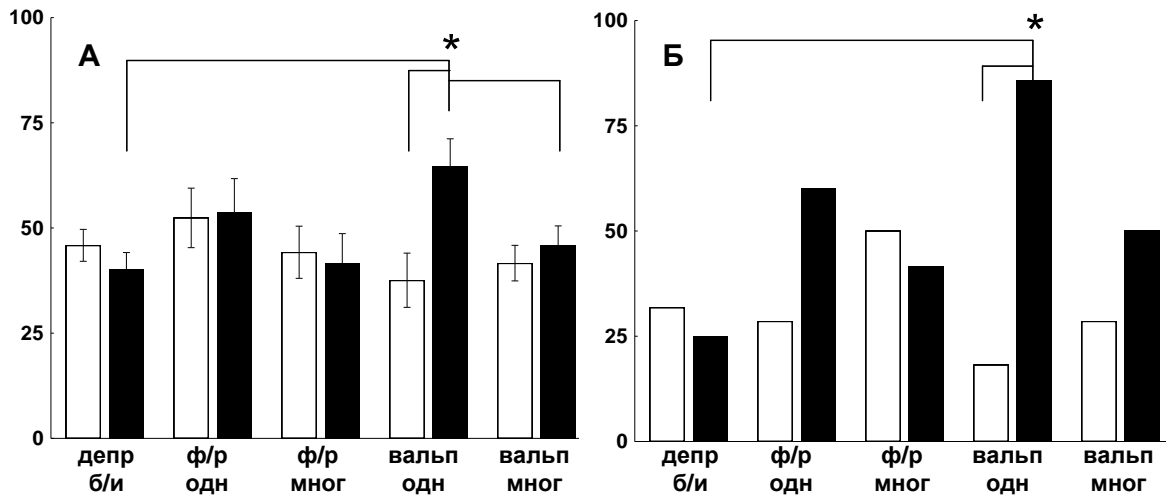


Рис. 12. Процентная доля времени, проведенного над тестовым отсеком (% от 300 сек) мышатами женского пола второго поколения (F2) (среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка) (А) и число мышат женского пола второго поколения (F2), предпочитающих тестовый отсек (%) (Б). Белые столбики – «контроль», черные – «обучение». \* –  $p < 0,05$  (А: U-критерий Манна-Уитни, Б: непараметрический критерий  $\chi^2$ ).

Вопреки распространенному мнению, согласно которому мыши линии 129Sv характеризуются низким уровнем материнского ухода и слабыми когнитивными способностями, нами было продемонстрировано, что в действительности уровень материнского ухода самок этой линии, как и уровень раннего обонятельного обучения, был достаточно высок в отсутствие вмешательства в отношения мать-детеныш в раннем онтогенезе. Однако при наличии такого вмешательства (депривация потомства от самок, однократные и многократные инъекции физраствора) происходило снижение показателей уровня материнского ухода и раннего обучения, т.е. формирование поведенческого фенотипа мышей линии 129Sv, соответствующего общепринятым представлениям. Многократное введение вальпроата натрия приводило к формированию поведенческого фенотипа животных, характерного для интактных мышей линии 129Sv, что могло свидетельствовать о коррекции изменений, происходивших в ответ на вмешательство в отношения матери с потомством.

Ниже приведена таблица, в которой задачи настоящего исследования сопоставлены с исходными рабочими гипотезами о предполагаемых результатах и полученными нами данными.

Табл. 2. Сводная таблица ожидаемых и полученных результатов.

Задачи исследования		Ожидаемые результаты и обоснование	Соответствие полученных результатов ожидаемым
раннее обучение	депривация от матери (F1)	ухудшение: предположительно посредством снижения уровня материнского ухода и уровня ацетилирования гистонов	+
	многократное введение вальпроата натрия (F1)	улучшение: посредством увеличения уровня ацетилирования гистонов	+
	депривация от матери (F2)	ухудшение: предположительно посредством снижения уровня материнского ухода, а затем посредством воспроизведения стиля материнского поведения у самок F1	+
	многократное введение вальпроата натрия (F2)	улучшение: предположительно посредством увеличения уровня материнского ухода у самок F1	- : отсутствие долговременного эффекта многократного введения вальпроата
материнское поведение	депривация от матери (F1)	ухудшение: посредством снижения уровня ацетилирования гистонов	- : отсутствие эффекта предположительно из-за недостаточной силы 60-минутной депривации
	многократное введение вальпроата натрия (F1)	улучшение: посредством увеличения уровня ацетилирования гистонов	+
фенотип взрослых самцов	депривация от матери (F1)	увеличение тревожности: предположительно посредством снижения уровня материнского ухода	- : отсутствие эффекта предположительно из-за недостаточной силы 60-минутной депривации
	многократное введение вальпроата натрия (F1)	снижение тревожности: предположительно посредством увеличения уровня ацетилирования гистонов во взрослом возрасте	- : увеличение тревожности предположительно из-за вовлечения других механизмов

Примечания: «+» обозначено соответствие ожидаемым данным, «-» обозначено несоответствие ожидаемым данным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа была продиктована необходимостью исследования вклада эпигенетических механизмов в долговременную модификацию поведения мышей 129Sv, определяемую условиями выращивания потомства. Для этого были использованы модель вмешательства в отношения мать-детеныш путем депривации потомства от матери, а также модель блокады гистоновых деацетилаз в раннем постнатальном периоде у мышей линии 129Sv. Эти манипуляции привели к изменению поведенческого фенотипа животных на ряде уровней: в раннем постнатальном периоде согласно результатам раннего обонятельного обучения, во взрослом возрасте согласно изменению уровня тревожности у самцов и уровня материнского ухода у самок, а также в следующем поколении потомства.

Введение физраствора, которое первоначально рассматривалось нами как стандартная контрольная процедура, оказалось важным эпигенетическим фактором и требует дальнейшего самостоятельного исследования.

Также предстоит более детальный анализ молекулярно-клеточных перестроек в мозге взрослых животных после наших воздействий в раннем онтогенезе, а также в мозге животных следующих поколений.

## **ВЫВОДЫ**

1. Модификация уровня ацетилирования гистонов в мозге мышей линии 129Sv в первую неделю жизни оказывает влияние на формирование их поведенческого фенотипа в двух поколениях.
2. Депривация от матери в 1-ю неделю жизни приводит к ухудшению результатов раннего обонятельного обучения с имитацией материнского груминга в качестве подкрепления у потомства мышей линии 129Sv и снижению уровня ацетилирования гистона H3 в мозге 7-суточных мышат.
3. Процедура многократных инъекций блокатора гистоновых деацетилаз в 1-ю неделю жизни приводит к избирательному восстановлению уровня обучения самцов, а процедура многократных инъекций физиологического раствора – самок.
4. Многократное введение блокатора гистоновых деацетилаз в 1-ю неделю жизни приводит к увеличению уровня тревожности и не влияет на когнитивные способности взрослых самцов по сравнению с животными интактной группы.
5. Многократное введение физраствора в 1-ю неделю жизни приводит к снижению уровня материнского ухода мышей линии 129Sv в условиях домашней клетки по сравнению с интактными самками, а многократное введение блокатора гистоновых деацетилаз приводит к восстановлению исходного уровня.
6. Однократное введение блокатора гистоновых деацетилаз, производившееся в раннем постнатальном периоде самкам первого поколения, не влияет на их уровень раннего обучения, но оказывает отложенное положительное действие на обучение самок следующего поколения.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ОП – Открытое поле;

ПКЛ – Приподнятый крестообразный лабиринт;

ПС – постнатальные сутки;

УРЗ – условнорефлекторное замирание;

HDAC – histone deacetylase (гистоновая деацетилаза).



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ*

- 1) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Депривация потомства мышей 129Sv от матери в раннем онтогенезе ухудшает обонятельное обучение с имитацией материнского груминга // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. – № 5. – С. 724-726.
- 2) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое действие блокатора гистоновых деацетилаз вальпроата натрия на обонятельное обучение мышей линии 129Sv в раннем постнатальном периоде // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99. – № 2. – С. 212-220.
- 3) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Введение блокатора гистоновых деацетилаз в неонатальном онтогенезе меняет эмоциональность взрослых самцов мышей линии 129Sv // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156. – № 11. – С. 561-564.

### *Публикации в других изданиях*

- 4) Буренкова О.В., Зоц М.А., Соловьева Н.А., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Материнский уход как эпигенетический фактор долговременной модификации поведения мышей // Материалы XXI съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова, Калуга, 2010, с. 92.
- 5) Александрова Е.А., Соловьева Н.А., Лазуткин А.А., Иванова А.А., Зоц М.А., Буренкова О.В., Зарайская И.Ю. Эпигенетические механизмы в процессах системогенеза // Материалы Первой международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», Сафага, Египет, 2010, с. 8-10.
- 6) Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zarayskaya I.Y. Early postnatal learning and development of adult maternal behavioral phenotypes in 129Sv mice following blockade of histone deacetylase // Proceedings, 8<sup>th</sup> IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011.
- 7) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Модель формирования измененного материнского поведенческого фенотипа лабораторных мышей // Материалы V Всероссийской конференции по поведению животных, Москва, 2012, с. 23.
- 8) Буренкова О.В., Иванова А.А., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Анализ материнского поведения лабораторных мышей с помощью видеорегистрации и поактовой сегментации взаимодействий мать-потомство в домашней клетке // Материалы Международной научно-практической конференции «Экология, эволюция и систематика животных», Рязань, 2012, с. 202-203.

- 9) Burenkova O.V., Aleksandrova E.A., Zarayskaya I.Y. Single injection of histone deacetylase inhibitor exerts long-term cross-generational effects on early olfactory learning // Proceedings, 8th FENS Forum, Barcelona, Spain, 2012, p.118.04.
- 10) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Влияние блокады гистоновых деацетилаз на формирование раннего постнатального и взрослого материнского поведенческого фенотипа мышей линии 129Sv // Материалы Второй международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», Бодрум, Турция, 2012, с. 26-29.
- 11) Александрова Е.А., Лазуткин А.А., Иванова А.А., Буренкова О.В., Зарайская И.Ю. Эпигенетические механизмы в процессах системогенеза // Материалы Пятой международной конференции по когнитивной науке, Калининград, 2012, т.1, с. 199-200.
- 12) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Роль эпигенетических стимулов в формировании измененного материнского поведенческого фенотипа мышей линии 129Sv // Материалы XXII съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова, Волгоград, 2013, с. 84.
- 13) Александрова Е.А., Буренкова О.В., Зарайская И.Ю. Эпигенетические механизмы в формировании поведенческого фенотипа мышей // Материалы XXII съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова, Волгоград, 2013, с. 17-18.
- 14) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Гендер-зависимое транс-генерационное действие эпигенетических стимулов на формирование фенотипа лабораторных мышей линии 129Sv // Материалы Третьей международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», Лимассол, Кипр, 2013, с. 25-28.
- 15) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Модификация материнского поведенческого фенотипа мышей линии 129Sv под влиянием блокады гистоновых деацетилаз в раннем постнатальном периоде // Материалы IV Конференции молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология», Москва, 2013, с. 6-7.
- 16) Буренкова О.В., Александрова Е.А., Зарайская И.Ю. Влияние блокады гистоновых деацетилаз на формирование раннего постнатального и взрослого материнского поведенческого фенотипа мышей линии 129Sv // Труды научного совета по экспериментальной и прикладной физиологии «Экспериментальная и прикладная физиология». Судаков К.В. и др. (ред.). М., НИИНФ РАМН, 2013. Т.18. 282 с., с. 165-167.