

УДК 612.821.6+599.323.4

Л.В. МАКСИМОВА

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОГО УРОВНЯ ТРЕВОЖНОСТИ НА НЕАССОЦИАТИВНОЕ ОБУЧЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

The ability for nonassociative learning (habituation of rearings) of mice with different genetically based level of anxiety (highly anxious BALB/c, lowly anxious C57Bl/6 and ICR mice, which have no distinct peculiarities of anxiety-phobic states) was studied. Habituation abnormality was stated among BALB/c mice in habitat-close experimental conditions either during single mouse or group of mice release. Zoosocial factor has a significant impact on habituation of vertical activity of inbred and outbred animals.

Привыкание (габитуация) – одна из форм неассоциативного обучения, которая проявляется ослаблением поведенческих реакций во времени [1, 2]. Нарушения габитуации наиболее подробно описаны для таких заболеваний ЦНС, как шизофрения [3, 4], синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [5]. Относительно редко упоминается об ухудшении привыкания при типичных и атипичных панических расстройствах и депрессиях [6], тревожных расстройствах [7].

В фармакологической практике показатели габитуации применяют для оценки ноотропной активности лекарственных средств. Известно, что препараты, улучшающие память, облегчают габитуацию в эксперименте [8–10].

К основным методам, наиболее часто используемым для исследования механизмов габитуации у животных, относится регистрация двигательной активности. Угашение двигательной активности рассматривается как следствие ослабления исследовательско-ориентировочной реакции (ИОР) в результате оценки животным окружающей обстановки как биологически незначимой [8, 9]. Существует мнение, что изменение вертикальной двигательной активности (ВДА) у животных характеризует привыкание наиболее точно и может быть использовано в качестве основного его показателя [10].

Нарушения габитуации при таких заболеваниях, как СДВГ, моделируются на крысах линии SHR [11, 12]. Поиск потенциальных корректоров привыкания в условиях патологических сдвигов тревожно-фобического статуса (ТФС) предполагает проведение экспериментов на

животных с различным генетически обусловленным уровнем тревожности. К числу инбредных мышей, различающихся по психоэмоциональному статусу, относятся BALB/c (высоко-тревожные) и C57Bl/6 (низкотревожные) [13, 14].

Установлено, что процессы привыкания у мышей более выражены в группе, чем у одиночных особей [9]. Однако исследования в отношении межлинейных различий габитуации вертикализаций с учетом зоосоциального фактора единичны и проведены лишь для инбредных мышей C57Bl/6 и DBA/2 [15].

Целью данной работы явилось изучение габитуации ВДА и анализ роли зоосоциального фактора в процессах привыкания у мышей с различным генетически обусловленным уровнем тревожности.

Материал и методика

Работа выполнена в отделе поведенческой фармакологии Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси под руководством кандидата биологических наук Е.В. Кравченко.

Показатели ВДА (ориентировочная реакция) регистрировались автоматически с помощью многоканального актометра с горизонтальными и вертикальными ИК-сенсорами, работающего под управлением ПЭВМ с использованием специального пакета программ «Mouse Statistic». Разрешение сетки сканирования – 12×8; шаг сетки – 2,54 см, периодичность съема информации – 0,1 с, данные выражены в условных единицах (усл. ед.), соответствующих числу пересечений лучей в вертикальной плоскости (N). Мышей помещали на 90 мин поодиночке или группами по 10 особей в камеры размером 32 см х 22 см х 19 см с подстилкой, кормушкой, поилкой (условия, соответствующие низкому уровню «опасности» экспериментальной камеры [16]). Эксперименты проводились в первой половине дня (9.00–12.00) при стандартизированной температуре воздуха (18±22 °С). Изучали поведение мышей-самцов линий BALB/c (обладающие патологически высоким уровнем тревожности и предложенные в качестве модели генерализованных тревожных расстройств [17, 18]); C57Bl/6 (низкотревожные) и аутбредных ICR (без четко выраженных особенностей ТФС). Животные в возрасте двух месяцев получены из питомника экспериментально-биологической клиники ИФБ НАН Беларуси. В наблюдениях с одиночной высадкой использовано по 12 мышей C57Bl/6, BALB/c и аутбредных мышей; в опытах с групповой высадкой – по 5 групп инбредных и 6 групп аутбредных животных.

В качестве показателя, характеризующего габитуацию вертикализаций в определенных «точках» эксперимента, применяли коэффициент угашения ВДА (K), вычисляемый по формуле

$$K = \frac{ДА_n}{ДА_1},$$

где $ДА_1$ – ВДА животных за первые 5 мин наблюдения; $ДА_n$ – тот же показатель в каждые последующие 5 мин; n – порядковый номер интервала регистрации [9]. Чем меньше абсолютное значение коэффициента K , тем глубже процесс привыкания.

Процесс габитуации описывали с помощью уравнений линейной регрессии; для построения прямой $y=a+bx$ использовали натуральные логарифмы значений ВДА, полученных в результате актометрии. При этом коэффициент a характеризует исходный уровень ВДА (чем выше a , тем выше начальный уровень вертикализаций), а коэффициент b отражает выраженность привыкания (чем ниже значения b , тем более выражено неассоциативное обучение).

Оценку статистической значимости результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики для множественных сравнений. Анализ данных предшествовала проверка распределений значений показателей на соответствие их критериям «нормальности». В случае нормального распределения применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA или ANOVA для повторных измерений, в противном случае – критерий Уилкоксона, Крускала – Уоллиса с post-hoc анализом по Тьюки или Ньюмену – Кейлсу или по Данну, критерий Фридмана с post-hoc анализом по Данну или Даннету. Статистическую значимость различий коэффициентов уравнений линейной регрессии определяли с применением t -критерия Стьюдента. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Origin 6.1, Statistica 6.0, Biostat.

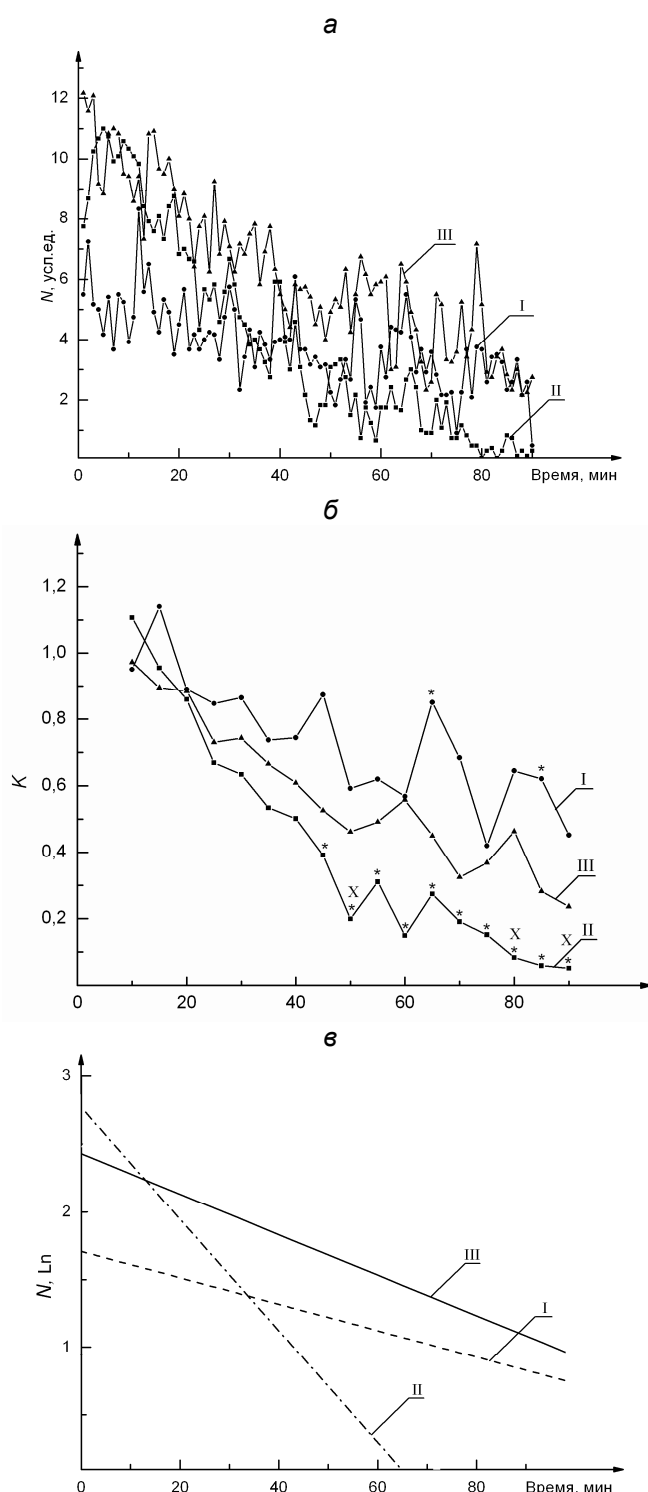


Рис. 1. Габитуация вертикальной двигательной активности (ВДА) у мышей линий BALB/c (I), C57BL/6 (II) и у аутбредных мышей ICR (III) при высадке поодиночке: а – ориентировочная реакция; б – коэффициенты угашения ВДА (K); в – прямые, полученные методом линейной регрессии, $y=a+bx$: I – $a=1,71\pm0,069$; $b=-0,0098\pm0,001$; II – $a=2,77\pm0,105$; $b=-0,0412\pm0,002$; III – $a=2,43\pm0,045$; $b=-0,015\pm0,0009$.

Здесь и на рис. 2 * – различия статистически достоверны в сравнении с линией BALB/c (I), критерий Крускала – Уоллиса, $P<0,05$; x – достоверность различий в сравнении с аутбредными мышами ICR (III), критерий Крускала – Уоллиса, $P<0,05$; N – число пересечений лучей в вертикальной плоскости

Результаты и их обсуждение

У мышей BALB/c ориентировочная реакция за первые 5 мин регистрации в условиях одиночной высадки существенно ниже, чем у инбредных C57BL/6 и аутбредных мышей ICR ($P<0,001$, критерий Крускала – Уоллиса с post-hoc анализом по Тьюки). Показатели ВДА у одиночных животных составили (усл. ед.): $27,08\pm2,75$; $48,33\pm2,98$ и $53,83\pm3,32$ соответственно; при групповой актометрии – $1007,2\pm73,4$; $1370,2\pm133,52$ и $1257,5\pm355,69$ соответственно (рис. 1 а). Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы [19]. Низкий исходный уровень ориентировочной реакции BALB/c подтверждает их высокую тревожность, проявляющуюся фризинг-реакцией и снижением двигательной активности [20].

Активная ориентировочная реакция первых минут опыта впоследствии сменялась достоверным снижением ВДА (габитуация) при высадке поодиночке у мышей C57BL/6, BALB/c и аутбредных животных ($P<0,05$; критерий Уилкоксона) (см. рис. 1 а), а в условиях групповой актометрии – только у C57BL/6 и аутбредных ICR ($P<0,001$; ANOVA) (рис. 2 а). Статистически значимого угашения ВДА у инбредных мышей BALB/c в группе за весь период регистрации отмечено не было. Число пересечений лучей в вертикальной плоскости у мышей BALB/c, C57BL/6 и аутбредных мышей ICR за последние 5 мин эксперимента в условиях одиночной высадки составило (усл. ед.): $11,17\pm3,09$; $1,75\pm1,24$ и $12,5\pm3,8$ (см. рис. 1 а), а при групповой – $817,6\pm365,33$; $74,2\pm45,77$ и $398,5\pm207,36$ соответственно (см. рис. 2 а).

Сравнение коэффициентов габитуации K показало достоверные различия процесса угашения у одиночных BALB/c и C57BL/6, начиная с интервала 40÷45 мин, и далее на протяжении 58,8 % от общего времени регистрации (BP) ($P<0,05$; критерий Крускала – Уоллиса с post-hoc анализом по Данну) (рис. 2 б). Достоверные различия при сравнении BALB/c с аутбредными мышами

ми ICR по тому же критерию наблюдались лишь при высадке животных в камеры актометра поодиночке в течение 11,8 % от ВР ($P<0,05$; критерий Крускала – Уоллиса с post-hoc анализом по Ньюмену – Кейлсу) (рис. 1 б). K , рассчитанный для последнего интервала наблюдения, у одиночных мышей BALB/c равен $0,45\pm0,012$, у C57BL/6 – $0,05\pm0,04$, у аутбредных – $0,24\pm0,07$, в условиях группы – $0,75\pm0,030$; $0,05\pm0,030$ и $0,31\pm0,12$ соответственно. Полученные результаты указывают на существенные нарушения процесса привыкания по этому критерию у животных линии BALB/c при одиночной высадке в сравнении с C57BL/6 и аутбредными ICR ($P<0,05$; критерий Крускала – Уоллиса с post-hoc анализом по Тьюки), при групповой актометрии – с C57BL/6 ($P=0,019$, ANOVA) (рис. 1 б, рис. 2 б).

У мышей BALB/c значимое снижение K относительно исходных значений отмечено лишь при высадке поодиночке на протяжении 11,8 % от ВР ($P<0,05$; критерий Фридмана с post-hoc анализом по Даннету) (см. рис. 1 б). У аутбредных мышей ICR продолжительность периода с выраженной габитуацией ориентировочной реакции при высадке поодиночке составила 53,9 % ($P<0,05$; критерий Фридмана с post-hoc анализом по Даннету), а в группе – 35,2 % ($P<0,05$; критерий Фридмана с post-hoc анализом по Ньюмену – Кейлсу) от ВР (см. рис. 2 б). Эти данные позволяют предположить отрицательное влияние зоосоциального фактора на привыкание у высокотревожных BALB/c и у аутбредных мышей, не имеющих четко выраженных особенностей ТФС.

Анализ полученных результатов с применением метода линейной регрессии (рис. 1 в и 2 в) показал статистически значимые различия значений коэффициентов a и b у линейных и аутбредных животных как при одиночной, так и при групповой высадке. У инбредных мышей BALB/c исходная ВДА и выраженность угашения значимо ниже, чем у C57BL/6 и нелинейных животных. У низкотревожных C57BL/6 исходный уровень вертикализаций и выраженность процесса габитуации достоверно выше тех же показателей для BALB/c и аутбредных мышей ICR. Полученные данные позволяют предположить определенную корреляцию этих показателей с генетически обусловленным уровнем тревожности мышей. Габитуация у инбредных BALB/c, C57BL/6 и аутбредных животных в группе существенно затруднена по сравнению с соответствующими показателями, найденными при актометрии у одиночных мышей ($P<0,001$; t -критерий Стьюдента), что позволяет предположить негативное влияние зоосоциального фактора на процессы неассоциативного обучения, в том числе при патологической тревожности.

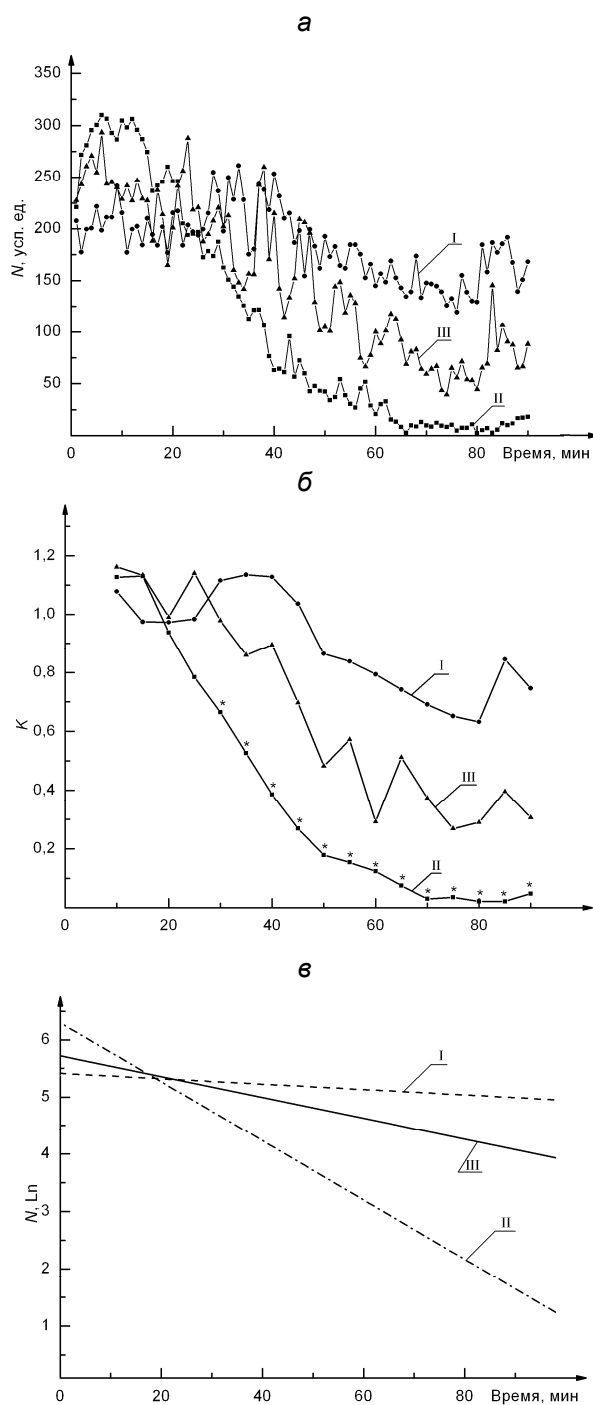


Рис. 2. Габитуация вертикальной двигательной активности (ВДА) у мышей линий BALB/c (I) и C57BL/6 (II) и у аутбредных мышей ICR (III) при высадке группой: а – ориентировочная реакция; б – коэффициенты угашения ВДА (K); в – прямые, полученные методом линейной регрессии, $y=a+bx$: I – $a=5,42\pm0,0294$; $b=-0,0047\pm0,0006$; II – $a=6,30\pm0,100$; $b=-0,0516\pm0,0019$; III – $a=5,72\pm0,055$; $b=-0,0183\pm0,0011$

Полученные нами результаты во многом совпадают с данными литературы [15, 19]. Однако цитируемые исследования проведены в условиях тестирования животных поодиночке, что предполагает изоляционный стресс [15, 20]. Вместе с тем нами впервые показаны нарушения габитуации у патологически тревожных мышей линии BALB/c при групповой и одиночной актометрии в условиях, наиболее близких к естественным условиям обитания животных, т. е. при «малой опасности» камеры актометра [16]. В дальнейшем возможна валидация использования животных этой линии для моделирования нарушений привыкания при тревожных расстройствах.

* * *

В результате актометрических исследований при «малой опасности» экспериментальной камеры показаны значимые различия габитуации вертикализаций у мышей с разным генетически обусловленным уровнем тревожности. Показано, что у патологически тревожных инбредных мышей BALB/c снижена способность к неассоциативному обучению. Зоосоциальный фактор значимо влияет на габитуацию ориентировочной реакции инбредных и аутбредных животных, в том числе мышей линии BALB/c.

1. Thompson R.F., Spencer W.A. // Psychol. Rev. 1966. Vol. 73. P. 16.
2. Соколов Е.Н. Нейрональные механизмы памяти и обучения. М., 1981.
3. Bepalov A., Jongen-Rêlo A.L., van Gaalen M. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. Vol. 320. № 2. P. 944.
4. Klamer D., Pålsson E., Revesz A. et al. // Psychopharmacol. (Berl.). 2004. Vol. 176. P. 440.
5. Fedorova I., Salem N.Jr. // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 2006. Vol. 75. № 4-5. P. 271.
6. Гордеев С.А. // ЖВНД. 2007. Т. 57. № 2. С. 161.
7. Савостьянов А.Н., Савостьянова Д.А. // Там же. 2003. Т. 53. № 3. С. 351.
8. Островская Р.У., Гудашева Т.А. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1991. № 5. С. 498.
9. Кравченко Е.В., Островская Р.У., Трофимов С.С. // Там же. 1996. Т. 122. № 7. С. 48.
10. Schiltein S., Huston J.P., Schwarting R.K.W. // Neurobiology of Learning and Memory. 2000. Vol. 73. P. 21.
11. Sagvolden T. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2000. Vol. 24. P. 31.
12. Hendley E.D., Wessel D.J., Atwater D.G. et al. // Physiology and Behavior. 1985. Vol. 34. P. 379.
13. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. С. 126.
14. Ohl F. // HEP. 2005. Vol. 169. P. 35.
15. Võikar V., Polus A., Vasar E., Rauvala H. // Genes, Brain and Behavior. 2005. Vol. 4. P. 240.
16. Leppanen P.K., Ewalds-Kvist S.B., Selander R.K. // J. Gen. Psychol. 2005. Vol. 132. № 2. P. 187.
17. Belzung C., Berton F. // Behav. Pharmacol. 1997. Vol. 8. P. 541.
18. Griebel D.J.S., Perrault G. // Aggress. Behav. 1997. Vol. 23. P. 19.
19. Jun-wei S., Hong Z., Mei-lei J. // Zoological Research. 2008. Vol. 29. № 1. P. 49.
20. van Loo, P.L. van Zutphen L.F., Baumans V. // Lab. Anim. 2003. Vol. 37. P. 300.

Поступила в редакцию 23.05.08.

Лейла Вагиф кызы Максимова – аспирант отдела поведенческой фармакологии Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси. Научный руководитель – кандидат биологических наук, заведующий отделом Е.В. Кравченко.