



ВЛИЯНИЕ СТЕРЕОТИПНЫХ ФОРМ АКТИВНОСТИ НА ПАРАМЕТРЫ ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ В СТАНДАРТНЫХ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ТЕСТАХ

К. П. АВИМОВА¹⁾, Д. Б. САНДАКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

У лабораторных животных нередко формируется аномальное повторяющееся (стереотипное) поведение, которое может сказываться на физиологическом состоянии, а также искажать результаты поведенческих экспериментов. Стереотипное поведение и аномальный груминг, как правило, развиваются в субоптимальных условиях содержания и усиливаются со временем. Чтобы изучить возникновение стереотипных форм поведения у лабораторных мышей, дважды в течение 16 нед. анализировали их ночную активность и сопоставляли ее с поведением в стандартных поведенческих тестах «открытое поле», «норный тест», «подвешивание за хвост». Стереотипное поведение оказалось слабовыраженным, его общая продолжительность за 16 нед. снизилась с 8,2 до 1,0 %. Груминг, напротив, стал более длительным, увеличившись с 29,5 до 49,6 %. Ночной груминг коррелировал с латентным временем начала движения в тесте «открытое поле» и временем неподвижности в тесте «подвешивание за хвост». Выраженность и устойчивость стереотипного поведения и ночного груминга влияли на длительность груминга в тесте «открытое поле»: дольше остальных им занимались мыши с неустойчивым уровнем стереотипного поведения и мыши с низким уровнем ночного груминга. Кроме того, уровень ночного груминга влиял и на поведение мышей в тесте «подвешивание за хвост»: мыши с неустойчивым уровнем груминга были наиболее подвижны. Аномальная спонтанная активность может отражать неблагоприятное состояние подопытных животных, а оно, в свою очередь, может сказываться на поведении в тестовых условиях. Это необходимо учитывать при планировании экспериментов с животными.

Ключевые слова: груминг; спонтанное стереотипное поведение; лабораторные животные; открытое поле; норный тест; подвешивание за хвост; клеточное поведение.

Благодарность. Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук, доценту О. И. Губич за ценные замечания и поддержку, а также директору вивария БГУ С. М. Дронову за содействие в организации эксперимента.

Образец цитирования:

Авимова КП, Сандаков ДБ. Влияние стереотипных форм активности на параметры поведения мышей в стандартных поведенческих тестах. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2021;3:47–58. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-47-58>

For citation:

Avimova KP, Sandakov DB. The influence of the stereotypic forms of activity in mice behaviour in standard behavioural tests. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;3:47–58. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-47-58>

Авторы:

Ксения Петровна Авимова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Д. Б. Сандаков.
Дмитрий Борисович Сандаков – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Kseniya P. Avimova, student at the faculty of biology. bio.avimova@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0001-8768-4537>
Dmitry B. Sandakov, PhD (biology), docent; associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
d.sandakov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1648-0275>





THE INFLUENCE OF THE STEREOTYPIC FORMS OF ACTIVITY IN MICE BEHAVIOUR IN STANDARD BEHAVIOURAL TESTS

K. P. AVIMOVA^a, D. B. SANDAKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: K. P. Avimova (bio.avimova@bsu.by)

Laboratory animals often develop abnormal repetitive (stereotypic) behaviour that can influence both physiology and behavioural test results. Such abnormal behaviours usually develop in suboptimal environment and increase over time. To explore the development of stereotypic forms of activity night home-cage behaviour of laboratory mice was analysed and collated with the behaviour in open field (OFT), hole-board (HBT) and tail suspension (TST) tests twice within 16 weeks. Mice expressed few stereotypies and their duration lessened over time from median 8.2 to 1.0 %. In contrast, grooming behaviour increased significantly from 29.5 to 49.6 %. Home-cage grooming correlated with the latency of locomotion start in OFT and with the immobility time in TST. Intensity and stability of stereotypic activity and grooming influenced the duration of grooming in OFT: the mice with unstable stereotypies groomed more than others, and mice with the lowest home-cage grooming level also groomed in OFT the most. Intensity and stability of night grooming influenced the behaviour in TST: the mice with unstable level of grooming were the most mobile in this test. Abnormal home-cage activity may indicate impaired welfare, and that, in turn, may affect test activity, so researchers need to keep it in mind when planning animal behaviour experiments.

Keywords: grooming; spontaneous stereotypies; home-cage behaviour; tail suspension test; open field test; hole-board test; laboratory animals.

Acknowledgements. The authors thank to PhD (biology), docent O. I. Hubich for valuable comments and support, as well as to director of the vivarium of the Belarusian State University S. M. Dronov for the help for holding our experiment.

Введение

Стереотипное поведение (инвариантные, повторяющиеся, бесцельные и бессмысленные действия человека или животного [1]) является распространенным типом поведения у животных, используемых в биомедицинских исследованиях, и считается аномальным. К нему относят двигательные стереотипии (пробежки, рытье субстрата, глотание прутьев клетки) и груминг (хотя нейрофизиологические основы последнего несколько отличаются от таковых для локомоторных стереотипий и часто его выделяют как вид иного повторяющегося поведения [2]). По данным некоторых исследований, 50 % лабораторных мышей *Mus musculus* проявляют стереотипное поведение в стандартных условиях содержания [3, p. 88]. В отдельных линиях стереотипии развивали 98 % наблюдавшихся животных [4], что может быть обусловлено генетической предрасположенностью к такому поведению [3, p. 93–94; 5].

Чаще стереотипное поведение связывают с неоптимальными условиями содержания: тесными клетками (хотя это не всегда подтверждается опытами) [3, p. 103–104; 6–8], несоответствующей биологическим потребностям животных [9; 10] или бедной сенсорными стимулами средой [11], одиночным содержанием [3, p. 135; 12–14], в том числе в раннем периоде развития [6; 15]. Некоторые локомоторные стереотипии объясняют попытками выбраться из клетки [16], т. е. фрустрированной потребностью в исследовательском поведении (например, когда животные чувствуют запах конспецификов поблизости) [3, p. 98].

Стереотипное и иное аномальное повторяющееся поведение также связывают с аномальной физиологией (которая может быть и причиной, и следствием стереотипий), в том числе с изменениями метаболизма мозга, воспалительными реакциями [3, p. 215; 17–21], повышенной реактивностью при стимуляции [2], ростом общей двигательной активности, персеверациями и пр. [3, p. 133, 136–141, 209; 14]. Некоторые авторы полагают, что устойчивые стереотипии, сопровождающиеся аномальным метаболизмом мозга, в частности дофаминергической системы в базальных ядрах (см., например, [3, p. 130]), приводят к искажению результатов поведенческих тестов, так как животные неестественно активны, не могут сделать правильного выбора в соответствующих тестах и т. п. [13].

Аномальный груминг часто связывают с депрессией, а для этого состояния характерны меньшая подвижность, быстрый отказ от борьбы в аверсивных условиях [14; 22].

Исследователи аномального поведения животных полагают, что стереотипии могут влиять на прохождение поведенческих тестов и сказываться на итогах экспериментов. Работы в этой области, к сожалению, демонстрируют противоречивые результаты. Нередко их невозможно воспроизвести даже в рамках одной лаборатории.



Некоторые виды грызунов, например полосатые мыши рода *Rhabdomys*, вырабатывают стереотипии в раннем возрасте, и их выраженность не меняется со временем [23], хотя чаще стереотипии развиваются в полную силу только спустя какой-то период [3, p. 9].

В настоящем исследовании проверялось, изменяется ли у лабораторных мышей выраженность стереотипий и груминга при парном содержании в течение 16 нед. и коррелирует ли выраженность стереотипных форм поведения с активностью животных в трех стандартных тестах – «открытое поле», «норный тест», «подвешивание за хвост».

Материалы и методы исследования

Животные и условия содержания. Изначально в эксперименте участвовали 20 самцов беспородных лабораторных мышей, впоследствии 4 особи выбыли по разным причинам, и их данные не учитывались.

Все животные содержались попарно в пластиковых клетках размером 30 × 20 × 14 см, в качестве субстрата использовались древесные опилки. Смена субстрата – раз в неделю, не позднее чем за 5 сут до тестирования. Кормление – *ad libitum*, смена воды – раз в 3 дня, режим освещения естественный.

Общая схема эксперимента. Мышей рассадил по клеткам и через 1 нед. записали их ночную активность (в течение 2 ночей), спустя еще 1 нед. в помещении вивария провели поведенческие тесты «открытое поле», «норный тест» и «подвешивание за хвост» (по одному в день с 9:15 до 13:00). Через 16 нед. после рассадки по клеткам запись ночной активности и поведенческие тесты повторили в той же последовательности.

Регистрация спонтанного поведения. Для записи спонтанного поведения выбрали ночное время, так как грызуны, являясь преимущественно ноктуральными животными, наиболее активны в первые часы после наступления темноты и перед восходом как при фиксированном, так и при естественном режиме освещения [24–26]. В обеих регистрациях фиксировались первые 15 мин 2, 3, 4 и 5-го часов после захода солнца [27]. Время захода определялось по данным Белгидромета, эксперимент проводился в 2019 г.

В первой регистрации для записи использовалась камера GoPro Hero 3 (США). Освещение – тусклый красный свет от фотографического фонаря (мыши не чувствительны к такому свету, и он допускается для наблюдения и манипуляций с грызунами в темновую фазу [28]). Во второй регистрации поведение записывалось с помощью камеры с инфракрасной подсветкой.

Для анализа типов активности применялся метод *one-zero sampling* с интервалом 15 с. Для стереотипного поведения были установлены следующие критерии: если оно связано с продолжительными действиями (груминг, глодание и т. п.), то в одном 15-секундном промежутке должно длиться 3 с и более, если же связано с законченными действиями (пробежки по кругу, верчение, сальто), то должно совершаться не менее 3 раз подряд с перерывом не более 3 с [27].

Выделялись и анализировались следующие виды поведения (в том числе стереотипного):

- неактивность – животное лежит неподвижно, изредка может вздрагивать или перемещаться, переворачиваться (но не дольше 5 с);
- активность – животное активно, однако это не стереотипная активность;
- пробежки – животное бежит по дну клетки по фиксированному маршруту;
- кружение – животное кружит по решетке, цепляясь за прутья всеми конечностями;
- лазанье – животное лазит по решетке по шаблону, фиксированному маршруту, цепляясь за прутья минимум двумя конечностями;
- глодание – животное стоит на задних конечностях, передними держится за прутья, которые пропускает между диастемой, может передвигаться вдоль прутьев и одновременно глодать их;
- груминг – животное умывает, вылизывает себя или вторую мышь в клетке;
- рытье – животное роет субстрат передними конечностями или носом.

По результатам наблюдений оценивались общая активность (отношение любой активности к общему времени наблюдений), стереотипная активность (отношение стереотипной активности всех типов ко времени общей активности), груминг (отношение груминга ко времени общей активности).

Открытое поле. Для теста использовалась установка размером 50 × 50 см с квадратами 10 × 10 см и высотой стенок 40 см (без крышки). Мыши помещались в ближний к камере угол поля. Продолжительность теста составляла 4 мин (так как требовалось проанализировать не только стрессовое поведение, которое, как считается, проходит через 2 мин теста, но и оценить активность животных в целом). Мышь, которая участвовала в тесте первой, по окончании процедуры возвращалась не в домашнюю клетку, а отсаживалась в новую, и только после того как тест проходила вторая мышь из той же клетки, обе мыши возвращались в домашнюю клетку. Перед началом тестирования установка протиралась чистой влажной салфеткой и вытиралась насухо, а после каждой мыши очищалась от экскрементов и снова дважды протиралась чистой влажной салфеткой и вытиралась насухо.



Анализировались горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность, латентное время начала движения, количество посещенных периферических и внутренних секторов (квадратов) и их сумма как длина пройденного пути, стрессовое поведение (замирание без движения и латентное время начала движения), груминг. В случаях, когда мышь сидела на одном месте, но при этом двигала головой, приносивалась и вытягивалась, такое поведение оценивалось как горизонтальная двигательная активность (исследовательское поведение). Двигательная активность вычислялась как сумма горизонтальной и вертикальной двигательной активности.

Норный тест. Использовалось стандартное 16-луночное пластиковое поле размером 50×50 см (диаметр лунок – 3 см), установленное на высоте приблизительно 1 м. Мышь сажалась в центр поля, длительность теста составляла 3 мин. По окончании процедуры животное временно отсаживалось в новую клетку, после того как тест проходила вторая мышь из той же клетки, обе мыши возвращались в домашнюю клетку. Перед первым и после каждого животного установка очищалась аналогично тому, как это делалось в предыдущем тесте.

При анализе фиксировались количество заглядываний в лунки, количество повторных заглядываний и число непосещенных лунок.

Подвешивание за хвост. Для этого теста мыши прикреплялись лейкопластырем за хвост к краю стола головой вниз. Длительность теста составляла 6 мин, после чего животное отсаживалось в пустую клетку. В домашнюю клетку мыши возвращались, когда тест проходила вторая мышь из той же клетки. При анализе фиксировались латентный период первой неподвижности, суммарное время неподвижности, количество эпизодов неподвижности испытуемого животного.

Статистическая проверка гипотез. При статистической проверке гипотез выполняли следующее.

1. Вариационные ряды проверяли на нормальность распределения признаков (тест Шапиро – Уилка, утилита среды R – *shapiro.test*¹).

2. Повторные измерения проводили с использованием критерия Вилкоксона для зависимых выборок (для всех типов распределения), сравнение более чем двух групп между собой – с применением ANOVA или критерия Краскела – Уоллиса (в зависимости от типа распределения) с поправками на множественные сравнения, для установления корреляции пользовались коэффициентом ранговой корреляции Спирмена (независимо от типа распределения) с поправкой Холма на множественную проверку гипотез (утилита среды R – *wilcox.test*², *aov*³, *kruskalmc* (пакет *pgirmess*)⁴, *corr.test* (пакет *psych*)⁵, *corrplot*⁶).

3. Визуальное представление распределения значений в группах и приблизительное сравнение разницы между ними осуществляли путем построения ящичковых диаграмм Тьюки с насечками, показывающих медианы, интерквартильные размахи, минимальные и максимальные значения, предполагаемые выбросы и 95 % доверительные интервалы медиан; если доверительные интервалы не перекрываются, то с 95 % вероятностью они различаются (это не формальный тест, а способ графического представления) [29, р. 60–63].

4. Построение диаграмм рассеяния и линии регрессии выполняли с помощью функции подгонки регрессионных моделей *lm* среды R .

Вычисления и построения диаграмм проводились в табличном процессоре *LibreOffice Calc 7.1* и среде R 4.0.4.

Результаты и их обсуждение

Структура ночной активности. Структура стереотипной и иной активности в обеих сериях представлена на рис. 1. У основной массы животных большую часть времени занимала нестереотипная активность, на втором месте по продолжительности – груминг. Самый часто встречающийся вид стереотипной активности – глотание, за ним – рытье. Некоторые виды активности проявлялись крайне мало

¹Shapiro – Wilk normality test [Electronic resource]. URL: <https://search.r-project.org/R/refmans/stats/html/shapiro.test.html> (date of access: 27.04.2021).

²Wilcoxon rank sum and signed rank tests [Electronic resource]. URL: <https://search.r-project.org/R/refmans/stats/html/wilcox.test.html> (date of access: 27.04.2021).

³Fit an analysis of variance model [Electronic resource]. URL: <https://search.r-project.org/R/refmans/stats/html/aov.html> (date of access: 27.04.2021).

⁴Giraudoux P. Pgirmiss & pgirbric. Miscellaneous functions for data handling and analysis in ecology [Electronic resource]. URL: <https://giraudoux.pagesperso-orange.fr/> (date of access: 27.04.2021) ; Pgirmiss: spatial analysis and data mining for field ecologists [Electronic resource]. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/pgirmiss/index.html> (date of access: 27.04.2021).

⁵Find the correlations, sample sizes, and probability values between elements of a matrix or data.frame [Electronic resource]. URL: <https://search.r-project.org/CRAN/refmans/psych/html/corr.test.html> (date of access: 27.04.2021).

⁶Corrplot: visualization of a correlation matrix [Electronic resource]. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/index.html> (date of access: 04.05.2021).



(лазание) или не наблюдались вовсе (кружение). Не все животные в принципе проявляли стереотипную активность (за исключением груминга, но он не всегда бывает именно стереотипным). Также можно заметить, что 3 мыши со временем стали осуществлять меньше груминга, остальные – больше.

У значительной части животных груминг стал занимать бóльшую долю в структуре ночной активности, но в стереотипном поведении не прослеживается общей тенденции.

Результат сравнения того, насколько изменились разные виды активности при первой и второй регистрациях, представлен на рис. 2.

Можно отметить тенденцию к снижению общей спонтанной активности (с 0,508 до 0,484 (медианное значение); парный тест Вилкоксона, $p > 0,05$) и стереотипной активности (с 0,082 до 0,010; парный тест Вилкоксона, $p > 0,05$). Доля груминга значимо увеличилась (с 0,296 до 0,497; парный тест Вилкоксона, $p > 0,01$).

Корреляции между спонтанной ночной активностью и результатами поведенческих тестов.

На данном этапе исследования проверялось, есть ли корреляции между спонтанной активностью и поведением мышей в тестах.

В первую очередь выполнялся корреляционный анализ между усредненными параметрами ночной активности и результатами поведенческих тестов (рис. 3). Было установлено, что уровень ночного груминга имеет отрицательную корреляцию ($r_s = -0,53$; $p < 0,05$) с латентным временем начала движения в тесте «открытое поле».

Как известно, латентное время начала движения – один из показателей стрессового поведения мышей. В нашем случае связь не очень тесная и имеет обратную направленность: мыши, которые больше занимались грумингом ночью, быстрее начинали двигаться в открытом поле, т. е. проявляли меньшую стресс-реактивность.

Раздельный корреляционный анализ результатов после 1-й и 16-й недель парного содержания животных выявил четкую положительную корреляцию между продолжительностью ночного груминга и суммарным временем неподвижности в тесте «подвешивание за хвост» после 1-й недели содержания ($r_s = 0,78$; $p < 0,01$).

Это может быть свидетельством того, что спонтанный груминг по меньшей мере частично обусловлен хроническим стрессом, который приводит к развитию депрессии.

Для более углубленного анализа взаимосвязи между спонтанным поведением и результатами поведенческих тестов мышей разделили на группы по критерию устойчивости стереотипной активности и груминга, взяв за основу их медианные значения после 1 нед. парного содержания.

По уровню стереотипий выделили три группы – А, В и С. Так, в группу А вошли мыши, чье стереотипное поведение не превышало 8,2 % и увеличилось не более чем наполовину от исходного уровня. Группу В составили мыши с неустойчивым стереотипным поведением, уровень которого, независимо от исходного, изменился более чем наполовину в любую сторону. В группу С включили мышей с уровнем стереотипий, превышавшим 8,2 % и снизившимся не более чем наполовину по отношению к исходному уровню.

Мыши группы В (с неустойчивыми стереотипиями) достоверно дольше малостереотипных мышей группы А занимались грумингом в открытом поле (критерий Краскела – Уоллиса с поправкой на множественные сравнения, $p < 0,05$). Так как груминг в первые минуты теста – показатель стресса, можно предположить, что спонтанные стереотипии в некоторой степени отражают стресс-реактивность, которая, в свою очередь, проявляется в условиях новизны.

По уровню груминга также выделили три группы – D, E и F. Так, в группу D вошли животные, уровень груминга которых не превышал 29,5 % и увеличился не более чем наполовину от исходного уровня. В группу E включили мышей, чей уровень груминга, независимо от исходного, изменился более чем наполовину в любую сторону. Группу F составили мыши, уровень груминга которых превышал 29,5 % и уменьшился не более чем наполовину.

Мыши с низким уровнем ночного груминга (группа D) достоверно больше остальных занимались грумингом в тесте «открытое поле» (критерий Краскела – Уоллиса с поправкой на множественные сравнения, $p < 0,05$). Это можно объяснить тем, что мыши группы D проявляли заметно больше стереотипного поведения, чем мыши группы E. Таким образом, вполне возможно, что на груминг в открытом поле больше влияет именно стереотипное поведение, а не ночной груминг.

В тесте «подвешивание за хвост» мыши с неустойчивым грумингом (группа E) двигались дольше остальных (наименьшее время неподвижности), также у них было меньшее количество эпизодов неподвижности, т. е. они реже останавливались (критерий Краскела – Уоллиса с поправкой на множественные сравнения, $p < 0,05$).

За 3 мес. стереотипное поведение уменьшилось у 11 из 16 мышей (рис. 4), а груминг, напротив, усилился у 13 из 16 мышей (рис. 5).

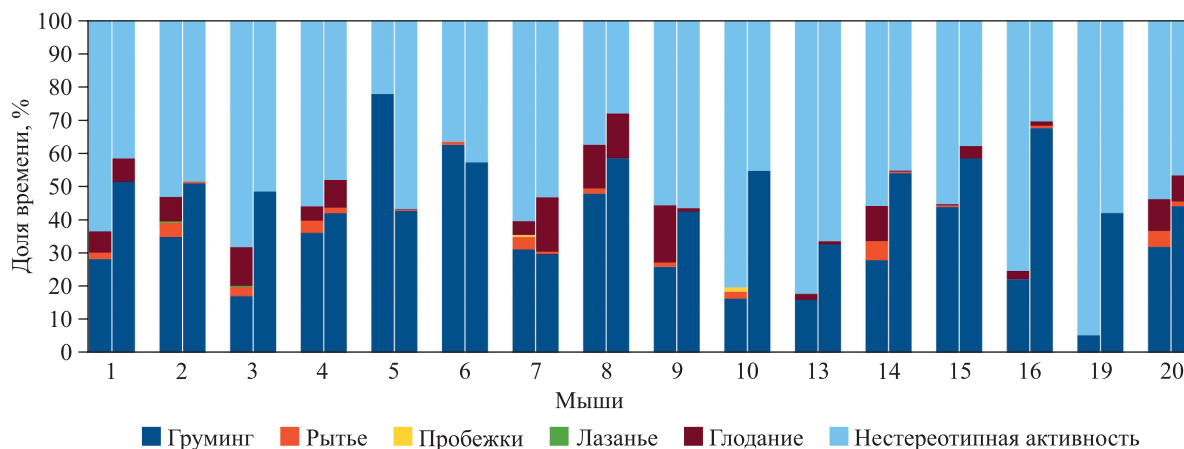


Рис. 1. Структура ночной активности мышей:
левый столбец – через 1 нед. после рассадки по парам,
правый столбец – через 16 нед. после рассадки по парам

Fig. 1. Night activity structure of mice:
the left column – 1 week after placement in pairs,
the right column – 16 weeks after placement in pairs

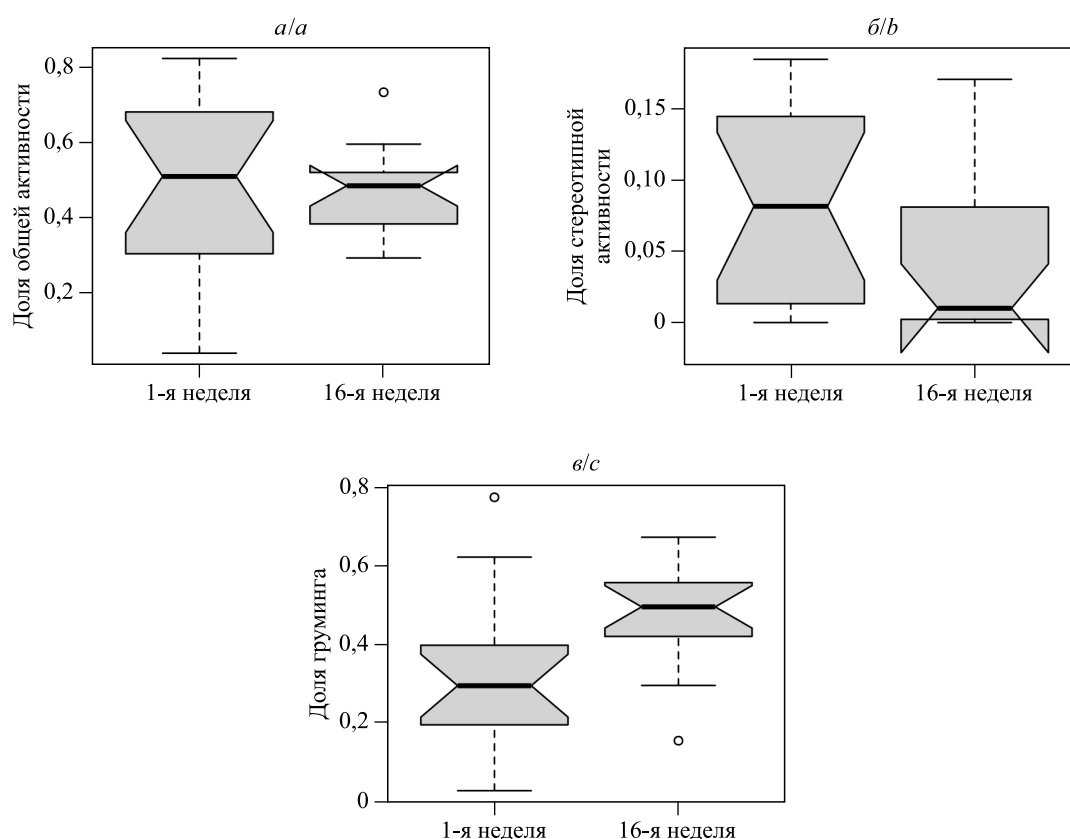


Рис. 2. Изменения ночной активности мышей в течение 16 нед. парного содержания в клетках.
Горизонтальные черные полосы – медианы, серые ящики – интерквартильная ширина (ИШ),
скошенные боковины (насечки) – 95 % доверительные интервалы медиан,
усы – размах значений от 1-го квантиля $-1,5ИШ$ до 3-го квантиля $+1,5ИШ$,
кружки – предполагаемые выбросы

Fig. 2. Changes in night activity of mice within 16 weeks of placement in pairs.
Black horizontal lines – median, grey boxes – interquartile range (IQR),
notches – 95 % confidence intervals of medians, whiskers – the range
from 1st quantile $-1.5IQR$ to 3rd quantile $+1.5IQR$, points – possible outliers

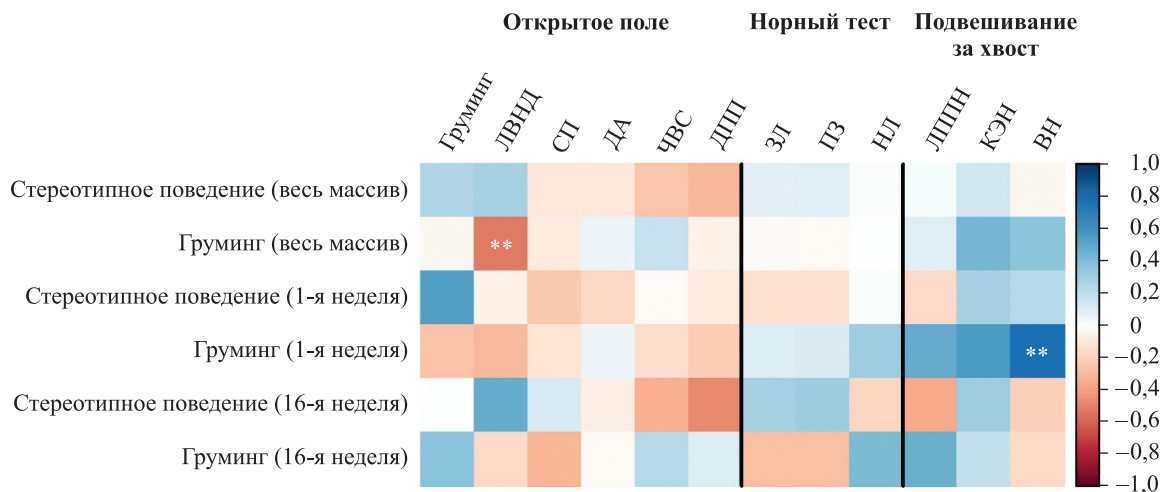


Рис. 3. Корреляции между ночной и тестовой активностью:

** – $p < 0,05$ (коэффициент корреляции Спирмена с поправкой Холма на множественные проверки гипотез).

Метрики открытого поля: ЛВНД – латентное время начала движения, СП – стрессовое поведение,

ДА – двигательная активность, ЧВС – число внутренних секторов (квадратов),

ДПП – длина пройденного пути. Метрики норного теста: ЗЛ – заглядывания в лунки,

ПЗ – повторные заглядывания, НЛ – непосещенные лунки.

Метрики подвешивания за хвост: ЛППН – латентный период первой неподвижности,

КЭН – количество эпизодов неподвижности, ВН – суммарное время неподвижности

Fig. 3. Correlations between night and test activity:

** – $p < 0.05$ (Spearman's rank coefficient with Holm's adjustment for multiple hypothesis testing).

Open field test metrics: LVND – latency before starting locomotion, SP – stress behaviour,

DA – locomotor activity, ChVS – quantity of passed inner quadrants, DPP – quantity of all passed quadrants.

Hole-board test metrics: ZL – all head-dippings in holes, PZ – repeated head-dippings, NL – ignored holes.

Tail-suspension test metrics: LPPN – latency of first immobility time,

KEN – quantity of immobility episodes, VN – total time of immobility

Изменения параметров поведения в тестах при длительном содержании. Также было проверено, как менялись параметры поведенческих тестов во времени (рис. 6). Латентное время начала движения в открытом поле уменьшилось с 3,5 до 0,5 с (парный тест Вилкоксона, $p < 0,01$). Число непосещенных лунок в норном тесте снизилось с 5,5 до 3,0 (парный тест Вилкоксона, $p < 0,05$). Количество эпизодов неподвижности в подвешивании за хвост увеличилось с 9,0 до 10,5 (парный тест Вилкоксона, $p < 0,01$).

Обсуждение результатов. Спустя 1 нед. парного содержания в клетках мыши были активны 51 % от всего времени наблюдений, а спустя 16 нед. – 48 %, что гораздо меньше приведенных в литературе величин. Поведение записывалось в темное время суток, когда грызуны наиболее активны (именно в первые часы после наступления темноты). И тем не менее подопытные животные почти половину времени в среднем были неактивны, что противоречит литературным данным [25; 30].

Как видно из рис. 1 и 2, значительную долю активности составляет нестереотипная активность (пробежки по клетке, питье, прием пищи, агонистические взаимодействия, садки и др.), т. е. нормальное поведение животных. На втором месте по продолжительности – груминг, который рассматривается и как нормальное (комфортное), и как аномальное поведение, связанное с действием стрессоров. Доля груминга в нашем эксперименте вполне согласуется с литературными данными о проявлении такого поведения у млекопитающих (20–40 % от суточной активности) [14, р. 20]. Увеличение доли груминга может свидетельствовать и о неблагополучии подопытных животных, так как мы обнаружили, во-первых, корреляции между грумингом и временем неподвижности в тесте на депрессию, а во-вторых, значимый рост количества эпизодов неподвижности в нем. Все это позволяет предположить, что по крайней мере часть случаев груминга являются аномальными и относятся к стереотипной активности.

Как отмечалось выше, груминг может быть проявлением комфортного поведения, когда он используется для очистки тела от загрязнений и паразитов, или же проявлением стрессового поведения, в том числе смещенного [14, р. 20, 48]. Также выделяют патологический груминг, связанный с состояниями, похожими на депрессию, однако в нашем случае нельзя достоверно судить о том, является ли груминг патологическим (для него, в частности, характерны направленность на определенную часть тела и плохое состояние шерсти и кожи в этих местах, например залысины, повреждения).

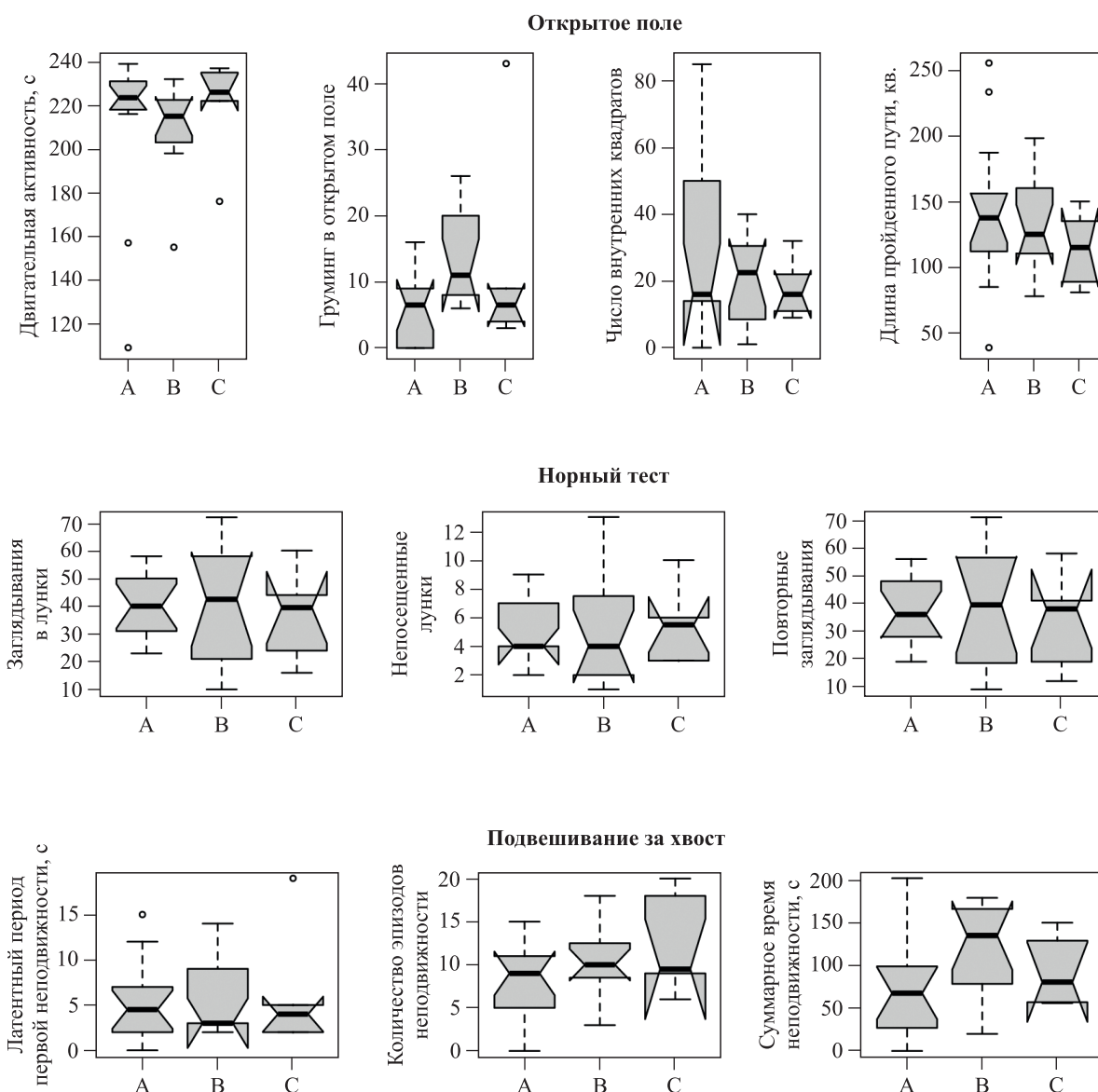
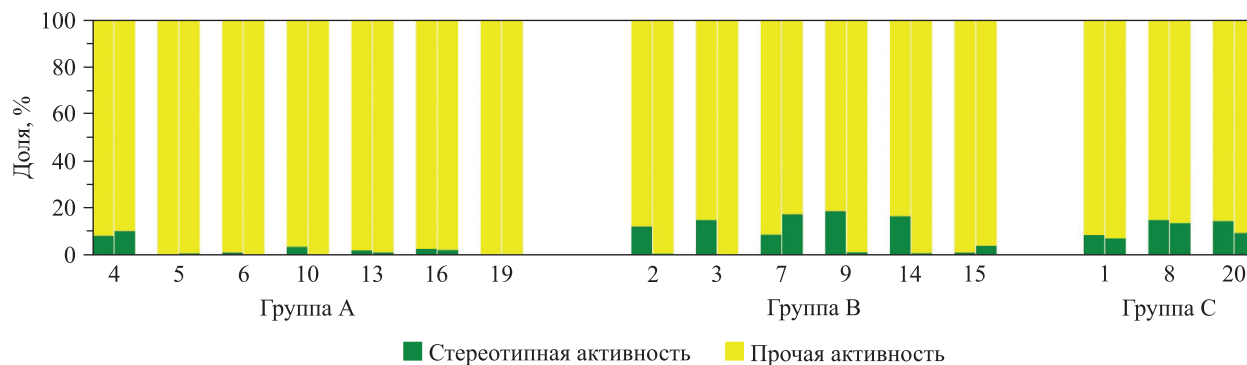


Рис. 4. Поведение мышей с разным уровнем спонтанной стереотипной активности в стандартных поведенческих тестах (см. пояснения к рис. 2)

Fig. 4. Behaviour of mice with different levels of spontaneous stereotypic activity in standard behavioural tests (see explanations to fig. 2)

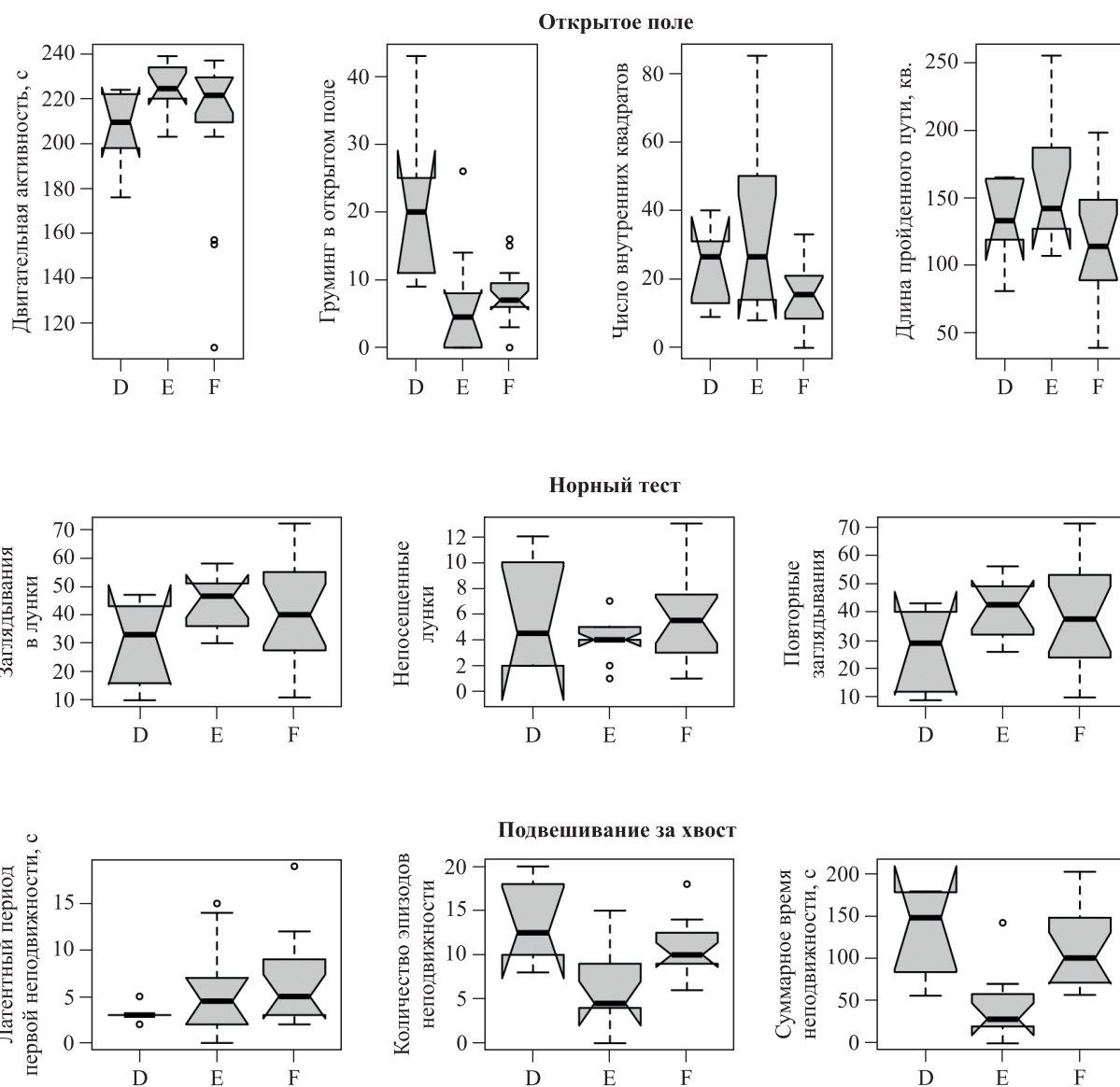
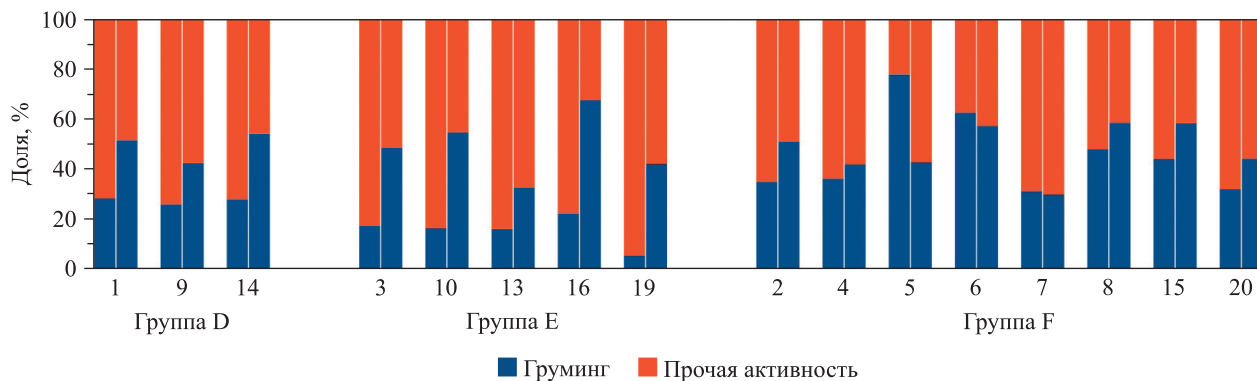


Рис. 5. Поведение мышей с разным уровнем спонтанного груминга в стандартных поведенческих тестах (см. пояснения к рис. 2)

Fig. 5. Behaviour of mice with different levels of spontaneous grooming in standard behavioural tests (see explanations to fig. 2)

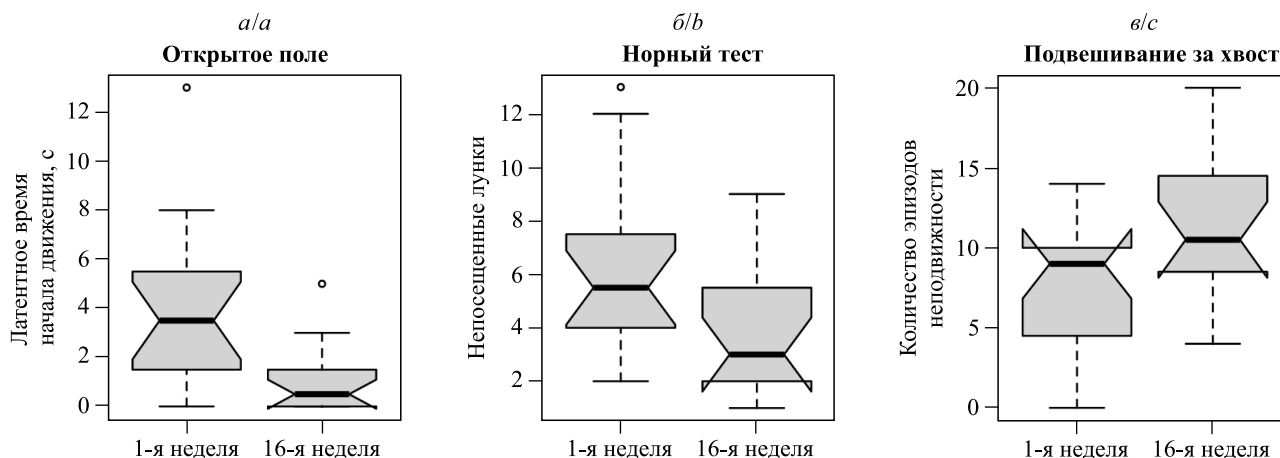


Рис. 6. Изменения поведения мышей с 1-й по 16-ю неделю содержания (см. пояснения к рис. 2)

Fig. 6. Changes in mice behaviour from 1st to 16th week of the experiment (see explanations to fig. 2)

Косвенными признаками депрессии могут служить ангедония, аутоагрессия, агрессия и сниженная подвижность [22]. Мы не анализировали первые три признака, но, как сказано ранее, в настоящем исследовании животные оказались менее подвижными, чем в экспериментах других авторов.

Доля стереотипной активности спустя 1 и 16 нед. парного содержания составляла 8,2 и 1,0 % соответственно. При этом какие-то животные стали проявлять больше стереотипного поведения, какие-то – меньше. В целом доля стереотипий заметно ниже по сравнению с данными других авторов, и такая динамика нетипична для мышей: считается, что со временем стереотипное поведение становится более продолжительным. На уровень стереотипий может влиять принадлежность к разным линиям (существуют высокостереотипные линии [31; 32]). Кроме того, известно, что животные одной линии, но от разных поставщиков также могут различаться по своему поведению, это снижает воспроизводимость результатов экспериментов [33].

Сами виды стереотипного поведения, как правило, зависят от возможности проявлять их. Так, самая распространенная стереотипия в нашем эксперименте – глотание прутьев клетки. Лазанье, сальто и другие виды не развились, вероятно, из-за недостатка вертикального пространства.

Чаще всего развитие стереотипий происходит постепенно и выраженность их усиливается со временем, однако в некоторых случаях грызуны (например, оленьи хомячки и мыши рода *Rhabdomys*) могут вырабатывать стереотипии в первые недели жизни, а дальше уровень этого поведения сохраняется [34].

Иногда уровень стереотипий понижается, а не повышается с течением времени. Это бывает связано с обогащением условий среды: животные получают возможность проявлять нормальную активность, которая замещает собой стереотипную [35], но это не наш случай. В настоящем исследовании снижение стереотипной активности может быть вызвано, например, депрессией или подобным ей состоянием, которое выражается в снижении подвижности в целом и отказе животного от борьбы со стрессом (если считать, что стереотипии являются частью копинг-стратегии) [3, p. 344].

Заключение

Стереотипные виды активности отмечаются у мышей начиная с 1-й недели парного содержания в клетках. Доля стереотипной активности в общем паттерне спонтанного ночного поведения составляет 8,2 %, доля груминга – 29,5 %. Стереотипная активность не является стабильной: у большинства мышей (11 из 16) она снизилась в течение 3 мес. парного содержания. При этом продолжительность груминга за аналогичный период повысилась у 13 из 16 животных.

Продолжительность груминга имеет четкую положительную корреляцию с количеством эпизодов неподвижности и временем неподвижности в тесте «подвешивание за хвост», а продолжительность стереотипной активности – со временем груминга в тесте «открытое поле».

Животные, содержащиеся в одних и тех же условиях, но имеющие различную продолжительность ночного груминга и стереотипной активности, демонстрируют разные показатели поведения в тестах «открытое поле» и «подвешивание за хвост».

Длительность содержания животных в клетках может оказать существенное влияние на поведение животных в тестах «открытое поле» и «подвешивание за хвост».



Библиографические ссылки / References

1. Mason GJ. Stereotypies: a critical review. *Animal Behaviour*. 1991;41(6):1015–1037. DOI: 10.1016/S0003-3472(05)80640-2.
2. Muehlmann AM, Lewis MH. Abnormal repetitive behaviours: shared phenomenology and pathophysiology. *Journal of Intellectual Disability Research*. 2012;56(5):427–440. DOI: 10.1111/j.1365-2788.2011.01519.x.
3. Mason G, Rushen J, editors. *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare*. 2nd edition. Wallingford: CAB; 2008. 367 p.
4. Mason GJ, Latham NR. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? *Animal Welfare*. 2004;13(supplement 1):57–69.
5. Langen M, Kas MJH, Staal WG, van Engeland H, Durston S. The neurobiology of repetitive behavior: of mice... *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2011;35(3):345–355. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2010.02.004.
6. Jones MA, Mason G, Pillay N. Early social experience influences the development of stereotypic behaviour in captive-born striped mice *Rhabdomys*. *Applied Animal Behaviour Science*. 2010;123(1–2):70–75. DOI: 10.1016/j.applanim.2009.12.009.
7. Girbovan C, Plamondon H. Environmental enrichment in female rodents: considerations in the effects on behavior and biochemical markers. *Behavioural Brain Research*. 2013;253:178–190. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.07.018.
8. Bayne K, Würbel H. The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. *OIE Revue Scientifique et Technique*. 2014;33(1):273–280.
9. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR Journal*. 2005;46(2):162–170. DOI: 10.1093/ilar.46.2.162.
10. Krohn TC, Ritskes-Hoitinga J, Svendsen P. The effects of feeding and housing on the behaviour of the laboratory rabbit. *Laboratory Animals*. 1999;33(2):101–107. DOI: 10.1258/002367799780578327.
11. Wemelsfelder F. Animal boredom: is a scientific study of the subjective experiences of animals possible? In: Fox MW, Mickle-LD, editors. *Advances in animal welfare science 1984*. Dordrecht: Springer; 1985. p. 115–154 (Advances in animal welfare science; volume 1). DOI: 10.1007/978-94-009-4998-0_8.
12. Balcombe JP. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Laboratory Animals*. 2006;40(3):217–235. DOI: 10.1258/00236770677611488.
13. Garner JP. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR Journal*. 2005;46(2):106–117. DOI: 10.1093/ilar.46.2.106.
14. Kalueff AV, La Porte JL, Bergner CL, editors. *Neurobiology of grooming behavior*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. 280 p. DOI: 10.1017/CBO9780511676109.
15. Jeppesen LL, Heller KE, Dalsgaard T. Effects of early weaning and housing conditions on the development of stereotypies in farmed mink. *Applied Animal Behaviour Science*. 2000;68(1):85–92. DOI: 10.1016/s0168-1591(00)00099-x.
16. Garner JP, Mason GJ. Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. *Behavioural Brain Research*. 2002;136(1):83–92. DOI: 10.1016/s0166-4328(02)00111-0.
17. Lewis MH, Tanimura Y, Lee LW, Bodfish JW. Animal models of restricted repetitive behavior in autism. *Behavioural Brain Research*. 2007;176(1):66–74. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.08.023.
18. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*. 2004;10(supplement):S18–S25. DOI: 10.1038/nrn1434.
19. Garner JP, Thogerson CM, Dufour BD, Würbel H, Murray JD, Mench JA. Reverse-translational biomarker validation of abnormal repetitive behaviors in mice: an illustration of the 4P's modeling approach *Behavioural Brain Research*. 2011;219(2):189–196. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.01.002.
20. Erbaş O, Taşkıran D. Sepsis-induced changes in behavioral stereotypy in rats; involvement of tumor necrosis factor-alpha, oxidative stress, and dopamine turnover. *Journal of Surgical Research*. 2014;186(1):262–268. DOI: 10.1016/j.jss.2013.08.001.
21. Erbaş O, Akseki HS, Aktuğ H, Taşkıran D. Low-grade chronic inflammation induces behavioral stereotypy in rats. *Metabolic Brain Disease*. 2015;30(3):739–746. DOI: 10.1007/s11011-014-9630-4.
22. Smolinsky AN, Bergner CL, La Porte JL, Kalueff AV. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: Gould TD, editor. *Mood and anxiety related phenotypes in mice*. Totowa: Humana Press; 2009. p. 21–36 (Neuromethods; volume 42). DOI: 10.1007/978-1-60761-303-9_2.
23. Jones M, van Lierop M, Pillay N. All a mother's fault? Transmission of stereotypy in striped mice *Rhabdomys*. *Applied Animal Behaviour Science*. 2008;115(1–2):82–89. DOI: 10.1016/j.applanim.2008.05.007.
24. Pietrewicz AT, Hoff MP, Higgins SA. Activity rhythms in the Mongolian gerbil under natural light conditions. *Physiology & Behavior*. 1982;29(2):377–380. DOI: 10.1016/0031-9384(82)90029-4.
25. Würbel H, Stauffacher M, von Holst D. Stereotypies in laboratory mice – quantitative and qualitative description of the ontogeny of «Wire-gnawing» and «Jumping» in Zur:ICR and Zur:ICR nu. *Ethology*. 1996;102(3):371–385. DOI: 10.1111/j.1439-0310.1996.tb01133.x.
26. Perrin MR. Notes on the activity patterns of 12 species of southern African rodents and a new design of activity monitor. *African Zoology*. 1981;16(4):248–258.
27. Novak J, Bailoo JD, Melotti L, Würbel H. Effect of cage-induced stereotypies on measures of affective state and recurrent perseveration in CD-1 and C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2016;11(5):e0153203. DOI: 10.1371/journal.pone.0153203.
28. Jennings M, Batchelor GR, Brain PF. Refining rodent husbandry: the mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. *Laboratory Animals*. 1998;32(3):233–259. DOI: 10.1258/002367798780559301.
29. Chambers JM, Cleveland WS, Kleiner B, Tukey PA. *Graphical methods for data analysis*. Belmont: Wadsworth International Group; 1983. 395 p. Co-published by the «Duxbury Press» (Wadsworth statistics/probability series).
30. Novak J, Bailoo JD, Melotti L, Rommen J, Würbel H. An exploration based cognitive bias test for mice: effects of handling method and stereotypic behaviour. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130718. DOI: 10.1371/journal.pone.0130718.
31. Amodeo DA, Jones JH, Sweeney JA, Ragozzino ME. Differences in BTBR T⁺tf/J and C57BL/6J mice on probabilistic reversal learning and stereotyped behaviors. *Behavioural Brain Research*. 2012;227(1):64–72. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.10.032.



32. Alleva E, Castellano C, Oliverio A. Ontogeny of behavioral development, arousal and stereotypes in two strains of mice. *Experimental Aging Research*. 1979;5(4):335–350. DOI: 10.1080/03610737908257209.

33. Åhlgren J, Voikar V. Experiments done in Black-6 mice: what does it mean? *Lab Animal*. 2019;48(6):171–180. DOI: 10.1038/s41684-019-0288-8.

34. Powell SB, Newman HA, Pendergast JF, Lewis MH. A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiology & Behavior*. 1999;66(2):355–363. DOI: 10.1016/s0031-9384(98)00303-5.

35. Howerton CL, Garner JP, Mench JA. Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchy linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2008;115(1–2):90–103. DOI: 10.1016/j.applanim.2008.05.004.

Получена 08.05.2021 / исправлена 08.06.2021 / принята 15.07.2021.
Received 08.05.2021 / revised 08.06.2021 / accepted 15.07.2021.