

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.

Использование зебраданио (*Danio rerio*) для оценки краткосрочной памяти – габитуация и определение домашней базы

**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*}**

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

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

³*Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия*

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

⁵*Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия*

⁶*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

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

⁸*Московский 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.

Новизна среды является одним из наиболее мощных стрессоров для животных и часто используется в нейробиологии поведения для изучения аффективных и когнитивных нарушений. Однако в процессе исследования незнакомой среды у экспериментальных животных происходит снижение стресса за счет габитуации (приспособление, habituation). В различных поведенческих тестах у зебраданио это проявляется в заплыве в зоны, представляющие потенциальную опасность для них: верхняя часть аквариума в тесте незнакомого аквариума (ТНА), центральная часть в тесте открытого поля (ТОП). При построении эффективной стратегии выживания важным является навигация в незнакомой среде, которая осуществляется за счет поиска домашней базы – наиболее безопасного участка, который служит отправной точкой в исследовании незнакомой среды. Правильное определение домашней базы является важным для выявления поведенческих особенностей у зебраданио, и рассмотрено в

настоящем обзоре (как и габитуация) как тест для оценки краткосрочной пространственной памяти.

Abstract.

Environmental novelty is one of the most potent stressors in animals and is often used in behavioral neuroscience to study affective and cognitive impairments. However, in the process of studying an unfamiliar environment in experimental animals, there is a decrease in stress due to habituation (adaptation, habituation). In various behavioral tests in zebrafish, this manifests as swimming in areas that pose a potential danger to them: the upper part of the aquarium in the novel tank test and the central part in the open field test. When building an effective survival strategy, it is important to navigate in an unfamiliar environment from a home base - the safest area that serves as a starting point in exploring a novel arena. Both discussed here, habitation and establishing the home base, are important for assessing cognitive behavioral traits in zebrafish related to short-term spatial working memory.

Ключевые слова: зебраданию, габитуация, домашняя база, стресс, поведение.

Keywords: zebrafish, habitation, home base, stress, behavior.

Введение

Новизна среды является одним из наиболее мощных стрессоров для животных и часто используется в нейробиологии поведения для изучения аффективных и когнитивных нарушений. В процессе исследования незнакомой среды у экспериментальных животных происходит снижение стресса за счет габитуации (приспособление, habituation). Габитуация – это исчезновение или снижение интенсивности реакции на непрерывно и/или многократно предъявляемый стимул (1). Выделяют межсессионную и внутрисессионную габитуацию: первая характеризует пространственную кратковременную память, а вторая - используется для оценки средне- и долговременной пространственной памяти (Табл. 1).

Адаптационные ответы зебраданию вызывают, используя тест незнакомого аквариума (ТНА), помещая рыбу в незнакомую ей экспериментальную установку (20 × 20 × 5 см), условно разделенную горизонтальной линией на две равные части, верхнюю и нижнюю. Межсессионную габитуацию определяют, исходя из ежедневной повторяющейся регистрации поведения рыбы в ТНА на протяжении недели, а внутрисессионную – при единовременной регистрации поведения экспериментальной рыбы в ТНА в течение 6-30 мин, после чего сравнивают поведение зебраданию каждой

минуты полученной видеозаписи. Как и в межсессионном, так и во внутрисессионном вариантах оцениваются такие показатели тревожного поведения зебр аданио, как латентный период выхода в верхнюю часть аквариума (с) и время нахождения в этой половине (с), частота и количество переходов в верхнюю часть, а также количество эрратических движений, частота и длительность фризинга (замираний) (2). При этом анксиогенные и анксиолитические препараты способны изменять характерные для данного теста адаптационные процессы.

Другой фактор, габитуацию к которому можно оценить у зебр аданио — это страх, что также нередко используется в нейроповеденческих и психофармакологических исследованиях (3). В тестировании используются различные стимулы, и может оцениваться поведение как взрослой особи, так и личинки зебр аданио. Например, для взрослой рыбы используется методика вибрационного «постукивания» или методика предъявления хищника и другие (4). При этом оценивают различные тревожные формы поведения: увеличение пройденного расстояния, высокая скорость плавания по сравнению с контрольной группой и характерный стартл-рефлекс (startle response), представленный мгновенной реакцией избегания возможной угрозы, основанной на парадигме «бей-замри-беги».

При тестировании личинок используют акустические, вибрационные, визуальные и электрические стимулы, подаваемые через равные промежутки времени. Для каждого раздражающего фактора существуют свои количественные параметры тревожного состояния. При акустической стимуляции рассчитывают пройденное расстояние (мм) (5), вибрационная стимуляция - угол изгиба (градусы) и максимальная угловая скорость (градус/мс) (6), визуальная стимуляция - пройденное расстояние (пиксели) или скорость плавания (мм/мин) (7), электрическая стимуляция - частота сердечных сокращений (уд/мин) (8). Видеозаписи с поведением рыбы оценивают вручную или посредством использования системой автоматической регистрации поведения.

Таблица 1. Фенотипические проявления габитуации у зебр аданио при воздействии различных экспериментальных факторов

Table 1. Phenotypic manifestations of zebrafish habituation modulated by various experimental factors

Габитуация	Адаптационные ответы
Меж- и внутрисессионная габитуация в тесте незнакомого аквариума	По мере приспособления к новой среде у рыб увеличивается количество переходов в верхнюю часть аквариума и время

	нахождения в его верхней части. Снижается тревожность, что проявляется в виде уменьшения количества эрратических движений и снижения фризинга
Меж- и внутрисессионная габитуация к акустической, вибрационной, визуальной и механической реакции испуга личинок зебраданио	Происходит прямопропорциональное снижение стартл-рефлекса на потенциально опасный стимул в зависимости от количества и качества его предъявления
Меж- и внутрисессионная габитуация взрослой рыбы к постукиванию	Тревожные проявления поведения постепенно уменьшаются, а поведенческие маркеры, такие как пройденное расстояние или скорость возвращаются к нормальному уровню
Меж- и внутрисессионная габитуация к присутствию хищника	Появляется исследовательский интерес, зебраданио проводит большую часть времени около хищника

Габитуация - это простейшая неассоциативная форма обучения, основанная на согласовании ответов с предыдущим опытом. Время привыкания животного к повторному предъявлению одного и того же стимула постепенно уменьшается и не связано с сенсорной адаптацией. Габитуация позволяет отфильтровать ненужные стимулы и сосредоточиться на важных изменениях окружающей среды, критических для выживания. В нейроповеденческих исследованиях тесты на габитуацию являются простой и быстрой альтернативой тестам прямого обучения и особенно полезны для автоматизированного скрининга.

Габитуацию можно успешно измерить, оценив реакцию зебраданио на испуг, которая имеет несколько четко определенных форм. S-старт - это быстрое стереотипное изгибание рыбы в S-образную форму (через ~ 6 мс), вызываемое резкими стимулами. Позволяя зебраданио избежать нападения хищников, S-старт впервые появляется у личинок на 4-й день после оплодотворения. Кроме того, существует также более медленная форма реакции S-старта (~30 мс) - O-старт. O-старт может быть вызван набором различных стимулов, таких как резкое выключение света, и представляет собой больший (чем при S-старте) изгиб тела рыбы. За реакциями S-старта и O-старта следуют характерные движения для избегания потенциально аверсивных стимулов, привыкание к которым позволяет оценить обучение рыбы.

Тестирование габитуации особенно полезно при работе с личинками зебраданио. Тесты личинок зебраданио отражают две формы габитуации: быструю и краткосрочную. Быстрая, которая обычно длится от 1 до 15 минут, вызывается низкочастотной звуковой стимуляцией. Кратковременная, длится от 25 до 60 минут и может быть вызвана

разнесенными во времени стимулами (9). Тем не менее, тесты на габитуацию не ограничиваются реакциями на испуг и могут основываться на других типах поведения. Поведение, связанное с распознаванием (discrimination) объекта, хотя и отличается от габитуации тем, что оно включает дискриминацию (которая с точки зрения мозговой деятельности основывается на других когнитивных процессах), также может быть оценено по снижению интенсивности исследования нового объекта, который становится знакомым после воздействия стимула. Предметы, различающиеся по форме, цвету и размеру, должны быть представлены зебраданию в знакомом аквариуме. Время, проведенное рядом с объектом стимула, отражает его общую узнаваемость и уменьшается при втором предъявлении объекта.

Навигация в незнакомой среде важна для организма при построении эффективной стратегии выживания (10). Наличие домашней базы (home base) – наиболее безопасного участка, который служит отправной точкой в исследовании незнакомой среды, – хорошо изучено у животных (11). К примеру, у грызунов наличие домашней базы в тесте открытого поля (ТОП) приводит к предпочтению одного (реже двух) условно выделенных секторов, в которых животное демонстрирует высокую вертикальную активность и частый груминг (12).

Анализ поведения животного, направленного на установление домашней базы, также является важным инструментом при изучении нарушения исследовательской активности субъекта в моделях различных нейропсихиатрических заболеваний. Так, в генетических моделях депрессии крысы демонстрируют длительные задержки в наиболее безопасных участках экспериментальных лабиринтов, совершая редкие попытки исследовать тёмные рукава сложных конструкций, наклонённые опасные участки лабиринта и области, содержащие физические препятствия (13).

Подобная задержка в «домашних» зонах ТОП происходит и у крыс в моделях тяжёлых энцефалопатий, вызывающих когнитивную дисфункцию (14). В экспериментах на мышах было доказано, что нарушение запоминания пути к домашней базе обусловлено нарушением афферентации и эфферентации гиппокампа (15). Несмотря на то, что такие сложные структуры, как гиппокамп и неокортекс, а также базальные ядра конечного мозга, присутствуют не у всех позвоночных животных, полагают, что данный поведенческий фенотип высоко консервативен (16). Например, для рыб также характерно поведение выбора домашней базы в незнакомой среде в ТНА (17) и ТОП (16, 18).

Методика определения домашней базы у зебраданию

Лабораторные животные: Линия – дикий тип, оптимальный возраст – 6-8 месяцев, Соотношением полов – 1:1. Количество животных в одной экспериментальной группе – 20. Необходимо использовать интактных животных, прошедших 20-дневную акклиматизацию.

Оборудование: Видеокамера с разрешением не менее 1280×720 (HD) с креплением/штативом, позволяющим снимать сверху (например, Sony Handycam DCR-SR47, США). Программное обеспечение: Система для автоматического отслеживания перемещения объекта (зебраданио) в поле регистрации (арене) EthoVison XT. В качестве альтернативы может использоваться программа для ручной регистрации поведения животных RealTimer.

Открытое поле (ОП): ОП1 - Прямоугольный пластиковый/стеклянный непрозрачный аквариум с прямыми углами, 12 см высотой, 38 см шириной и 47 см длиной. ОП2 - Пластиковый/стеклянный непрозрачный аквариум цилиндрической формы 24 см высотой и 23 см в диаметре. ОП3 - Прямоугольный пластиковый/стеклянный непрозрачный аквариум с округлыми углами, 14 см высотой, 29 см шириной и 37 см длиной. Каждый аквариум имеет условное деление на сектора (Рис. 1).

Ход работы

До начала видеорегистрации ТОП наполняется чистой водой до отметки 12 см для достаточной свободы передвижения тестового объекта и для получения видеозаписей без водной ряби, подходящих для адекватного анализа в программах автоматической регистрации поведения.

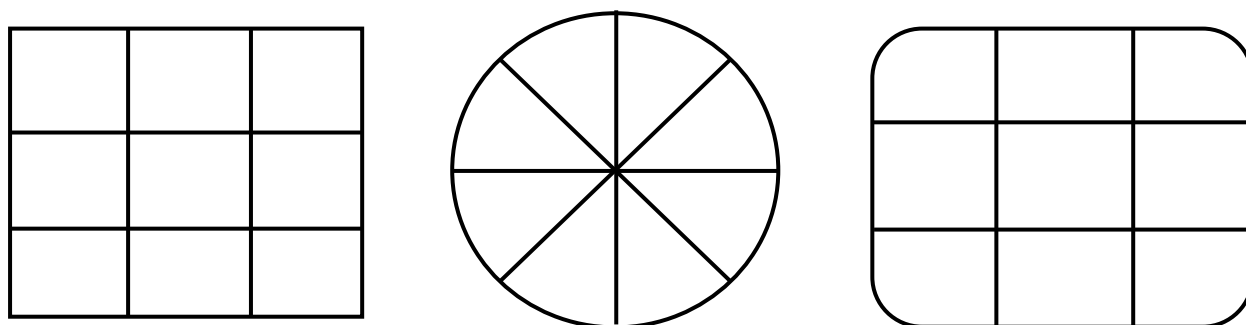


Рисунок 1. Примеры аквариумов для выявления домашней базы зебраданио (вид сверху)

1. Перед самым началом видеозаписи рыба аккуратно помещается в центр ТОП.

2. Затем производится видеосъёмка в течение 30 мин. Перед каждой новой съёмкой необходимо производить полную смену воды в тестовом аквариуме, так как химические стимулы предыдущей рыбы могут исказить результаты последующих наблюдений.

3. Полученные видеозаписи обработать с помощью программы EthoVision XT.

3.1 Сначала следует выполнить анализ активности зебр аданио относительно заранее установленных секторов открытого поля (арен) (Рис. 2). Ключевые поведенческие маркеры: - Время пребывания в определённом секторе (с / %), Дистанция, пройденная по секторам (м/с / %), Количество заходов в сектор, %.

3.2 Далее идёт поиск домашней базы по следам всех передвижений зебр аданио в течение видеорегистрации, построенных программой в виде сплошной линии пройденного пути объекта и в виде тепловых карт (Рис. 2).

4. Домашняя база выбирается на основании 3-х самых посещаемых секторов открытого поля на основании ключевых поведенческих маркеров и оценки траектории передвижения объекта. Сектора, перекрывающиеся по большинству параметров и совпадающие с наибольшей плотностью траектории пройденного пути (3 балла), рассматриваются в качестве домашней базы. Помимо траектории пройденного пути, для оценки плотности пребывания в том или ином секторе зебр аданио используется настройка EthoVision XT – построение тепловых карт (цветовое отображение присутствия объекта в арене: жёлтый- минимальное присутствие, красный – наиболее часто посещаемый участок).

5. Чтобы доказать наличие домашней базы для всей экспериментальной группы, необходимо измерить домашнюю базу каждой рыбы в выборке для каждого поведенческого маркера. Вычислить средние величины по каждому поведенческому параметру для домашней базы и для остальных секторов и сравнить их статистически (например, оценив различия от теоретического равномерного распределения по секторам при помощи теста Хи-квадрат).

А) Время нахождения в секторе			Дистанция, пройденная в секторе			Количество заходов в сектор			Б) Следы		
0%	20%	28%	0%	19%	35%	0%	18%	45%	0	3	3
3%	3%	24%	2%	2%	20%	1%	1%	22%	1	1	3
4%	4%	14%	3%	3%	16%	2%	2%	9%	1	1	2

Рисунок 2. Процедура отбора наиболее посещаемых участков (выделенные серым цветом) открытого поля по трём количественным параметрам (А) и кривой пройденного пути (Б) с их дальнейшим наложением и получением общего итогового результата

Правильное определение домашней базы является важным для выявления поведенческих особенностей у рыб, и рассмотрено в настоящем обзоре (как и тесты на габитуацию) как эффективные акватические тесты для оценки краткосрочной пространственной памяти зебр аданио.

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

Литература

1. Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;208(2):450-7.
2. Maximino C, de Brito TM, da Silva Batista AW, Herculano AM, Morato S, Gouveia A, Jr. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):157-71.
3. Chanin S, Fryar C, Varga D, Raymond J, Kyzar E, Enriquez J, et al. Assessing startle responses and their habituation in adult zebrafish. *Zebrafish protocols for neurobehavioral research: Springer;* 2012. p. 287-300.
4. Clark KJ, Boczek NJ, Ekker SC. Stressing zebrafish for behavioral genetics. 2011.
5. Zurn J, Falls W, Motai Y. Detecting startle responses in the zebra fish using novel digital imaging techniques. *Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, San Diego, CA.* 2006.
6. Burgess HA, Johnson SL, Granato M. Unidirectional startle responses and disrupted left-right co-ordination of motor behaviors in robo3 mutant zebrafish. *Genes, Brain and Behavior.* 2009;8(5):500-11.
7. Pelkowski SD, Kapoor M, Richendrfer HA, Wang X, Colwill RM, Creton R. A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in zebrafish larvae. *Behavioural brain research.* 2011;223(1):135-44.
8. Mann KD, Hoyt C, Feldman S, Blunt L, Raymond A, Page-McCaw PS. Cardiac response to startle stimuli in larval zebrafish: sympathetic and parasympathetic components. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2010;298(5):R1288-R97.
9. Roberts AC, Reichl J, Song MY, Dearinger AD, Moridzadeh N, Lu ED, et al. Habituation of the C-start response in larval zebrafish exhibits several distinct phases and sensitivity to NMDA receptor blockade. *PLOS one.* 2011;6(12):e29132.
10. Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 2014;55(2):310-32.

11. Eilam D, Golani I. Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behavioural brain research*. 1989;34(3):199-211.
12. Tchernichovski O, Benjamini Y, Golani I. Constraints and the Emergence of 'Free' Exploratory Behavior in Rat Ontogeny. *Behaviour*. 1996;133(7/8):519-39.
13. Magara S, Holst S, Lundberg S, Roman E, Lindskog M. Altered explorative strategies and reactive coping style in the FSL rat model of depression. *Front Behav Neurosci*. 2015;9(89).
14. Leke R, de Oliveira DL, Mussulini BHM, Pereira MS, Kazlauckas V, Mazzini G, et al. Impairment of the Organization of Locomotor and Exploratory Behaviors in Bile Duct-Ligated Rats. *PLOS ONE*. 2012;7(5):e36322.
15. Gorny JH, Gorny B, Wallace DG, Wishaw IQ. Fimbria-Fornix Lesions Disrupt the Dead Reckoning (Homing) Component of Exploratory Behavior in Mice. *Learning & Memory*. 2002;9(6):387-94.
16. Stewart A, Cachat JM, Wong K, Wu N, Grossman L, Suci C, et al. Phenotyping of Zebrafish Homebase Behaviors in Novelty-Based Tests. In: Kalueff AV, Cachat JM, editors. *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 143-55.
17. Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BHM, Piatto ÂL, Calcagnotto ME, Bonan CD, et al. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *PLOS ONE*. 2011;6(5):e19397.
18. Stewart A, Cachat J, Wong K, Gaikwad S, Gilder T, DiLeo J, et al. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behavioural Processes*. 2010;85(2):198-203.