

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОГО, ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И СТРЕССОРЕАКТИВНОСТЬ КРЫС В „ОТКРЫТОМ ПОЛЕ”

Корлэтяну Александр

*Технический Университет Молдовы, Кишинэу,
Республика Молдова. alexandrcorlateanu52@gmail.com*

Abstract. *The effects of the combination of muscular load and emotional stress on the characteristics of exploratory behavior and stress resistance of rats in the “open field” were investigated. The rats were divided into two groups: the animals of the first group were stressed by forced swimming “forced swim test” for 7 days for 60 min; the rats of the second group were subjected to short-term deprivation of freedom of movement in cages-pennels corresponding to the body size of animals for 7 days for 60 min. The nature of the stressor was found to influence exploratory behavior and stress resistance of rats in the “open field”. Forced swimming induces a significant decrease in indices characterizing exploratory behavior and reduces the stress tolerance of animals when tested again in the open field. Muscular load aimed at release from the aversive situation does not affect locomotor activity and stress resistance during repeated testing in the „open field”.*

Key words. *Open field, forced swim test, stress resistance, exploratory behavior, rats.*

Введение

Исследовательское поведение представляет собой сложный комплекс реакций, целью которых является получение информации, в значительной степени касающейся оценки благоприятности условий существования. Важным компонентом взаимодействия животного организма со средой обитания является локомоторная активность [1]. Очевидно, что, исследовательское поведение обусловлено деятельностью скелетной мускулатуры, а преодоление сложных ситуаций требует значительного увеличения двигательной активности [2]

Известно, что избыточная физическая нагрузка вызывает стресс – реакцию. В экспериментальной практике существует ряд методов, позволяющих достаточно точно дозировать мышечную деятельность животных [3], однако в реальных условиях эмоциональное напряжение, вызываемое условиями существования, оказывает значительный эффект на физиологические параметры и поведенческую деятельность животных. Эффективность адаптационных механизмов во многом определяется устойчивостью организма при действии стресс – факторов. Существует ряд экспериментов, в которых оценивали влияние физической нагрузки на исследовательское поведение [4], однако, остаётся недостаточно изученной особенности поведенческой стратегии организма и стрессорезистентности после краткосрочной интенсивной физической нагрузки в неблагоприятных условиях среды.

Исследования, посвящённые анализу результатов влияния краткосрочной, периодической физической нагрузки на физиологические и поведенческие характеристики лабораторных животных, представляют интерес, поскольку могут быть использованы для разработки методов аттенуации вредных последствий действия сочетанного физического и эмоционального стресса [5].

В связи с этим целью исследования было изучение влияния сочетания краткосрочной, периодической мышечной нагрузки при эмоциональном напряжении на характеристики исследовательского поведения и стрессоустойчивость животных.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 40 белых крысах самцах массой 130 ± 15 г, содержащихся в стандартных условиях вивария с соблюдением принципов биоэтики в соответствии с международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей [6, 7]. Тестирование поведения животных проводили в „открытом” поле квадратной формы размером 1×1 м в течение 5 мин. Согласно классическим представлениям у крыс, в „открытом поле” проявляются ориентировочно-исследовательская и защитно-оборонительная поведенческие реакции [5, 8]. Паттерны поведения, характеризующие исследовательское поведение, эмоциональность животных и смещённое поведение регистрировали

визуально. Тестирование животных в открытом поле проводили дважды: до и после принудительного плавания или краткосрочного лишения свободы передвижения; оценивали общее количество поведенческих паттернов в течение 5 минут, а для выявления их динамики подсчитывали количество исследуемых параметров в течение каждой минуты наблюдения. Крысы были разделены на две группы: животных первой группы стрессировали путём принудительного плавания „forced swim test” [9, 10] в течение 7 дней по 60 мин при температуре воды +25°C; крысы второй группы были подвергнуты краткосрочному лишению свободы передвижения [11] в клетках- пеналах, соответствующих размерам тела животных в течение 7 дней по 60 мин. Для оценки индекса стрессоустойчивости была использована формула, оценивающая особенности двигательной активности в открытом поле [12].

Результаты и обсуждение

В настоящее время тестирование в „открытом поле” широко применяется в различных экспериментальных исследованиях; оно позволяет выявить индивидуальные различия между животными, оценить физиологическую реакцию животного на новую обстановку [1, 3, 5]. Эта реакция включает в себя элементы двигательного, ориентировочно-исследовательского и эмоционального поведения (табл.1).

Тест „открытое поле” используют для оценки реакции крыс на новизну окружающей среды, которая является стресс-фактором. Стресс – это комплекс общих универсальных неспецифических реакций на агентах, угрожающие жизни и благополучию целостного организма, реализуемый при обязательном участии нейроэндокринной системы [13]. Поведенческие реакции животного характеризуют результат взаимодействия генетически детерминированных особенностей высшей нервной деятельности, предыдущего опыта и реакции центральной нервной системы, обусловленной новизной обстановки [14]. Принято считать, что двигательные реакции животного в «открытом поле» характеризуют его локомоторную и исследовательскую активность, а частота актов дефекации отражает в основном эмоциональную реактивность животного.

Таблица 1. Поведенческие характеристики крыс до и после стрессирования

Паттерн поведения	1 группа, фон	После вынужденного плавания	2 группа, фон	После краткосрочного лишения свободы передвижения
Пересечённые квадраты	62,2±12,5	11,2±2,8*	12,24±3,0	14,59±3,8*
Вертикальные стойки	26,0±0,3	7,3± 1,6*	24,2±0,3	36,95± 1,3*
Грумминг	2,3± 0,7	0,4± 0,1*	12,1± 0,6	21,65± 0,4*
Дефекация (болюсы)	1,55±0,7	2,6± 0,9*	3,0±0,8	0,45± 0,1*
Продолжительность замирания, с	6,3±3,8	75,0±13,2*	6,5±1,2	1,6±0,4*
Латентный начала движения, с	4,0±0,07	46±13	7,4±0,04	13,5±1,2*
Латентный период выхода в центр поля, с	168±43	236±75*	195±46	231±42

Примечание: * – различия достоверны, $p < 0,05$

Анализ полученных данных выявил дифференциацию животных первой группы по уровню горизонтальной двигательной активности. У 33% обнаружен высокий уровень, у 23% средний, а у 44% низкий уровень горизонтальной двигательной активности. Кроме того, при первом тестировании оказалось, что уровень горизонтальной двигательной активности коррелирует с высоким уровнем вертикальной двигательной активности. Отмеченные особенности исследовательского поведения указывают на различный характер нервных процессов при попадании животных в новые условия существования.

Анализ динамики проявления паттернов поведенческих реакций выявил различный характер влияния принудительного плавания и краткосрочного лишения свободы передвижения на исследовательское поведение и стрессоустойчивость животных.

Тест „принудительного плавания” представляет собой комбинированный метод, сочетающий в себе эмоциональный стресс на ситуацию, угрожающую жизни и благополучию целостного организма и аэробно-анаэробную физическую нагрузку. Плавание, использованное в наших экспериментах для стрессирования вызывала генерализованное снижение показателей,

характеризующих исследовательское поведение, у всех животных первой группы. Количество пересечённых квадратов за 5 минут после принудительного плавания было в 5 раз меньше, чем после первого тестирования в „открытом поле”. Ежеминутный подсчёт пересечённых квадратов при первом тестировании продемонстрировал обычную динамику изменения двигательной активности: повышение локомоции в первые две минуты, свидетельствующая о наличии страха в незнакомой обстановке [5], а затем регистрировали сниженную по сравнению с первоначальной, но стабильную двигательную активность, характеризующую преобладание исследовательского поведения [14]. Дополнительным доказательством уменьшения страха является постепенное увеличение продолжительности замирания в конце первого тестирования, в то время как после принудительного плавания продолжительность отсутствия двигательной активности составляло более 20% времени, проведённого в условиях новизны, то есть обнаружено снижение мотивации исследования незнакомого пространства. Дополнительным доказательством уменьшения исследовательского поведения после принудительного плавания является уменьшение в 5 раз количества вертикальных стоек. Принудительное плавание уменьшило вертикальную двигательную активность на 84% ($P < 0,05$). Обнаружено, что у животных с низкой или средней горизонтальной двигательной активностью после стрессирования количество стоек не изменяется или незначительно снижается, тогда, как у животных с высокой вертикальной двигательной активностью наблюдали полное исчезновение этого компонента поведения, характеризующего исследовательское поведение.

В процессе выполнения физиологических исследований особое значение приобретает количественная оценка исследуемого явления, позволяющая более точно и адекватно охарактеризовать его и обнаружить наличие или отсутствие влияния факторов внутренней и внешней среды. Как известно надёжными индикаторами стресс реакции являются показатели, характеризующие состояние гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [13, 15]. Однако, в экспериментах, исследующих поведение животных, по понятным причинам, применение методов эндокринологического исследования весьма затруднено или невозможно. В связи с этим нами был использован

неинвазивный метод оценки стрессоустойчивости, принцип которого основан на регистрации исключительно этологических параметров: количества пересечённых квадратов, латентного периода начала движения и латентного периода захода в центральные квадраты „открытого поля” (таб. 2). Анализ величины показателя, характеризовавшего индекс стрессоустойчивости продемонстрировал влияние условий, в которых животные выполняли кратковременную физическую нагрузку, на их поведение в условиях новизны окружающей среды. Обнаружено значительное отличие влияния принудительного плавания и краткосрочного лишения свободы передвижения. Принудительное плавание оказывает значительное снижение стрессоустойчивости, обусловленное уменьшением исследовательского поведения. Интегральный индекс стрессоустойчивости у крыс первой группы снижен в 14,3 раза. Крысы, вынужденные плавать в замкнутом пространстве без возможности выхода из стрессовой ситуации, отказывались от активных действий, принимали позу «зависания», достаточную только для удержания головы на поверхности воды – стадия иммобилизации. Продолжительный отказ от активного плавания (иммобилизация, поведение отчаяния) является показателем депрессивного состояния, развивающегося в ситуации невозможности избежать опасности [16, 17].

Таблица 2. Влияние принудительного плавания и краткосрочного ограничения свободы передвижения на стрессоустойчивость

Показатель	1 группа, фон	После принудительного плавания	2 группа, фон	После краткосрочного лишения свободы передвижения
Интегральный индекс стрессоустойчивости	0,53±0,02	0,037 ± 0,001*	2,5± 0,3	2,65 ± 0,4

Примечание: * – различия достоверны, $p < 0,05$

Крысы со средним и низким уровнем горизонтальной и вертикальной активности характеризуются одним и тем же индексом стрессоустойчивости, а применённый метод моделирования интенсивной физической нагрузки вызывает наибольшее снижение индекса стрессоустойчивости у крыс,

характеризовавшихся высоким уровнем исследовательской активности. Полученные данные указывают на диминуацию нервных процессов, обеспечивающих адекватное исследовательское поведение [13, 18].

Краткосрочное содержание крыс в пеналах является сильным стресс-фактором, который запускает рефлекс свободы и стимулирует интенсивную постоянную мышечную активность, направленную на избавление от аверсивной ситуации. Обращает на себя внимание, что такой тип поведения не оказывал влияния на горизонтальную двигательную активность животных, характерную для исследовательского поведения и обеспечивал поддержание величины индекса стрессоустойчивости на уровне фоновых значений.

Выводы

1. Природа стрессора оказывает влияние на исследовательское поведение и стрессоустойчивость крыс в „открытом поле”.

2. Принудительное плавание вызывает существенное снижение показателей, характеризующих исследовательское поведение.

3. Принудительное плавание снижает стрессорезистентность животных при повторном тестировании в открытом поле.

4. Периодическая, краткосрочная мышечная нагрузка, направленная на освобождение от аверсивной ситуации, не влияет на локомоторную активность и стрессоустойчивость при повторном тестировании в „открытом поле”.

Список литературы

1. Yoshizawa T., Shimada S., Takizawa Y. and oth. Continuous measurement of loco-mo-tor activity during convalescence and acclimation in group-housed rats. In: Experimental Animals, 2019, vol. 68, nr. 3, p. 277–283. ISSN 1881-7122.

2. Brown G. R., Nemes C. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia? In: Behavioural Processes. 2008. vol. 78, nr. 3, p. 442–448. ISSN 0376-6357.

3. Tatem K.S., Quinn J.L., Phadke A. and oth. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. In: Journal of visualized experiments. Published online 2014. Sep 29.

4. Saré R.M., Lemons A., Smith C.B. Behavior testing in rodents: highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. In: Brain Sciences. 2021. vol. 11, nr.4, p. 522-534. ISSN 2076-3425.

5. Kraeuter A-K, Guest P.C., Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. În: *Methods in Molecular Biology*, 2019, vol.1916, p. 99-103. ISSN 19406029.
6. Exner C., Limbach CH. *Animal Experimentation in Research*. 2016, Druckerei Hachenburg GmbH, 76 p. ISBN: 978-3-527-34355-3.
7. Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice 2010. p. 33–79.
8. Sarkar D. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. În: *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 2020, vol. 18, nr. 3, p. 341-351. ISSN 1738-1088.
9. Álvarez-Suárez P., Banqueri M., Vilella M., Méndez M., Arias J. L. The effect of recording interval length on behavioral assessment using the forced swimming test. În: *Revista Iberoamericana de Psicología y Salud*, 2015, vol.6, nr. 2, p.90-95. ISSN 1989-9246.
10. Armario A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. În: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2021 vol. 128, p.74-86. ISSN 0149-7634.
11. Molina P., Andero R., Armario A. Restraint or immobilization: A comparison of methodologies for restricting free movement in rodents and their potential impact on physiology and behavior. În: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2023, vol. 151, p. 105 ISSN 0149-7634.
12. Конлик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу. În: *Вестник новых медицинских технологий*, 2002, т. 9, с. 16-18. ISSN 1609-2163.
13. Фурдуй Т., Чокінэ В., Вуду Л. et al. Стресс, эволюция человека, здоровье и санокреатология. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții*, 2010, vol.310, nr.1, p. 3-14. ISSN 1857-064X.
14. Whishaw I. Q., Kolb B. Chapter 8 - Analysis of Behavior in Laboratory Rats. *The Laboratory Rat (Third Edition)* 2020, American College of Laboratory Animal Medicine p. 215-242. ISBN 9780128143391.
15. Приймак А.Б., Корпачева О.В., Золотов А.Н., Ключникова Е.И. Методика ранжирования крыс по стрессоустойчивости и определение объема выборки при экспериментальном ушибе сердца. În: *Современные проблемы науки и образования*, 2022, № 4, с.56-61. ISSN 2070-7428.
16. Kalueff A.V., Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 2004, v.13, nr. 3, p.151-158. ISSN 1385-299X.
17. Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. În: *European Journal of Pharmacology*. 2003, vol. 463, nr.1-3, p.3–33. ISSN 0014-2999.

18. *La-Vu M., Tobias B. C., Schuette P.J., Adhikari A.* To approach or avoid: an introductory overview of the study of anxiety using rodent assays. În: *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2020, vol. 14, p. 145. ISSN 1662-5153.

Acknowledgments: This study was supported by the research project 011001 Mechanisms for regulating the organism's homeostasis and health and the elaboration of procedures and measures to maintain it), funded by Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie.