

УДК 57.084.1: 57.024

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ СТРЕССИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ^{1,2}Морковин Е.И., ¹Тарасов А.С., ¹Степанова В.В., ¹Неделько Е.А.¹ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград;²Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, e-mail: e.i.morkovin@gmail.com

Фармакологическая коррекция тревожно-депрессивных расстройств имеет неоспоримое значение для современной медицины. В то же время на доклиническом этапе изучения новых биологически активных веществ исследователи сталкиваются с несовершенством методик экспериментального моделирования данных состояний. Целью настоящей работы явилась выработка алгоритма оценки тревожно-фобических поведенческих реакций после непродолжительного стрессирующего воздействия принудительным плаванием, подвешиванием и изоляцией в замкнутом пространстве. Было установлено, что понижение двигательной и поисково-исследовательской активности в открытом поле не связано с физическим утомлением после принудительного плавания. При этом, несмотря на увеличение уровня тревожности, рациональные поведенческие реакции сохранялись. Обнаружено достоверное снижение локомоторной и исследовательской активности животных, подвергнутых принудительному плаванию и иммобилизации. Установлено, что изоляция приводит к пространственной дезориентации и ажитации, проявляющейся в виде нерациональной поисковой активности. Был выработан доступный алгоритм, позволяющий проводить предварительный скрининг анксиолитических, антидепрессивных и адаптогенных средств.

Ключевые слова: стресс, поведение, крысы, методы доклинических исследований, экспериментальная биология, тревожность

THE ELABORATION OF SHORT COTEMPORARY STRESS EXPOSURE METHOD^{1,2}Morkovin E.I., ¹Tarasov A.S., ¹Stepanova V.V., ¹Nedelko E.A.¹Volgograd State Medical University, Volgograd;²Volgograd Medical Science Centre, Volgograd, e-mail: e.i.morkovin@gmail.com

Pharmacological correction of anxiodepressive disorders is significant for modern medicine. However, scientists are faced with a lack of reliable and adequate models of such conditions in basic pharmacology. We aimed to create a new algorithm of behavior estimation using forced swimming, immobilization and isolation methods of stress modeling. The decrease in locomotor and explorative activity in open field test was not recognized to be connected with physical exhaustion after forced swimming test. Furthermore, the rational behavior was not affected by rise of anxiety level. Although the most significant influence on activity showed immobilization and forced swimming tests, the isolation was associated with spatial disorientation and agitation manifested in irrational and inadequate exploratory activity. The underlying algorithm of current study could be used during preclinical tests of antidepressant and sedative medications.

Keywords: stress, behavior, rats, methods of basic pharmacology, experimental biology, anxiety

Важной проблемой современной медицины является фармакологическая коррекция психоневрологических расстройств, которые зачастую развиваются на фоне дезадаптации, вызванной повышением стрессогенности окружающей среды [7, 10]. Существует большое количество методов оценки анксиолитических и антидепрессивных эффектов, успешно применяющихся в научно-исследовательской практике [5, 6, 8]. В то же время, руководства по доклиническому исследованию лекарственных средств носят, как правило, рекомендательный характер [2], что затрудняет выбор конкретных методик и усложняет сопоставление результатов. Например, показатели двигательной активности при аппаратной актометрии бывают значительно выше, чем при выполнении методики «Открытое поле» [3, 4]. Вторым фактором, усложняющим осуществление поточкового скрининга психоактивных веществ, является то, что большая часть методик

оценки тревожно-фобических реакций у животных требует длительной подготовки [1, 4]. Методики, связанные с кратковременным стрессированием путём принудительного плавания или иммобилизации, технически просты и широко применяются в экспериментальной психофармакологии [9], однако недостаточно изучены как механизмы влияния таких воздействий на активность животных, так и их ближайшие психоэмоциональные последствия. В связи с этим, целью нашей работы стала оценка взаимосвязи между характеристиками активности животных, подвергнутых гипо- и гиперкинезии, и выработка алгоритма оценки тревожно-фобических поведенческих реакций после непродолжительного стрессирующего воздействия.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено в лаборатории психофармакологии НИИ фармакологии ВолгГМУ на

100 самцах крыс Wistar массой 250-300 г. В качестве стрессирующих методов воздействия были выбраны принудительное плавание, иммобилизация подвешиванием за холку, изоляция в замкнутом пространстве с сопутствующей гипокинезией. Плавание осуществлялось в прозрачных цилиндрических ёмкостях диаметром 20 см и высотой в 45 см, на 2/3 наполненных водой температурой 28 °С. Подвешивание производилось на высоте 1 м от пола за кожную складку на холке животного при помощи атравматичных зажимов. Для изоляции использовались раздвижные пластиковые контейнеры-домики, применяемые для иммобилизации животных. После 15-минутного воздействия поведение крыс оценивалось в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». Животные отправлялись на цикл испытаний с 5-минутным интервалом, призванным снизить влияние суточных биологических ритмов на активность. Эксперимент происходил в два этапа. На первом этапе была произведена оценка влияния гиперактивности при принудительном плавании на поведение животных в «Открытом поле». На втором этапе подопытные животные были разделены в соответствии с методиками стрессирования и оценки двигательной активности.

Статистическая обработка производилась с помощью программы GraphPad Prism 5. Достоверность межгрупповых различий оценивалась по критериям Вилкоксона и Краскела-Уоллиса с пост-тестом Данна при $p < 0,05$. Для оценки корреляционных взаимосвязей был выбран ранговый критерий Спирмена.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе первого этапа эксперимента у животных, подвергнутых форсированному плаванию, оценивались следующие показатели: латентный период до начала активности ($7,0 \pm 3,18$ с), общее время активного сопротивления ($287,0 \pm 41,21$ с), количество прыжков ($1,7 \pm 0,45$) и подныряний ($0,8 \pm 0,41$). При испытании в открытом поле в данной группе было выявлено достоверное снижение двигательной и исследовательской активности по сравнению с интактными животными (критерий Вилкоксона, $p < 0,05$; см. Табл. 1).

Таблица 1

Результаты теста «Открытое поле» – первый этап

Группа	Г.А.	В.А.	З.О.	В.Ц.
1. Плавание	$14,3 \pm 1,6^*$	$2,5 \pm 0,60^*$	$1,4 \pm 0,31^*$	$0,9 \pm 0,23$
2. Контроль	$55,6 \pm 3,09$	$12,4 \pm 1,09$	$3,8 \pm 0,56$	$0,6 \pm 0,13$

Примечание: Приведены показатели горизонтальной (ГА) и вертикальной (ВА) активности, количество заглядываний в отверстие (ЗО), выходов в центр (ВЦ). Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки; * – достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между показателями активности в «Открытом поле» и 15-минутного форсированного плавания

Показатели	Латентный период	Активное сопротивление	Прыжки	Ныряния
Горизонтальная активность	0,180	0,164	-0,150	0,237
	$p = 0,620$	$p = 0,650$	$p = 0,679$	$p = 0,509$
Вертикальная активность	-0,457	0,343	-0,242	0,083
	$p = 0,185$	$p = 0,333$	$p = 0,500$	$p = 0,820$
Заглядывания в отверстия	0,007	-0,259	0,0400	-0,470
	$p = 0,985$	$p = 0,469$	$p = 0,913$	$p = 0,171$
Выходы в центр	-0,166	-0,342	-0,656	-0,506
	$p = 0,647$	$p = 0,333$	$p = 0,039$	$p = 0,136$

Эти изменения могут быть как результатом повышения уровня тревожности, так и следствием истощения, вызванного предшествовавшей физической нагрузкой. Для уточнения причин этих изменений был проведён корреляционный анализ потенциальных взаимосвязей между наблюдаемыми проявлениями (Табл. 2). При этом, у абсолютного большинства значений коэффициенты корреляции оказались недостаточно

велики, что позволяет отвергнуть влияние утомления при выбранном характере нагрузки на поведение животных в открытом поле. Исключением стала статистически значимая обратная корреляция между количеством прыжковых движений при плавании и выходами в центр арены, которая может свидетельствовать о сохранении рационального поведения у животных в условиях повышенной тревожности.

В ходе второго этапа экспериментов количество испытаний было расширено. После иммобилизации подвешиванием и принудительного плавания, локомоторная и поисково-исследовательская активность животных в открытом поле достоверно снижалась по сравнению с интактными группами (Табл. 2), что свидетельствует в пользу увеличения тревожности и страха. Это подтверждается достоверным снижением количества актов груминга и их суммарной продолжительности. У животных, изолированных в замкнутом пространстве, достоверного снижения этих показателей не отмечалось: напротив, у них была обнаружена тенденция к повышению поисковой активности с увеличением количества заглядываний в отверстия на 34% и удвоении частоты выходов в центральную зону.

Повышение поисковой активности может говорить об отсутствии фобического компонента у данной группы животных на фоне ажитации и дезориентации в пространстве. Последнее подтверждается результатами тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте (Табл. 4): у изолированных животных достоверно увеличилось время нахождения в светлых рукавах как по сравнению с контролем, так и с другими экспериментальными группами. Более того, в этой группе наблюдалась тенденция к увеличению времени пребывания в центре лабиринта, количества переходов, выглядываний и выходов в светлые рукава. В других группах, напротив, отмечалась значимая тенденция к снижению этих показателей, что говорит о развитии тревожно-фобических реакций.

Таблица 3

Результаты теста «Открытое поле» – второй этап

Группа	Г.А.	В.А.	З.О.	В.Ц.	А.Г.	Д.Г., с
1. Плавание	13,4 ± 6,2 ^{1,2}	2,6 ± 0,72 ^{1,2}	1,2 ± 0,25 ^{1,2}	0,7 ± 0,26	1,3 ± 0,39 ¹	7,2 ± 3,61 ^{1,2}
2. Подвешивание	23,2 ± 3,71 ¹	4,3 ± 0,87 ^{1,2}	2,1 ± 0,50 ²	0,6 ± 0,22	1,4 ± 0,49 ¹	13,1 ± 4,17 ¹
3. Изоляция	39,6 ± 3,81	12,9 ± 1,49	5,1 ± 0,60	1,2 ± 0,36	4,3 ± 1,20	25,4 ± 4,47
4. Контроль	55,6 ± 3,09	12,4 ± 1,09	3,8 ± 0,56	0,6 ± 0,13	5,4 ± 0,53	29,4 ± 2,72

Примечание: В таблице приведены показатели горизонтальной (ГА) и вертикальной (ВА) активности, количество заглядываний в отверстие (ЗО), выходов в центр (ВЦ), актов груминга (АГ) и их общая продолжительность (ДГ). Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки измерения; 1 – достоверные различия с контрольной группой; 2 – достоверные различия с группой, подвергшейся изоляции ($p < 0,05$).

Таблица 4

Результаты теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Группа	Вр.С., с	В.С.	В.	П.	В.Ц., с
1. Плавание	5,3 ± 3,75 ²	0,3 ± 0,21 ²	1,4 ± 0,49	0,1 ± 0,1 ^{1,2}	2,7 ± 2,29 ²
2. Подвешивание	6,4 ± 2,57 ²	0,6 ± 0,22	1,3 ± 0,37 ^{1,2}	0,7 ± 0,26	2,6 ± 1,41 ²
3. Изоляция	40,2 ± 3,67 ¹	1,4 ± 0,27	3,6 ± 0,75	1,4 ± 0,37	11,9 ± 3,27
4. Контроль	17,5 ± 7,47	0,7 ± 0,21	3,7 ± 0,73	1,5 ± 0,27	7,9 ± 3,31

Примечание: В таблице приведены время нахождения в светлом рукаве (ВрС), количество выходов в светлый рукав (ВС), выглядываний (В) и переходов (П), а также время, проведенное в центре (ВЦ). Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки измерения; 1 – достоверные различия с контрольной группой; 2 – достоверные различия с группой, подвергшейся изоляции ($p < 0,05$).

Выводы

Произведён анализ тревожно-фобических реакций крыс, подвергшихся кратковременному стрессирующему воздействию. Установлено, что снижение двигательной и исследовательской активности в открытом поле у животных, подвергшихся форсированному плаванию, не было связано с физическим утомлением. В то же время, несмотря на повышение

тревожности и общее угнетение, рациональные поведенческие реакции у подопытных крыс сохранились. Обнаружено, что принудительное плавание и иммобилизация повышают тревожность животных, достоверно снижая локомоторную и исследовательскую активность, а изоляция приводит к пространственной дезориентации и ажитации, проявляющейся в виде нерациональной поисковой активности.

В ходе работы выработан алгоритм, который в дальнейшем может быть применён при скрининге анксиолитических, антидепрессивных и адаптогенных средств.

Список литературы

1. Волотова Е.В. Влияние фенибута на память и поведение крыс различных возрастных групп, подвергшихся 7-дневному стрессорному воздействию. / Волотова Е.В., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Филина И.С., Тюренков И.Н. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1 (49). – С. 23-25.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
3. Спасов А.А. Изучение взаимодействия соединения RU-1205 с анализаторами нейромедиаторных систем. / Спасов А.А., Гречко О.Ю., Штарёва Д.М., Рашенко А.И., Калитин К.Ю., Литвинов Р.А. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 2 (50). – С. 120-122.
4. Тюренков И.Н. Влияние иммунизации на адаптационные механизмы при хроническом стрессировании животных. / Тюренков И.Н., Филина И.С., Гумилевский Б.Ю., Волотова Е.В., Бакулин Д.А. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-2. – С. 368-371.
5. Тюренков И.Н. Влияние фенибута, его солей и композиций с органическими кислотами на физическую работоспособность. / Тюренков И.Н., Волотова Е.В., Перфилова В.Н. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2007. – № 1. – С. 65-67.
6. Тюренков И.Н. Депрессивное состояние у крыс при хроническом комбинированном стрессе, вызванном сочетанием разномодальных стрессоров. / Тюренков И.Н., Багметова В.В., Чернышева Ю.В., Бородин Д.Д. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99. – № 9. – С. 1045-1056.
7. Frasure-Smith N. Depression and anxiety as predictors of 2-year cardiac events in patients with stable coronary artery disease. / Frasure-Smith N., Lespérance F. // Arch. Gen. Psychiatry. – 2008. – 65(1). – P. 62-71.
8. Maltsev D.V. Anxiolytic action of a new 5-HT_{2A} antagonist RU-476. / Maltsev D.V., Yakovlev D.S., Matokhin D.G., Samsonik Y.V., Spasov A.A., Anisimova V.A. // European Neuropsychopharmacology. – 2013. – Vol. 23, Supp. 2 – P. S519-S520.
9. Morkovin E.I. Novel 3- and 4-hydroxybenzoyl acids' lithium salts as potential psychotropic agents. / Morkovin E.I., Tarasov A.S., Samsonik Y.V., Myagkova I.A. // The First European Conference on Biology and Medical Sciences. – 2014. – P. 181-184.
10. Mykletun A. Levels of anxiety and depression as predictors of mortality: the HUNT study. / Mykletun A., Bjerkeset O., Overland S., et al. // Br. J. Psychiatry. – 2009. – 195(2). – P. 118-125.