

УДК 612.82

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202123-133>

Научная статья

Оценка общей двигательной активности и тревожности зебраданио (*Danio rerio*) с использованием тестов незнакомого аквариума, открытого поля, черно-белого аквариума и построения косяка

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^{1–8}

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

² Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова, 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

Тревожность — сложное и многогранное поведенческое расстройство, которое включает в себя различные формы хронических патологических тревог и страхов, становящееся причиной развития различных патологий, таких как депрессия, сердечно-сосудистые заболевания и др. Для ее изучения традиционно применяются поведенческие тестирования на модельных организмах, в том числе рыбах зебраданио (*Danio rerio*, zebrafish). Рассмотренные в статье тесты нового (незнакомого) аквариума, открытого поля, черно-белой камеры и тест построения косяка широко используются в трансляционной биологической психиатрии для выявления тревожных поведенческих фенотипов у зебраданио. В статье рассмотрены методические аспекты применения данных тестов на зебраданио.

Ключевые слова: *Danio rerio*; зебраданио; тревожность; геотаксис; тигматтаксис; скототаксис; косяк; новизна.

Как цитировать:

Галстян Д.С., Колесникова Т.О., Косицын Ю.М., Забегалов К.Н., Губайдуллина М.А., Маслов Г.О., Демин К.А., Калуев А.В. Оценка общей двигательной активности и тревожности зебраданио (*Danio rerio*) с использованием тестов незнакомого аквариума, открытого поля, черно-белого аквариума и построения косяка // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2022. Т. 20. № 2. С. 123–133. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202123-133>

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202123-133>

Research Article

Assessment of general locomotor activity and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*) in the light-dark box (tank), the shoaling test, in the novel tank and the open field tests

David S. Galstyan^{1, 2}, Tatyana O. Kolesnikova³, Yurii M. Kositsyn¹, Konstantin N. Zabegalov³, Mariya A. Gubaidullina³, Gleb O. Maslov^{3, 5}, Konstantin A. Demin^{1, 3, 4}, Allan V. Kalueff¹⁻⁸

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

² A.M. Granov Russian research center for radiology and surgical technologies, Saint Petersburg, Russia;

³ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia;

⁴ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia;

⁵ Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia;

⁶ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

⁷ Research Institute of Neuroscience and Medicine, Novosibirsk, Russia

⁸ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

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, the open field test, light-dark box and shoaling test that are widely used in translational biological psychiatry to characterize anxiety-related behavioral phenotypes in zebrafish.

Keywords: *Danio rerio*; zebrafish; anxiety; geotaxis; thigmotaxis; scototaxis; shoaling; novelty.

To cite this article:

Galstyan DS, Kolesnikova TO, Kositsyn YuM, Zabegalov KN, Gubaidullina MA, Maslov GO, Demin KA, Kalueff AV. Assessment of general locomotor activity and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*) in the light-dark box (tank), the shoaling test, in the novel tank and the open field tests. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2022;20(2):123–133. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF202123-133>

Received: 18.04.2022

Accepted: 17.05.2022

Published: 30.06.2021

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 (the novel tank test, ТНА, рис. 1) и тест открытого поля (the open field test, ТОП, рис. 2), детально рассмотренные ниже.

ТЕСТ НОВОГО (НЕЗНАКОМОГО) АКВАРИУМА (ТНА)

Основа ТНА у рыб состоит в эффекте новизны, при котором животное сталкивается с новым предметом или окружающей средой. Новизну традиционно используют как стрессорный фактор в самом широком спектре животных моделей. ТНА у зебраданио впервые был введен в практику в 2007 г. E.D. Levin и соавт. [1], отметившими геотаксис — врожденное защитное «ныряние» рыб в новых (потенциально угрожающих) условиях среды, представляющее собой резкий уход животного в придонную область. Биологической мотивацией для данного поведения служит 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 обычно выше у зебраданио, находящихся в состоянии стресса.

6. Общая мобильность. В ТНА можно выявить (с использованием специальных программ, позволяющих задать необходимые параметры) характер подвижности: высокая или низкая подвижность (например, в процентах 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 др.

Стандартный аппарат для проведения ТНА состоит из узкого прямоугольного аквариума (чаще из акрила, иногда из стекла) 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 чувствительной к собственно уровню тревоги зебраданио. Целесообразность ее использования в ТНА, по нашему опыту, невелика. При этом узость аппарата

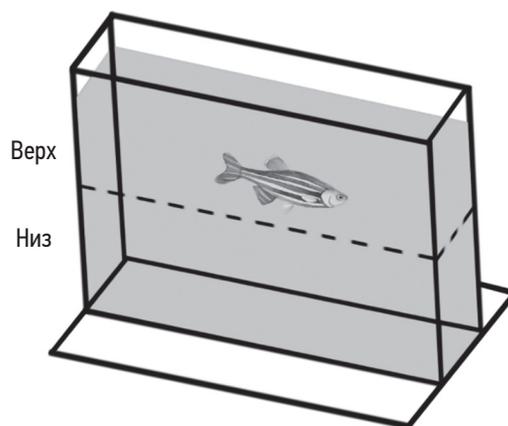


Рис. 1. Аппарат для проведения теста нового (незнакомо) аквариума

Таблица 1. Примеры эффектов различных фармакологических воздействий на зебраданио в тесте нового (незнакомо) аквариума

Фармакологический препарат	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

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 ч), куда их поместили из виария. 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 определяют как стандартное, чтобы вызвать изменения нейрохимических показателей и экспрессии генов, однако возможны изменения протокола в зависимости от характера действия тестируемого препарата).

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 приведенных 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 зебраданио, обычно рассчитывают с помощью непараметрических *U*-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни (для сравнения двух групп) или критерия Краскела – Уоллиса (для трех 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 расценивается как признак 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].

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 можно отнести 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 аппарата 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 использовали 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 С.С. 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 используют для моделирования тревожного поведения и оценки реакции на острый стресс и для тестирования ряда фармакологических препаратов. В отличие от ТНА [обычно более глубокого аквариума для анализа

вертикального положения рыбы (геотаксис) при записи поведения сбоку], в ТОП обычно используют широкий неглубокий аквариум и 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 (табл. 2). Приведенные поведенческие факторы чувствительны к различным фармакологическим манипуляциям (табл. 3), а также к условиям содержания и тестирования [16].

Таблица 2. Основные показатели поведения зебранию в тесте открытого поля

Параметр	Детали поведения
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 (см или м). Увеличение данного параметра свидетельствует об увеличении исследовательской активности зебранию
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 зебранию. 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 % 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

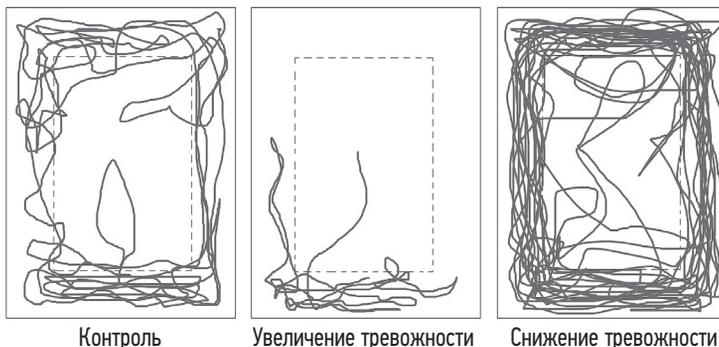


Рис. 2. Типичные фенотипы, наблюдаемые в тесте открытого поля

Таблица 3. Примеры эффектов различных фармакологических факторов в тесте открытого поля

Препарат	Эффект
Фенциклидин	Вызывает круговое плавание, не изменяет основные параметры
Буспирон	Повышает уровень тревожности, увеличивает продолжительность фризинга, снижает скорость передвижения
Этанол	Увеличивает состояние неподвижности у самцов, но не у самок
Ибогаин	Не изменяет пространственно-временное исследование новой среды, однако вызывает явное предпочтение одних областей другим
Лизергиновая кислота (ЛСД)	Вызывает умеренный тигмотаксис, уменьшает число выходов в центр
Острый и хронический стресс	Вызывает тигмотаксис, увеличивает тревожность

Основные параметры, анализируемые в тесте, и процедура тестирования

Тестовая установка состоит из открытой арены круглой или прямоугольной формы, различной высоты, разделенная воображаемой линией на две зоны — центр и периферия (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 варьировать (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 помещают в центр ТОП и его поведение записывают 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). Для оценки уровня тигмотаксиса (стремление

животного находиться возле стенки) также подсчитывают отношение времени, проведенного 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].

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. С помощью компьютерного моделирования также 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].

ТЕСТ ЧЕРНО-БЕЛОЙ КАМЕРЫ

Тест черно-белой камеры (ЧБК, рис. 3) 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 г. E.L. Serra и соавт. [18], продемонстрировавшими, что рыбы предпочитают больше времени проводить в темной части аквариума (скотофилия или скототаксис, *scototaxis*). 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 [19]. Помимо этого, было продемонстрировано, что препараты, обладающие анксиогенными свойствами, увеличивают частоту и продолжительность заплывов в темную часть аквариума (табл. 4). Необходимо также 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 темной части [20, 21].

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. Попав в новую среду обитания, зебраданио естественным образом не заплывают в светлую часть аквариума и постепенно исследуют ее 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. 3). 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 съемка. Для острого эксперимента (перед непосредственной съемкой в аппарате ЧБК) каждая рыбка, участвующая в эксперименте, по отдельности подвергается воздействию лекарства в пластиковом химическом стакане емкостью 0,5–1 л в течение 20 мин (данное время принято считать стандартным,

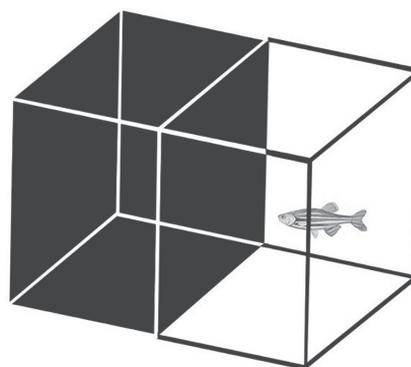


Рис. 3. Аппарат для проведения акватического теста черно-белой камеры на зебраданио

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.

После 20 мин рыбу аккуратно вылавливают и опускают на поверхность темной части аппарата ЧБК [6]. 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 [6]. Для расчета статистических данных используют стандартные дескриптивные (описательные) 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). В целом, тревожные воздействия усиливают скототаксис у рыб в ЧБК, а анксиолитические (табл. 4) — увеличивают исследовательскую активность в светлом отсеке теста.

Особенности выполнения данного теста и проблемы при тестировании

Необходимо учитывать, что сильное освещение может исказить результаты исследования, так как 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.

Таблица 4. Примеры результатов тестирования в черно-белой камере

Фармакологическое воздействие	Параметр	Эффект
Ареколин [22]	Продолжительность нахождения в светлой части аквариума	Повышение
Флуоксетин (хронический) [23]	Продолжительность нахождения в светлой части аквариума	Повышение
Диэтиламид d-лизергиновой кислоты (ЛСД) [10]	Продолжительность нахождения в светлой части аквариума	Повышение

Тест ЧБК, как и другие поведенческие тесты, очень чувствителен 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) относится к поведенческим тестам, активно применяемым 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) [24, 25], которое поддерживается на относительно стабильном и высоком уровне на протяжении всей жизни [26]. 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) [26]. Показано, что плотность косяка коррелирует с присутствием хищников, а организация косяка в период развития связана с активностью дофаминергических нейронов [27, 28].

Основной параметр, анализируемый в тесте ТПК, — среднее расстояние между рыбами. Показано, что меньшее расстояние между рыбами (формирование более плотных косяков) — признак тревожности и беспокойства у рыб. Дополнительно (особенно с применением современных методов регистрации группового поведения) можно оценивать размер косяка, среднее расстояние до максимально отдаленной рыбы, процент времени нахождения всех рыб косяка вблизи (например, на расстоянии 2,5 см — одной длины тела).

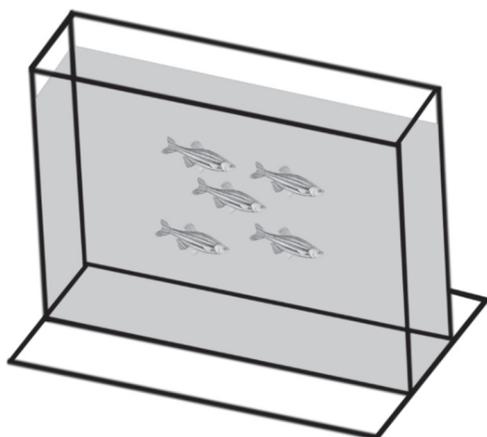


Рис. 4. Примерный вид теста построения косяка зебр аданио

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, аналогичном аппарату в тесте нового аквариума (ТНА) (см. выше), в который помещаются 4–6 рыб после предварительной экспозиции в растворе с лекарством (рис. 4). После 5-минутной акклиматизации в тестовом аквариуме, необходимой для нормализации группового поведения, осуществляется фотосъемка косяка зебр аданио после установленных равных промежутков времени (после каждых 5–10 с в течение 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 [6].

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 определением 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 в качестве основного теста для анализа тревожного поведения рыб лучше применять 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 рыбку 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, зебр аданио 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. 5) — снижают плотность косяка в ТПК.

Таблица 5. Результаты некоторых исследований в тесте построения косяка

Фармакологическое воздействие	Параметр	Эффект
Ареколин [22]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Атропин [6]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Скополамин [6]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Кетамин [9]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение
Диэтиламид d-лизергиновой кислоты (ЛСД) [10]	Среднее расстояние между рыбами	Повышение

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: Д.С. Галстян, Т.О. Колесникова, Ю.М. Косицын, К.Н. Забегалов, М.А. Губайдуллина, Г.О. Маслов — написание статьи и анализ данных; К.А. Демин, А.В. Калуев — рецензирование статьи и разработка общей концепции.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-901).

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. Contribution of each author: D.S. Galstyan, T.O. Kolesnikova, Yu.M. Kositsyn, K.N. Zabegalov, M.A. Gubaidullina, G.O. Maslov — manuscript drafting, writing and pilot data analyses; K.A. Demin, A.V. Kalueff — paper reconceptualization and general concept discussion.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. 075-15-2020-901).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Levin E.D., Bencan Z., Cerutti D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish // *Physiol Behav.* 2007. Vol. 90, No. 1. P. 54–58. DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026
- Bencan Z., Sledge D., Levin E.D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety // *Pharmacol Biochem Behav.* 2009. Vol. 94, No. 1. P. 75–80. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.07.009
- Stewart A., Wu N., Cachat J., et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011. Vol. 35, No. 6. P. 1421–1431. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.11.035
- Piato A.L., Capiotti K.M., Tamborski A.R., et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011. Vol. 35, No. 2. P. 561–567. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.018
- Kysil E.V., Meshalkina D.A., Frick E.E., et al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests // *Zebrafish.* 2017. Vol. 14, No. 3. P. 197–208. DOI: 10.1089/zeb.2016.1415
- Volgin A.D., Yakovlev O.A., Demin K.A., et al. Acute behavioral effects of deliriant hallucinogens atropine and scopolamine in adult zebrafish // *Behav Brain Res.* 2019. Vol. 359. P. 274–280. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.10.033
- Cachat J., Stewart A., Grossman L., et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish // *Nature protocols.* 2010. Vol. 5, No. 11. P. 1786–1799. DOI: 10.1038/nprot.2010.140
- Serikuly N., Alpyshov E.T., Wang D., 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. Vol. 104. P. 109977. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.109977
- Riehl R., Kyzar E., Allain A., et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish // *Neurotoxicol Teratol.* 2011. Vol. 33, No. 6. P. 658–667. DOI: 10.1016/j.ntt.2011.05.011
- Grossman L., Utterback E., Stewart A., et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish // *Behav Brain Res.* 2010. Vol. 214, No. 2. P. 277–284. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.05.039
- Kyzar E., Stewart A.M., Landsman S., et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish // *Brain Res.* 2013. Vol. 1527. P. 108–116. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.06.033
- Hall C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // *Journal of Comparative Psychology.* 1934. Vol. 18, No. 3. P. 385–403. DOI: 10.1037/h0071444
- Hall C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity // *Journal of Comparative Psychology.* 1936. Vol. 22, No. 3. P. 345–352. DOI: 10.1037/h0059253
- Godwin J., Sawyer S., Perrin F., et al. Adapting the open field test to assess anxiety-related behavior in zebrafish // *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research: Springer;* 2012. p. 181–189. DOI: 10.1007/978-1-61779-597-8_13

15. Stewart M.A., Kalueff A.V. The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research // *Current Neuropharmacology*. 2012. Vol. 10, No. 3. P. 263–271. DOI: 10.2174/157015912803217323
16. Ahmad F., Richardson M.K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity // *Behav Processes*. 2013. Vol. 92. P. 88–98. DOI: 10.1016/j.beproc.2012.10.014
17. Cachat J., Stewart A., Utterback E., et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, No. 3. P. e17597. DOI: 10.1371/journal.pone.0017597
18. Serra E.L., Medalha C.C., Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment // *Braz J Med Biol Res*. 1999. Vol. 32, No. 12. P. 1551–1553. DOI: 10.1590/s0100-879x1999001200016
19. Blaser R.E., Chadwick L., McGinnis G.C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*) // *Behav Brain Res*. 2010. Vol. 208, No. 1. P. 56–62. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.11.009
20. Stephenson J.F., Whitlock K.E., Partridge J.C. Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation // *Zebrafish*. 2011. Vol. 8, No. 1. P. 17–22. DOI: 10.1089/zeb.2010.0671
21. Steenbergen P.J., Richardson M.K., Champagne D.L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study // *Behav Brain Res*. 2011. Vol. 222, No. 1. P. 15–25. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.025
22. Serikuly N., Alpyshov E.T., Wanga D.M., 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. Vol. 104. ID 109977. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.109977
23. Maximino C., da Silva A.W.B., Gouveia A. Jr., Herculano A.M. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011. Vol. 35, No. 2. P. 624–631. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.01.006
24. Ward A.J., Duff A.J., Horsfall J.S., Currie S. Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish // *Proc Biol Sci*. 2008. Vol. 275, No. 1630. P. 101–105. DOI: 10.1098/rspb.2007.1283
25. Reyhanian N., Volkova K., Hallgren S., et al. 17- α -Ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebrafish (*Danio rerio*) // *Aquat Toxicol*. 2011. Vol. 105, No. 1–2. P. 41–48. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.05.009
26. Miller N., Gerlai R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*) // *Behav Brain Res*. 2007. Vol. 184, No. 2. P. 157–166. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.07.007
27. Engeszer R.E., Da Barbiano L.A., Ryan M.J., Parichy D.M. Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio* // *Anim Behav*. 2007. Vol. 74, No. 5. P. 1269–1275. DOI: 10.1016/j.anbehav.2007.01.032
28. Buske C., Gerlai R. Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish // *Dev Psychobiol*. 2012. Vol. 54, No. 1. P. 28–35. DOI: 10.1002/dev.20571

REFERENCES

1. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav*. 2007;90(1):54–58. DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026
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. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.07.009
3. Stewart A, Wu N, Cachat J, et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(6):1421–1431. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.11.035
4. Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(2):561–567. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.018
5. Kysil EV, Meshalkina DA, Frick EE, et al. Comparative analyses of zebrafish anxiety-like behavior using conflict-based novelty tests. *Zebrafish*. 2017;14(3):197–208. DOI: 10.1089/zeb.2016.1415
6. Volgin AD, Yakovlev OA, Demin KA, et al. Acute behavioral effects of deliriant hallucinogens atropine and scopolamine in adult zebrafish. *Behav Brain Res*. 2019;359:274–280. DOI: 10.1016/j.bbr.2018.10.033
7. Cachat J, Stewart A, Grossman L, et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*. 2010;5(11):1786–1799. DOI: 10.1038/nprot.2010.140
8. Serikuly N, Alpyshov ET, Wang D, 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. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.109977
9. Riehl R, Kyzar E, Allain A, et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2011;33(6):658–667. DOI: 10.1016/j.ntt.2011.05.011
10. Grossman L, Utterback E, Stewart A, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):277–284. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.05.039
11. Kyzar E, Stewart AM, Landsman S, et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res*. 2013;1527:108–116. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.06.033
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):385–403. DOI: 10.1037/h0071444
13. Hall CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology*. 1936;22(3):345–352. DOI:10.1037/h0059253
14. Godwin J, Sawyer S, Perrin F, et al. Adapting the open field test to assess anxiety-related behavior in zebrafish. *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*. Springer; 2012. P. 181–189. DOI: 10.1007/978-1-61779-597-8_13
15. Stewart AM, Kalueff AV. The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research. *Current Neuropharmacol*. 2012;10(3):263–271. DOI: 10.2174/157015912803217323
16. Ahmad F, Richardson MK. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. *Behav Processes*. 2013;92:88–98. DOI: 10.1016/j.beproc.2012.10.014

17. Cachat J, Stewart A, Utterback E, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS One*. 2011;6(3): e17597. DOI: 10.1371/journal.pone.0017597
18. Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32(12):1551–1553. DOI: 10.1590/s0100-879x1999001200016
19. Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010;208(1): 56–62. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.11.009
20. Stephenson JF, Whitlock KE, Partridge JC. Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation. *Zebrafish*. 2011;8(1):17–22. DOI: 10.1089/zeb.2010.0671
21. Steenbergen PJ, Richardson MK, Champagne DL. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. *Behav Brain Res*. 2011;222(1):15–25. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.025
22. Serikuly N, Alpyshov ET, Wanga DM, 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. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.109977
23. Maximino C, da Silva AWB, Gouveia A Jr, Herculano AM. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(2):624–631. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.01.006
24. Ward AJ, Duff AJ, Horsfall JS, Currie S. Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish. *Proc Biol Sci*. 2008;275(1630):101–105. DOI: 10.1098/rspb.2007.1283
25. Reyhanian N, Volkova K, Hallgren S, et al. 17alpha-Ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. 2011;105(1–2):41–48. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.05.009
26. Miller N, Gerlai R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2007;184(2):157–166. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.07.007
27. Engeszer RE, Da Barbiano LA, Ryan MJ, Parichy DM. Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim Behav*. 2007;74(5):1269–1275. DOI: 10.1016/j.anbehav.2007.01.032
28. Buske C, Gerlai R. Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish. *Dev Psychobiol*. 2012;54(1):28–35. DOI: 10.1002/dev.20571

ОБ АВТОРАХ

Давид Самвелович Галстян, научн. сотр.;
e-mail: david_sam@mail.ru

Татьяна Олеговна Колесникова, научн. сотр.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5561-8583>;
eLibrary SPIN: 8558-7887; e-mail: philimontani@yandex.ru

Юрий Михайлович Косицын, научн. сотр.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4266-808X>;
e-mail: ikosicin53@gmail.com

Константин Николаевич Забегалов, научн. сотр.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9748-0324>;
eLibrary SPIN: 5993-6315; e-mail: hatokiri@mail.ru

Мария Андреевна Губайдуллина, научн. сотр.;
e-mail: mariangub@gmail.com

Глеб Олегович Маслов, научн. сотр.;
e-mail: maslovog6@gmail.com

Константин Андреевич Демин, канд. биол. наук, научн. сотр.;
eLibrary SPIN: 3830-1853; e-mail: deminkasci@gmail.com

***Алан Валерьевич Калуев**, д-р биол. наук, профессор; адрес:
Россия, 199134, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7525-1950>;
eLibrary SPIN: 4134-0515; e-mail: avkalueff@gmail.com

AUTHORS' INFO

David S. Galstyan, Research Associate;
e-mail: david_sam@mail.ru

Tatyana O. Kolesnikova, Research Associate;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5561-8583>;
eLibrary SPIN: 8558-7887; e-mail: philimontani@yandex.ru

Yurii M. Kositsyn, Research Associate;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4266-808X>;
e-mail: ikosicin53@gmail.com

Konstantin N. Zabegalov, Research Associate;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9748-0324>;
eLibrary SPIN: 5993-6315; e-mail: hatokiri@mail.ru

Mariya A. Gubaidullina, Research Associate;
e-mail: mariangub@gmail.com

Gleb O. Maslov, Research Associate;
e-mail: maslovog6@gmail.com

Konstantin A. Demin, Cand. Sci. (Biol.), Research Associate;
eLibrary SPIN: 3830-1853; e-mail: deminkasci@gmail.com

***Allan V. Kalueff**, Dr. Sci. (Biol.), Professor;
address: 7-9, Universitetskaya em., 199134, Saint Petersburg, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7525-1950>;
eLibrary SPIN: 4134-0515; e-mail: avkalueff@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author