

Статья принята в печать в журнал «Обзоры клинической фармакологии и лекарственной терапии» 20 ноября 2021 года, главным редактором, профессором, д.м.н. П.Д. Шабановым.

Оценка общей двигательной активности и тревожности зебраданио (*Danio rerio*) с использованием теста незнакомого аквариума и теста открытого поля

2021 г. Д.С. Галстян^{1,2}, Т.О. Колесникова³, Ю.М. Косицын¹, К.Н. Забегалов³,
М.А. Губайдуллина³, Г.О. Маслов^{3,5}, К.А. Демин^{1,3,4}, А.В. Калуев^{1,3,4,5,6,7,8}*

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия

⁵Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

⁶Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁷Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

⁸Московский физико-технический институт, Москва, Россия

* avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию xx.xx.2021 г.

После доработки xx.xx.2021 г.

Принята к публикации xx.xx.2021 г.

Аннотация.

Тревожность - сложное и многогранное поведенческое расстройство, которое включает в себя различные формы хронических патологических тревог и страхов, являющееся причиной развития различных патологий, такие как депрессия, сердечно-сосудистые заболевания и др. Для ее изучения традиционно применяются поведенческие тестирования на модельных организмах, в том числе рыбы зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish). Рассмотренные в статье тесты нового (незнакомого) аквариума и открытого поля широко используются в трансляционной биологической психиатрии для выявления тревожных поведенческих фенотипов у зебраданио.

Abstract.

Anxiety is a complex and multifaceted neurobehavioral disorder that includes various forms of chronic pathological anxiety and fears, and is also the cause for various comorbid pathologies, such as depression or cardiovascular diseases. Behavioral testing of various model

organisms, including the zebrafish (*Danio rerio*), is widely used to study neurobiological mechanisms of anxiety. Here, we discuss the novel tank test (NTT) and the open field test (OFT) that are widely used in translational biological psychiatry to characterize anxiety-related behavioral phenotypes in zebrafish.

Ключевые слова: зебраданио, тревожность, геотаксис, тигматоксис, новизна.

Keywords: zebrafish, anxiety, geotaxis, thigmotaxis, novelty.

Зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish) – ведущий модельный организм в биомедицине, в том числе – трансляционной биологической психиатрии и нейрофармакологии (1). Одними из наиболее широко используемых методов оценки поведения зебраданио являются тест нового (незнакомо) аквариума, ТНА (the novel tank test, Рис. 1) и тест открытого поля (ТОП, the open field test, Рис. 2), детально рассмотренные ниже.

Тест нового (незнакомо) аквариума (ТНА)

Основой ТНА у рыб является эффект новизны, при котором животное сталкивается с незнакомым предметом или окружающей средой. Новизна традиционно используется как стрессорный фактор в самом широком спектре животных моделей. ТНА у зебраданио впервые был введен в практику в 2007 году Levin и соавторами, отметившими геотаксис – врожденное защитное «ныряние» рыб в новых (потенциально угрожающих) условиях среды, представляющее собой резкий уход животного в придонную область (1). Биологической мотивацией для данного поведения является стремление рыбы покинуть поверхность воды, где она в природе может стать легкой добычей для хищников (птицы, хищные рыбы, личинки стрекоз и др.). Таким образом, ТНА вызывает классический конфликт между двумя мотивациями зебраданио – «защитным» поведением при нырянии, и исследовательским поведением, в результате которого рыбы заплывают наверх. При этом стресс и фармакологические агенты, обладающие анксиогенными свойствами, способствуют нырянию (diving), неподвижности (immobility/freezing) и беспорядочным эрратическим движениям-метаниям (erratic movements), тогда как анксиолитические препараты и стимулы увеличивают время пребывания наверху ТНА (1-5).

Основные параметры, анализируемые в тесте, и процедура тестирования

1) Частота заплыва и продолжительность нахождения в верхней части аквариума. Более длительное пребывание в верхней части аквариума указывает на более низкий уровень тревожности.

2) Латентный период (латентность, латенция) выхода наверх. Попав в новую среду обитания, зебраданио естественным образом ныряют на дно аквариума, и лишь спустя какое-то время постепенно исследуют его по мере привыкания к тесту. Повышение латентности выхода наверх указывает на более высокий уровень тревоги.

3) Пройденная дистанция. Отражает общие моторные и неврологические фенотипы. Как правило, у стрессированной рыбы снижена исследовательская активность за счет увеличения времени замирания, и поэтому пройденная дистанция может быть ниже. Однако дистанцию необходимо рассматривать в комплексе вместе с другими параметрами. Например, если зебраданио проплыла большую дистанцию, но при этом находилась в нижней части аквариума, то вывод о высоком уровне тревожности следует считать достоверным.

4) Средняя скорость. Локомоторный параметр зебраданио. Как правило, в зависимости от метода подсчета, прямо коррелирует с показателем пройденной дистанции.

5) Частота и продолжительность фризинга и эрратических движений. Указывает на повышенное беспокойство/тревожность и, как правило, выше у зебраданио, находящихся в состоянии стресса.

6) Общая мобильность. Также, в ТНА можно выявить (с использованием специальных программ, позволяющих задать необходимые параметры) характер подвижности: высокая или низкая подвижность (например, в % от общей активности), что может дополнить сведения об активности рыб.

7) Иные параметры. Помимо основных поведенческих параметров ТНА, существует ряд специфических маркеров в зависимости от типа воздействия или вводимого препарата: характер судорожных припадков, уровень токсичности лекарственных веществ, как правило, вызывающей у рыб атаксию (нарушение координации движений) и другие.

Стандартный аппарат для проведения ТНА состоит из узкого прямоугольного аквариума (чаще используется акрил, иногда - стекло) с примерными параметрами: высота 20 см × длина 20 см × ширина 5 см (Рис. 1). Аппарат разделяется на две половины (аверсивный верх и более безопасный низ) виртуальной линией, либо пунктирной линией, нанесенной маркером снаружи аквариума. Заход рыбы в ту или иную зону ТНА считают по пересечению этой линии точкой – условным центром тела рыбы (Рис. 1). В

некоторых исследованиях ТНА разделяют на три равные части (верх, середина и низ), однако средняя зона чаще всего оказывается транзитной по своей природе и не чувствительна к собственно уровню тревоги зебр-данио. Целесообразность ее использования в ТНА, по нашему опыту, невелика. При этом узость аппарата ТНА (обычно 5 см) крайне важна для ограничения латерального движения рыб (между широкими стенками), которое иначе сложно регистрировать и оценивать в эксперименте при наиболее часто применяемой записи поведения рыб сбоку. Задняя и боковые стороны ТНА, как правило, обклеиваются белой пленкой для увеличения контраста во время записи поведения (с учетом того, что рыбы способны определенным образом реагировать на цвет, предлагается обклеивать стороны именно белым материалом, например, пластиком). Типичные эффекты различных воздействий приведены в Табл. 1.

Тестирование обычно проводят в дневное время, например, с 11:00 до 14:00 ч. Перед началом работы рыбы должны пройти процесс акклиматизации в новом помещении (не менее 30 мин, лучше 1 час), куда их поместили из вивария. Для острого эксперимента (перед непосредственной съемкой в аппарате ТНА) каждую рыбу, участвующую в эксперименте, по отдельности помещают в пластиковый стакан емкостью 0.5-1 л с раствором препарата на 20 мин (данное время является стандартным, чтобы вызвать изменения нейрохимических показателей и экспрессии генов, однако возможны изменения протокола в зависимости от характера действия тестируемого препарата).

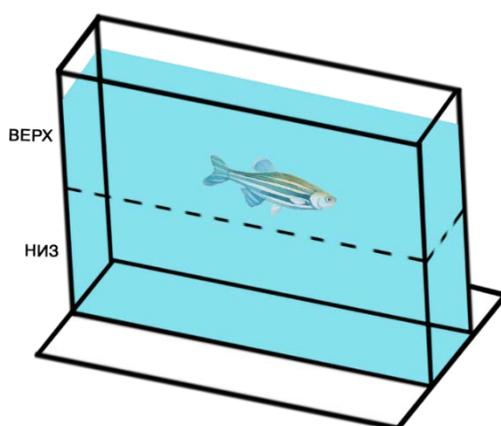


Рисунок 1. Аппарат для проведения ТНА

Аналогичным образом поступают, если требуется применить к рыбе другое воздействие – например, электрический ток, феромон тревоги, яркий свет и т.д. По истечении 20 мин, рыбу аккуратно вылавливают сачком и опускают в ТНА, который

предварительно нужно заполнить водой комнатной температуры на высоту 19 см. Для хронического эксперимента рыб начинают тестировать сразу после истечения времени экспозиции (7-14 дней). Испытания записывают веб-камерой (или другим аналогом) для дальнейшего анализа указанных параметров. Стандартное время съемки обычно составляет 5-6 мин, при этом запись должна начаться непосредственно в момент опускания рыбы в воду (6).

Для расчета статистических данных в данном и других описанных далее тестах используют стандартные дескриптивные методы с определением средних значений, стандартной ошибки среднего (при условии, если данные подчиняются нормальному распределению) или медианы и перцентилей (при условии неподчинения законам нормального распределения). Уровень статистической значимости изменений между группами в ТНА, как и в других тестах на зебрании, обычно рассчитывают с помощью непараметрических U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (для сравнения двух групп) или критерия Краскела-Уоллиса (для 3 и более групп), с последующим пост-хок анализом. Нормальность распределения и гомоскедастичность (постоянство дисперсии) данных анализируют тестами Колмогорова–Смирнова и Бартлетта, соответственно, в качестве основных предпосылок для проведения параметрического анализа.

Особенности выполнения теста и возможные проблемы при тестировании

Изначально рыба, помещенная в новый аквариум, демонстрирует выраженное стрессоподобное поведение: ограничение исследовательской и двигательной активности (или, наоборот, производит большое количество резких метаний, что также является признаком тревожности). Однако затем, в процессе адаптации к условиям новой среды, начинает больше исследовать окружающее пространство и совершать меньшее число эрратических движений и актов фризинга (неподвижности) (7).

Таблица 1. Примеры эффектов различных фармакологических воздействий на зебрании в ТНА

Table 1. Examples of pharmacological effects in the novel tank test in zebrafish

Воздействие	Параметр	Эффект
Ареколин (8)	Продолжительность нахождения в верхней части аквариума	Повышение
Атропин (6)	Пройденная дистанция и средняя скорость	Повышение
Кетамин (9)	Частота заплыва и продолжительность нахождения в верхней части аквариума	Повышение
Кетамин (9)	Латентный период выхода наверх	Снижение
Лизергиновая кислота ЛСД (10)	Продолжительность фризинга	Снижение

ЛСД (10)	Время нахождения в верхней части аквариума	Свышение
Дексамфетамин (11)	Частота заплыва и продолжительность нахождения в верхней части аквариума	Снижение

Поведенческие тесты (в особенности, ТНА) также очень чувствительны к эффекту исследователя: любое неаккуратное действие с экспериментальной рыбой может сильно исказить результаты опыта. К таким действиям относятся долгие попытки поймать рыбу сачком в их домашнем аквариуме или в стакане для 20-минутной экспозиции, длительное нахождение рыбы на воздухе в процессе переноса ее из аквариума содержания или экспозиции в аппарат ТНА, придавливание рыбы, громкие звуки во время экспозиции и съемки, выпрыгивание рыб из сачка (случается часто и поэтому сачок лучше прикрывать рукой сверху) и падение с высоты на твердую поверхность. Все действия экспериментатора должны быть четкими и отработанными. Зебраданио также способны выпрыгивать из воды, покидая места содержания, экспозиции или аппарат ТНА. Поэтому рекомендуется в аппаратах ТНА доливать воду до отметки 1 см от края аквариума, а также закрывать прозрачной пластиковой крышкой стаканы для 20-минутной экспозиции.

Очень важное значение имеет экспозиция рыбы перед тестированием в ТНА. При 20-минутном выдерживании в растворе лекарственного вещества необходимо добиться полной идентичности растворов контрольных и опытных групп: если для растворения вещества использовались органические растворители, необходимо в раствор для контрольной группы добавить такое же количество растворителя. При этом органолептические свойства (цвет, мутность) также не должны существенно отличаться от контроля.

Тест открытого поля (ТОП)

С момента описания Hall в 1932 г. для оценки поведения грызунов, ТОП стал «золотым стандартом» доклинических исследований, базирующихся на ориентировочно-исследовательских реакциях мышей и крыс в незнакомой открытой площадке (12, 13). Концептуально, ТОП для рыб (Рис. 2) похож на таковой у грызунов (14), а также на описанный ранее ТНА (Рис. 1). Чаще всего ТОП используется для моделирования тревожного поведения и оценки реакции на острый стресс, а также для тестирования ряда фармакологических препаратов. В отличие от ТНА (обычно более глубокого аквариума для анализа вертикального положения рыбы (геотаксис) при записи поведения сбоку), ТОП обычно является широким неглубоким аквариумом, и использует запись камерой сверху, оценивая горизонтальное положение рыбы (тигмотаксис).

Относительно неглубокий (например, 10 см) характер теста методически важен для ограничения фактора глубины/геотаксиса в поведении рыб, чтобы последний не интерферировал с показателями тигмотаксиса в ТОП, и не превращал его в ТНА, рассмотренный выше. При этом аппарат ТОП также не должен быть слишком мелким, чтобы мелководье не вызывало сильного стресса у рыб.

При помещении животного в условия новизны, активируются две параллельные мотивации - оценка риска с желанием избежать неблагоприятных стимулов и ориентировочно-исследовательское поведение (15). Преобладание одной из них соответствует либо тревожному фенотипу (в этом случае животное демонстрирует характерные тревожные паттерны - замирание, эрратические движения, снижение двигательной активности), либо активному исследовательскому поведению (когда тревожные паттерны снижены или вовсе отсутствуют), см. Табл. 2. Данные поведенческие факторы чувствительны к различным фармакологическим манипуляциям (Табл. 3), а также к условиям содержания и тестирования (16).

Основные параметры, анализируемые в тесте, и процедура тестирования

Тестовая установка представляет собой открытую арену круглой или прямоугольной формы, различной высоты, которая делится воображаемой линией на две зоны - центр и периферию (например, область шириной 5 см от края стенок). Центральная часть является потенциально опасной зоной для животного, поэтому нахождение в ней может рассматриваться как снижение уровня тревожности. Форма тестовой установки не влияет на результаты теста. Размеры тестовой установки могут варьироваться (30 × 30 × 10 см, 56 × 40 × 28 см для прямоугольного, 21 см – диаметр, 24 см – высота для цилиндра). Съемка экспериментальной установки ведется сверху. Во время тестирования необходимо соблюдать тишину в экспериментальной комнате, находиться в помещении во время съемки не рекомендуется. Температура и химические показатели воды в установке должны быть аналогичными параметрам в домашнем аквариуме (26-28 °С). Освещение в комнате тестирования должно быть около 200 лк.

После предварительной экспозиции (если это необходимо), животное индивидуально помещается в центр ТОП и его поведение записывается в течение 5-6 мин для дальнейшего анализа. После окончания тестирования рыбу аккуратно вылавливают сачком и перемещают в другой аквариум для дальнейших манипуляций или в домашний аквариум. В момент помещения животного в тест необходимо соблюдать аккуратность, не касаться сачком воды, а также не допускать падения животного в воду с высоты, не сжимать животное в сачке, минимизируя дополнительное воздействие на него. После каждого животного производят смену воды в установке во

избежание формирования ольфакторных (запаховых) следов, что может привести к артефактам в результатах исследования.

К основным параметрам, регистрируемым в ТОП, можно отнести общую пройденную дистанцию, латентный период, количество и продолжительность выходов в центральную зону и периферию, количество и продолжительность эпизодов повышенной активности, количество и продолжительность эпизодов замираний (фризинга). Также, для оценки уровня тигмотаксиса (стремление животного находиться возле стенки) подсчитывают отношение времени, проведенном в центральной зоне, ко времени пребывания на периферии.

Дополнительные параметры для оценки специфических поведенческих паттернов (например, количество круговых движений, стереотипные движения и др.) могут служить для более полного понимания поведенческих фенотипов, демонстрируемых зебраданио. Построение траекторий движения с помощью автоматизированной системы видеотрекинга также позволяет оценивать предпочтение зебраданио к нахождению не только на периферии, но и относительно углов (в случае, если используется прямоугольный ТОП). Для формирования корректных изображений все траектории движения животных в отдельной когорте ранжируются от минимума к максимуму по степени активности движения. Среднее изображение принимается за усредненную траекторию и служит иллюстрацией и материалом для дальнейшего анализа активности зебраданио (17).

Таблица 2. Основные показатели поведения зебраданио в ТОП

Table 2. Common behavioral endpoints assessed in the zebrafish open field test

Параметр	Детали
Замирание (фризинг)	Отсутствие заметного движения рыбы, кроме движений глаз и жаберных крышек, более чем на 2 с. При автоматизированном подсчете фризингом считается движение со скоростью менее 0.1 см/с. Увеличение данного параметра свидетельствует о повышении уровня тревожности, седации.
Общая локомоторная активность	Общая пройденная дистанция (в см или м). Увеличение данного параметра свидетельствует об увеличении исследовательской активности зебраданио.
Число выходов в центральную зону	Число, продолжительность нахождения в центре, а также латентный период первого захода в центральную зону арены. Увеличение числа и продолжительности выходов рассматривается как снижение тревожности зебраданио. Укорочение латентного периода первого выхода в центр также свидетельствует о снижении уровня тревоги.

Число выходов в зону периферии	Число, продолжительность нахождения на периферии. Увеличение длительности нахождения на периферии свидетельствует о повышенном уровне тревоги.
Количество эпизодов повышенной активности	При автоматизированном подсчете - количество эпизодов движения рыбы со средней скоростью, превышающей 80%-ый порог средней скорости передвижения анализируемой выборки. Увеличение числа эпизодов рассматривают как тревожный фенотип.
Тигмотаксис	Отношение время в центре/время на периферии, отражающее предпочтение животного находиться вблизи безопасных стенок. Увеличение данного параметра свидетельствует о предпочтении животных находиться в центральной зоне.

Анализ поведенческой активности зебраданио может быть осуществлен как с помощью ручной обработки (например, в программе RealTimer), так и с помощью специализированного автоматизированного программного обеспечения (например, EthoVision), позволяющего отслеживать перемещение животного как в реальном времени, так и на видеозаписи. Также, с помощью компьютерного моделирования возможно реконструировать траекторию движения в 3D, что позволяет дополнительно оценивать такой параметр как «расстояние от дна». Рекомендуемый размер выборки - не менее 15 особей в каждой когорте. Данный тест адаптирован не только для взрослых зебраданио, но и для личинок, демонстрирующих схожие фенотипы (16).

Таблица 3. Примеры эффектов различных фармакологических факторов в ТОП

Table 3. Effects of various pharmacological treatments in the zebrafish open field test

Препарат	Эффект
Фенциклидин	Вызывает круговое плавание, не изменяет основные параметры
Буспирон	Повышение уровня тревожности, увеличение продолжительности фризинга, снижение скорости передвижения.
Этанол	Увеличивает состояние неподвижности у самцов, но не самок.
Ибогаин	Не изменяет пространственно-временное исследование новой среды, однако вызывая явное предпочтение одних областей другим.
ЛСД	Вызывает умеренный тигмотаксис, уменьшение числа выходов в центр.
Острый и хронический стресс	Вызывает тигмотаксис, увеличение тревожности



Рисунок 2. Типичные фенотипы, наблюдаемые в ТОП

Благодарности: Работа поддержана Госзаданием (проект 73026081) Санкт-Петербургскому Государственному Университету.

Литература

1. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* 2007;90(1):54-8.
2. Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;94(1):75-80.
3. Stewart A, Wu N, Cachat J, Hart P, Gaikwad S, Wong K, et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(6):1421-31.
4. Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Osés JP, Barcellos LJ, Bogo MR, et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(2):561-7.
5. Kysil EV, Meshalkina DA, Frick EE, Echevarria DJ, Rosemberg DB, Maximino C, et al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. *Zebrafish.* 2017;14(3):197-208.
6. Volgin AD, Yakovlev OA, Demin KA, Alekseeva PA, Kalueff AV. Acute behavioral effects of deliriant hallucinogens atropine and scopolamine in adult zebrafish. *Behav Brain Res.* 2019;359:274-80.
7. Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature protocols.* 2010;5(11):1786-99.

8. Serikuly N, Alpyshov ET, Wang D, Wang J, Yang L, Hu G, et al. Effects of acute and chronic arecoline in adult zebrafish: Anxiolytic-like activity, elevated brain monoamines and the potential role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021;104:109977.
9. Riehl R, Kyzar E, Allain A, Green J, Hook M, Monnig L, et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2011;33(6):658-67.
10. Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suci C, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):277-84.
11. Kyzar E, Stewart AM, Landsman S, Collins C, Gebhardt M, Robinson K, et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res*. 2013;1527:108-16.
12. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology*. 1934;18(3):385.
13. Hall CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*. 1936;22(3):345.
14. Godwin J, Sawyer S, Perrin F, Oxendine SE, Kezios ZD. Adapting the open field test to assess anxiety-related behavior in zebrafish. *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*: Springer; 2012. p. 181-9.
15. Michael Stewart A, V Kalueff A. The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research. *Current neuropharmacology*. 2012;10(3):263-71.
16. Ahmad F, Richardson MK. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. *Behavioural processes*. 2013;92:88-98.
17. Cachat J, Stewart A, Utterback E, Hart P, Gaikwad S, Wong K, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS one*. 2011;6(3):e17597.