

© Семенов Д.Г., Беляков А.В., 2019

УДК 612.821.2+616.8-092

Семенов Д.Г., Беляков А.В.

Модификация ПКЛ-теста для оценки поведенческой активности и памяти крыс

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034, г. Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6

Поведенческое тестирование лабораторных грызунов в приподнятом крестообразном лабиринте широко применяется в доклиническом тестировании препаратов, в психоневрологических исследованиях, при разработке профилактических и терапевтических мер коррекции неврологических расстройств.

Цель исследования – разработка и испытание модифицированного протокола тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте, повышающего возможность оценки индивидуальных поведенческих характеристик и уровня долговременной памяти крыс.

Методика. На крысах Вистар применено двойное тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте для определения изменений индивидуальных индексов тревожности и характеристик локомоторной и исследовательской активности в повторном тесте. Параллельно определялся индивидуальный индекс долговременной памяти методом «transfer latency». Первичное тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте показало нормальное распределение индекса тревожности для большинства из 130 тестируемых животных. Животные с предельно высоким индексом тревожности и крайне низкой активностью (12%) были исключены из последующего анализа. Основная группа была разделена на 4 подгруппы, в которых крысы повторно тестировались в крестообразном лабиринте через 24 ч (1-я и 2-я подгруппы) и через 72 ч (3-я и 4-я подгруппы).

Результаты. В контроле (1-я и 3-я подгруппы) повторный тест снижал исследовательскую и локомоторную активность, что «имитирует» повышение тревожности. При этом значение индекса долговременной памяти в контроле при трехсуточном интервале (3-я подгруппа) было несколько ниже, чем при суточном (1-я подгруппа). Животные экспериментальных подгрупп между тестами были подвергнуты двум вариантам гипоксии (тяжелая гипоксия для 2-й подгруппы и три сеанса умеренной гипоксии для 4-й подгруппы). Тяжелая гипоксия нивелировала характерный для контроля тормозный паттерн поведения и снижала индекс долговременной памяти. Умеренная гипоксия не давала подобных эффектов, что позволило видеть причину тормозного феномена двойного тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте скорее в развитии габитуации, основанной на долговременной памяти, чем в повышении тревожности.

Заключение. Предлагаемый протокол имеет ряд достоинств в сравнении с однократным тестированием в приподнятом крестообразном лабиринте. Он допускает значительное поведенческое фенотипирование животных, что позволяет: 1) скорректировать протоколы последующих воздействий; 2) учитывать индивидуальные реакции животных на экспериментальное воздействие с возможностью исключения артефакта двойного тестирования; и 3) включить оценку долговременной памяти.

Ключевые слова: поведение; парное тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте; transfer latency-тест; габитуация; пространственная память.

Для цитирования: Семенов Д.Г., Беляков А.В. Модификация ПКЛ-теста для оценки поведенческой активности и памяти крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(4): 158-164.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.158-164

Для корреспонденции **Семенов Дмитрий Германович**, e-mail: dsem50@rambler.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.05.2019

Semenov D.G., Belyakov A.V.

A modification of EPM test for evaluation of behavioral activity and memory of rats

I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
Naberezhnaya Makarova 6, St. Petersburg 199034, Russia

Behavioral testing of laboratory rodents in the elevated plus maze (EPM) is widely used in preclinical pharmacology and psychoneurology to develop preventive and therapeutic approaches for correction of neurological disorders. The aim of the work was to develop and test a modified EPM protocol to enhance evaluation of individual behavioral characteristics and the long-term memory in rats. A double EPM test was used in Wistar rats to study changes in individual anxiety indexes (AI) and locomotor and

exploratory activities in the second test. Also, individual Long-term Memory Indexes (LMI) were determined using the «transfer latency» method. The primary EPM test showed a normal distribution of AI for a majority of 130 rats except for 12% of animals with extremely high AI and low activity; these animals were excluded from the analysis. The main group was divided into 4 subgroups, which were subjected to the repeated test either in 24 hours (subgroups 1 and 2) or in 72 hours (subgroups 3 and 4). In the control subgroups (1 and 3), the second EPM test showed a decrease in exploratory and locomotor activities, which «mimicked» increased anxiety. The LMI value in subgroup 3 was somewhat lower than in subgroup 1. The experimental subgroups were exposed to different hypoxic impacts between the tests (severe hypoxia or three sessions of moderate hypoxia in subgroups 2 and 4, respectively). Severe hypoxia abolished the inhibitory pattern of behavior characteristic in the control group and reduced LMI. Moderate hypoxia did not exert such effects. This suggested that habituation based on long-term memory rather than anxiety was a cause for the inhibitory phenomenon of double EPM. The proposed protocol has advantages over a single EPM. This protocol allows a for initial phenotyping of animals 1) to adjust protocols of subsequent exposures; 2) to take into account individual responses of animals to experimental impacts, which makes it possible to exclude the artifact of double testing; and 3) to include an assessment of long-term memory.

Keywords: rat behavior; habituation; repeated EPM test; transfer latency test; spatial memory.

For citation: Semenov D.G., Belyakov A.V. A modification of EPM test for evaluation of behavioral activity and memory of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(4): 158-164. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.04.158-164

For correspondence:

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 25.05.2019

Введение

Количественная оценка поведения лабораторных грызунов в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) является распространенным методом доклинических исследований фармакологических препаратов, в частности, транквилизаторов. Метод успешно используется в экспериментальной психофизиологии при изучении механизмов функционирования и повреждения различных отделов головного мозга. Обычно при исследовании в ПКЛ сравнивают усредненные поведенческие характеристики двух групп животных – экспериментальной и контрольной. Применение ПКЛ в одной группе дважды, до и после применяемого воздействия, целесообразно по нескольким причинам. Во-первых, парадигма повторяемого теста ПКЛ (пПКЛ) позволяет еще до экспериментального воздействия выявить индивидуальный уровень тревожности животных и при повторном тесте оценивать эффект самого воздействия с учетом исходной специфики каждого животного. Среди крыс линии Вистар были выделены две подпопуляции, различающиеся предпочтением к активной или пассивной тактике избегания, причем, у них были обнаружены различия в конститутивной активности определенных генов [1]. Во-вторых, пПКЛ позволяет оценить эффект воздействия, наносимого между тестами, для каждой особи путем количественной оценки индивидуальной разницы между характеристиками 1-го и 2-го тестирования. В таком

случае сравниваются и статистически обрабатываются выборки этих разностей, полученных в контрольной и экспериментальной сериях, а не два рандомизированных массива данных однократного ПКЛ тестирования контрольной и экспериментальной групп. В-третьих, пПКЛ открывает возможность одновременного применения дополнительного теста на «время перемещения» – «transfer latency» (TL), характеризующего долговременную пространственную память и, при этом, не интерферирующего с оценкой тревожности [1-4]. Тест TL заключается в начальном позиционировании крысы не в центре ПКЛ лабиринта, а на конце его открытого рукава, и регистрации времени, в течение которого животное находит убежище в закрытом рукаве. При первом посещении лабиринта (ПКЛ1) на это тратится время TL_0 , обычно, десятки секунд. При втором тестировании (ПКЛ2) через «t» часов или суток животное уходит в закрытый рукав быстрее (TLt), при условии сохраненной пространственной памяти. Степень снижения TLt относительно TL_0 характеризует «прочность» этой памяти у данного животного для данного отрезка времени «t» между тестами.

Вместе с тем, парадигма пПКЛ имеет недостаток. Было замечено, что при повторном пребывании в ПКЛ животные демонстрируют сниженную посещаемость открытых рукавов по сравнению с первичным тестированием [5]. Этот феномен ранее обратил на себя вни-

вание, когда применение анксиолитических препаратов после ПКЛ1 приводило к парадоксальному повышению, а не снижению, показателей тревожности, регистрируемых в ПКЛ2 [6, 7,]. Некоторые авторы склонны считать этот феномен результатом именно повышения тревожности после ПКЛ1 [8]. Иное объяснение предполагает ведущую роль торможения локоторной и/или исследовательской активности животного и, как следствие, автоматическое сокращение посещаемости открытых участков лабиринта [9], т.е. главного показателя, характеризующего тревожность. Каков бы ни был механизм этого феномена, методически следует отделять эффект экспериментального воздействия от артефакта пПКЛ, для чего нужен соответствующий «Sham» – контроль. Мы склонны усматривать причину «анксиогенного» феномена пПКЛ в привыкании, в основе которого должна лежать сохраненная пространственная память о ПКЛ1. Один из способов проверки этого предположения состоит в применении теста TL и амнезирующих экспериментальных воздействий между ПКЛ1 и ПКЛ2.

Цель работы – разработка и испытание модифицированного протокола тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте, повышающего возможность оценки индивидуальных поведенческих характеристик и уровня долговременной памяти крыс.

Методика

В задачи исследования входило создание протокола пПКЛ, при котором: (1) по результатам первичного тестирования для каждого животного определяется уровень тревожности для выявления из общего массива возможных фенотипических групп, требующих при дальнейших экспериментальных воздействиях раздельного анализа; (2) при повторном тесте в ПКЛ после экспериментального воздействия (эксперимент) или без него (контроль) регистрируются характеристики тех же особей с установлением соответствующих индивидуальных различий их поведенческих показателей (ПКЛ2 – ПКЛ1), а так же определяются индивидуальные уровни пространственной памяти, сохраненной к моменту ПКЛ2, (3) результаты тестирования контрольных и экспериментальных групп сравниваются с целью выяснения эффекта воздействия, отделенного от артефакта повторного ПКЛ-теста. Для уточнения природы «анксиогенного» феномена пПКЛ применяются экспериментальные воздействия, предположительно по-разному влияющие на долговременную память (в нашем случае – 2 вида гипобарической гипоксии различной тяжести).

Животные. Работа проведена на 130 крысах линии Вистар (самцах массой 180–210 г), полученных в ЦКП

«Биоколлекция» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все процедуры, связанные с содержанием и использованием животных, проводили с соблюдением директив Европарламента и Совета европейского союза (2010/63/EU), регламентирующих использование животных в научных целях. Экспериментальные протоколы рассмотрены и утверждены Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (протокол № 12/9 от 03.09.2018). Перед началом исследований животные, рассажены по 6 особей в стандартные полипропиленовые лабораторные клетки, размером 545x395x200 мм, проводили 4 сут в лабораторных условиях без пересортировки, при постоянной температуре 22 °С, режиме освещения 12 ч через 12 ч (со сменой в 7:00 и 19:00) и неограниченном доступе к воде и корму. Поведенческое тестирование проводили с 10:00 до 12:00.

Оборудование. Инструмент ПКЛ (рукава 50x14 см, высота стенок 30 см, высота над полом 90 см) был модифицирован встроенной светодиодной подсветкой полов открытых участков [10]. Эта модификация позволила сделать освещение обоих открытых рукавов одинаковым, стабильным для всех серий тестирования и четко регулируемым при настройке освещения. Кроме того, светящийся пол, в отличие от внешних софитов с лампами накаливания, не имеет теплового компонента и не дает тени. Яркость и градиент свечения полов предварительно были настроены так, чтобы добиться соотношения заходов в закрытые и открытые рукава приблизительно равного 3:1, т.е. типичного для лабиринтов с софитным освещением.

Измерения. Классификация, подсчет и хронометрирование поведенческих актов по видеозаписи, проводились лаборантом «вслепую», т.е. без ознакомления его с протоколами процедур, применявшихся к наблюдаемым группам животных. Тестирование в ПКЛ применяли дважды и оба раза начинали с посадки животного на конце открытого рукава (носом от центра) и определения показателя TL. Для количественной оценки индивидуальной пространственной памяти нами применен «индекс долговременной памяти» (ИДП), определяемый по формуле: $ИДП = 1 - TL_t / TL_0$, где TL_t и TL_0 латентность ухода при повторном (через t сут) и первичном (0 сут) посещении ПКЛ, соответственно. Животному, проникшему в закрытый рукав (всеми четырьмя лапами) после TL теста, предоставляли 5 мин на обследование всего лабиринта. При этом регистрировали поведенческие показатели, характеризующие тревожность: суммарное число посещений открытых рукавов и задержек в центральном участке (пОЦ), а также время в секундах, потраченное на это (тОЦ); характеризующие исследовательскую активность: общее чис-

ло стоек и свешиваний (nCC); и характеризующие локомоторную активность: число перемещений в закрытых рукавах с изменением направления движения (nПЗ). Ряд других учитываемых характеристик (дефекация, уринация, груминг, замирания и др.) не были взяты в расчет, т.к. проявлялись не у всех животных и не показали зависимости от применяемых воздействий. Метод пПКЛ применялся в двух вариантах, с межтестовым интервалом 24 ч и 72 ч. Для выявления эффектов пПКЛ для каждого животного в каждом варианте определяли разность между повторными и первично-тестовыми значениями. Для оценки изначальной индивидуальной тревожности, определяемой в ПКЛ1, для каждой особи рассчитывался индекс тревожности (ИТ).

$ИТ = 1 - 0,5(tOЦ / 300 + nOЦ / nOЗ)$, где:

nOЗ - общее число посещений открытых и закрытых рукавов,

tOЦ – время (с), потраченное на суммарное число посещений открытых рукавов и задержек в центральном участке,

nOЦ – суммарное число посещений открытых рукавов и задержек в центральном участке.

Этот, разработанный нами индекс, является модификацией индекса тревожности Коена [9], но отличается тем, что число и время посещения открытых рукавов мы дополняем числом и временем задержек на открытом освещенном перекрестке, которые обычно сопровождаются свешиванием.

Тестовые воздействия. Для экспериментального воздействия на поведение и пространственную память часть крыс из группы, предназначенной для тестирования с 1 сут интервалом, была подвергнута однократной барокамерной 3-часовой тяжелой гипобарической гипоксии – ТГГ (180 ммHg) сразу после ПКЛ1. Тест ПКЛ2 применяли через 1 сут. по завершении воздействия. Процедура ТГГ известна своим амнестическим эффектом на крыс, тестируемых в лабиринте Морриса [11]. К части крыс, у которых тестировалось поведение и память с интервалом 3 сут, применяли серию из 3-ежедневных 2-часовых экспозиций барокамерной умеренной гипобарической гипоксии – ЗУГГ (360 ммHg). В такой серии первая экспозиция применялась сразу после ПКЛ1, а последующие две экспозиции с интервалом 1 сут. В данном случае, тест ПКЛ2 применяли через 1 сут после 3-й экспозиции. Процедура ЗУГГ ранее описана, как оказывающая нейропротективное воздействие на мозг [12, 13] и, предположительно, не должна была ухудшать процессы формирования долговременной памяти. Соответствующие подгруппы крыс, прошедших пПКЛ без гипоксии, служили контролем. Технические детали указанных гипобарических процедур описаны нами ранее [12].

Обработка данных. При сопоставлении количественных значений поведенческих характеристик каждой особи, полученных в ПКЛ1 и ПКЛ2 с интервалом 1 сут или 3 сут были получены соответствующие две группы разностей подгрупп 1 и 2. Тот же метод применен для животных, которым между тестами предъявляли ТГГ (межтестовый интервал 1 сут) или ЗУГГ (межтестовый интервал 3 сут) с получением разностей для подгрупп 3 и 4, соответственно. Для выявления эффектов ТГГ или ЗУГГ сравнивались между собой соответствующие пары – 1 с 3 и 2 с 4.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики при помощи пакета программ «Statistica 10» с использованием параметрического t критерия Стьюдента для пар независимых выборок. Все 4 группы разностей соответствовали требованиям нормальности распределения по критерию Шапиро-Уилка. Пороговый уровень статистической значимости был принят равным 5%. На диаграммах представлены средние значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Результаты испытания методики пПКЛ

Фенотипирование животных в ПКЛ1. При вычислении ИТ для каждой особи в ПКЛ1 получено разделение всей совокупности ($n=130$) на 2 кластера с $ИТ \leq 0,95$ ($n=114$) и $ИТ \geq 0,96$ ($n=16$), названных, соответственно, группами с «изначально нормальным уровнем тревожности» (Н) и с «изначально высоким уровнем тревожности» (Т) (рис. 1, а). Группы Н и Т статистически значимо различались не только по среднему ИТ, но и по характеристикам исследовательской и локомоторной активности (рис. 1, б).

Для повторного теста в ПКЛ с двумя интервалами времени без и с экспериментальным воздействием необходимо было разделить каждую из фенотипических групп на 4 подгруппы. При таком делении анализ поведения группы Т приводил к статистически незначимым результатам сравнения из-за малочисленности выборок. Кроме того, изначально крайне низкие значения характеристик крыс этой группы не позволяли выявить тормозных реакций, как на повторный тест, так и на гипоксию. В связи с этим «минорная» группа Т была изъята из рассмотрения. Приведенные далее результаты испытаний касаются группы Н.

Воздействие пПКЛ и гипобарической гипоксии на поведенческие характеристики крыс группы Н. В ПКЛ2 в обеих контрольных подгруппах 1 и 2 выявлено снижение показателей локомоторной (nПЗ) и исследовательской (nCC) активности. Поскольку эти показатели косвенно связаны с показателями, формирующими вели-

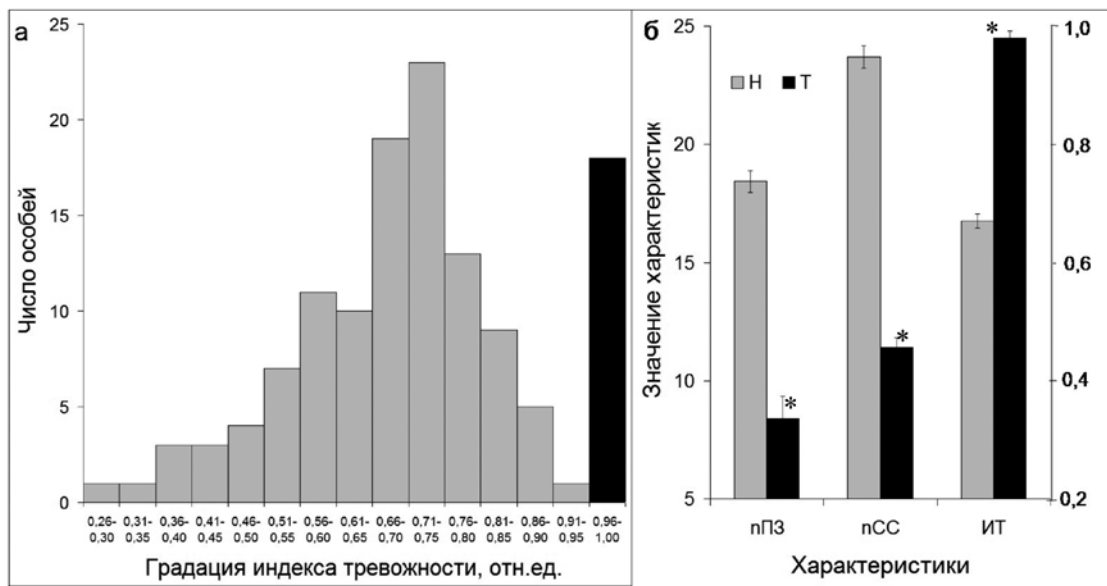


Рис. 1. Разделение животных с различными поведенческими фенотипами по результатам первичного теста ПКЛ.

а) Классификация животных по величине индекса тревожности. Серые столбики – группа Н (n=114), черные столбики – группа Т (n=16).

б) Усредненные характеристики поведения выделенных фенотипических групп. По оси абсцисс – поведенческие характеристики: пПЗ – число перемещений в закрытых рукавах и пСС – общее число стоек и свешиваний (значения на левой оси ординат). А так же ИТ – индекс тревожности (значения на правой оси ординат). (*) – статистически значимые различия характеристик Н и Т групп.

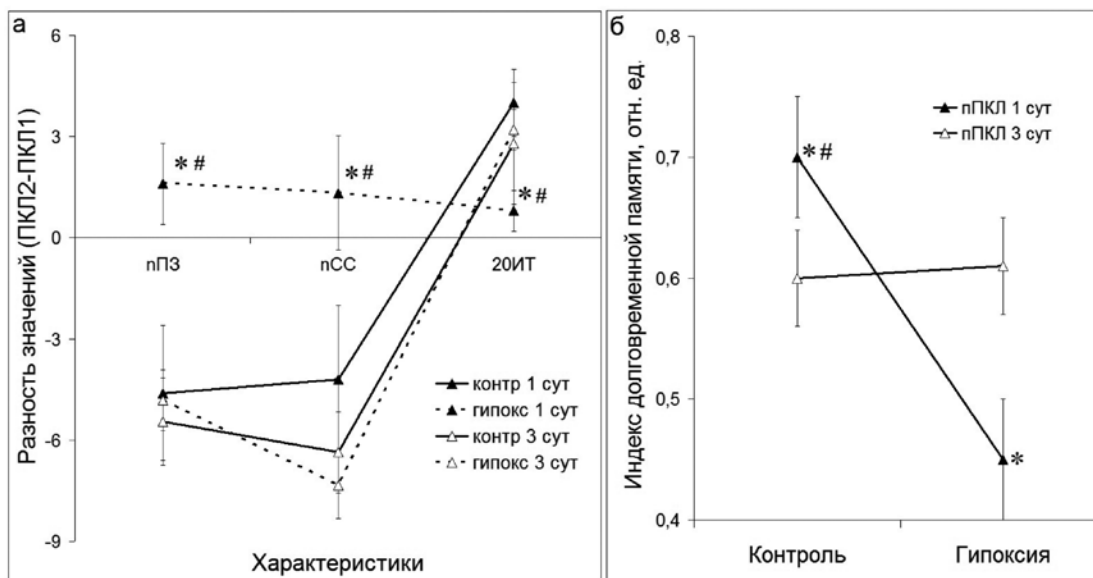


Рис. 2. Изменения поведенческих характеристик и долговременной памяти при двух интервалах пПКЛ тестирования крыс группы Н.

а) Разности поведенческих характеристик контрольных (n=14) и гипоксических (n=15) животных (сплошная и штриховая линии, соответственно), прошедших пПКЛ с интервалом 1 сут (черные треугольники), и разности характеристик контрольных (n=11) и гипоксических (n=21) животных (обозначения линий те же), прошедших пПКЛ с интервалом 3 сут (белые треугольники). (*) – статистически значимые различия групп «ТГГ (1 сут)» и «контроль (1 сут)». (#) – статистические значимые различия групп «гипоксия 1 сут» и «гипоксия 3 сут».

б) Значения Индекса долговременной пространственной памяти в контроле (n=13-14) и с применением гипоксии (n=16-17) для пПКЛ 1 су (черные треугольники) и пПКЛ 3 сут (белые треугольники). (*) – статистически значимые различия групп «пПКЛ 1 сут» и «пПКЛ 3 сут»; (#) – статистические значимые различия групп «гипоксия (ТГГ)» и «контроль».

чину ИТ, можно предположить, что рост последнего при контрольных пПКЛ (и даже в случае применения ЗУГГ между тестами) является следствием снижения локомоторной и исследовательской активности (рис. 2, а), показывая, таким образом, отчетливый тормозный след ПКЛ1, проявляющийся при втором тесте. Вместе с тем, если между тестами с интервалом 1 сут применялась ТГГ (подгруппа 3), то уровни характеристики, полученных при ПКЛ1 и ПКЛ2 существенно не различались (разности близки к «0») (рис. 2, а, пунктир с черными маркерами).

Воздействие пПКЛ и гипобарической гипоксии на долговременную пространственную память группы Н. В контроле средние величины индивидуальных ИДП, определявшиеся в подгруппе 2 (3 сут интервал) были несколько ниже, чем в подгруппе 1 (1 сут интервал), что представляется естественным. Применение ТГГ между тестами показало сильный амнестический эффект при межтестовом интервале 1 сут, а процедура ЗУГГ не влияла на память даже при 3 сут. интервале (рис. 2, б)

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в парадигме пПКЛ тестирования животные как с 1 сут, так и 3 сут интервалом, демонстрируют снижение исследовательской и локомоторной активности, что, очевидно, отражается и на посещаемости открытых участков, симулируя феномен «анксиогенности». Поскольку ТГГ, как нами показано, подавляет долговременную память и блокирует феномен повторного теста, а ЗУГГ сохраняет память и не влияет на этот феномен, можно предположить, что основной причиной снижения показателей при повторном тесте ПКЛ является именно сохраненная пространственная память о первичном его посещении.

Заключение

Таким образом, испытанный протокол пПКЛ имеет ряд преимуществ в сравнении с традиционным однократным ПКЛ-тестированием. Он оценивает индивидуальные реакции каждого животного на воздействие в сравнении с его исходным состоянием, допускает «сортировку» животных по результатам исходного поведенческого фенотипирования, которая может скорректировать протоколы последующего воздействия, позволяет вычленить фоновый эффект повторяющегося тестирования из исследуемого экспериментального эффекта, дополнительно включает оценку долговременной пространственной памяти.

Работа проведена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (направление 63).

Литература (п.п. 1-9; 11 см. References)

10. Семенов Д.Г., Беляков А.В. Патент РФ на ПМ № 159773. Устройство для тестирования уровня тревожности грызунов. *Оф. Бюл. «Изобретения. Полезные модели»*. 2016; № 5. <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU159773.PDF>.
12. Беляков А.В., Дудкин К.Н., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О., Семенов Д.Г. Способ улучшения когнитивных функций. Патент РФ на изобретение № 2593345. *Оф. Бюл. «Изобретения. Полезные модели»*. 2016; № 22. <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU2593345.PDF>.
13. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. Молекулярно-клеточные и гормональные механизмы индуцированной толерантности мозга к экстремальным факторам среды. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2012; 98(1): 108–26. https://elibrary.ru/download/elibrary_17697773_92891518.pdf.

References

1. Landgraf R., Wigger A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav. Genet.* 2002; 32(5): 301–14. <https://doi.org/10.1023/A:1020258104318>.
2. López Hill X, Richeri A., Scorza C. Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus maze in rats. *Physiol. Behav.* 2015; 147: 359–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.013>.
3. López Hill X, Richeri A., Scorza M.C. Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT_{1A} receptors and hippocampal BDNF levels. *Physiol. Behav.* 2017; 179: 346–52. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.07.016>.
4. Nade V.S., Kawale L.A., Valte K.D., Shendye N.V. Cognitive enhancing effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on learning and memory. *Indian J. Pharmacol.* 2015; 47(3): 263–69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450550/>.
5. Walf A.A., Frye C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007; 2(2): 322–28. doi:10.1038/nprot.2007.44.
6. Pereira J.K., Vieira R.J., Konishi C.T., Ribeiro R.A., Frussa-Filho R. The phenomenon of «one-trial tolerance» to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci.* 1999; 65(10): 101–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499876>.
7. Gonzalez, L.E., File S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 1997; 17: 1505–11. <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/17/4/1505.full.pdf>.
8. Schneider P., Ho Y-J., Spanagel R., Pawlak C.R. A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Front. Behav. Neurosci.* 2011; 5: 1–8. <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU159773>. *Ustrojstvo dlya testirovaniya urovnya trevozhnosti gryzunov.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146044/pdf/fnbeh-05-00043.pdf>.
9. Cohen H., Liu T., Kozlovsky N., Kaplan Z., Zohar J., Mathe A. The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacol.* 2012; 37: 350–63. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3242318/pdf/npp2011230a.pdf>.
10. Semenov D.G., Belyakov A.V. The device testing of anxiety level in rodents. Patent № 159773, RF; Patent RF на ПМ № 159773.

- Ustrojstvo dlya testirovaniya urovnya trevozhnosti gryzunov. *Off. Bull. «Izobreteniya. Poleznye modeli»*. 2016; № 5. (In Russian). <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU159773.PDF>.
11. Vataeva L.A., Tyul'kova E.I., Samoilov M.O. Influence of Severe Hypoxia on Rat Emotional Behavior: The Modifying Effect of Preconditioning. *Doklady Biological Sciences*. 2004; 395: 109-11.
 12. Belyakov A.V., Dudkin K.N., Rybnikova E.A., Samoilov M.O., Semenov D.G. *The way to improve cognitive functions. Patent № 2593345, RF; [Sposob uluchsheniya kognitivnyh funkcyj. Patent RF na izobretenie № 2593345]. Of. Byul. «Izobreteniya. Poleznye modeli»*. 2016; № 22. *Off. Bull.* (In Russian). <http://www.infran.ru/Documents/Innovation/RU2593345.PDF>.
 13. Samoilov M.O., Rybnikova E.A. Molecular-cellular and hormonal mechanisms of induced brain tolerance of extreme factors. *Russ. J. Physiol.* 2012; 98(1): 108-26. (In Russian). https://elibrary.ru/download/elibrary_17697773_92891518.pdf.

Сведения об авторах:

Семенов Дмитрий Германович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., проф., лаб. регуляции функций нейронов мозга, e-mail: dsem50@rambler.ru;

Беляков Александр Витальевич, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. регуляции функций нейронов мозга ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, e-mail: belyakov07@gmail.com