



Влияние разных доз этанола на ультразвуковую вокализацию крыс

Ю.В. Фокин¹, А.Г. Берзина², В.Н. Каркищенко¹, О.В. Алимкина¹,
Н.Б. Гамалей²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГБУ «Национальный научный центр наркологии» Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.б.н. Фокин Юрий Владимирович, fokin-yuri@yandex.ru

Исследовано влияние разных доз этанола на параметры вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне. Установлено, что накопление этанола отражается в изменении частотно-спектральных характеристик ультразвуковой вокализации крыс. Этанол, вводимый крысам в дозах, приблизительно равных 1, 3 и 4 г/кг, формирует позитивное аффективное состояние, а в дозах 2 и 5 г/кг – негативное. Ультразвуковая вокализация крыс, получивших 3 г/кг этилового спирта, может отражать признаки эйфории, а близкая к летальной доза 5 г/кг вызывает обнаружение в ультразвуке признаков дистресса. Модель исследования психоэмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуке можно рекомендовать для доклинических испытаний средств лечения алкогольной зависимости.

Ключевые слова: этанол, алкогольное опьянение, ультразвуковая вокализация, аффективное состояние, крысы.

Введение

Разработка лекарственных средств и способов лечения алкогольной зависимости тесно связана с изучением нейрофизиологических процессов, происходящих в организме под действием алкоголя.

Этиловый спирт относится к биологически активным веществам широкого фармакологического действия. Он быстро проникает в мозг и обнаруживается там почти в такой же концентрации как и в крови, что обуславливает его непосредственное влияние на ЦНС.

При высоких дозах алкоголя повышается сосудистая проницаемость. Это способствует поступлению алкоголя в астроциты, являющиеся компонентом гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В результате происходит набухание и деструкция астроцитов и, как следствие, повышение проницаемости ГЭБ. Пройдя этот барьер, этанол и, особенно, ацетальдегид могут оказывать прямое токсическое влияние на нейроны, приводя к их гибели [8].

Одним из доступных неинвазивных методов выявления структурных изме-

нений в ЦНС у человека под влиянием различного рода интоксикаций является регистрация стволовых слуховых вызванных потенциалов (ССВП). Метод ССВП широко применяется в клинической нейрофизиологии и в специальных экспериментальных исследованиях действия алкоголя на мозг человека.

До настоящего времени оценка влияния алкоголя на лабораторных животных проводилась с помощью метода электроэнцефалографии (ЭЭГ). Однако в последние годы группой учёных в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России проводился интенсивный поиск новых биологических моделей для исследования различных аспектов действия фармакологических препаратов, в т.ч. на психоэмоциональную сферу [3]. В частности, была изучена возможность применения с этой

целью метода регистрации ультразвуковой вокализации (УЗВ) животных [7]. Данный феномен УЗВ был обнаружен у всех исследованных видов лабораторных животных (крысы, мыши, хомяки, морские свинки, кролики, мини-свиньи, макаки-резусы), а также был установлен и в отношении человека. Было показано, что УЗВ крыс является не только коммуникативной особенностью животных, но и отражением таких аффективных состояний как комфорт/дискомфорт, тревожность, агрессия и др. [17]. В частности, было показано, что доминирование УЗВ крыс в диапазоне 20-30 кГц свидетельствует о негативных аффективных состояниях, тогда как УЗВ в более высокочастотном диапазоне (35-45 кГц) отражает позитивные аффективные состояния (рис. 1).

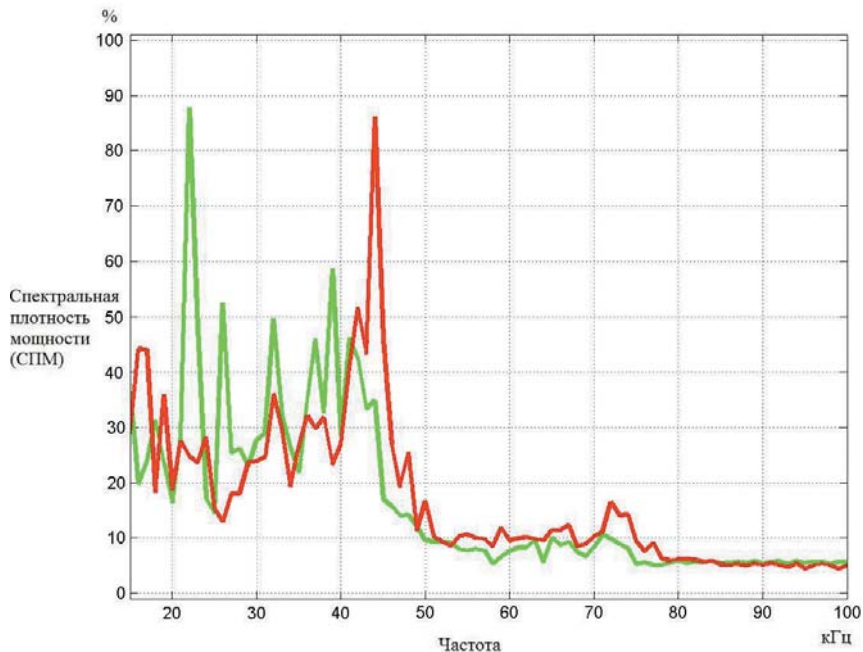


Рис. 1. Пример УЗВ крыс в позитивных и негативных аффективных состояниях. По оси абсцисс — частота УЗВ, кГц; по оси ординат — спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Зелёная кривая — психоэмоциональный дискомфорт, красная кривая — комфорт.

Способность человека и животных генерировать ультразвуковые колебания в сопоставимых диапазонах частот позволяет использовать параметры УЗВ для экстраполяции на человека результатов исследований, полученных на лабораторных животных.

Цель исследования – оценить действие разных доз этанола на параметры вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне.

Материалы и методы

Эксперимент проводился сотрудниками лаборатории нейротехнологий ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» совместно с сотрудниками лаборатории иммунохимии ФГБУ «Национальный научный центр наркологии» Минздрава России на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА.

Тестируемые животные – 4 половозрелые (3 мес.) самки крыс линии WAG/GY, массой 250 ± 10 г.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 г.), в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986),

согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [9]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтическими комиссиями ФГБУН НЦБМТ ФМБА и ФГБУ «ННЦ наркологии» Минздрава России.

Условия кормления и содержания. Крыс содержали в микроизоляторной системе «RairIsoSystem». Животные соответствовали категории конвенциональных. В качестве подстила использовали стерильные древесные опилки. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась вволю в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха $18-22^{\circ}\text{C}$ и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. Вновь прибывшие животные находились на карантине 7 дней в клетках.

Алкогольное опьянение моделировалось с помощью внутрижелудочного зондового введения (рис. 2) этанола (водка «Путинка»), пятикратно, в дозах по 1 г/кг с интервалами в 20 мин (для 2-й и 3-й доз) и 60 мин (для 4-й и 5-й доз).



Рис. 2. Внутривентрикулярное введение крысам алкоголя.

Регистрация УЗВ. Ультразвуковые волны фиксировались с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack («Metris B.V.», Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощности ультразвука (СПМ), генерируемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку

изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнивая его к 100%, остальные значения приводили в соответствие с максимумом. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам.

Запись УЗВ осуществлялась в течение 5 мин по следующей схеме:

- 1-я доза (1 г/кг) – через 20 мин,
- 2-я доза (2 г/кг) – через 40 мин*,
- 3-я доза (3 г/кг) – через 60 мин*,
- 4-я доза (4 г/кг) – через 120 мин*,
- 5-я доза (5 г/кг) – через 180 мин*,
- (* – после первой дозы).

Результаты и их обсуждение

График УЗВ крыс, получивших первую дозу этанола (через 20 мин после введения), представлен на рис. 3.

Согласно рис. 3, наибольшая мощность УЗВ группы животных, получивших этанол в дозе 1 г/кг, приходится на диапазон 37-44 кГц, с максимумом в его конечной точке. Дополнительные пики СПМ имеются в диапазонах до 20 и около 30 кГц, однако они выражены на 25-50% слабее.

Согласно литературным сведениям [13-19] и результатам, полученным нами ранее в исследованиях по данной тематике [2; 4-7; 11; 12], диапазон около 35-45 кГц в УЗВ крыс отражает их благоприятное, комфортное состояние, т.е. после «принятия» одной дозы алкоголя у крыс отмечается позитивное аффективное состояние.

До настоящего времени нет единого мнения о том, на какие именно структуры мозга наиболее сильно влияет алкоголь. Опыты на животных показали, что алкоголь в дозе 1г/кг вызывал началь-

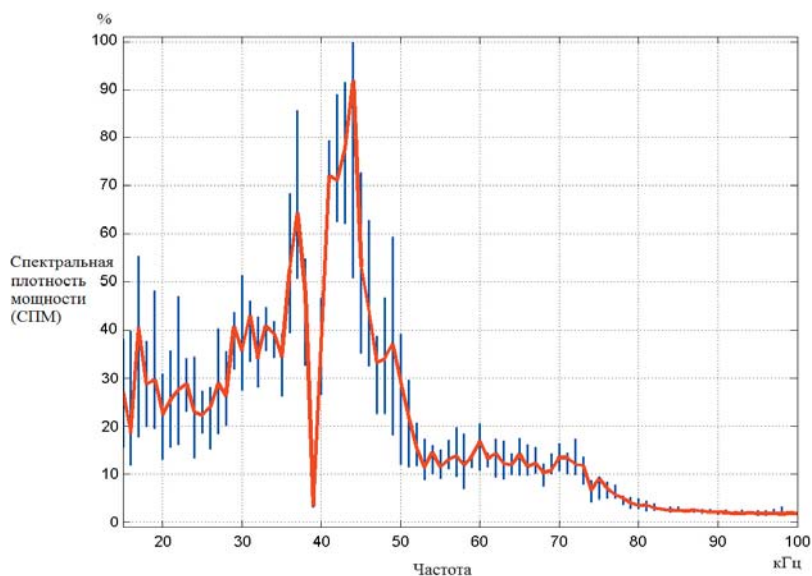


Рис. 3. УЗВ крыс после 1-й дозы алкоголя. По оси абсцисс – частота УЗВ, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности (СПМ) УЗВ, %. Красная кривая – медианы частот, синие вертикальные линии – 95% доверительный интервал.

ное увеличение частоты и амплитуды волн спонтанной ЭЭГ в корковых зонах и уменьшение их частоты и амплитуды в среднемозговой ретикулярной формации при всех концентрациях раствора алкоголя. Однако, если концентрации более высоки, имеет место выраженное

уменьшение частоты и амплитуды волн во всех отведениях при заметной тормозной поведенческой реакции [1].

Результаты исследования УЗВ крыс, получивших вторую дозу этанола (через 40 мин после первой дозы), представлены на рис. 4.

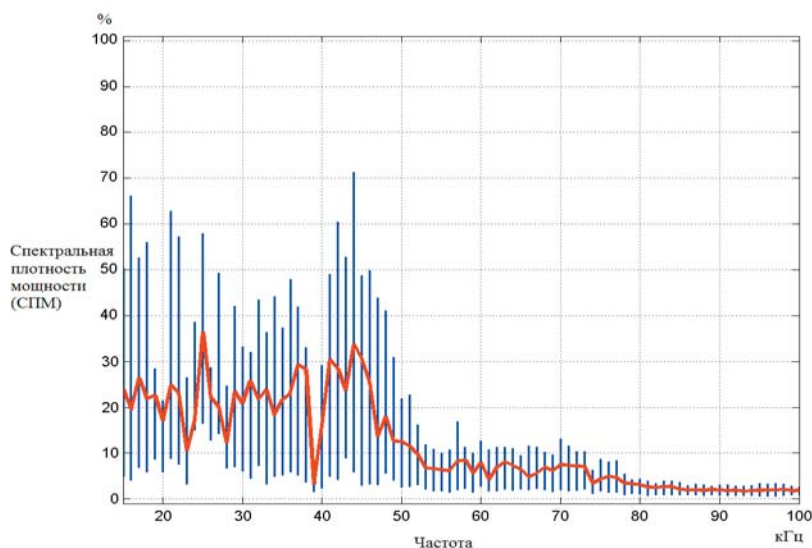


Рис. 4. УЗВ крыс после 2-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 3.

Из рис. 4 видно, что после второй дозы этанола (общая концентрация – примерно 2 г/кг, без учёта выведения) произошло существенное снижение спектральной мощности УЗВ в «диапазоне комфорта» и перемещение максимума её плотности в диапазон 20-30 кГц, являющийся показателем дискомфорта, тревожного психоэмоционального состояния. Максимум СПМ (примерно 38%) приходится на частоту около 26 кГц. На частоте около 45 кГц эта величина равна примерно 34%.

Таким образом, аффективное состояние животных, получивших вторую дозу алкоголя, в данный временной промежуток является достаточно противоречивым. Вероятно, оно может расцениваться как пограничное, с негативными признаками.

Параметры УЗВ крыс, получивших третью дозу этанола (через 60 мин после первой дозы), представлены на рис. 5.

После введения третьей дозы этанола (общая концентрация – примерно 3 г/кг, без учёта выведения) максимальная спектральная мощность УЗВ (около 70-80%) снова, как и после первой дозы алкоголя, приходится в диапазон 35-45 кГц, что свидетельствует о пребывании животных в комфортном психоэмоциональном состоянии.

Максимум СПМ приходится на крайнюю точку «комфортного» диапазона. Негативных признаков в виде тревожности, беспокойства и т.д. у крыс в данный временной промежуток не наблюдается (СПМ в «дискомфортном» диапазоне почти на 50% ниже). На основании этого можно предположить, что аффективное состояние крыс, получивших этанол в дозе, приблизительно равной 3 г/кг, более позитивное и, возможно, гомологично человеческой радости, эйфории и т.д.

Анализ УЗВ крыс, получивших четвертую дозу этанола (через 120 мин после первой дозы), представлен на рис. 6.

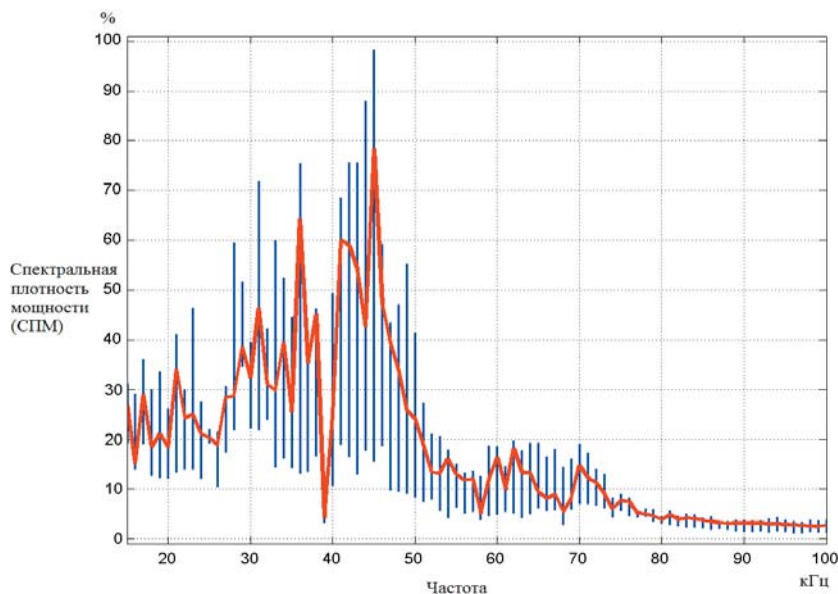


Рис. 5. УЗВ крыс после 3-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 3.

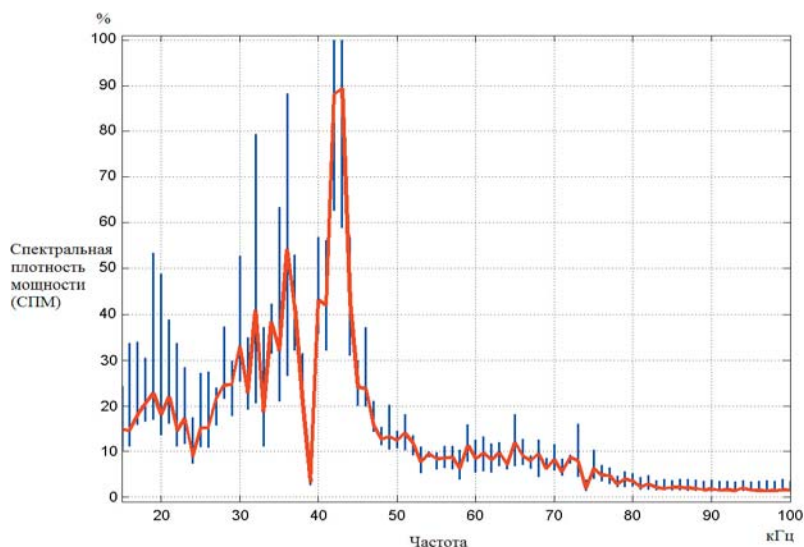


Рис. 6. УЗВ крыс после 4-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 5.

Анализируя рис. 6, можно заключить, что после введения четвертой дозы этанола (общая концентрация – примерно 4 г/кг, без учёта выведения) максимум СПМ чуть сместился влево (на 2-3 ед.), но, в целом, картина УЗВ не изменилась, т.е. психоэмоциональное состояние крыс в данный момент по-

прежнему является позитивным и благоприятным. Максимум мощности УЗВ (порядка 90%) приходится на частоту около 43 кГц, т.е. соответствует диапазону «комфорта».

Параметры УЗВ крыс, получивших пятую дозу этанола (через 180 мин после первой дозы), представлены на рис. 7.

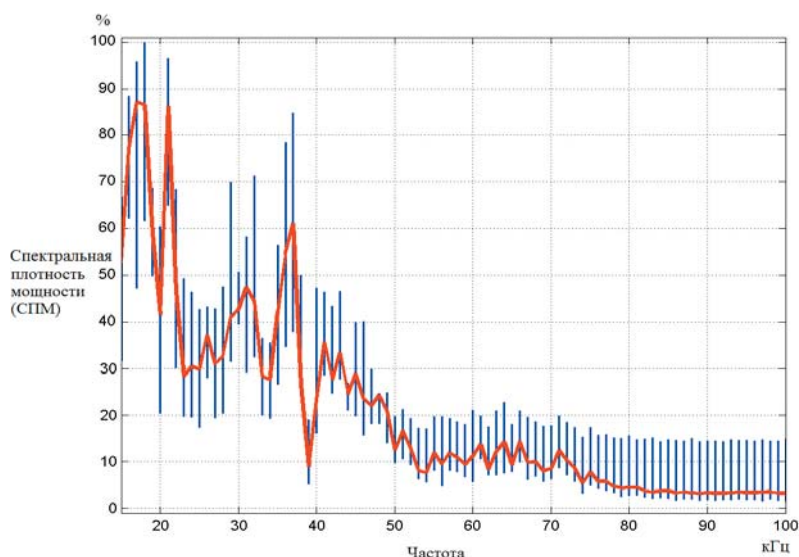


Рис. 7. УЗВ крыс после 5-й дозы алкоголя. Все обозначения – как на рис. 3.

Из рис. 7 следует, что введение пятой дозы этанола (общая концентрация – примерно 5 г/кг, без учёта выведения), как и после второй дозы, вызвало снижение спектральной мощности УЗВ в диапазоне «комфорта» и одновременное её возрастание в диапазоне «тревоги». Максимум СПМ (примерно 88%) приходится на частотный диапазон 18-21 кГц, а СПМ на частоте около 38 кГц составляет примерно 61%.

Наблюдаемое «смещение» пика спектральной мощности УЗВ крыс, вероятно, отражает смену позитивного аффективного состояния животных на негативное. В эмоциональной сфере животных, по всей видимости, преобладают тревога, страх и, возможно, агрессия. Наблюдаемый эффект объясняется высокой дозой этилового спирта, близкой для крыс к летальной.

В других исследованиях [1, 10], при проведении опытов на людях, было показано, что через 60 мин после приема средней и большей дозы алкоголя (0,8-1,5 г/кг) возникает увеличение количества медленных волн в ЭЭГ, замедление частоты в α -диапазоне. При дальнейшей интоксикации происходит увеличение β -активности, т.е. можно утверждать, что средние и относительно высокие дозы алкоголя вызывают замедление ритмов ЭЭГ.

Выводы

1. Накопление этанола отражается в изменении частотно-спектральных характеристик УЗВ крыс.

2. При введении этилового спирта крысам в дозах, приблизительно равных 1, 3 и 4 г/кг, регистрируется позитивное, комфортное аффективное состояние, а в дозах 2 и 5 г/кг – дискомфортное аффективное состояние.

3. В УЗВ крыс, получивших 3 мг/кг этанола, могут отражаться признаки эйфории, а доза 5 мг/кг, близкая к летальной, отражает, вероятно, признаки дистресса.

4. Модель исследования психоэмоционального состояния по вокализации крыс в ультразвуковом диапазоне можно рекомендовать при проведении доклинических испытаний средств лечения алкогольной зависимости.

Список литературы

1. *Арзуманов Ю.Л., Судаков С.К.* Нейрофизиологические механизмы зависимости от психоактивных веществ // Руководство по наркологии / под ред. Н.Н. Иванца. - Медицинское информационное агентство. М. 2008. С.141-163.
2. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармако-токсикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007, 448 с.
3. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В.* Биологические модели в инновационной фармакологии // Мат-лы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 18-21 сентября 2012 г. Республика Татарстан, г. Казань. – М.: Фолиум. – 2012. – 82 с.
4. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н., Сахаров Д.С., Алимкина О.В.* Роль нейромедиаторных систем мозга в генерации ультразвуковой вокализации и её корреляции с поведением животных // Биомедицина. – 2011. – № 4. – С. 8-18.
5. *Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капаназе Г.Д., Чайванов Д.Б.* Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 4-23.
6. *Морозов Г.В.* Алкоголизм. – М.: Медицина. – 1983. – С. 89-97.
7. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.
8. *Фокин Ю.В.* Влияние пептидов и низкомолекулярных белков природного происхождения на вокализацию крыс в ультразвуке // Биомедицина. – 2012. – № 2. – С. 84-91.

9. Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н. Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обезвреживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 17-21.
10. Aalto J., Kiinmaa K. Role of brain monoaminergic systems in the increased ethanol caused by REM-sleep deprivation. In: Advances in biomedical alcohol research / K. Lindros, R. Jikahri (eds.). - Oxford; Pergamon Press. 1987. P. 313-318.
11. Blanchard R.J., Blanchard D.C., Agullana R., Weiss S.M. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems // Physiol. Behav. – 1991. – № 50. – P. 967-972.
12. Brudzynski S.M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches // ILAR Journal. – 2009. – Vol. 50. – N. 1. – P. 43-50.
13. Brudzynski S.M. Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: Acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding // Behav. Brain Res. – 2007. – № 182. – P. 261-273.
14. Burgdorf J., Knutson B., Panksepp J., Shippenberg T.S. Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs // Psychopharmacology. – 2001. – № 155. – P. 35-42.
15. Burgdorf J., Kroes R.A., Moskal J.R., Pfau J.G., Brudzynski S.M., Panksepp J. Ultrasonic vocalization of rats during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback // J. Comp. Psychol. – 2008. – № 122. – P. 357-367.
16. Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J. High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats // Physiol. Behav. – 1999. – № 66. – P. 639-643.
17. Knutson B., Burgdorf J., Panksepp J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats // Psych. Bull. – 2002. – № 128. – P. 961-977.
18. Sanchez C. Stress-induced vocalization in adult animals. A valid model of anxiety? // Eur. J. Pharmacol. – 2003. – № 463(1-3). – P. 133-43.
19. Wöhr M., Borta A., Schwarting R.K.W. Overt behavior and ultrasonic vocalization in fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat // Neurobiol. Learn. Mem., 2005, 84:228-240.

Influence of different doses of ethanol on ultrasonic vocalization of rats

Yu.V. Fokin, A.G. Berzina, V.N. Karkischenko, O.V. Alimkina,
N.B. Gamaleya

Influence of different doses of ethanol on parameters of vocalization of rats in the ultrasonic range is investigated. It is established that accumulation of ethanol is reflected in change of frequency spectral characteristics of ultrasonic vocalization of rats. The ethanol entered to rats in doses, approximately equal 1, 3 and 4 g/kg forms a positive affective state, and in doses of 2 and 5 g/kg – negative. Ultrasonic vocalization of the rats who received 3 g/kg of ethyl alcohol can reflect euphoria signs, and close to lethal the dose of 5 g/kg causes detection in ultrasound of signs of a distress. The model of research of a psychoemotional state on vocalization of rats in ultrasound can be recommended for preclinical tests of remedies for alcoholic dependence.

Key words: ethanol, alcoholic intoxication, ultrasonic vocalization, affective state, rats.