



Анализ поведенческих характеристик и ультразвуковой вокализации лабораторных крыс при фармакологической коррекции их психоэмоционального состояния

В.Н. Каркищенко, Ю.В. Фокин, Е.Б. Шустов

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

Контактная информация: д.м.н., проф. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Интерпретация психоэмоционального состояния лабораторных животных по анализу их свободного поведения и параметров ультразвуковой вокализации является ценным инструментом доклинического исследования медицинских технологий и фармакологических средств.

Ключевые слова: поведение, ультразвуковая вокализация, психоэмоциональное состояние, фармакологическая коррекция, крысы.

Введение

Применение фармакологических средств позволяет изменить функциональное состояние животных, что может проявиться в картине их поведения и вокализации в ультразвуковом диапазоне (УЗВ) [2-4]. Однако для выявления некоторых специфических видов психофармакологической активности необходимо предварительно смоделировать измененное состояние у животных. Так, например, для выявления транквилизирующего (анксиолитического) действия необходимо моделировать эмоциональный стресс, для антидепрессивного – состояние депрессии, для антиастенического действия – состояние утомления.

Несмотря на то, что к настоящему времени УЗВ различных животных в

обычных, комфортных условиях достаточно хорошо изучена, какой-либо системы ее поведенческой интерпретации, приемлемой для доклинического изучения психофармакологических средств, не создано.

Цель настоящей работы состояла в разработке методики интерпретации поведенческих характеристик и УЗВ лабораторных животных, приемлемой для доклинической оценки эффектов психофармакологических средств.

Материалы и методы

Исследование планировалось и проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и РД 64-126-91 «Правила доклинической

оценки безопасности фармакологических средств. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией НЦБМТ ФМБА России.

Исследование выполнялось на лабораторных белых аутбредных самцах крыс линии WAG/GY, в возрасте 2,5-3 мес., средней массой 300 ± 25 г, по 8 особей в группе, поступивших из филиала «Андреевка» НЦБМТ ФМБА России. Карантин, содержание животных, осмотры и рандомизация, введение препаратов и этаназия осуществлялись в соответствии с утвержденными стандартными операционными процедурами (СОП) организации. Животные содержались в вентилируемых клетках RairIsoSystem. В качестве корма животным использовался стандартный экструдированный гранулированный полнорацционный комбикорм для лабораторных животных ПК-120, произведенный в соответствии с ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществлялось в свободном режиме, исходя из суточных нормативов. Водопроводная очищенная вода давалась всем животным *ad libitum* в стандартных поилках.

Анализ поведенческих характеристик, осуществляемый с помощью автоматизированной системы, является наиболее современным методом оценки локомоторной активности животных и проводится в нашем Центре с использованием системы Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяет вычислять длительность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность, стойки (вертикальная или ориентировочная активность), груминг (умывания, признак эмоционально комфортного состояния), стереотипные движения и др. Кроме

того, оценивалось время элементов сложного поведения. За каждый временной промежуток по каждому животному определяется процент каждой формы поведения.

Основными преимуществами компьютерного анализа поведения с помощью Laboras являются:

- возможность тестирования многих мелких лабораторных животных – мыши, крысы, хомяки, морские свинки – что крайне важно при выборе оптимальной модели для биомедицинских, доклинических и других исследований;
- полная автоматизированность системы, позволяющая без участия экспериментатора и, соответственно, «человеческого фактора», измерять поведенческие характеристики животных;
- способность работы в полной темноте, когда использования иных методов, таких как видеорегистрация, ограничено или невозможно;
- длительность исследования, составляющая до 7 дней в непрерывном режиме, т.е. тестируемые животные при этом находятся в привычных для них условиях;
- простота и удобство использования, которое не требует дополнительных навыков работы исследователя и особенной профессиональной подготовки.

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.

До начала эксперимента у каждого животного осуществляли регистрацию ультразвуковых колебаний (фоновые данные, являлись объектом сравнения).

Длительность регистрации свободного поведения и УЗВ составляла 15 мин.

Тестируемые препараты. Изменение функционального состояния животных обеспечивалось введением фармакологических средств: транквилизатора бензодиазепиновой группы Диазепам (Релиум, Тархоминский фармацевтический завод «Польфа»), ноотропа с психоактивирующим действием Фенотропил (Щелковский витаминный завод), норадренэргического стимулятора Атомоксетин (Страттера, Eli Lilly), центрального холинэргического средства непрямого действия Галантамин (Каннофарма) и синтетического аналога энкефалинов Даларгин (Бион). Указанные средства применялись в следующих дозах: Релиум – 2 мг/кг, Фенотропил – 21 мг/кг, Страттера – 1 мг/кг, Нивалин – 1 мг/кг, Даларгин – 0,5 мг/кг. Дозы исследуемых препаратов соответствуют средним терапевтическим для людей с учетом коэффициентов видового переноса для лабораторных животных [1]. Все исследуемые препараты вводились внутривенно с помощью металлического зонда однократно в объеме 0,2-0,5 мл за 0,5-1,5 ч до начала исследования, при достижении максимальной концентрации препаратов в крови. Контрольной группе животных вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Обработка материалов. После удаления физических артефактов

(монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 20 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB-5.5 методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье (Nfft) – 2000 интервалов. После вычислений спектральной плотности мощности (СПМ) УЗВ находились медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного. Кроме того, отдельно вычислялись медианы значений спектра по всей частотной полосе (20-100 кГц), и для каждой частоты осуществлялось суммирование числа случаев, когда СПМ была выше этой «общей» медианы. Значения СПМ УЗВ выражались в виде безразмерных коэффициентов ($K_{СПМ}$), рассчитанных как отношение СПМ к фону окружающей среды.

Статистическая обработка данных проводилась методами параметрической статистики, корреляционного, регрессионного, дисперсионного и мультифакторного анализа с помощью пакета прикладных программ WinStat и пакета анализа данных для процессора таблиц Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

В состоянии психологического комфорта (спокойное бодрствование) картина УЗВ у крыс характеризуется (рис. 1) наличием доминантного пика УЗВ в частотном диапазоне 31-45 кГц (наиболее часто – 36-40 кГц) при отсутствии высокоамплитудных пиков в других частотных диапазонах.

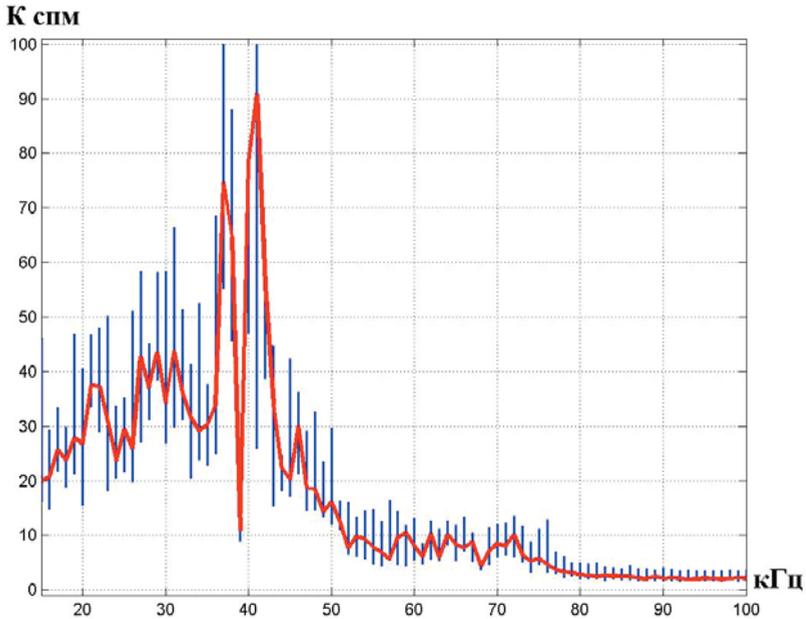


Рис. 1. УЗВ крыс в спокойном комфортном состоянии. По оси абсцисс – частота, кГц; по оси ординат – спектральная плотность мощности (Кспм). Синие линии – 95% доверительный интервал.

Высокоамплитудная вокализация в диапазоне 31-45 кГц свидетельствует о комфортном для животных эмоциональном состоянии. Появление высокоамплитудных пиков УЗВ в частотном диапазоне 20-30 кГц свидетельствует об острых стрессовых воздействиях, причем, чем выраженнее стресс, тем «громче» происходит вокализация в этом диапазоне. Этот диапазон может быть охарактеризован как отражающий тревогу, напряжение (или умеренный дискомфорт при низких амплитудах УЗВ). Вовлечение в УЗВ частотного диапазона менее 20 кГц свидетельствует об экстремальном, опасном для жизни состоянии животного. Появление основного или дополнительных пиков в диапазоне 45-75 кГц свидетельствует о дискомфортном состоянии животных или их астенизации (появление при утомлении, постстрессовых состояниях). Для

УЗВ высокочастотного диапазона (75 и более кГц) интерпретируемых признаков на этом этапе работы не выявлено.

В литературе [5] выделяют два подтипа 50 кГц-вокализации у крыс. Первый из них связан с приятными ощущениями (юношеские игры, спаривание, еда, электростимуляция некоторых ядер лимбической системы мозга), второй, напротив, – с отрицательной стимуляцией (запах кота, звук шагов, яркий свет). 50-кГц вокализация может быть индикатором комфортных, представляющих гомологию радости человека, и дискомфортных состояний, что совпадает с результатами наших исследований.

С целью дальнейшей детализации интерпретации показателей УЗВ было выполнено ее сопоставление с показателями теста Laboras при синхронной регистрации.



Рис. 2. Суточная структура спонтанной поведенческой активности крыс (интактная группа) по данным методики Laboras.

Структура типичной поведенческой активности интактных крыс при суточной регистрации представлена на рис. 2.

Интерпретация регистрируемых системой Laboras показателей может строиться исходя из их самостоятельной поведенческой характеристики. Горизонтальная активность отражает общую двигательную (локомоторную) активность, вертикальная активность – ориентировочную активность, груминг – состояние психологического комфорта. Показатели иммобилизации (замирания, неподвижности) и сложных элементов системного поведения не имеют однозначной прямой интерпретации.

Так, замирание животного может отражать его поведенческую реакцию на опасность, быть признаком стресс-реакции, а может отражать гипоактивное, сонное состояние. К числу элементов сложного системного поведения относятся вздрагивания, резкие движения головой, встряхивания «по типу мокрой собаки», почесывания, заваливания на бок, развороты на месте, вынюхивание, которые не имеют единого поведенческого вектора интерпретации.

Прямые показатели методики Laboras, определяемые у интактных животных, характеризуются достаточно высокой степенью вариативности (табл. 1).

Таблица 1

Статистические характеристики показателей методики Laboras у интактных крыс (полигон измерения – 900 сек)

Показатель	Горизонтальная активность	Неподвижность	Вертикальная активность	Элементы системного поведения	Груминг
Среднее	4,90	566,91	43,09	172,71	112,39
Стандартная ошибка	0,33	17,42	2,38	13,80	6,08
Стандартное отклонение	3,82	204,58	27,96	162,16	71,45
Коэффициент вариации	0,78	0,36	0,65	0,94	0,64

В исследовании с моделированием ситуационного стресса выполнен анализ анксиолитического (транквилизирующего) действия препаратов Релиум и Даларгин, в исследовании в условиях утомления – препарата Фенотропил. На специально сформированной группе животных, находящихся в гипоактивном состоянии, – препарата Страттера.

Результаты исследования поведенческих характеристик животных при действии указанных фармакологических средств представлены в табл. 2.

В контрольной группе животных по отношению к фоновым данным наблюдалось возрастание длительности неподвижности, умывания и ЭСП, снижение горизонтальной и вертикальной активности.

На фоне введения препарата Релиум наблюдалось повышение времени неподвижности при снижении горизонтальной и вертикальной активности по сравнению с фоновыми данными. Повышение длительности умывания по отношению к фону указывает на пребывание животных в благоприятном, комфортном состоянии.

После введения препарата Даларгин наблюдались противоположные вышеописанным эффекты: возрастание горизонтальной и вертикальной активности при уменьшении времени неподвижности по сравнению с фоновыми данными. Повышение длительности умывания также является показателем благоприятного, комфортного состояния животных.

В группе «Фенотропил» были зафиксированы следующие эффекты по отношению к фоновым данным: возрастание горизонтальной и вертикальной активности, снижение времени неподвижности, умывания и ЭСП. Усиление и активизирование сенсорных и сенсомоторных реакций, наблюдаемое в данной группе, вероятно, сопряжено с психоэмоциональным напряжением и общим беспокойством.

В группе «Страттера» наблюдались следующие изменения по отношению к фоновым данным: возрастание горизонтальной и вертикальной активности, а также длительности умывания, снижение времени неподвижности и ЭСП.

Таблица 2

Поведенческие характеристики крыс при действии тестируемых препаратов

Группа	Фон (сек)					Эффект (сек)				
	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.	ЭСП	Г.а.	Им.	В.а.	Гр.
Контроль	389	25	148	187	151	398	20	169	141	172
Релиум	161	13	552	84	90	102	2	563	62	171
Даларгин	84	6	723	13	74	116	11	665	17	91
Фенотропил	347	31	129	204	189	265	59	107	313	156
Страттера	286	35	219	225	135	253	55	65	313	214

Примечание: ЭСП – элементы системного поведения, Г.а. – горизонтальная активность (локомоции), Им. – иммобилизация (неподвижность), В.а. – вертикальная активность (стойки), Гр. – груминг (умывание).

Таким образом, состояние животных, принимавших препараты Даларгин и Страттера, может расцениваться как благоприятное, т.е. возрастание двигательной активности на фоне приёма

препаратов не является для них дискомфортным признаком.

Результаты исследования УЗВ животных при действии указанных фармакологических средств представлены на рис. 3-6.

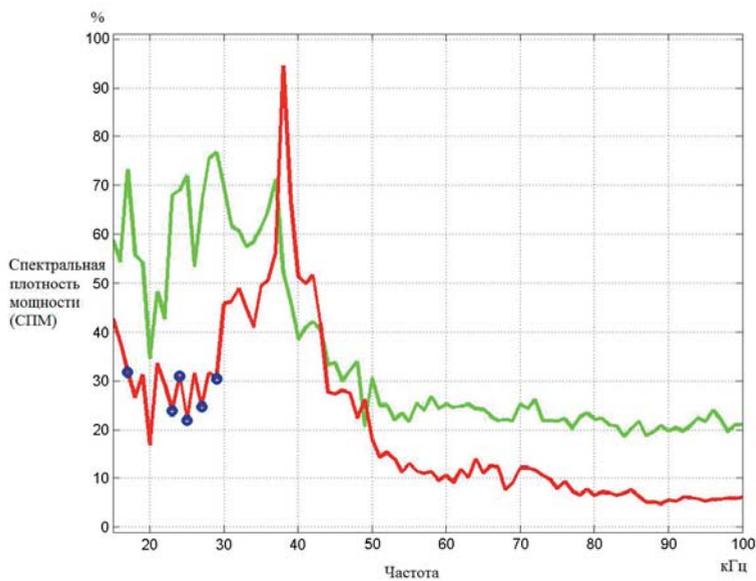


Рис. 3. УЗВ группы «Релиум». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные. Синие кружочки – $p < 0,01$ (ANOVA).

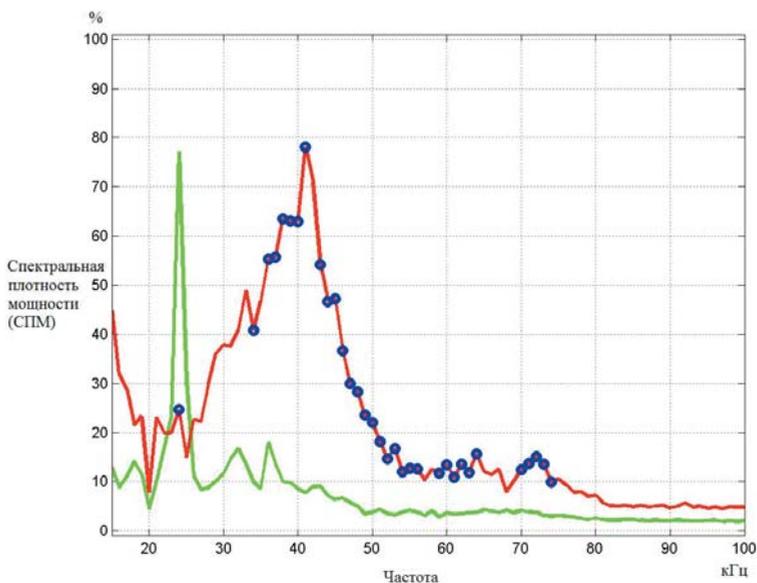


Рис. 4. УЗВ группы «Даларгин». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные. Синие кружочки – $p < 0,01$ (ANOVA).

После применения препарата Релиум сформировался отчетливый доминантный пик УЗВ на частоте около 38 кГц, отражающей комфортный диапазон для крыс. Кроме того, произошло снижение амплитуд УЗВ в тревожно-дискомфортном диапазоне (20-30 кГц). Такие изменения УЗВ отражают противотревожное (анксиолитическое, транквилизирующее) действие препарата Релиум, его способность контролировать эмоционально-негативные состояния.

После применения препарата Дарлгин происходит умеренное повышение ультразвуковой вокализации в частотном диапазоне до 20 кГц, разрушение спектрального пика тревожного диапазона (20-30 кГц) и формирование широкого потока вокализации в комфортном диапазоне частот (31-45 кГц, с максимумом около 41 кГц (достоверность изменений по сравнению с фоном обнаруживается на многих точках графика)), отражающем пребывание крыс в благоприятном, комфортном психо-

эмоциональном состоянии. Кроме того, отмечается усиление вокализации в диапазоне 50-75 кГц, отражающую коммуникативную активность этих животных, эмоционально-позитивное состояние.

Максимум СПМ УЗВ в фоновых измерениях приходится на частоту около 42 кГц, что является показателем комфортного состояния животных. Однако относительно низкая амплитуда по частотным диапазонам в целом и дополнительный пик в диапазоне 50-60 кГц свидетельствует о состоянии утомления животных. После введения препарата Фенотропил отмечается усиление УЗВ в диапазоне частот до 20 кГц. При этом сохраняется в достаточно полной степени УЗВ в комфортном для животных частотном диапазоне. Эмоциональное состояние животных, оцениваемое по полученным УЗВ-граммам, представляется достаточно противоречивым: комфорт с элементами напряжения, возможно – возбуждение, пограничное состояние, но уже не утомление.

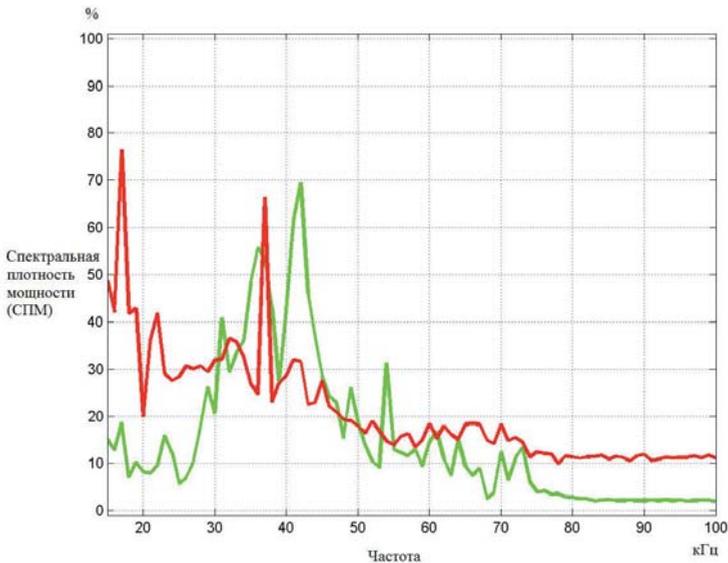


Рис. 5. УЗВ группы «Фенотропил». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные.

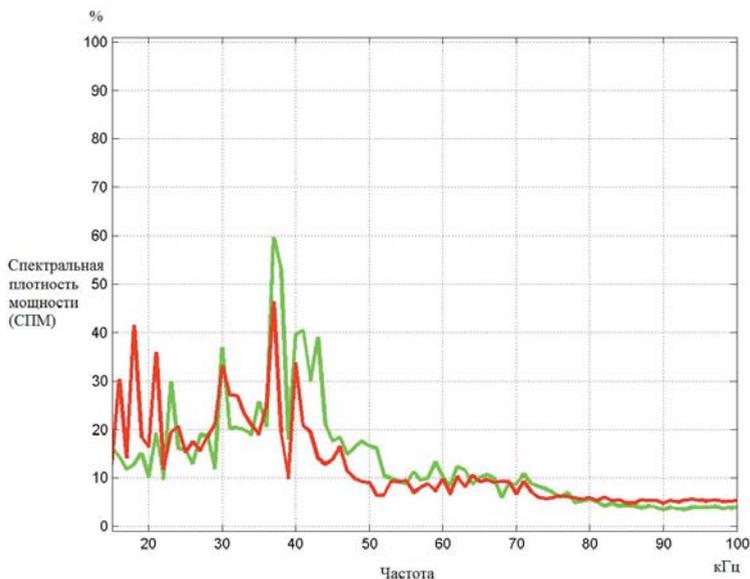


Рис. 6. УЗВ группы «Страттера». Зелёная кривая – фоновые данные, красная кривая – экспериментальные данные.

Максимальная СПМ УЗВ обеих кривых приходится на частоту около 38 кГц, что является маркером позитивного эмоционального состояния животных. После введения препарата Страттера отмечается некоторое возрастание СПМ в диапазоне около 20 кГц, однако его мощность ниже, чем в «диапазоне комфорта». Вероятно, данный эффект, наблюдаемый и в контрольной группе, связан с процедурой инъекции. В целом, существенных изменений в спектре ультразвуковых сигналов при однократном применении препарата не наблюдается, состояние крыс оценивается как благоприятное.

Заключение

Изменения поведенческих характеристик и параметров УЗВ при фармакологической коррекции психоэмоционального состояния животных позволяют на скрининговом уровне вы-

явить признаки анксиолитического, седативного, антиастенического и активирующего действия биологически активных веществ. Методика интерпретации функционального состояния животных по анализу их свободного поведения и УЗВ является ценным инструментом доклинического исследования медицинских технологий и нейротропных лекарственных средств.

Список литературы

1. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических средств: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств / под общ. ред. Р.У. Хабриева. - М.: Медицина. 2005. С. 41-54.
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов В.Б. Очерки спортивной фармакологии. Том 1. Векторы экстраполяции / под ред. Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. - М., Спб: Айсинг. 2013. 288 с.

3. Каркищенко Н.Н., Фокин Ю.В., Сахаров Д.С., Каркищенко В.Н., Капанадзе Г.Д., Чайванов Д.Б. Ультразвуковая вокализация и её информативные параметры у животных и человека // Биомедицина. 2011. № 1. С. 4-23.
4. Фокин Ю.В., Каркищенко В.Н. Вокализация крыс в ультразвуковом диапазоне как модель оценки стрессового влияния обездвиживания, электрокожного раздражения, физической нагрузки и фармакодинамики лекарств // Биомедицина. 2010. № 5. С. 17-21.
5. Wöhr M., Houx B., Schwarting R.K.W., Spruijt B. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats // Physiology and behavior. 2008. V. 93. P. 766-776.

The analysis of behavioural characteristics and ultrasonic vocalization of laboratory rats at pharmacological correction of their psychoemotional state

V.N. Karkischenko, Yu.V. Fokin, E.B. Shustov

Interpretation of a psychoemotional state of laboratory animals according to the analysis of their free behaviour and parameters of ultrasonic vocalization is the valuable instrument of preclinical research of medical technologies and pharmacological agents.

Key words: behaviour, ultrasonic vocalization, psychoemotional state, pharmacological correction, rats.