

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 черно-белого аквариума и теста построения косяка

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 – распространенное расстройство мозга, для изучения которого традиционно применяются поведенческое тестирование на модельных организмах, в том числе на рыбах зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish). Тест черно-белой камеры (ЧБК) и тест построения косяка (ТПК) являются важными, широко применяемыми и эффективными методами оценки тревожности у зебраданио. В статье рассмотрены методические аспекты применения данных тестов на зебраданио.

Abstract.

Anxiety is a highly prevalent, widespread human brain disorder. Anxiety is commonly studied in various experimental animal models, including the zebrafish (*Danio rerio*). The light-dark box (LDB) and shoaling test (ST) are important, popular and widely used methods for assessing anxiety-related phenotypes in zebrafish. Here, we discuss methodological aspects of using these two tests in translational anxiety research in zebrafish models.

Ключевые слова: зебраданио, тревожность, скототаксис, косяк, новизна.

Keywords: zebrafish, anxiety, scototaxis, shoaling, novelty.

Тест черно-белой камеры

Тест черно-белой камеры (ЧБК, Рис. 1) традиционно используют для количественной оценки тревожного поведения у рыб. Подобно другим акватическим тестам на тревожность, тест ЧБК основан на погружении рыб в новые, незнакомые условия с последующей характеристикой поведенческих особенностей. Для зебраданио, тест ЧБК впервые был предложен в 1999 году Serra и соавторами, продемонстрировавшими, что рыбы предпочитают больше времени проводить в темной части аквариума (скотофилия или скототаксис, scototaxis) [1]. Показано, что скототаксис помогает рыбам избегать хищников в природе, поскольку взрослые зебраданио четко выделяются при плавании на светлом фоне, что способствует увеличению уровня тревожности, возникающей при нахождении на белом фоне [2]. Помимо этого, было продемонстрировано, что препараты, обладающие анксиогенными свойствами, увеличивают частоту и продолжительность заплывов в темную часть аквариума (Табл. 1). Также необходимо обратить внимание на то, что предпочтение рыб светлой или темной половине тестовой установки зависит от уровня внешнего освещения. При сильном освещении или при большей концентрации света в белом отсеке, зебраданио предпочитают находиться в темном отсеке [3, 4].

Основные параметры, анализируемые в тесте, и процедура тестирования

1. Частота заплывов и продолжительность пребывания в светлом отсеке. Более длительное пребывание в светлой части ЧБК указывает на более низкий уровень тревожности.
2. Латентный период заплыва в светлую часть аквариума. Попад в новую среду обитания, зебраданио естественным образом не заплывают в светлую часть аквариума и постепенно исследуют её по мере привыкания к установке. Более длительная задержка указывает на более высокий уровень беспокойства.
3. Частота и продолжительность фризинга и эрратических движений в светлом отсеке. Указывает на повышенное беспокойство/тревожность и, как правило, выше у зебраданио, находящихся в стрессовом состоянии.

Аппарат для теста ЧБК состоит из пластикового резервуара (длина 50 см × ширина 20 см × высота 20 см), разделенного на два отделения равного размера: белое и черное, заполненных водой комнатной температуры (Рис. 1). Тестирование обычно

проводят с 11:00 до 16:00 ч. Перед началом работы рыбы должны пройти процесс акклиматизации в новом помещении (не менее 30 мин), в котором будет производиться съёмка. Для острого эксперимента (перед непосредственной съёмкой в аппарате ЧБК) каждая рыба, участвующая в эксперименте, по отдельности подвергается воздействию лекарства в пластиковом химическом стакане емкостью 0.5-1 л в течение 20 мин (данное время является стандартным, чтобы вызвать изменение нейрохимических показателей и экспрессии генов, однако возможны нескорые изменения). Аналогичный порядок действий относится и к другим стимулам: электрическому току, феромону тревоги, яркому свету и т.д.).

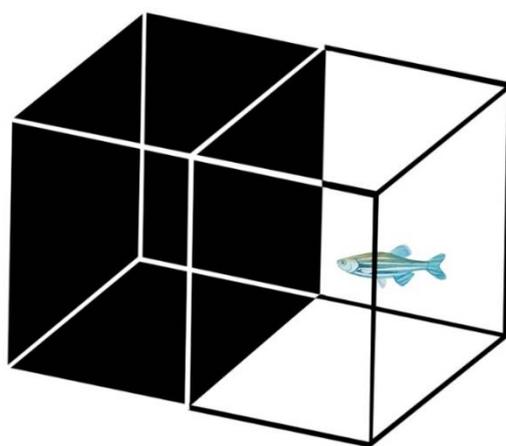


Рисунок 1. Аппарат для проведения акватического теста ЧБК на зебраданио

После 20 мин, рыбу аккуратно вылавливают и опускают на поверхность темной части аппарата ЧБК [5]. Для хронического эксперимента рыб начинают тестировать сразу после истечения времени экспозиции (7-14 дней). Испытания записываются на веб-камеру для дальнейшего анализа параметров, описанных выше. Стандартное время съемки составляет 5 мин, при этом запись должна начаться непосредственно в момент опускания рыбы в воду [5]. Для расчета статистических данных используют стандартные дескриптивные (описательные) методы с определениями средних значений, стандартной ошибки среднего (при условии, если данные подчиняются нормальному распределению) или медианы и перцентилей (при условии неподчинения законам нормального распределения). В целом, тревожные воздействия усиливают скототаксис у рыб в ЧБК, а анксиолитические (Табл. 1) – увеличивают исследовательскую активность в светлом отсеке теста.

Таблица 1. Примеры результатов тестирования в ЧБК

Table 1. Examples of behavioral results in the light-dark box

Воздействие	Параметр	Эффект
Ареколин [6]	Продолжительность нахождения в светлой части аквариума	Повышение
Флуоксетин (хронический) [7]	Продолжительность нахождения в светлой части аквариума	Повышение
Диэтиламид лизергиновой (ЛСД) [8]	d- Продолжительность нахождения в светлой части аквариума	Повышение

Особенности выполнения данного теста и проблемы при тестировании

Необходимо учитывать, что сильное освещение может исказить результаты исследования, т.к. нарушается контраст между белой и черной областью. С этой целью рекомендуется прикрывать черную часть тестового аквариума крышкой или иными предметами. Однако в таком случае будет проблематично анализировать такие типы поведения, как эрратические движения или фризинг в темной части установки.

ЧБК, как и другие поведенческие тесты, очень чувствительны к эффекту исследователя: любое неаккуратное действие с экспериментальной рыбой может сильно исказить результаты. К таким действиям относятся долгие попытки поймать рыбу сачком в их домашнем аквариуме или в стакане для 20-минутной экспозиции, долгое нахождение рыбы на воздухе в процессе переноса ее из аквариума содержания или экспозиции в аппарат ЧБК, придавливание рыбы, громкие звуки во время экспозиции и съемки. Все действия экспериментатора должны быть четкими.

Тест построения косяка (ТПК)

Тест построения косяка (ТПК, shoaling test) является поведенческим тестом, активно применяемый с целью оценки тревожного состояния рыб. У зебр аданио, как у социальных водных животных, выработалось эволюционно консервативное жизненно важное поведение – способность к построению косяка (shoaling) [9, 10], которое поддерживается на относительно стабильном и высоком уровне на протяжении всей жизни [11]. Косяк — это группа рыб, тесно взаимодействующих друг с другом с целью облегчения поиска пищи и увеличения собственной безопасности (большой косяк с высокой долей вероятности обнаружит приближающегося хищника или обнаружит его раньше, чем отдельная рыба) [11]. Показано, что плотность косяка коррелирует с присутствием хищников, а организация косяка в период развития связана с активностью дофаминергических нейронов [12, 13].

Основные параметры, анализируемые в тесте ТПК: Среднее расстояние между рыбами. Показано, что меньшее расстояние между рыбами (формирование более плотных косяков) является признаком тревожности и беспокойства у рыб. Дополнительно (особенно с применением современных методов регистрации группового поведения) можно оценивать размер косяка, среднее расстояние до максимально отдаленной рыбы, % времени нахождения всех рыб косяка вблизи (например, на расстоянии 2.5 см – одной дины тела).

Процедура тестирования

Перед началом работы рыбы должны пройти процесс акклиматизации в помещении (не менее 30 мин), где будет осуществляться видеосъемка. Данный эксперимент выполняется в аквариуме, аналогичному аппарату ТНА (см. выше), в который помещаются 4-6 рыб после предварительной экспозиции в растворе с лекарством (Рис. 2). После 5-минутной акклиматизации в тестовом аквариуме, необходимой для нормализации группового поведения, осуществляется фотосъемка косяка зебрданио после установленных равных промежутков времени (после каждых 5-10 с в течении 1-5 мин, после каждой минуты в течение 10 мин). Каждую фотографию необходимо откалибровать по размеру аквариума и измерить расстояния (в см) между каждой рыбой в группе [5].

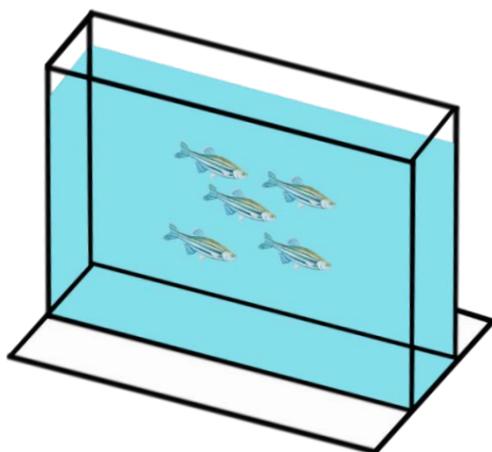


Рисунок 2. Примерный вид теста построения косяка зебрданио

При анализе косяка можно также использовать современные методы видеорегистрации группового поведения (например, коммерческая программа Noldus Ethovision TX имеет дополнительный социальный модуль для оценки поведения сразу целого косяка рыб). Для расчета статистических данных используют стандартные дескриптивные (описательные) методы с определениями средних значений, стандартной

ошибки среднего (при условии, если данные подчиняются нормальному распределению) или медианы и перцентилей (при условии неподчинения законам нормального распределения).

Особенности выполнения данного теста и проблемы при тестировании

Данный поведенческий тест способен дополнить результаты по выявлению тревожности, однако основным тестом для анализа тревожного поведения рыб является тест нового аквариума (ТНА). В целом, поведенческие тесты очень чувствительны к эффекту исследователя: любое неаккуратное действие с экспериментальной рыбой может сильно исказить результаты. К таким действиям, например, относятся долгие попытки поймать рыбу сачком в их домашнем аквариуме или в стакане для 20-минутной экспозиции, долгое нахождение рыбы на воздухе в процессе переноса ее из аквариума содержания или экспозиции в аппарат ТПК, придавливание рыбы, громкие звуки во время экспозиции и съемки. Все действия экспериментатора должны быть четкими. Наконец, как и в ТНА, зебраданию могут «выпрыгивать» из установки. Поэтому рекомендуется в аппаратах ТПК доливать воду до отметки 0.5-1 см от края аквариума, а также закрывать крышкой стаканы для 20-минутной экспозиции. В целом, тревожные воздействия усиливают плотность косяка и снижают его размеры, а анксиолитические (Табл. 2) – снижают плотность косяка в ТПК.

Таблица 2. Результаты некоторых исследований в ТПК

Table 2. Examples of behavioral data in zebrafish shoaling test

Воздействие	Параметр	Эффект
Ареколин [6]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Атропин[5]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Скополамин [5]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Кетамин [14]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
ЛСД [8]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение

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

Литература

1. Serra, E.L., C.C. Medalha, and R. Mattioli, *Natural preference of zebrafish (Danio rerio) for a dark environment*. Braz J Med Biol Res, 1999. **32**(12): p. 1551-3.
2. Blaser, R.E., L. Chadwick, and G.C. McGinnis, *Behavioral measures of anxiety in zebrafish (Danio rerio)*. Behav Brain Res, 2010. **208**(1): p. 56-62.
3. Stephenson, J.F., K.E. Whitlock, and J.C. Partridge, *Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation*. Zebrafish, 2011. **8**(1): p. 17-22.
4. Steenbergen, P.J., M.K. Richardson, and D.L. Champagne, *Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study*. Behav Brain Res, 2011. **222**(1): p. 15-25.
5. Volgin, A.D., et al., *Acute behavioral effects of deliriant hallucinogens atropine and scopolamine in adult zebrafish*. Behav Brain Res, 2019. **359**: p. 274-280.
6. Serikuly, N., 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**: p. 109977.
7. Maximino, C., et al., *Pharmacological analysis of zebrafish (Danio rerio) scototaxis*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011. **35**(2): p. 624-31.
8. Grossman, L., et al., *Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish*. Behav Brain Res, 2010. **214**(2): p. 277-84.
9. Ward, A.J., et al., *Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish*. Proc Biol Sci, 2008. **275**(1630): p. 101-5.
10. Reyhanian, N., et al., *17alpha-Ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebra fish (Danio rerio)*. Aquat Toxicol, 2011. **105**(1-2): p. 41-8.
11. Miller, N. and R. Gerlai, *Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (Danio rerio)*. Behav Brain Res, 2007. **184**(2): p. 157-66.
12. Engeszer, R.E., et al., *Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, Danio rerio*. Anim Behav, 2007. **74**(5): p. 1269-1275.
13. Buske, C. and R. Gerlai, *Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish*. Dev Psychobiol, 2012. **54**(1): p. 28-35.
14. Riehl, R., et al., *Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish*. Neurotoxicol Teratol, 2011. **33**(6): p. 658-67.