ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-092.9

Панина Ю.А., Малиновская Н.А., Салмина А.Б., Лопатина О.Л., Рябоконь Р.В., Герцог Г.Е., Антонова С.К.

ОЦЕНКА СОЦИАЛЬНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ЭМОЦИОНАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС С МОДЕЛЬЮ АУТИЗМА

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

Резюме. *В статье приводятся данные экспериментального исследования животных с экспериментальным аутизмом (вальпроевая модель), где в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «3-камерная активность» оценивались показатели эмоционального и социального поведения у крыс линии Wistar возрастом 90 дней. Выявлены значимые различия показателей указанных тестов (количество входов в закрытые рукава и время нахождения в них, открытых рукавах и в центре в тесте ПКЛ, контакт с ранее знакомым животным в 3 сессии, время нахождения в центре установки в социальном тесте) в опытной группе и контроле, что может свидетельствовать о повышенной эмоциональной лабильности и нарушении социального распознавания у животных с экспериментальным аутизмом.*
Ключевые слова. *Расстройства аутистического спектра, социальное поведение, эмоциональная лабильность, нарушение развития головного мозга, аутизм.*

Panina Yu.A., Malinovskaya N.A., Salmina A.B., Lopatina O.L., Ryabokon R.V., Gertsog G.E., Antonova S.K.

ASSESSMENT OF SOCIAL INTERACTION AND EMOTIONAL BEHAVIOR IN ANIMAL MODEL OF AUTISM

Summary. *The article presents the results of experimental animal studies with experimental autism (valproic model), where the test "elevated plus maze" and "3-chamber activity" were evaluated indicators of emotional and social behavior of Wistar rats aged 90 days. There were significant differences in performance of these tests (the number of entries in the closed arms and the time spent in them, open arms and in the center of the test PCL contact with previously familiar animals in 3 sessions, time spent in the center of installation in the social test) in the experimental group and control that may be indicative of increased emotional lability and abuse of social recognition in animals with experimental autism.*
Keywords. *Autism spectrum disorders, social behavior, emotional lability, impaired brain development, autism.*

Введение. Пренатальное нарушение развития (ПНР) головного мозга, в частности, расстройство аутистического спектра (РАС) в настоящее время представляет собой глобальную социально значимую проблему. Заболеваемость РАС за последние десятилетия значительно увеличилась с 5 случаев на 10 000 в начале 80-х годов XX века до 1 из 68 на нынешний момент [4]. Аутизм – это нарушение развития нервной системы, характеризующееся дефицитом коммуникативных и социальных навыков, повторяющимся (стереотипным) поведением, при этом степень их выраженности и развитие симптоматики варьирует при различных видах расстройств [2]. Данные симптомы, как правило, начинают проявляться у детей до трехлетнего возраста [8]. Кроме этого, РАС могут характеризоваться высоким уровнем тревожности, синдромом дефицита внимания и гиперактивности, нарушением когнитивных функций [11]. Тревожность/эмоциональная лабильность – защитный ответ организма на возможное наличие угрозы, носящее дезадаптивный характер. Она является одним из факторов, влияющих на социальное взаимодействие, как у людей, так и у животных. При повышенной тревожности отмечается снижение количества и продолжительности социальных контактов [1]. Одной из важных составляющих интегративных функций головного мозга являются социальные взаимодействия, относящиеся к сложным формам поведения. Они включают в себя социальное распознавание и память, социальное предпочтение, межполовое, родительское

поведение и т.д. На текущий момент исследование социальных коммуникаций становится все более необходимым в связи с расширением общества [7].

Точная этиология аутизма остается неизвестной. В настоящее время эпидемиологические исследования доказали, что кроме генетической предрасположенности, на развитие заболевания также оказывает влияние взаимодействие с нейротоксичными веществами из окружающей среды [6]. Например, пренатальное воздействие ксенобиотиков (талидомид, 2-пропилпентаонат/вальпроевая кислота) приводит к развитию аутизма, как показано на моделях трансгенных животных (линии мышей CD-1, нокаутных по Gabrb3, Gabrb3-нокаутные, Tsc2-мутантных крыс), в вальпроевой, талидомидовой, липополисахаридной моделях аутизма [5].

Исследование патогенеза аутизма с использованием образцов нервной ткани, полученных от человека, затруднено, поэтому изучение этой патологии на данный момент ограничено методами нейровизуализации, определением содержания метаболитов в доступных биологических жидкостях без корреляции с уровнем в центральной нервной системе (ЦНС), а также генетическим анализом. В связи с этим возрастает важность изучения патогенеза аутизма в экспериментальных моделях на животных, дающих возможность более детально анализировать механизмы нарушения развития мозга, исследовать их поведенческий фенотип и способы коррекции РАС [10]. Вальпроевая модель аутизма у животных имеет значительное сходство с поведением людей-аутистов [3]: в экспериментальной модели отмечено появление повторяющегося и стереотипного поведения, ограничения социальных контактов, нарушение инициации социального взаимодействия и аномальный циркадный ритм [9].

Цель исследования. Оценить изменения эмоционального и социального поведения животных с вальпроевой моделью аутизма.

Материалы и методы: объектом исследования являлись 19 крыс обоего пола возрастом 90 суток (ювенильный возраст), полученные от самок крыс линии Wistar с подкожным введением на 12-й день гестации вальпроевой кислоты из расчета 500 мг/кг веса (экспериментальная группа, Э) и с введением физиологического раствора (1 мл/кг веса, контрольная группа, К). Животные содержались в клетках со свободным доступом к пище и воде при постоянной температуре 21±1ºС, а также регулярном световом цикле – 12 ч день/12ч ночь. Критериями включения подопытных самок в исследование был исходный нормальный неврологический статус (0 баллов по шкале NSS) до проведения эксперимента; не включались в исследование животные с «грубой» неврологической симптоматикой (более 2 баллов по шкале NSS), с инфекционной или соматической патологией. Критерием исключения потомства из исследования было присоединение соматической или инфекционной патологии, смерть животного. Для проведения исследования было получено одобрение представителей биоэтической комиссии по работе с лабораторными животными при локальном этическом комитете, членов локального этического комитета КрасГМУ. Опыты на животных проводились с соблюдением правил гуманного обращения с животными (согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. N 755; национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и приказу Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва "Об утверждении Правил лабораторной практики").

Тестирование поведения животных проводилось с 09.00 до 12.00. Для оценки эмоционального состояния крыс использовался тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), представляющий собой крестообразную арену с двумя закрытыми (высота бортов 30 см) и двумя открытыми (высота бортов 1 см) рукавами, размер рукавов - 50х10 см, размещенную на высоте 1 м от пола. При проведении теста исследуемая крыса помещалась в центр установки и осуществлялась видеорегистрация поведения животного в течение 5 минут. Подвергались оценке такие параметры, как время (в секундах) пребывания в открытых, закрытых рукавах и центре, количество входов и выходов из рукавов. Социальное взаимодействие оценивалось в тесте «3-камерная активность». Установка представляет собой трехкамерный пластиковый ящик с прозрачными перегородками и отверстиями в них для пере-

мещения крыс между камерами. Исследование состоит из трех 10-минутных сессий: в первой животное адаптируется к установке, во второй - в левый отсек камеры помещался «иммобилизированный» в пластиковом контейнере с отверстиями стимул (незнакомое для исследуемой крысы животное, сопоставимое по полу, возрасту и весу) и осуществляется видеорегистрацию поведения, в третьей – в правый боковой отсек располагали новый стимул, а ранее помещенное животное становилось уже «знакомым». В тесте оценивали время (в секундах), проведенное в каждой камере, и время, затраченное на контакт с животным-стимулом. Грызуны-стимулы брались из разных клеток и до проведения теста ранее не контактировали с исследуемым животным. Изучаемые параметры регистрировались с помощью программы для видеотрекинга ANY-maze (Stoelting Co., США).

Статистическая обработка включала в себя методы описательной статистики и проверки статистических гипотез с использованием программы Statplus 2006 Professional Сборка 3.9.0.0. Сравнение групп осуществляли с помощью непараметрического теста Манна-Уитни для независимых выборок. Все результаты представлены в виде Me (Q1…Q2), где Me - медиана, Q1…Q2 - межквартильный размах, p – уровень значимости. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

Результаты. При исследовании уровня тревожности/эмоциональной лабильности (табл. 1) нами было выявлено значимое ($p<0,05$) увеличение количества входов в закрытые (защищенные) рукава и времени нахождения в них и в центре (на пересечении безопасных и незащищенных зон) у группы экспериментальных животных, в то время как крысы из группы контроля больше времени проводили в открытых (потенциально опасных) рукавах. Данные показатели, вероятнее всего, свидетельствуют о повышенной тревожности и эмоциональной лабильности животных с моделированием ПНР. Длительное нахождение контрольных животных в открытых рукавах свидетельствует об их высокой поисковой активности, в отличие от опытных крыс. Считаем, что увеличение количества переходов между зонами у крыс аналогично нарушению внимания у людей.

Таблица 1

Выраженность признаков тревожности при экспериментальном моделировании пренатального нарушения развития мозга

Группы / Признаки	Контроль (n=7)	Эксперимент (n=12)
Время пребывания в закрытых рукавах	63,6 (55,3…76,3)	193,5 (172,1… 232,7)*
Время пребывания в открытых рукавах	209,8 (197,7… 232,2)	54 (48,8… 91,6)*
Время пребывания в центре	24,5 (18,8…41,8)	46,9 (36,8… 70,1)*
Число входов в открытые рукава	5 (4,5…11)	7 (5…9)
Число входов в закрытые рукава	5 (4,7…6,2)	8 (7…11)*
Число входов в центр	9 (8,7…16,2)	15 (13…22)
Уровень значимости	* – $p<0,05$	

При анализе социальной активности животных (табл. 2) обращает на себя внимание время контакта с ранее знакомым животным в 3 сессии эксперимента: у контрольных животных этот показатель значимо ниже. В норме животные при наличии нового животного-стимула превалируют процессы изучения нового социального объекта, а знакомый ранее стимул становится менее «интересным». В опытной группе отмечается нарушение социального распознавания и памяти: крысы с экспериментальным аутизмом недостаточно запоминают ранее знакомого стимула и могут воспринимать его как нового, в отличие от группы контроля. Также отмечается значимое превалирование пребывания экспериментальных животных в центральной камере теста в обеих регистрируемых сессиях, что может свидетельствовать о стереотипности поведения и о стремлении экспериментальных крыс минимизировать социальные контакты.

Таблица 2

Анализ социальной активности в эксперименте

Группы / Признаки	Контроль (n=7)	Эксперимент (n=12)
Контакт с незнакомым животным во 2 сессии	68,1 (39,7…86,8)	80,7 (73,5…111,6)
Контакт с ранее знакомым животным в 3 сессии	4,9 (3,7…86,7)	42,8 (35,5…125,9)*
Контакт с незнакомым ранее животным в 3 сессии	33,2 (19,6…99,8)	22,2 (13,3…45)
Время в левом отсеке (2 сессия)	54 (16,9…225,5)	90 (80,4…142,7)
Время в правом отсеке (2 сессия)	300,3 (170,9…576,4)	181,6 (134,9…286,2)
Время в центре (2 сессия)	25,1 (14,9…177,6)	231,8 (155,9…326,8)*
Время в левом отсеке (3 сессия)	81 (33,3…252,2)	109,6 (81,4…181,8)
Время в правом отсеке (3 сессия)	206,9 (11…339,6)	129,9 (106,1…205,8)
Время в центре (3 сессия)	66,3 (29,8…190,3)	271,8 (218…378,4)*
Уровень значимости	* - $p<0,05$	

Полученные данные согласуются с данными других авторов [8] и дополняют их особенностями изменения эмоционального и социального поведения (повышенная тревожность, эмоциональная лабильность, нарушение социального распознавания и социальной памяти), а также являются очень схожими со многими проявлениями РАС у человека (не только с дефицитом коммуникативных и социальных навыков, стереотипным поведением, но и с высоким уровнем тревожности и синдромом дефицита внимания) [2, 10].

Выводы. У животных с моделью пренатального нарушения развития головного мозга зарегистрирована повышенная эмоциональная лабильность в виде появления тревожности, что проявляется в предпочтении пребывания в защищенных зонах, в увеличении количества переходов между зонами, свидетельствующем о дефиците внимания. В экспериментальной группе отмечается и нарушение социального распознавания: снижается предпочтение социальной новизны, нарушена инициация социального контакта с новым стимулом. Таким образом, при аутизме в эксперименте отмечаются повышенная эмоциональная лабильность и нарушение социального распознавания.

Литература:

1. Амикишиева А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование // Вестник ВОГиС. – 2009. –Т. 13, № 3. – С. 529-542.
2. Клиническая характеристика детей с заболеваниями аутистического спектра / Ю.А. Пичугина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – N 6. – С.74-78.
3. Animal model of autism induced by prenatal explosure to valproate behavioral changes and liver parameters / V. Bambini-Junior [et al.] // Brain research. – 2011. – T.1408. – P. 8-16.
4. Baio J. Prevalence of Autism spectrum disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008 // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2012. – Vol. 61, Issue SS-3. – P. 1-19
5. Bello S.C. Autism and environmental influences: review and commentary // Rev Environ. Health. – 2007. – Vol. 22. P. 139–156.
6. Currenti S.A. Understanding and determining the etiology of autism // Cell. Mol. Neurobiol. – 2010. – Vol. 30. - P. 161–171
7. Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. Pediatric Research, 2009, Vol. 65, N 6, P. 591-598
8. Goyal D.K. Neuro-Immune Abnormalities in Autism and Their Relationship with the Environment: A Variable Insult Model for Autism / D.K. Goyal, J.A. Miyan // Front Endocrinol (Lausanne). - 2014. - Vol.5
9. Schneider T. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism / T. Schneider, R. Przewlocki // Neuropsychopharmacology. – 2005. – Vol.30. – P.80–89
10. Stewart A.M. Developing better and more valid animal models of brain disorders / A.M. Stewart, A.V. Kalueff // Behav Brain Res, 2015. – Vol. 276. – P.28-31.
11. Tsai L.Y. Psychopharmacology in autism // Psychosom. Med. – 1999. – Vol. 61. – P. 651-665