

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.

## **Поведение отчаяния у рыб на примере модельного организма зебраданио (*Danio rerio*)**

2021 г. Д.С. Галстян<sup>1,2</sup>, Т.О. Колесникова<sup>3</sup>,

Ю.М. Косицын<sup>1</sup>, К.Н. Забегалов<sup>3</sup>, М.А. Губайдуллина<sup>3</sup>, Г.О. Маслов<sup>3,5</sup>

К.А. Демин<sup>1,3,4</sup>, А.В. Калуев<sup>1,3,4,5,6,7,8 \*</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

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

<sup>3</sup>Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup>Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

<sup>6</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>7</sup>Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

<sup>8</sup>Московский физико-технический институт, Москва, Россия

\* [avkalueff@gmail.com](mailto:avkalueff@gmail.com)

Поступила в редакцию xx.xx.2021 г.

После доработки xx.xx.2021 г.

Принята к публикации xx.xx.2021 г.

### **Аннотация.**

Тест иммобилизации хвоста (ТИХ) является относительно новым методом анализа поведения зебраданио, основанный на парадигме выученной беспомощности и отчаяния, когда животное подвергается действию неконтролируемого (неизбежного) стрессора, и рано или поздно бросает все попытки к избеганию аверсивного стимула, принимая позу неподвижности. В качестве аверсивного стимула выступает фиксация рыбы вниз головой в вязкой губке, в центральный разрез которой фиксируется хвост рыбы без ограничения подвижности боковых плавников и передней части тела. ТИХ является подходящим тестом для выявления у животного депрессивно-подобного поведения (отчаяния), одними из основных клинических симптомов которых являются апатия и вялость.

### **Abstract.**

The zebrafish tail immobilization test (ZTI) is a relatively new method for analyzing zebrafish behavior, based on the paradigm of learned helplessness, when the animal is exposed to an uncontrollable stressor, and soon abandons all attempts to avoid the aversive stimulus, adopting a posture of immobility. As an aversive stimulus acts restraining fish tail in a viscose sponge, without restricting the mobility of the lateral fins and the front of the body. ZTI is suitable for detecting depressive-like ‘despair’ behavior in zebrafish, paralleling clinical apathy and lethargy in depression.

**Ключевые слова:** зебраданио, отчаяние, антидепрессанты, иммобилизация хвоста, выученная беспомощность.

**Keywords:** zebrafish, despair, antidepressants, tail immobilization, learned helplessness.

### **Введение: тест иммобилизации хвоста**

Тест иммобилизации хвоста (ТИХ, zebrafish tail immobilization, ZTI test, Рис. 1) является относительно новым методом для анализа поведения зебраданио, и имеет концептуальное сходство с широко используемыми на грызунах тестами поведенческого “отчаяния” – вынужденного плавания (the forced swim test, FST) и тестом подвешивания за хвост (the tail suspension test, TST) (1-4).

В основе таких тестов лежит парадигма выученной беспомощности, когда животное подвергается действию неконтролируемого стрессора, и рано или поздно бросает все попытки к избеганию авersive стимула, принимая позу неподвижности. В ТИХ животное никак не может избежать воздействие стрессора. Данная особенность делает ТИХ наиболее подходящим для выявления депрессивно-подобного поведения у животного, одними из основных симптомов которых являются моторная ретардация (motor retardation), апатия и вялость, хорошо проявляющиеся во время стрессового воздействия.

Поскольку оба теста на “отчаяние” (FST и TST) у грызунов были разработаны для анализа эффектов антидепрессантов (5), ТИХ у рыб также оценивает эффекты различных антидепрессантов и других психоактивных веществ (Табл. 1). Также он моделирует поведение, подобное отчаянию, которое может усиливаться при некоторых моделях депрессии (6) и которое выражается в росте показателя иммобильности, и косвенно свидетельствует о формировании состояния подобному отчаянию.

### **Методика тестирования (по (7))**

Перед началом эксперимента подготавливают вязкую губку. Размеры губки следующие: длина 8 x высота 4 x ширина 5 см. Как показано на Рис. 1, губка разрезается посередине острым скальпелем на 2 см глубины от задней поверхности, с дополнительной парой 2-см разрезов по бокам для обеспечения фиксации на стенках стакана.

Опытная группа рыб поодиночке помещается на 20 мин в пластиковый прозрачный контейнер, емкостью 200 мл, содержащий исследуемый препарат в необходимой дозировке, контрольная группа помещается в соответствующий объем чистой воды с добавлением растворителя, если таковой использовался при растворении исследуемого препарата. Время экспозиции 20 мин.

Далее рыба аккуратно перемещается из емкости в центральный разрез влажной вязкой губки так, чтобы хвостовая часть тела рыбы была зафиксирована, не ограничивая подвижность боковых плавников и передней части тела. Важно укрепить зебраданию так, чтобы на ее тело не повреждалось от контакта с губкой. Именно этот фактор является ключевым для моделирования поведения, подобного отчаянию. Центральный разрез, в который помещают рыбу, и боковые, служащие для закрепления губки на пластиковом стакане, обеспечивают фиксацию, при которой рыба не в состоянии самостоятельно выбраться, но также исключается чрезмерное сдавливание её тела.

Наполненный водой прозрачный стаканчик, параметры которого 7 x 4.8-5.5 см, с задней и боковых сторон обклеивают белым скотчем, что необходимо для обеспечения контраста арены и окружающего пространства во время видеозаписи. Для лучшего понимания, как должен выглядеть тест, в сети Интернет доступны видео на Youtube и на веб-сайте Международного общества стресса и поведения ([www.stressandbehavior.com/zti](http://www.stressandbehavior.com/zti)). Перед фиксацией губки на стакане необходимо заранее включить видеокамеру. Время тестирования составляет 5 или 10 мин.

После записи теста на видеокамеру, рыбу извлекают из губки, при необходимости эвтаназируют посредством помещения в ледяную воду, декапитуруют и на холоде извлекают мозг для дальнейших исследований. Однако стоит помнить, что данный тест обладает сильным анксиогенным эффектом на рыб, поэтому при хронических экспериментах (выдерживание рыбы в растворе лекарственного препарата или в определенных условиях 3, 5, 7 или более дней) рекомендуется приступить к процедуре изъятия головного мозга на следующий день после эксперимента. Также во время проведения батареи тестов, рекомендуется использовать ТИХ в самом конце.

Активность рыбы в губке - основной параметр, который рассчитывается в данном тесте. Считается как количество подергиваний или общее время активных действий рыбы за определенное время. Однако наиболее часто данный параметр рассчитывается в специальном программном обеспечении (EthoVision,) где, задав нужные параметры, точнее можно рассчитать всю (даже самую незначительную) двигательную активность рыбы. В программе анализируются частота и общая продолжительность активного поведения, рассчитываемая по изменению пикселей в заданной зоне, возможно рассчитать общую дистанцию по непосредственному движению рыбы в пространстве, что также будет хорошим показателем активности, и другие параметры.

**Таблица 1.** Эффекты веществ на время подвижности зебраданию в ТИХ (по (7))

**Table 1.** Effects of psychoactive drugs in zebrafish tail immobilization test (ZTI) ((7))

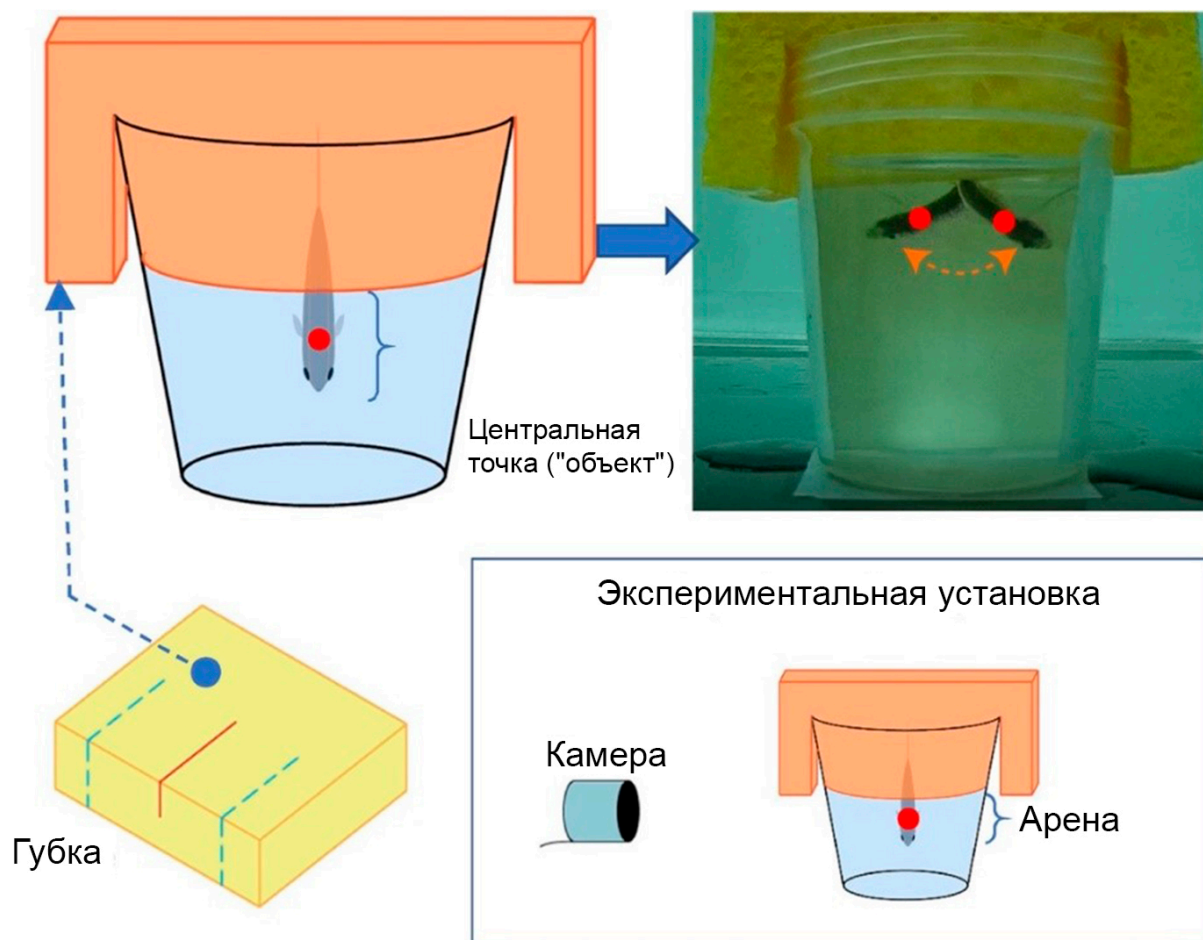
Вещества	Эффект
Сертралин 2-10 мг/л (антидепрессант-селективный ингибитор обратного захвата серотонина, СИОЗС)	Повышение
Амитриптилин 1 мг/л (трициклический антидепрессант)	Повышение
Феназепам 0.1 мг/л (анксиолитик)	Нет эффектов

Вначале задаётся тестовая арена, ограниченная верхней зоной пластикового стакана, в которой находится рыба (Рис. 1). Общую активность рассчитывают как среднее количество пикселей, измененных между каждой парой последовательных видеок кадров, относительно размера пикселя всей области настройки, что выражается как средний процент (%) измененных пикселей за один тест. Активное время (с) рассчитывают, как период, в течении которого тестируемое животное было автоматически определено как «активное» на основании анализа пикселей, при этом пороговые значения параметров следует настраивать и «подгонять» вручную для повышения точности результатов. Общую мобильность (а) оценивают как среднее количество пикселей, измененных между каждой парой последовательных видеок кадров, и она выражается как процент от среднего изменения пикселей с порогом > 20%. Соответственно, (а) – это параметр, который рассчитывается как продолжительность времени, за которое определенное количество пикселей изменяется между последовательными кадрами по меньшей мере на 20% за кадр.

Различные стрессоры влияют на поведенческие характеристики рыб, помещенных в ТИХ. Например, предварительное воздействие электрическим током снижает уровень поведенческих показателей в тесте, за исключением количества эпизодов активности. Другой стрессор - феромон тревоги - вызывает аналогичные, но менее выраженные поведенческие изменения в ТИХ, уменьшая как пройденное расстояние, так и процент подвижности, но не влияет на другие поведенческие параметры (7).

Поскольку моноамины мозга играют важную роль в стрессовом и аффективном патогенезе, для более полного описания эффектов ТИХ, были определены концентрации важнейших нейромедиаторов: норадреналина, серотонина, дофамина и их метаболитов: 5-гидроксииндолеуксусная кислота (ГИУК), 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (ДОПАК) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ анализ ТИХ с предварительным стрессорным воздействием показывает увеличение соотношения ГИУК/серотонина в обеих экспериментальных группах, получавших удар током и экспозицию с феромоном тревоги, по сравнению с контрольными группами. Другие значительные изменения обнаружены только у рыб, получивших электрический удар перед тестом, где наблюдали повышенные уровни ДОПАК и ГИУК и увеличение соотношения ДОПАК/дофамин. Также в этом тесте апробировались препараты, используемые в клинической практике. Например, антидепрессант сертралин продемонстрировал увеличение пройденной дистанции в ТИХ и время нахождения в подвижном состоянии. В другом эксперименте антидепрессант amitriptilin оказывал значительные эффекты на длину пути в ТИХ и на время, проведенное в подвижном состоянии. Напротив, обычный анксиолитик феназепам оказался неэффективным.

Таким образом, и электрический шок, и феромон тревоги снижали активность зебраданио в этом тесте, антидепрессанты повышали ее, а феназепам не проявил эффектов. Кроме того, 5-минутное воздействие ТИХ повышало уровень метаболизма серотонина, увеличивая соотношение ГИУК/серотонин в мозге зебраданио в то время как предварительный удар электрическим током перед ТИХ повышал как уровень этой пары метаболитов, так и соотношение ДОПАК/дофамин. Напротив, предварительное воздействие антидепрессантов сертралина и amitriptilina снижало оба соотношения по сравнению с контрольными рыбами. Соответственно, ТИХ является первой экспериментальной моделью отчаяния на зебраданио, и потенциально полезным протоколом для скрининга препаратов и поведенческого фенотипирования зебраданио.



**Рисунок 1.** Тест иммобилизации хвоста зебраданью (ТИХ, по (7)). Красным цветом указана точка, которую программа считывает как «нулевую» (местонахождение объекта). Показатель иммобильности тем выше, чем меньше амплитуда раскачивания рыбы

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

## Литература

1. Bernal-Morales B, Contreras CM, Cueto-Escobedo J. Acute restraint stress produces behavioral despair in weanling rats in the forced swim test. *Behav Processes*. 2009;82(2):219-22.
2. Swiergiel AH, Leskov IL, Dunn AJ. Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2008;186(1):32-40.
3. Ostadhadi S, Haj-Mirzaian A, Nikoui V, Kordjazy N, Dehpour AR. Involvement of opioid system in antidepressant-like effect of the cannabinoid CB1 receptor inverse agonist AM-251 after physical stress in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(2):203-12.

4. Haj-Mirzaian A, Ostadhadi S, Kordjazy N, Dehpour AR, Ejtemaei Mehr S. Opioid/NMDA receptors blockade reverses the depressant-like behavior of foot shock stress in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* 2014;735:26-31.
5. Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(5):238-45.
6. Ma L, Demin KA, Kolesnikova TO, Khatsko SL, Zhu X, Yuan X, et al. Animal inflammation-based models of depression and their application to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(10):995-1009.
7. Demin KA, Lakstygai AM, Chernysh MV, Krotova NA, Taranov AS, Ilyin NP, et al. The zebrafish tail immobilization (ZTI) test as a new tool to assess stress-related behavior and a potential screen for drugs affecting despair-like states. *Journal of neuroscience methods.* 2020;337:108637.