

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
ВОДНОГО ЛАБИРИНТА МОРРИСА ДЛЯ ОЦЕНКИ
КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У ЖИВОТНЫХ**

© А. Л. Ивлиева,¹ Е. Н. Петрицкая,¹ Д. А. Рогаткин,¹ В. А. Демин²

¹ Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия
E-mail: ivlieva@medphyslab.com

² Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Представлен обзор возможностей использования водного лабиринта Морриса для выявления нарушений когнитивных функций мозга в целях оценки токсического действия наночастиц. В модельном эксперименте показано, что индивидуальная вариабельность поведения животных значительно влияет на результаты водного теста. Обоснована необходимость предварительного отбора особей в качестве меры для снижения подобного влияния, предложено применение типа поведения животного в тесте в качестве критерия для отбора.

Ключевые слова: водный лабиринт Морриса, когнитивные функции, отбор особей, наночастицы, индивидуальная изменчивость, поведение животных.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 102. № 1. С. 3—17. 2016

A. L. Ivlieva,¹ E. N. Petritskaya,¹ D. A. Rogatkin,¹ V. A. Demin.² METHODICAL FEATURES OF THE APPLICATION OF MORRIS WATER MAZE FOR ESTIMATION OF COGNITIVE FUNCTIONS IN ANIMALS. ¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute named after M. F. Vladimirskiy, Moscow, Russia, e-mail: ivlieva@medphyslab.com; ² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia.

In order to estimate toxic effects of nanoparticles on the brain we review the possibilities of using the Morris water maze to detect impairments of cognitive functions. Besides, the model experiment showed that individual variability of animal behavior significantly affects the results of water maze. The pre-selection of individuals is justified as a required measure to reduce such influence. We suggest using the type of behavior that each individual demonstrates in the test as a criterion for pre-selection.

Key words: the Morris water maze, cognitive functions, individual variability, pre-selection, nanoparticles, animal behavior.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 102. N 1. P. 3—17. 2016

В современных научных исследованиях в биологии, физиологии и медицине встречается много задач, связанных с необходимостью оценки нарушений когнитивных функций мозга, вызываемых разными внешними и внутренними факторами — заболеваниями нервной системы, токсическим воздействием фармпре-

паратов, травмами мозга и т. д. Один из таких токсических факторов, который стали исследовать сравнительно недавно, — потенциальная способность наночастиц металлов преодолевать гематоэнцефалический барьер [6]. Не исключено, например, что постоянный контакт с наночастицами рабочих на производстве в перспективных отраслях наноиндустрии потенциально в будущем будет приводить к возникновению новых форм профессиональных заболеваний, связанных с нарушением работы мозга человека вследствие токсического действия наночастиц, попавших в нейрональные ткани [1–3]. Исследовать этот вопрос сегодня можно только в эксперименте на животных, поэтому поиск и исследование изменений поведения животных и их когнитивных функций при хроническом введении наночастиц является актуальной задачей.

Один из ключевых вопросов — чувствительность методики даже к небольшим нарушениям когнитивных функций, поскольку, с одной стороны, речь идет об экспериментах с животными, мыслительные способности которых понижены по сравнению с человеком, а с другой — сами нарушения на начальных этапах интоксикации могут быть выражены слабо. В МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского опыта исследований подобного рода ранее не было, поэтому остро встал вопрос выбора методики для оценки когнитивных функций. Цель данной работы — критический анализ литературы для обоснования наиболее оптимального теста для выявления подобных нарушений и оценка потенциальной чувствительности выбранного метода.

АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПОДХОДОВ И ВЫБОР ВАРИАНТА ТЕСТА

В экспериментальных исследованиях поведения животных и факторов, влияющих на него, широко применяются сухопутные или водные лабиринты. Несомненное достоинство водных лабиринтов по сравнению с сухопутными заключается в использовании стремления животного выбраться из воды в качестве мотивации для прохождения процессов научения и запоминания. С начала XX в. было разработано несколько вариантов водных лабиринтов [12, 19, 24, 52, 57], и все они исходно спроектированы для исследования пространственного научения (spatial learning) и пространственной памяти (spatial memory). Впоследствии водный лабиринт как тип теста оказался эффективным инструментом для изучения особенностей функционирования различных отделов мозга, а также обрел широкое применение при оценке влияния на функционирование мозга самых разных факторов (лекарственных препаратов, старения, диет и пр.) [16, 50].

Наиболее широко применяется в физиологии и фармакологии для решения подобных задач водный лабиринт Морриса (Morris water maze, MWM) [36, 37]. Типовой его вариант — тест со скрытой платформой (Hidden Platform test) — заключается в следующем. Тестовая установка представляет собой круглый белый или черный бассейн диаметром 1.2—1.8 м, который не до краев заполнен водой температурой чуть выше комнатной. В выбранное место в бассейне (в один из четырех квадрантов) исследователь помещает вертикальную стойку с небольшой, по размеру грызуна, платформой на вершине. Платформа расположена лишь немного — примерно на 1 см — ниже уровня воды в бассейне, поэтому животное, усевшись на нее, выберется из воды.

Животных тестируют по одному: пускают свободно плавать в бассейне в течение определенного времени. В воде животному дискомфортно, оно стремится выбраться, и единственная возможность сделать это в течение заплыва — отыскать вышеупомянутую платформу. Однако сделать это не так просто, потому что платформа невидима в воде: либо вода в бассейне окрашена в цвет платформы (сухим молоком или нетоксичной краской), либо и бассейн, и платформа черного цвета. Если по истечении времени заплыва особь не найдет платформу, исследователь сам помещает животное на нее и дает некоторое время посидеть, чтобы

животное смогло осмотреться и попыталось запомнить положение платформы относительно видимых внелабиринтных ориентиров. В роли таковых могут выступить цветные плакаты на стенах, любые предметы обстановки лаборатории, направление света, сам исследователь и т. п. После этого отдыха особь снова пускают плавать; в некоторых экспериментах животному между попытками устраивают перерыв — снимают с платформы, вытирают насухо и на время возвращают в клетку [9, 11, 43].

Тестирование проводится в течение нескольких последовательных дней. Каждому животному в день дается определенное число попыток доплыть до платформы. Если зверь запоминает положение платформы, он изо дня в день проплывает меньшую дистанцию и тратит меньше времени на то, чтобы добраться до цели. Исследователь замеряет время, затраченное зверем на доплытие до платформы, и определяет параметры траектории движения животного (длину, кривизну, число поворотов и пр.). Сегодня это делают при помощи компьютерного анализа видеосъемки эксперимента, получаемой с прикрепленной к потолку над бассейном видеокамеры.

Для решения различных исследовательских задач применяются разные варианты теста Морриса. Например, во многих исследованиях [22, 31, 32, 55, 58] формирование долговременной пространственной памяти у тестируемых животных по окончании типового теста проверяют в тесте с перемещением (Transfer test): условия неизменны, только платформа убрана из бассейна. Подход «место—напоминание» (Place Recall test) позволяет выявить воздействие произведенных над животными манипуляций (операции на мозге, введение каких-либо веществ и т. п.) на применение информации, усвоенной в ранее пройденном тесте Морриса [45].

При экономичном в отношении количества подопытных животных подходе на одной и той же группе животных можно проводить повторные циклы научения в тесте Морриса (Relearning Phases). Платформу в каждом цикле надо перемещать в противоположный предыдущему квадрант бассейна, так как показано, что память о местоположении платформы может сохраняться у животных в течение двух месяцев после окончания цикла тестирования [32]. После окончания каждого цикла (базовый вариант теста и часто после него тест с перемещением) группа животных отдыхает одну или две недели [50]. Однако при данной постановке исследования следует учитывать, что с каждым циклом научение в целом идет все быстрее, потому что животные накапливают информацию о пространстве в бассейне и вокруг него во время предыдущих циклов и пользуются ею в последующих циклах. За подобное поведение отвечает особая функция мозга — рабочая память [4], ее также исследуют в водном лабиринте (Working Memory Procedures) [49–51]. Следует особо отметить, что в данном варианте теста обнаружено перекрытие процессов формирования пространственной памяти с влиянием фактора стресса иного рода (вспышек яркого света): если крыса находилась под вспышками света в течение всего 15-минутного перерыва между заплывами, запоминания положения платформы не происходило. Однако в том случае, когда особи давали посидеть без вспышек 3—5 мин после заплыва, а потом вспышки включали, — пространственная память формировалась [11]. Это наблюдение указывает на возможное преимущество протоколов теста с предусмотренными перерывами на отдых между попытками.

Также существуют модификации базового теста и теста на рабочую память, в которых исследователь продолжительное время, до 5—6 мин, не помогает зверю отыскать платформу — все это время зверь свободно плавает — и большинство особей находят платформу самостоятельно. Длительность эксперимента при этом составляет всего два дня, но дается по 6 попыток в день на зверя. Данные протоколы могут быть использованы для исследования роли биохимических процессов, проходящих в мозге (для этого различные вещества вводятся непосредственно в мозг), в становлении и сохранении пространственной памяти [7].

Факторы, влияющие на результаты теста Морриса. При планировании экспериментов с водным лабиринтом Морриса и анализе полученных данных необходимо контролировать и брать в расчет характеристики тестируемых особей. Вес животного, степень физического развития и возраст могут влиять на скорость плавания. На выполнение теста влияют пол, вид или генетическая линия животного. Самцы в целом показывают лучшие результаты, чем самки, и это почти не связано с различиями по мускульной силе [16]. Животные, содержащиеся в обогащенной среде, выполняют тест лучше, чем живущие в стандартных условиях [48]. Наконец, обнаружено, что хуже справляются с задачей стрессированные или больные особи; доказано влияние диет [16].

Различия между полами. В большинстве экспериментов самцы грызунов демонстрируют преимущество перед самками в пространственном научении в тесте Морриса. Однако существуют указания, что к возрасту 6 месяцев самцы и самки крыс выравнялись по успешности выполнения теста, и в этом случае предположено, что у молодых животных разница в результатах обусловлена разными темпами взросления [10]. А в недавнем исследовании на мышах аутбредной линии ICR было обнаружено более быстрое выполнение теста самками, хотя согласно контрольному тестированию через день после окончания основного теста оба пола запомнили местоположение платформы корректно [22].

Очевидно, что в различиях полов по когнитивным способностям играют роль половые гормоны. Инъекции тестостерона крысам на протяжении первой недели жизни приводили к лучшим результатам у взрослых самок, чем у взрослых самцов, в противоположность контрольной группе: предположено, что тестостерон влияет на становление пространственной памяти в раннем постнатальном онтогенезе [43]. О воздействии на пространственную память эстрогенов существуют противоречивые данные. С одной стороны, овариоэктомированные самки справлялись с тестом лучше интактных [15], и самки в фазе проэструса (низкая концентрация эстрогенов) демонстрировали превосходство над самками в фазе эструса (высокая концентрация эстрогенов) [53]. Но, с другой стороны, введение эстрадиола в гиппокамп снижало результативность теста как у овариоэктомированных самок, так и у самцов [38, 39]. Возможно, стимуляция или ингибирование эстрогенами пространственной памяти зависит от дозы этих гормонов, и похоже разные дозы эстрогенов воспринимаются различными рецепторами [16]. Так, введенные небольшие дозы эстрадиола улучшили результаты теста Морриса у овариоэктомированных мышей, а введенные высокие дозы, сравнимые с содержанием эстрогенов в крови в проэструсе, не отразились на результатах теста [41]. Примечательно, что терапия эстрогенами уменьшала успешность обучения в тесте Морриса овариоэктомированных мышей, в геном которых не было вмешательств (условно «дикий тип»), в то время как такого эффекта не наблюдалось у мышей, нокаутных по гену эстрогенового рецептора α [42].

Колебания уровней гормонов на протяжении эстрального цикла принимаются исследователями за фактор, усложняющий толкование результатов в поведенческих тестах [25, 27, 28]. Однако при тестировании когнитивных функций не было обнаружено различий между фазами менструального (эстрального у грызунов) цикла ни у человека [26], ни у крыс [49]. Более того, обнаружено, что большинство содержащихся в одном помещении самок находится в одинаковых фазах цикла, и поведенческие особенности самок мышей могут быть оценены без помех со стороны эстрального цикла [35].

Межвидовые различия. Изначально тест Морриса был разработан для изучения пространственной памяти крыс (*Rattus norvegicus*) [36, 37]. Но в настоящее время он широко применяется также для мышей (*Mus musculus*), особенно в связи с расширением их использования в качестве объектов для генетических модификаций (трансгенные мыши) [42, 55].

Мыши в водном лабиринте Морриса демонстрируют поведение, заметно отличающееся от крысиного: они гораздо более склонны к некогнитивным страте-

гиям плавания — пассивному дрейфу и тигмотаксису, что затрудняет выполнение мышами теста. Некоторые исследователи [55] предполагают, что крысы в тесте превосходят мышей благодаря лучшим способностям к плаванию и более стабильному выполнению теста раз за разом, но не из-за каких-либо различий в когнитивных способностях. Однако здесь же замечают, что межвидовые различия могут быть обусловлены некой разницей в клеточных и молекулярных механизмах памяти. При сравнении поведения крыс и мышей в наборе тестов на ориентирование на местности было показано, что виды одинаково хорошо справляются с задачами «на суше» (варианты радиального лабиринта), но мыши проигрывают крысам в выполнении «водных» задач (варианты теста Морриса) [54]. Таким образом, различия между видами в тесте вызваны не межвидовой разницей в способностях к пространственному научению [16]. Возможно, что лучшее выполнение теста Морриса лабораторными крысами обусловлено их происхождением от серой крысы — исходно околоводного вида, для которого плавание не представляет собой нестандартной, как для мышей, активности [5].

В ситуациях, провоцирующих лабораторных животных на проявление беспокойства или вызывающих стресс, мыши и крысы ведут себя по-разному. К примеру, из сравнения животных моделей по проявлению беспокойства было сделано заключение о том, что мыши показывают лучшие результаты в тестах, основанных на парадигме исследования, в то время как крысы лучше действуют в тестах, опирающихся на парадигму наказания [13]. Мыши могут проваливать тесты на активное избегание (а таков и тест Морриса) просто ведя себя пассивно, даже не пытаясь активно искать путь к спасению от неприятного фактора (это указывает на выше формы поведения — пассивный дрейф и тигмотаксис) [16].

Различия между генетическими линиями. Во многих исследованиях показано, что особенности выбранной для теста Морриса линии лабораторных животных отражаются на результатах теста. В части работ сделаны предположения о связи различий в выполнении теста Морриса разными линиями крыс с недостатками зрения у альбиносов (особенно инбредных): двухцветные Long-Evans справляются с задачей лучше инбредных альбиносов Fischer 344 [33]. Однако при сравнении нескольких линий альбиносов выяснилось, что спокойные Sprague—Dawley учатся в водном лабиринте лучше, чем гиперстрессированные Wistar—Kyoto, следовательно характерные для линии особенности работы мозга также сказываются на результатах теста Морриса [17, 29]. Тем более примечательно, что крысы линии Tokai High Avoider, выведенной по признаку хорошего выполнения тестов на избегание, справляются с задачей лучше крыс исходной линии Wistar [47].

Было проведено подобное сравнение на нескольких линиях мышей — 129/Ola, BALB/c, C57BL/6 и FVB/N [44]. Интересно, что здесь между пигментированными C57BL/6 и альбиносами BALB/c различия не было обнаружено. Все линии мышей, кроме FVB/N, выполняли и базовый вариант теста, и проверку на перемещение, и тест с видимой платформой хорошо. Плохие результаты мышей FVB/N авторы работы связывают с пониженной остротой зрения у данной линии, обусловленной наличием в генотипе аллелей, вызывающих дегенерацию сетчатки. Также отдельные линии мышей с разной степенью успешности выполняют тест в бассейнах разного диаметра [14].

Различия по возрастам. Начиная с ранних работ, неоднократно было установлено, что с возрастом успешность прохождения животными теста Морриса падает. Частично этот факт может быть связан с возрастным снижением способностей к плаванию, передвижению и исследовательскому поведению [16]. К тому же у стареющих лабораторных животных (крыс и мышей), как и у пожилых людей, наблюдаются проблемы с когнитивными способностями во многих ситуациях, и во многих работах показана связь между плохим выполнением теста Морриса и структурными изменениями в отделах мозга, особенно в гиппокампе [20, 23, 40, 58]. При терапии эстрадиолом взрослые и стареющие самки крыс показали

улучшенные результаты в тесте Морриса, в то время как у молодых такого эффекта не наблюдалось, что свидетельствует о влиянии возрастных особенностей биохимии мозга на результаты теста [31]. У крыс линии Fischer 344 в возрасте от 1.5 месяцев до 2 лет и 2 месяцев, прошедших базовый тест и тест с видимой платформой, наблюдалось плавное, близкое к линейному, снижение уровня успешности научения в зависимости от возраста особей [34]. Однако среди особей присутствовал значительный разброс результатов, и возраст как фактор объяснял только часть этого разброса. Предположено, что характер полученных результатов можно объяснить и возрастным снижением функций мозга, не связанных со способностью к пространственному научению, т. е. функций, определяющих некогнитивные стратегии поведения. Таким образом, еще раз утверждается несинонимичность результатов теста Морриса и уровня способностей к пространственному научению.

Достоинства и недостатки водного лабиринта Морриса. Широта применения теста Морриса обусловлена наличием ряда преимуществ данной методики перед другими поведенческими тестами для мелких лабораторных животных. Во-первых, для него не требуется какой-либо предварительной тренировки или подготовки животных (как-то стимуляция голоданием), хотя в некоторых работах животным дают один «тренировочный» день с видимой платформой [44, 58]. Тест может быть выполнен за сравнительно малый срок (несколько дней) на небольшом количестве животных (от 5 особей).

Во-вторых, различные модификации теста позволяют исследовать разные проблемы. Например, базовый тест отражает прохождение процесса научения, а тест угасания — противоположный процесс. Также в отличие от «сухопутных» поведенческих тестов — радиального лабиринта, открытого поля и других — в водном лабиринте сводится к нулю влияние обонятельных стимулов и меток на поведение животного.

Благодаря видеосъемке и отслеживанию по видеоматериалам траекторий и скоростей плавания становится возможным выделить типы и стратегии поведения, не связанные с пространственной памятью (тигмотаксис, пассивный дрейф), а также обнаружить у животных проблемы с моторикой или зрением. Особый вариант теста с видимой платформой позволяет обойти проблему нарушения зрительной ориентации, при которой становится неприменимым базовый метод [50]. Стоит переместить платформу в другую часть бассейна, и можно исследовать не только первичное, но и повторное научение; тем же способом можно создать условия для сравнения действия разных доз веществ на одну и ту же экспериментальную группу (см. выше). И конечно, погружение животного в воду — фактор стресса, однако он относительно мягок по сравнению с применяемыми в других поведенческих методиках голоданием или электрическим шоком [50]. На результат теста не влияет такой распространенный аспект эксперимента, как подкожная инъекция (сам факт ее проведения) [45].

Очень важно, что при использовании теста Морриса можно заметно снизить отвлекающее влияние экспериментатора на тестируемое животное: исследователь может прятаться за занавеской или загородкой, для слежения за животным используя видеосъемку. Наконец, водный лабиринт можно использовать в больших лабораториях, и он сравнительно несложен технически для освоения исследователями [50].

В то же время водный лабиринт Морриса имеет и недостатки, связанные с трудностями толкования вклада пространственного научения в различные формы поведения животных в тесте. Когда при проверке на перемещение (т. е. при отсутствии платформы) зверь начинает проводить меньше времени в той части бассейна, где платформа раньше была, то может показаться, что это и есть прямое указание на угасание пространственной памяти. Однако в немалой доле случаев причины увеличения временных затрат на поиск платформы или угасания поисков на месте бывшей платформы совсем не связаны с пространственной па-

мью животного. Наряду с запоминанием структуры пространства вокруг себя, а часто перед этим зверь использует «некогнитивные» стратегии поведения: например, хаотичное перемещение по всему бассейну или исследование от и до («сканирование») фрагмента бассейна [18, 21, 56]. В обширном исследовании на мышах было показано, что около половины вариативности результатов теста появлялось из-за различий в тигмотаксисе — форме поведения, при которой животное держится около стенок бассейна; тогда мыши плавали долго и мало времени проводили около цели. Девятнадцать процентов разброса результатов было объяснено стратегией «пассивного дрейфа»: мыши плавали медленно и проявляли тенденцию пассивно держаться на воде до «спасения» экспериментатором. А различия в пространственной памяти заняли только третье место среди рассмотренных факторов, объяснив лишь 13 % разброса результатов. Конечно, приведенный выше порядок факторов отражает только их статистически обнаруженное влияние на полученные в конкретном эксперименте данные, а не их функциональную приоритетность. Но все же две трети результатов были объяснены факторами, не имеющими прямого отношения к пространственному обучению и памяти, потому названными «некогнитивными» [55].

В таком случае можно предположить, что индивидуальная вариабельность применения зверями некогнитивных стратегий превышает таковую в процессах выработки пространственной памяти (на основании большего влияния некогнитивных стратегий как факторов на разброс данных). Для описанного выше исследования было собрано значительное количество материала (данные от 115 особей), однако в подавляющем большинстве работ используются намного меньшие выборки, что затрудняет достоверное отделение эффектов пространственной памяти от некогнитивных стратегий поведения.

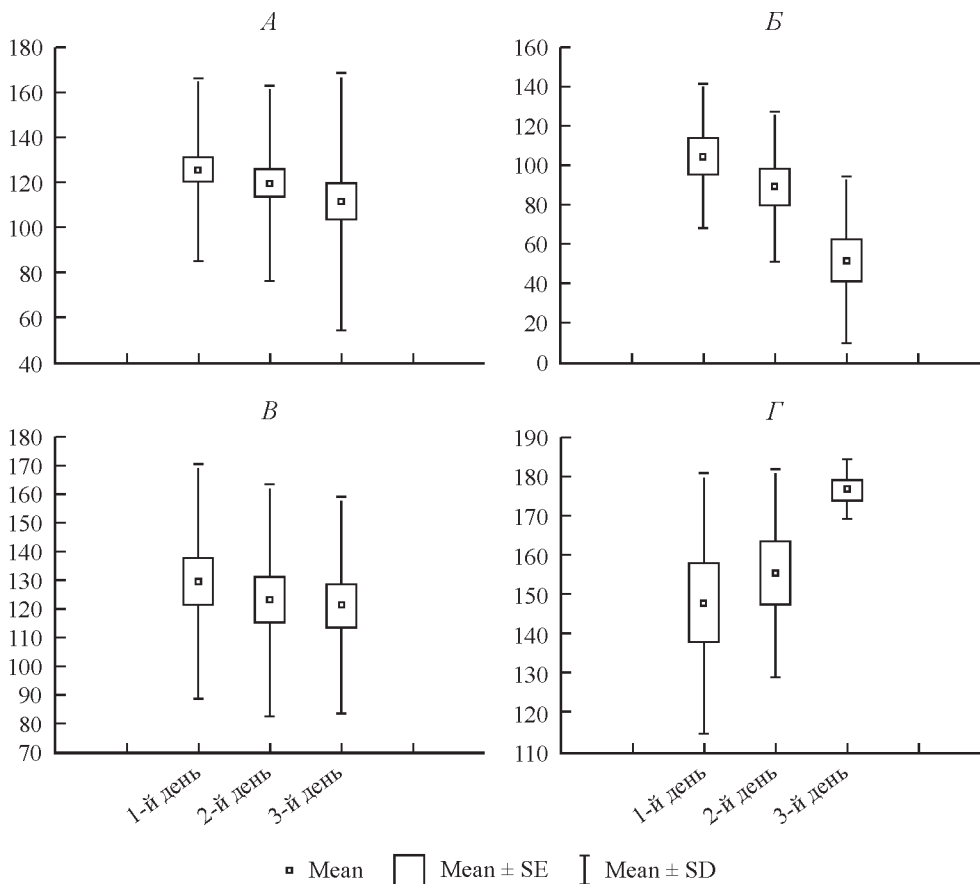
Таким образом, анализ совокупности данных литературы показывает отсутствие обоснованных общепринятых рекомендаций в пользу лучшей пригодности какого-либо одного варианта теста Морриса для задач оценки влияния веществ на функции мозга, поэтому мы выбрали самый простой из существующих методов и проверили его пригодность для наших целей.

МОДЕЛЬНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

Методика. Эксперименты проводили в стандартной установке — круглом бассейне диаметром 1.5 м, заполненном водой, замутненной сухим молоком [37]; выполняли базовый вариант теста. Вокруг бассейна были расставлены хорошо заметные ориентиры. Замеряли время в секундах, затраченное животным на доплыв до платформы.

Тестирование проводилось в течение 3 дней по 3 заплыва на животное в день группами по 10—12 особей. Мышей запускали плавать из одной из четырех определенных точек бассейна, места запуска чередовали случайным образом. Длительность одной попытки 180 с, на платформе особи сидели 20 с, затем их снимали с платформы, вытирали насухо и возвращали в клетку до следующего заплыва; перерыв между заплывами составлял 20—30 мин.

В эксперименте участвовало 56 нелинейных мышей линии SHK в возрасте 3.5—4 месяца (средним весом 28.2 ± 3.4 г), ранее не проходивших поведенческие тесты. Животные содержались в виварии МОНИКИ, получали суточные нормы кормовых продуктов и воду в неограниченном количестве. Данные от 4 особей впоследствии были исключены из выборки из-за невыполнения индивидами протокола эксперимента: 2 мыши постоянно прыгивали с платформы, не посидев на ней, а 2 особи более двух дней подряд применяли пассивный дрейф, т. е. не исследовали окружение. Итоговая выборка для статистических анализов составила 52 особи, 26 самцов и 26 самок. Для каждой особи вычисляли среднее время нахождения платформы за день; в дальнейшем сравнивали дневные выборки



Разброс результатов теста Морриса по дням эксперимента.

A — вся группа, B — способные особи, B — середняки, Г — неспособные особи. По оси ординат — среднее время нахождения платформы, с. Точка — среднее значение по группе за день, прямоугольники — стандартная ошибка среднего, интервал — стандартное отклонение.

средних значений. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования. Мы не обнаружили искомым статистически значимых различий между первым и последним днями эксперимента (критерий Уилкоксона для сопряженных пар — $p = 0.077$; критерий знаков — $p = 0.055$), что для всей группы целиком ($n = 52$) (см. рисунок, A), что для выборок по полам (критерий Уилкоксона для сопряженных пар: для самцов $p = 0.13$, для самок $p = 0.36$; $n = 26$ в каждой группе). Между дневными выборками самцов и самок также не найдено различий (критерий Манна—Уитни — $p > 0.3$; двухвыборочный критерий Колмогорова—Смирнова — $p > 0.1$). Так как сравниваемые выборки относились к разным дням эксперимента, мы проверили роль дня как фактора, способного влиять на различия между дневными выборками (критерий Фридмана). Влияние дня как фактора было найдено недостоверным и для всей группы ($p = 0.17$), и для полов в отдельности (для самцов $p = 0.1$, для самок $p = 0.29$).

При визуальном наблюдении за плавающими мышами было отмечено, что разные особи по-разному ведут себя во время тестирования, при этом данные особенности индивидуального поведения стабильны во всех трех заплывах лю-

бого дня эксперимента, но по дням могут меняться. По характеру проявленных индивидуальных особенностей поведения в тесте вся совокупность особей была разделена нами на три группы (см. таблицу). Способными названы животные, хотя бы в один из дней показавшие те стратегии поведения, при применении которых вероятность отыскать платформу велика («сканирование», направленный поиск — классификация согласно [21]). Такие особи составили всего треть выборки (31 %; $n = 16$), среднее время доплытия до платформы у них составило 81.8 ± 27.3 с. У данной группы наблюдается заметное сокращение затраченного времени по дням (см. рисунок, Б), и различия между первым и последним днями достоверны (критерий Уилкоксона для сопряженных пар — $p = 0.006$; критерий знаков — $p = 0.006$).

Результаты теста Морриса по дням эксперимента

Группа согласно поведению во время тестирования	Номер особи	Пол особи	Среднее время нахождения платформы по дням, с			Поведение во время заплывов
			день 1-й	день 2-й	день 3-й	
Способные	1	Самцы	92.0	44.7	26.0	День 1-й — случайный поиск, день 2-й — направленный поиск, день 3-й — «сканирование»
	2	»	59.0	73.3	23.3	День 1-й — случайный поиск, дни 2-й и 3-й — «сканирование»
	3	»	170.3	94.3	61.0	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — направленный поиск
	4	»	84.0	27.0	14.7	День 1-й — случайный поиск, день 2-й — «сканирование», день 3-й — направленный поиск
	5	»	75.3	97.3	44.0	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — направленный поиск
	6	»	51.7	45.3	21.3	То же
	7	Самки	89.7	95.7	27.7	» »
	8	»	111.3	71.0	15.7	День 1-й — случайный поиск, дни 2-й и 3-й — направленный поиск
	9	»	113.7	47.0	71.3	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — направленный поиск
	10	Самцы	110.3	153.3	168.0	День 1-й — случайный поиск, день 2-й — «сканирование», день 3-й — случайный поиск
	11	»	156.3	142.7	40.0	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — тенденция к «сканированию»
	12	»	92.7	108.3	36.0	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — направленный поиск
	13	»	82.7	85.3	130.7	День 1-й — случайный поиск, день 2-й — «сканирование», день 3-й — случайный поиск
	14	Самки	180.0	115.0	37.7	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — «сканирование»
	15	»	90.7	83	43	День 1-й — случайный поиск, дни 2-й и 3-й — «сканирование»
	16	»	115.7	145.3	64.7	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — «сканирование»
Средняки	17	»	83.0	66.7	79.3	Случайный поиск
	18	Самцы	87.3	120.3	139.7	» »

Продолжение таблицы

Группа согласно поведению во время тестирования	Номер особи	Пол особи	Среднее время нахождения платформы по дням, с			Поведение во время заплывов
			день 1-й	день 2-й	день 3-й	
Неспособные	19	Самцы	88.3	76.0	72.7	Случайный поиск
	20	»	71.3	132.3	60.3	» »
	21	»	180.0	180.0	108.3	» »
	22	Самки	180.0	121.7	119.7	» »
	23	»	134.0	66.3	121.7	» »
	24	»	145.7	84.3	58.0	» »
	25	»	101.3	99.0	121.7	» »
	26	»	158.7	107.0	82.7	» »
	27	»	34.0	91.7	128.7	» »
	28	»	119.7	106.0	110.0	» »
	29	Самцы	147.3	72.3	83.3	» »
	30	»	180.0	180.0	180.0	» »
	31	»	175.7	142.7	108.0	» »
	32	»	165.3	180.0	113.0	» »
	33	»	135.0	166.0	131.3	» »
	34	»	123.3	180.0	180.0	» »
	35	»	124.7	96.3	94.7	» »
	36	Самки	57.0	103.3	123.7	» »
	37	»	154.3	180.0	180.0	» »
	38	»	139.3	86.7	129.7	» »
	39	»	123.0	123.7	180.0	» »
	40	»	180.0	180.0	180.0	» »
	41	»	145.0	131.3	140.3	» »
	42	Самцы	160.7	123.0	163.3	День 1-й — преобладал тигмотаксис, дни 2-й и 3-й — случайный поиск
	43	»	131.3	126.0	180.0	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — тенденция к пассивному дрейфу
	44	»	180.0	180.0	180.0	Дни 1-й и 2-й — тигмотаксис, день 3-й — случайный поиск
	45	»	87.3	167.3	159.3	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — тенденция к тигмотаксису
	46	»	126.3	126.7	180.0	Дни 1-й и 2-й — случайный поиск, день 3-й — тигмотаксис
	47	Самки	180.0	180.0	180.0	Дни 1-й и 2-й — тигмотаксис, день 3-й — тенденция к пассивному дрейфу
	48	»	161.0	180.0	180.0	День 1-й — случайный поиск, дни 2-й и 3-й — тигмотаксис
	49	»	104.0	144.3	180.0	Дни 1-й и 2-й тенденция к пассивному дрейфу, день 3-й — пассивный дрейф
	50	»	180.0	122.3	180.0	Тигмотаксис
51	»	180.0	180.0	180.0	»	
52	»	133.0	178.0	180.0	День 1-й — случайный поиск, дни 2-й и 3-й — тенденция к тигмотаксису	

Индивиды, постоянно применявшие случайный поиск — тип поведения со средней вероятностью нахождения платформы, составили группу середняков ($n = 25$). Они находят платформу в среднем за 124.5 ± 4.3 с. Различий между днями здесь почти не наблюдается (критерий Уилкоксона для сопряженных пар — $p = 0.27$; критерий знаков — $p = 0.1$; см. рисунок, В). Заметим, что внутри данной группы можно выделить условно более успешную часть особей, два дня из трех находивших платформу в течение двух минут (за все дни в среднем за 98 ± 28 с; $n = 12$), в то время как остальные мыши справлялись с задачей преимущественно на третьей минуте заплыва (за все дни в среднем за 149 ± 31 с; $n = 13$). Следует также отметить, что стратегию случайного поиска демонстрировало большинство мышей в первый день эксперимента — при первичном обследовании бассейна. Также было отмечено, что в первый день эксперимента мыши плавали более активно, чем в последующие дни.

Наконец, оставшаяся часть особей выборки ($n = 11$) хотя бы в один из дней проявляли варианты поведения, при которых нахождение платформы очень мало вероятно: это так называемые «некогнитивные» стратегии (пассивный дрейф или тигмотаксис — [16]). До платформы такие мыши доплывали в среднем к концу попытки (160 ± 15 с), но чаще не находили ее за отведенное время. Время достижения платформы у данной группы возрастает по дням (см. рисунок, Г): после начального (в первый день) ознакомления с обстановкой особи переходили к упомянутым выше поведенческим стратегиям, которые редко приводят к нахождению платформы. Различия между первым и последним днями здесь достоверны (критерий Уилкоксона для сопряженных пар — $p = 0.018$; критерий знаков — $p = 0.023$).

Для каждой из описанных выше групп особей была оценена роль дня эксперимента как фактора (критерий Фридмана). Достоверное влияние дня на различия между дневными выборками было показано у способных и неспособных особей ($p = 0.003$ и $p = 0.02$ соответственно), но не у середняков ($p = 0.24$). Между середняками и способными особями обнаружены достоверные различия дневных выборок значений по дням эксперимента (критерий Манна—Уитни — по всем трем дням $p < 0.048$; двухвыборочный критерий Колмогорова—Смирнова — в первый и третий дни $p < 0.01$). Различия между середняками и группой неспособных достоверны во второй и третий дни (критерий Манна—Уитни — $p < 0.027$; двухвыборочный критерий Колмогорова—Смирнова — $p < 0.025$).

Обсуждение результатов. Исходя из полученных данных можно предположить, что индивидуальные особенности поведения тестируемых животных оказали значительное влияние на результаты теста Морриса. Примененный нами метод оказался нечувствительным к динамике различий между днями эксперимента, в том числе по причине случайного состава выборки тестируемых особей. Из-за того что индивиды с предпочтением различных типов поведения и изначально с неравными шансами найти платформу были взяты в анализ как единая выборка, при статистических расчетах произошло сглаживание различий между днями эксперимента. Эти результаты были рассмотрены как недостоверные, и был сделан вывод о видимом отсутствии изменений в группе по дням.

В недавнем исследовании О. А. Соловьевой и соавт. [8] было проведено деление совокупности особей на две группы согласно времени нахождения животными платформы: тех, чье время было меньше медианы, причисляли к «хорошо обучаемым», а остальных — к «плохо обучаемым». Далее составляли смешанные экспериментальные и контрольные группы: одну половину особей брали из одной «группы по способностям», другую половину — из второй. При сравнении результатов повторного (после введения вещества) прохождения теста между контрольной и экспериментальной группами в целом разница получилась достоверной. Но отдельно между «хорошо обучаемыми» и «плохо обучаемыми» животными из эксперимента и контроля достоверных различий не было найдено. При другой же концентрации вещества наблюдали почти обратную ситуацию.

Авторы статьи [8] объясняют характер различий особенностями влияния разных концентраций введенного вещества на особей из двух выделенных групп. Однако при данной постановке исследования на результат могла значительно повлиять условность принципа выделения «групп по способностям» — точечная граница относительна, т. е. подвержена влиянию случайных факторов и применима только к конкретной выборке особей. Также крайне малое число особей в группах (6 особей, 3 «хорошие» и 3 «плохие») позволяет предположить возможность наложения влияния случайного распределения индивидов по группам на эффекты от введенного вещества. Получается, что в случае применения отбора особей в качестве меры по снижению влияния индивидуальной вариабельности выполнения теста на характер получаемых результатов необходима не только конкретная граница по времени, а и более универсальная, менее подверженная влиянию случайностей граница, например по предпочитаемым типам поведения в тесте.

Возникают вопросы: чем обусловлен демонстрируемый особью тип поведения? Возможно ли его изменение при каких-либо подобранных условиях теста? В нескольких исследованиях рассматривалось выполнение теста Морриса животными с отличиями в поведении: была обнаружена достоверная разница в выполнении теста животными с различными уровнями тревожности — качества, зависящего от индивидуального уровня врожденной характеристики нервной системы (возбудимости) [9]. Ранее уже было упомянуто влияние на выполнение теста Морриса особенностей работы мозга, присущих разным линиям лабораторных животных [17, 29, 44], а также врожденных качеств. В то же время водный лабиринт Морриса предназначен для отражения «уровня работы» функций пространственного научения и пространственной памяти (понятно, что данный уровень будет определен индивидуально для каждой особи). Данные функции выполняются структурами лимбической системы (гиппокампом и др.), и лимбическая система в числе прочего ответственна за эмоции — значимую часть темперамента, с точки зрения физиологии, соответствующего павловскому типу высшей нервной деятельности.

Исходя из вышесказанного можно предположить, что проявляемый особью при прохождении теста Морриса тип поведения определяется (хотя бы в заметной степени) врожденными особенностями функционирования нервной системы данного индивида, присущим особи типом высшей нервной деятельности. А так как тип нервной деятельности неизменен на протяжении жизни особи, можно утверждать, что предпочитаемый характер поведения в тесте Морриса у каждой особи также будет оставаться неизменным при любом протоколе теста, поэтому может быть применим в качестве критерия для разделения особей на хорошо проходящих и плохо проходящих тест. Полученные результаты указывают на правомерность подобного принципа отбора: выявлены заметные и достоверные различия в диапазонах значений и динамике рассматриваемого параметра между группами особей, выделенными по признаку характера поведения в тесте. У способных мышей обнаружено сравнительно быстрое нахождение цели и заметная динамика времени доплыва по дням эксперимента, что позволит использовать данную группу в исследованиях воздействий на мозг, требующих оценки и изменений динамики параметра, и сдвигов его диапазона. Условно более успешную часть середняков также возможно включать в подобные исследования в качестве отдельной «пограничной» группы для выяснения сдвигов диапазона параметра.

Также из вышесказанного следует, что неспособные особи, применяющие «неэффективные» стратегии поведения (например, пассивный дрейф), в принципе систематически не будут находить платформу, потому или изменений по дням у них не наблюдается, как было показано в работах [30, 46], или изменения направлены в сторону увеличения времени доплыва до платформы. Следовательно, такие особи непригодны для экспериментальных исследований каких-либо воздействий на мозг в тех случаях, когда постановка эксперимента предполагает

выявление изменений в динамике времени доплыва или возможно ожидать увеличения диапазона параметра. Но если в качестве результата исследуемого воздействия предполагают уменьшение времени доплыва по сравнению с контролем, таких особей можно брать в тест как отдельную группу.

Таким образом, мы полагаем, что для снижения влияния индивидуальных особенностей поведения на результаты теста необходимо проводить предварительный отбор особей с использованием проявленного каждой особью типа поведения в качестве отборочного критерия. Данное предположение будет проверено нами в последующих работах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ литературы по применению теста Морриса для различных исследовательских задач. Показано, что в литературе нет общепринятых рекомендаций в пользу лучшей пригодности какого-либо одного варианта теста Морриса для задач оценки влияния веществ на функции мозга. Соответственно в данной работе выбран самый простой из методов и с его использованием проведен модельный эксперимент для оценки применимости данного метода в предстоящих исследованиях физиологического влияния наночастиц на когнитивные функции. По результатам эксперимента исходный вариант метода признан нечувствительным. В качестве меры для увеличения чувствительности метода предложен предварительный отбор особей согласно индивидуальным особенностям поведения в данном тесте.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-32-20429 мол_a_вед.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Абаева Л. Ф., Шумский В. И., Петрицкая Е. Н., Рогаткин Д. А., Любченко П. Н. Наночастицы и нанотехнологии сегодня и завтра. Альманах клинич. медицины. 22: 10—17. 2010.
- [2] Анциферова А. Н., Бузулуков Ю. П., Демин В. А., Рогаткин Д. А., Петрицкая Е. Н., Абаева Л. Ф. Методы радиоактивных индикаторов и нейтронно-активационного анализа для исследований биокинетики наночастиц в живом организме. Рос. нанотехнологии. 10(1—2): 100—108. 2015.
- [3] Гмошинский И. В., Хотимченко С. А., Попов В. О., Дзантиев Б. Б., Жердев А. В., Демин В. Ф., Бузулуков Ю. Г. Наноматериалы и нанотехнологии: методы анализа и контроля. Успехи химии. 82(1): 48—76. 2013.
- [4] Гоулман Д. Эмоциональный интеллект. М. АСТ. 2010.
- [5] Жуков Д. А. Стой, кто ведет? Биология поведения человека и других зверей. М. Альпина нон-фикшн. 2014.
- [6] Измеров Н. Ф., Ткач А. В., Иванова Л. А. Нанотехнологии и наночастицы — состояние проблемы и задачи медицины труда. Медицина труда и промышленная экология. 8: 1—5. 2007.
- [7] Подольский И. Я., Щеглов И. В. Влияние подавления синтеза белка в центральной нервной системе на формирование долговременной памяти при решении некоторых поведенческих задач. Журн. высш. нервной деятельности. 54(1): 59—67. 2004.
- [8] Соловьева О. А., Сторожева З. И., Прошин А. Т., Шерстнев В. В. Эффекты стимулятора нейрогенеза Ro 25—6981 на формирование пространственного навыка у взрослых крыс зависят от срока его введения и способности животных к обучению. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 97(2): 146—154. 2011.
- [9] Томиленко Р., Дубровина Н. Избирательность влияния дизоцилпина на пространственное обучение у низко- и высокотревожных мышей. Бюл. СО РАМН. 1: 97—102. 2007.

- [10] *Bucci D., Chiba A., Gallagher M.* Spatial learning in male and female Long-Evans rats. *Behav. Neurosci.* 109(1): 180—183. 1995.
- [11] *Buresova O., Panakhova E., Bures J.* Post-trial flicker stimulation interferes with spatial memory in the Morris water maze. *Neurosci. Lett.* 56: 359—363. 1985.
- [12] *Consalvi C.* Motivation and learning in a water maze. *Psychon. Sci.* 16(1): 34—35. 1969.
- [13] *Crawley J.* Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 37—44. 1985.
- [14] *Van Dam D., Lenders G., De Deyn P.* Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains. *Neurobiol. Learning Memory.* 85: 164—172. 2006.
- [15] *Daniel J., Roberts S., Dohanich G.* Effects of ovarian hormones and environment on radial maze and water maze performance of female rats. *Physiol. Behav.* 66: 11—20. 1999.
- [16] *D'Hooge R., De Deyn P.* Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36: 60—90. 2001.
- [17] *Diana G., Domenico M., Loizzo A., Scotti de Carolis A., Sagratella S.* Age and strain differences in rat place learning and hippocampal dentate gyrus frequency-potential. *Neurosci. Lett.* 171: 113—116. 1994.
- [18] *Eichenbaum H., Stewart C., Morris R.* Hippocampal representation in place learning. *J. Neurosci.* 10: 3531—3542. 1990.
- [19] *Evans S.* How rats learn the simple alternation problem in a temporal water maze. *Pedagogical Seminary and J. Genetic Psychol.* 50(2): 243—275. 1937.
- [20] *Gallagher M., Nicolle M.* Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behav. Brain Res.* 57: 155—162. 1993.
- [21] *Garthe A., Behr J., Kempermann G.* Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS ONE* 4:e5464. doi:10.1371/journal.pone.0005464. 2009.
- [22] *Ge J.-F., Qi C.-C., Qiao J.-P., Wang C.-W., Zhou J.-N.* Sex differences in ICR mice in the morris water maze task. *Physiol. Res.* 62: 107—117. 2013.
- [23] *Geinisman Y., Detoledo-Morrell L., Morrell F., Heller R.* Hippocampal markers of aged-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog. Neurobiol.* 45: 223—252. 1995.
- [24] *Glaser O.* The formation of habits at high speed. *J. Comp. Neurol.* 20: 165—184. 1910.
- [25] *Van Goethem N., Rutten K., van der Staay F. J., Jans L., Akkerman S., Steinbusch H., Blokland A., van't Klooster J., Prickaerts J.* Object recognition testing: Rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behav. Brain Res.* 232(2): 323—334. 2012.
- [26] *Gordon H., Lee P.* No difference in cognitive performance between phases of the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology.* 18(7): 521—531. 1993.
- [27] *Gouveia A., dos Santos U., Felisbino F., Afonseca T., Antunesa G., Morato S.* Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behav. Proc.* 67(2): 167—171. 2004.
- [28] *Gouveia A., Afonseca T., Maximino C., Dominguez R., Morato S.* Influence of gender and estrous cycle in the forced swim test in rats. *Psychol. Neurosci.* 1(2): 191 — 197. 2008.
- [29] *Grauer E., Kapon Y.* Wistar—Kyoto rats in the Morris water maze: impaired working memory and hyper-reactivity to stress. *Behav. Brain Res.* 59: 147—151. 1993.
- [30] *Hoh T., Cain D.* Fractionating the nonspatial pretraining effect in the water maze task. *Behav. Neurosci.* 111: 1285—1291. 1997.
- [31] *Kiss A., Delattre A. M., Pereira S., Carolino R., Szawka R., Anselmo-Franci J., Zanata S., Ferraz A.* 17 β -Estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas. *Behav. Brain Res.* 227: 100—108. 2012.
- [32] *Li Liu, Ding J., Marshall Ch., Gao J., Hua Gang, Xiao Ming.* Pretraining affects Morris water maze performance with different patterns between control and ovariectomized plus d-galactose-injected mice. *Behav. Brain Res.* 217: 244—247. 2011.
- [33] *Lindner M., Schallert T.* Aging and atropine effects on spatial navigation in the Morris water task. *Behav. Neurosci.* 102: 621—634. 1988.
- [34] *Lindner M.* Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. *Neurobiol. Learning Memory.* 68(3): 203—220. 1997.

- [35] *Meziane H., Ouagazza A.-M., Aubert L., Wietrzych M., Krezel W.* Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes, Brain Behav.* 6(2): 192—200. 2007.
- [36] *Morris R.* Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning Motivation.* 12(2): 239—260. 1981.
- [37] *Morris R.* Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 11: 47—60. 1984.
- [38] *Packard M., Kohlmaier J., Alexander G.* Posttraining intrahippocampal estradiol injections enhance spatial memory in male rats: interaction with cholinergic systems. *Behav. Neurosci.* 110: 626—632. 1996.
- [39] *Packard M., Teather L.* Intra-hippocampal estradiol infusion enhances memory in ovariectomized rats. *NeuroReport.* 8: 3009—3013. 1997.
- [40] *Van Praag H., Shubert T., Zhao Ch., Gage F.* Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci.* 25: 8680—8685. 2005.
- [41] *Rissanen A., Puolivali J., van Groen T., Riekkinen Jr. P.* In mice tonic estrogen replacement therapy improves non-spatial and spatial memory in a water maze task. *NeuroReport.* 10: 1369—1372. 1999.
- [42] *Rissman E., Wersinger S., Fugger H., Foster T.* Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor alpha. *Brain Res.* 835: 80—90. 1999.
- [43] *Roof R.* Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. *Behav. Brain Res.* 53: 1—10. 1993.
- [44] *Royce S., Collins F., Rupniak H., Barnes J., Anderson R.* Behavioural analysis and susceptibility to CNS injury of four inbred strains of mice. *Brain Res.* 816: 337—349. 1999.
- [45] *Saab B., Saab A., Roder J.* Statistical and theoretical considerations for the platform re-location water maze. *J. Neurosci. Methods.* 198: 44—52. 2011.
- [46] *Saucier D., Cain D.* Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature.* 378: 186—189. 1995.
- [47] *Shigeta S., Misawa T., Yoshida T., Aikawa H., Momotani H., Miyake K.* Neurobehavioral analysis of high-rate Sidman avoidance rat strain. *Yakubutsu Seishin Kodo.* 9: 217—224. 1989.
- [48] *Simpson J., Kelly J.* The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects. *Behav. Brain Res.* 222: 246—264. 2011.
- [49] *Stackman R., Blasberg M., Langan C., Clark A.* Stability of spatial working memory across the estrous cycle of long—evans rats. *Neurobiol. Learning Memory.* 67(2): 167—171. 1997.
- [50] *Terry A.* Spatial navigation (water maze) tasks. In: Buccafusco J. J. (ed.). *Methods of behavior analysis in neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL). CRC Press. 2009.
- [51] *Vorhees Ch., Williams M.* Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1(2): 848—858. 2006.
- [52] *Waller M., Waller P., Brewster L.* A water maze for use in studies of drive and learning. *Psychol. Rep.* 7: 99—102. 1960.
- [53] *Warren S., Juraska J.* Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav. Neurosci.* 111(2): 259—266. 1997.
- [54] *Whishaw I., Tomie J.-A.* Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water maze. *Physiol. Behav.* 60: 1191—1197. 1996.
- [55] *Wolfer D., Staglar-Bozicevic M., Errington M., Lipp H.-P.* Spatial memory and learning in transgenic mice: fact or artifact? *Physiology.* 13(3): 118—123. 1998.
- [56] *Wolfer D., Madani R., Valenti P., Lipp H.* Extended analysis of path data from mutant mice using the public domain software Wintrack. *Physiol. Behav.* 73: 745—753. 2001.
- [57] *Woods P., Davidson E., Peters R.* Instrumental escape conditioning in a water tank: effects of variation in drive stimulus intensity and reinforcement magnitude. *J. Comp. Psychol.* 57: 466—470. 1964.
- [58] *Yau J., McNair K., Noble J., Brownstein D., Hibberd C., Morton N., Mullins J., Morris R., Cobb S., Seckl J.* Enhanced hippocampal long-term potentiation and spatial learning in aged 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knock-out mice. *J. Neurosci.* 27: 10 487—10 496. 2007.

Поступила 3 VI 2015
После доработки 22 IX 2015