

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 17, №2

2018



МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

УДК 615.035.4

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА РАННЕЙ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИЕЙ У КРЫС© Шабанов П.Д.^{1,2}, Егерова Е.А.¹, Лебедев А.А.¹¹Институт экспериментальной медицины, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Россия, 194044, Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, 6*Резюме*

Цель. Создание поведенческой модели аутизма выращиванием крыс в условиях социальной изоляции и экспериментальная оценка влияния нейролептика трифтазина (0,35 мг/кг) на двигательную и исследовательскую активность, степень тревожности, социальное взаимодействие и когнитивную функцию крыс в данной модели.

Методика. Для оценки поведения использованы «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «чужак-резидент» и условная реакция пассивного избегания. Крыс последовательно тестировали на 49-50-й, 59-й и 69-й дни жизни.

Результаты. Показано, что в эксперименте на крысах-подростках (2 мес) формируется синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), если животные выращиваются в условиях полной изоляции от сородичей и частичной сенсорной депривации с 17-го дня жизни. СДВГ у крыс характеризуется двигательной гиперактивностью, снижением исследовательской активности, появлением элементов тревожности, депрессивности, агрессии и снижением когнитивных функций. Этот фон можно рассматривать как исходный для оценки психофармакологического действия исследованных препаратов. Длительное введение трифтазина (0,35 мг/кг, 3 цикла) существенно не меняет двигательного поведения крыс, но подавляет все формы исследовательского поведения, растормаживает груминговые реакции и эмоциональность и нарушает сохранение УРПИ. Удлинение сроков введения трифтазина приводит к растормаживанию двигательных реакций, а в дальнейшем – к появлению феномена привыкания.

Заключение. Результаты исследования могут быть полезными для создания средств лечения СДВГ или расстройств аутистического спектра.

Ключевые слова: аутизм, синдром дефицита внимания с гиперактивностью, моделирование, поведение, социальная изоляция, трифтазин, крысы

MODELLING THE AUTISTIC SPECTRUM DISORDERS BY EARLY SOCIAL ISOLATION IN RATSShabanov P.D.^{1,2}, Egereva E.A.¹, Lebedev A.A.¹¹Institute of Experimental Medicine, 12, Acad. Pavlov St., 197376, St. Petersburg, Russia²S.M. Kirov Military Medical Academy, 6, acad. Lebedeva St., 194044, St. Petersburg, Russia*Abstract*

Objective. To create a rat autism model by means of rearing in conditions of social isolation and experimental assessment of effects of neuroleptic triptazine 0.35 mg/kg on motor and explorative activity, anxiety, social interactions and cognitive function of rats in this model.

Methods. The tests of open field, elevated plus maze, resident-intruder and conditioned passive avoidance task were chosen to study behavioral responses. The rats were subsequently tested on 49th, 59th and 69th days of life.

Results. The syndrome of attention deficit with hyperactivity was shown to develop in juvenal rats (2 months) if they were rearing in conditions of full social isolation from relatives and partial sensory isolation from 17th day of their life. The syndrome was characterized by motor hyperactivity, decreased explorative activity, appearance of anxiety elements, depression, aggression and cognitive deficit. This

background was a control for assessment of psychopharmacological action of the drugs studied. The chronic administration of triptazine (0.35 mg/kg, 3 cycles) did not change significantly motor behavior of rats but depressed all forms of explorative behavior and disinhibited grooming reactions and emotions as well as disordered passive avoidance response storage. The prolongation of administration of triptazine disinhibited motor reactions and facilitated habituation phenomenon in advance.

Conclusion. The results can be useful for development of drugs to treat the syndrome of attention deficit with hyperactivity and disorders of autistic spectrum.

Keywords: autism, syndrome of attention deficit with hyperactivity, modelling, behavior, social isolation, triptazine, rats

Введение

В настоящее время имеется настоятельная потребность в экспериментальной оценке лекарственных средств, потенциально приемлемых для лечения синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) или расстройств аутистического спектра (РАС) у ребенка [1, 3]. В обоих случаях ведущим признаком являются элементы поведения, сопровождающиеся такими симптомами как повышенная двигательная активность (гиперактивность), разные проявления агрессии, компоненты тревожности, снижение контактности, или замкнутость в себе, все, что в совокупности можно назвать эмоционально-когнитивной дисфункцией. В части когнитивных проявлений одни составляющие поведения (мышление, речь и праксис) у аутичных детей и подростков, как правило, ниже, чем у обычных детей, другие (память, внимание) могут обостряться [1, 2].

На сегодня мы с сожалением должны констатировать, что специфические средства лечения аутистических расстройств отсутствуют [7, 8]. При данной форме патологии применяют преимущественно нейролептики (как классические, так и атипичные), седативные антидепрессанты (амитриптилин), реже ноотропные препараты. Для лечения СДВГ используют разные подходы – от назначения депримирующих средств (нейролептики, транквилизаторы) до тимэректиков (психостимуляторов) типа атомоксетина [1]. У более старших детей в последние годы стали использовать антидепрессанты как тимолептической направленности (амитриптилин), так и группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (флуоксетин, сертралин, циталопрам), с устойчиво неплохим результатом. Вместе с тем, продолжается поиск препаратов для лечения подобных расстройств. Иногда находки среди уже имеющих хождение средств, но не предназначенных для лечения СДВГ или РАС, ставят новые задачи для исследователей с точки зрения их оценки на моделях у животных как первого этапа доклинических исследований лекарственных средств.

Перспективной моделью СДВГ и РАС на животных (грызунах) является внутривидовая социальная изоляция от сородичей с раннего возраста [4, 10]. Данная модель позволяет в совокупности воспроизводить в эксперименте такие составляющие СДВГ и аутизма как двигательная гиперактивность, нарушение исследовательского поведения, эмоциональности, обучения условным рефлексам.

В данном исследовании для оценки возможностей коррекции РАС и СДВГ была охарактеризована модель поведенческих нарушений по типу аутистических у крысят породы Вистар, вызванных изоляцией от сородичей с момента их самообеспечения, с использованием различных поведенческих тестов.

Исследования были выполнены с учетом ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», требований руководств по проведению доклинических испытаний лекарственных средств [5, 6], а также описания модели социальной изоляции [4, 10].

Методика

В качестве тест-системы были использованы крысы породы Вистар. Данные животные являются стандартным объектом подобных фармакологических исследований. Эксперименты выполнены на самцах крыс первого поколения массой 200-220 г, содержащихся в сообществе или в условиях социальной изоляции. Родительское поколение (18 беременных самок) было получено из питомника «Рапполово», Всеволожский р-н, дер. Рапполово, Ленинградская область (Ветеринарное свидетельство 247 №0137788 от 10.02.2015). Лабораторные животные до начала исследования содержались 14 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. Во время

этого периода у животных каждый день контролировалось клиническое состояние путем визуального осмотра. Все опыты проведены в осенне-зимний период.

Животных содержали в соответствии с правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), утвержденными МЗ СССР 06.07.73 г., в контролируемых условиях окружающей среды (18-22°C и относительной влажности воздуха 30-70%) при 12-часовом цикле освещения; в поликарбонатных клетках, покрытых стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, беременные крысы – в индивидуальных клетках по одной. Контрольные (к изоляции) животные (34 крысы) содержались в группах по 8-10 особей в стандартных условиях вивария. Крысы из групп социальной изоляции содержались в индивидуальных клетках в условиях частичной сенсорной и полной внутривидовой изоляции с 17-го дня после рождения: 62 самца (крысята) взяты в эксперимент, 64 самки (крысята) исключены из опыта. Крысы-изолянты содержались в условиях изоляции в течение всего исследования. Контакт животного из групп изоляции с экспериментатором или служителем вивария был сведен к минимуму. После каждого опыта крысы-изолянты помещались в индивидуальные клетки.

Животных содержали при свободном доступе к воде и пище. Крыс кормили комбикормом ПК-120-1, приготовленным по ГОСТу Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г. Животные получали воду, соответствующую ГОСТу «Вода питьевая» 2874-82. При скормливание исследуемых препаратов крысам-изолянтам вещества добавляли в катыш пшенной каши со сливочным маслом (масса катыша 2-2,5 г), помещали его в кормушку для каждого животного индивидуально.

Крысы были распределены по возрастным группам в качестве основного критерия. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер. Формировали 3 экспериментальных группы животных, по 10 крыс в каждой: 1) контроль, выращенные в сообществе; 2) изолянты, получавшие воду; 3) изолянты, получавшие трифтазин 0,35 мг/кг. Нейролептик трифтазин выбран с целью оценки возможности фармакологической коррекции поведенческих расстройств в рассматриваемой модели. Поскольку данный препарат используется достаточно часто в терапии аутистических расстройств, предполагалось оценить, на какие из проявлений РАС главным образом действует препарат.

Препарат трифтазин (трифлуоперазин) производства ЗАО «Дальхимфарм» (Россия) представлял собой ампульный раствор для внутримышечных инъекций объемом 1 мл, содержащие трифлуоперазина гидрохлорида в пересчете на 100% сухое вещество – 2 мг и вспомогательные вещества (натрия цитрат, вода для инъекций), его использовали в дозе 0,35 мг/кг в виде раствора в воде для инъекций. Животным контрольных групп 1 и 2 вводили воду для инъекций в эквивалентном объеме.

Тестируемый препарат трифтазин 0,35 мг/кг и воду для инъекций вводили внутрь с пищей. Препараты перемешивали вместе с кашей (объем около 2-2,5 г в разные сроки жизни крысят) и давали животным индивидуально каждому, не соприкасаясь с ним руками. Введение веществ проводили в соответствии со следующим режимом: 1) вода: ежедневное пероральное введение, кроме дней проведения поведенческих тестов; 2) трифтазин: ежедневное пероральное введение с 44-го (61-й день постнатального развития) по 68-й день (85-й день постнатального развития), кроме дней проведения поведенческих тестов (49-50-й, 59-й и 69-й).

На 49-й день социальной изоляции (на следующий день после завершения первого цикла введения трифтазина) проводили поведенческие тесты для каждого животного в следующей последовательности: открытое поле (оценка двигательной активности, циклического, или стереотипного поведения, исследовательской активности, эмоциональности), приподнятый крестообразный лабиринт (оценка тревожности), «чужак-резидент» (социальное взаимодействие, проявления агрессии) и тест УРПИ (усвоение навыка, долговременная память).

Свободную двигательную активность животных исследовали в тесте «открытого поля» [4], представляющего собой круглую площадку диаметром 80 см, ограниченную по окружности непрозрачными бортами высотой 30 см. По всей площади открытого поля равномерно расположены 16 отверстий (норок), диаметром 3 см каждая, предназначенных для выявления видоспецифичного компонента исследовательской активности у грызунов (норковый рефлекс). Освещенность открытого поля равнялась 100 лк. Во время опыта экспериментальный вольер находился в специальной звукоизолированной комнате. Продолжительность одного опыта составляла 3 мин. За единицу горизонтальной активности принимали перенос тела животного из одного сектора в соседний, который регистрируется при пересечении 2/3 тела животного начерченной на полу установки радиальных линий. Для оценки двигательной активности, обусловленной тревожностью при попадании в новую обстановку, определяли активность животного в секторе.

На основании поведенческого атласа для грызунов [4] выбирали ряд элементарных двигательных актов и поз, совокупность которых характеризует целостное поведение в «открытом поле»: «обнюхивание» (принюхивание и повороты головы без существенных изменений координат корпуса в горизонтальной и вертикальной плоскостях); «вертикальная стойка» (стойка на задних лапах в центре открытого поля); груминг (все разновидности этой реакции); «замирание» (покой, сидение, визуально определяемая неподвижность животного обычно в позе «сидя» с подогнутыми конечностями и сгорбленной спиной); «заглядывание в норку» (норковый рефлекс); «стойка с упором» (вертикальная стойка на задних лапах с упором передними лапами на стенку вольера). Регистрация актов производилась нажатием экспериментальной клавиши, соответствующей определенному поведенческому акту.

Поведение крыс исследовали в крестообразном приподнятом лабиринте, который состоял из двух открытых рукавов (50×10 см) и двух закрытых рукавов (50×10 см) с открытым верхом, расположенных перпендикулярно относительно друг друга. Высота над полом – 1 м. Животное помещали в центр лабиринта и фиксировали время пребывания в закрытых и открытых рукавах, время свешивания в открытых рукавах и число выглядываний из закрытых рукавов. Продолжительность теста составляла 5 минут.

Изучение внутривидового взаимодействия производили в тесте «чужак-резидент» следующим образом. Подопытное животное – «резидент» в течение 1 ч. находилось в клетке размерами 20×36×20 см, после чего к нему подсаживали на 5 мин. второе животное – «чужака». «Чужаками» являлись крысы-самцы массой 110-140 г, то есть заведомо меньших размеров, чем «резиденты», что создавало условия для зоосоциального доминирования последних. В процессе 5-минутного совместного пребывания регистрировали этограмму поведения «резидента» – общее число, последовательность и длительность всех элементарных актов и поз, образующих внутривидовую общительность, агрессию, защиту и индивидуальное поведение [4]. Общительность включала в себя следующие дискретные акты: приближение, следование за партнером, обнюхивание партнера, груминг загривка или тела, напозание или подползание под партнера. Агрессия проявлялась в виде вертикальных или боковых стоек (угроза) или атаки. Социальная пассивность выражалась различными актами индивидуального поведения: локомоцией, обнюхиванием, аутогрумингом, движениями на месте, вертикальными стойками, неподвижностью.

Условная реакция пассивного избегания (УРПИ) используется для изучения механизмов памяти у грызунов [9]. В основе данного метода лежит безусловно-рефлекторная реакция стремления животного находиться в более темном и небольшом пространстве – норке, избегать освещенного пространства. Установка УРПИ состояла из двух камер, освещенной (100 лк, размеры — 25×25×25 см) и темной (15×15×15 см), снабженной электрифицированным полом. Между ними находилось отверстие диаметром 5 см с закрывающейся дверцей на высоте 1 см от пола. Животное помещали в светлую камеру на 3 мин. и регистрировали время пребывания в светлом отсеке. Как правило, животное обследовало камеру, находило отверстие в темный отсек и проникало в него. Дверцу между светлым и темным отсеками закрывали и на электродный пол темной камеры подавали электрический ток (50 Гц, 10 мс, 0,5 мА, в течение 10 с). Затем крысу вынимали из темной камеры через дополнительную дверь и возвращали в свою клетку. У такого животного считалась выработанной УРПИ в одной пробе. Тестирование сохранения УРПИ осуществляли через 24 ч., помещая крысу в светлый отсек установки на 3 мин. при открытой двери в темную камеру. Электрический ток на пол темной камеры при тестировании не подавали. Регистрировали время пребывания в светлом и темном отсеках в течение 3 мин., определяя тем самым сохранение памятного следа отрицательного эмоционального воздействия электрического тока на лапы животного. Дополнительное тестирование навыка осуществляли через 10 и 20 дней.

Для статистической обработки полученных количественных данных и построения графиков применяли пакеты программ GraphPadPrizm v.4; SPSSSigmaStat 3.0 и Minitab 14. В качестве статистических критериев использовали традиционные показатели описательной статистики. Для сравнения контрольной и экспериментальных групп использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, а также критерии попарных сравнений групп Стьюдента-Ньюмена-Кейлса и Данна. Из непараметрических критериев использовали критерий Краскела-Уоллиса для сравнения групп. Для оценки соответствия распределений случайных величин Гауссовым применяли критерий нормальности Колмогорова-Смирнова.

Результаты исследования

Исследование поведения крыс, выращенных в сообществе и в условиях социальной изоляции (с 17-го дня жизни) начинали на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции). Процедура исследования включала последовательное тестирование в «открытом поле», приподнятом

крестообразном лабиринте, тесте «чужак-резидент» и обучение УРПИ в одной пробе с ее оценкой на следующий день.

В табл. 1 представлены основные результаты тестирования животных в открытом поле. Было обнаружено, что у контрольных крыс-изолянтов (группа 2, изолянты) вдвое возрастает двигательная активность с 2-кратным уменьшением вертикальной активности. Это указывает на двигательно-гиперактивный тип поведения.

Таблица 1. Двигательное и исследовательское поведение крыс в «открытом поле» на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции), 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) и 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)

Группа	Линейное движение, ед.	Движение в секторе, ед.	Принюхивание	Вертикальная стойка	Стойка с упором	Обследование отверстий
Тестирование на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции)						
Сообщество	29,63±3,21	1,0±0,38	3,00±0,42	2,25±0,62	4,25±0,62	8,50 ±1,38
Изолянты	61,00±9,43*	0,86±0,46	9,71±1,78*	1,14±0,46*	6,57±1,51	7,29 ±1,44
Изолянты + трифтазин	58,14±5,30*	2,71±1,36*	1,57±0,53#	0,43±0,30*#	3,0 ±1,11#	4,29±1,52*#
на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции)						
Сообщество	26,88±3,19	1,00±0,27	3,50±0,53	1,63±0,46	3,88±0,88	6,25±1,33
Изолянты	30,86±9,16	0,14±0,14*	0,86±0,26*	0,71±0,47*	2,14±0,67*	4,57±2,00
Изолянты + трифтазин	41,71±5,80*	0,14±0,14*	0,86±0,34*	0,57±0,30*	1,71±0,29*	7,71±1,46
на 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)						
Сообщество	29,63±3,21	0	3,0±0,4	0,4±0,3	2,3±0,6	8,5±1,4
Изолянты	11,0±4,46*	1,0±0,4*	1,7±0,4*	0*	0*	0,9± 0,3*
Изолянты + трифтазин	14,86±1,37*	0,3±0,3#	2,0±0,2*	0*	1,0±0,7#	0,71±0,2*

Примечание. *p<0,05 по отношению к группе 1 (контроль, сообщество), #p<0,05 по отношению к группе 2 (контроль, изоляция)

Таблица 2. Эмоциональное поведение в «открытом поле» у крыс на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции), 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) и 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)

Группа	Груминг	Замирание	Болусы дефекаций
Тестирование на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции)			
Сообщество	1,25±0,53	0,38±0,26	0,75±0,62
Изолянты	0,71±0,36	0,71±0,36*	0,14±0,14**
Изолянты + трифтазин	1,71±1,25	0*#	0,43±0,43
на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции)			
Сообщество	1,63±0,78	0,75±0,31	1,25±0,67
Изолянты	1,71±0,84	10,29±0,81**	1,14±0,40
Изолянты + трифтазин	1,00±0,53	1,57±0,48##	1,29±0,61
на 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)			
Сообщество	1,3±0,5	4,25±0,6	0,8±0,6
Изолянты	0,1±0,1*	1,71±0,3*	1,1±0,6
Изолянты + трифтазин	0*	2,14±0,3*	0,7±0,5

Примечание. *p<0,05 по отношению к группе 1 (контроль, сообщество), #p<0,05 по отношению к группе 2 (контроль, изоляция)

Исследовательская активность не менялась по основному показателю – обследование отверстий. В то же время наблюдалось 3-кратное увеличение активности по числу принюхиваний (неосновной показатель). При этом у крыс-изолянтов умеренно снижались груминговые реакции (недостаточно) с 2-кратным возрастанием числа замираний и резким снижением болусов

дефекаций (табл. 2). Приведенные данные указывают на снижение эмоционального реагирования у изолянтов (эмоциональная обедненность поведения).

Таким образом, социальная изоляция крыс с 17-го дня жизни (времени начала самообеспечения) приводит к изменению поведения животных (66-й день жизни) по типу двигательной гиперактивности со снижением эмоциональности.

В приподнятом крестообразном лабиринте оценивают степень тревожности крыс. Обнаружено, что у крыс-изолянтов на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции) наблюдается умеренное анксиогенное действие изоляции, проявляющееся статистически недостоверным снижением времени нахождения в открытых (освещенных) отсеках установки и возрастанием времени пребывания в закрытых (темных) отсеках установки (табл. 3). Число свешиваний и перебежек при этом не менялось. Умеренно снижались реакции груминга, указывая на некомфортность пребывания животных в лабиринте.

Таблица 3. Поведение в приподнятом крестообразном лабиринте у крыс на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции), 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) и 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)

Группа	Время в светлой камере, с	Время в темной камере, с	Свешивания	Перебежки	Груминг
на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции)					
Сообщество	68,13±10,53	111,88±10,53	5,38±1,03	4,00±0,63	3,88±0,44
Изолянты	41,71±10,65	138,57±10,76	6,29±0,99	6,29±2,26	2,29±0,29*
Изолянты + трифтазин	63,43±16,71	116,71±16,63	5,43±0,81	4,14±0,94	2,71±0,78
на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции)					
Сообщество	67,75±10,63	112,3±10,6	5,6±0,9	4,4±0,6	2,8±0,5
Изолянты	15,71±2,97*	164,3±2,97*	1,3±0,2*	1,6±0,4*	1,7±0,4*
Изолянты + трифтазин	57,14±4,61#	122,9±4,61#	4,3±0,5#	1,6±0,3*	2,3±0,3
на 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)					
Сообщество	62,50±8,78	117,5±8,78	4,8±0,5	4,0±0,5	2,8±0,5
Изолянты	93,14±27,31	86,86±27,3	1,4±0,2*	1,7±0,3*	0,1±0,1**
Изолянты + трифтазин	32,0±4,54#	148,0±4,54#	2,3±0,5*	1,3±0,2*	0,3±0,2

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе 1 (контроль, сообщество), # – $p < 0,05$ по отношению к группе 2 (контроль, изоляция)

В тесте «интродер-резидент» у крыс-изолянтов умеренно возростала агрессия (данные не достоверны) при снижении груминговых и исследовательских реакций (табл. 4). Учитывая, что крысы линии Вистар изначально малоагрессивны (у крыс сообщества агрессия отсутствует), полученные данные достаточно закономерны.

При обучении и тестировании (через 24 ч после обучения – 67-й день жизни) УРПИ у крыс-изолянтов обнаружена тенденция к снижению сохранения навыка пассивного избегания (табл. 5).

Таким образом, в целом, у крыс-изолянтов на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции) вырисовывается достаточно типичная картина синдрома социальной изоляции, характеризующаяся двигательной гиперактивностью со снижением исследовательской активности, эмоциональности, умеренной тревожностью и агрессивностью и тенденцией к нарушению обучения. Все это позволяет квалифицировать данную модель как экспериментальный аналог синдрома двигательной гиперактивности с нарушением внимания (СДГВ), или минимальную мозговую дисфункцию по классификации МКБ-10.

Нейролептик трифтазин (0,35 мг/кг), вводимый крысам-изолянтам в течение 5 дней до их тестирования на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции) существенно не менял двигательное поведение, но подавлял все формы исследовательского поведения (принюхивание, стойка с упором, вертикальная стойка, обследование отверстий), растормаживал груминговые реакции, полностью снимал замирания и повышал число болюсов дефекаций (недостоверно) в тесте «открытого поля» (см. табл. 1 и 2). В приподнятом крестообразном лабиринте трифтазин проявил тенденцию к восстановлению всех показателей практически до уровня крыс из

сообщества (см. табл. 3). В тесте «интродер-резидент» трифтазин восстанавливал груминговые реакции, не менял коммуникационные характеристики и проявления агрессии (см. табл. 4). В тесте на сохранение УРПИ (см. табл. 5) трифтазин вызывал умеренное нарушение сохранения навыка, значительно более выраженное, чем в контроле (группа 1, сообщество).

Таблица 4. Поведение крыс в тесте «интродер-резидент» на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции), 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) и 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)

Группа	Груминг	Замирание	Вертикальная стойка	Коммуникация	Агрессия
на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции)					
Сообщество	1,6±0,8	5,5±1,1	8,4±1,5	16,1±1,6	0
Изолянты	0,9±0,4*	1,6±0,6*	3,3±1,0*	12,0±1,9	0,4±0,4
Изолянты + трифтазин	1,4±0,5	2,1±0,4*	5,7±1,0	13,2±0,9	0,3±0,2
на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции)					
Сообщество	2,3±0,6	4,3±0,6	8,5±1,4	18,1±1,5	0
Изолянты	3,0±0,4	3,7±0,4	3,7±0,5*	3,3±0,5**	0,3±0,2
Изолянты + трифтазин	4,3±0,9	4,4±0,4	4,3±0,6*	15,2±1,1#	1,0±0,5*
на 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)					
Сообщество	0,9±0,4	2,5±0,8	5,3±1,1	18,1±1,3	0
Изолянты	4,1±0,8*	2,0±0,7	8,1±1,9	13,0±2,0*	0
Изолянты + трифтазин	4,6±0,7*	2,6±0,5	8,0±1,7	11,1±1,6*	0

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе 1 (контроль, сообщество), # – $p < 0,05$ по отношению к группе 2 (контроль, изоляция)

Таблица 5. Сохранение УРПИ через 24 ч после обучения у крыс на 67-й день жизни (50-й день социальной изоляции), 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) и 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)

Группа	Время пребывания в светлой камере, с	Время пребывания в темной камере, с	Число переходов из камеры в камеру
на 67-й день жизни (50-й день социальной изоляции)			
Сообщество	180	0	0
Изолянты	157,1±22,9	22,9±22,9	0,3±0,3
Изолянты + трифтазин	107,4±34,2*	72,6±34,2*	0,4±0,2*
на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции)			
Сообщество	180	0	0
Изолянты	131,7±31,2*	48,3±31,2*	0,3±0,2*
Изолянты + трифтазин	156,4±23,6	23,6±23,6	0,1±0,1
на 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции)			
Сообщество	180	0	0
Изолянты	180	0	0
Изолянты + трифтазин	180	0	0

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к группе 1 (контроль, сообщество), # – $p < 0,05$ по отношению к группе 2 (контроль, изоляция)

Поведение крыс-изолянтов (группа 2, изолянты) на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) характеризовалось снижением исследовательской активности (см. табл. 1), восстановлением нормальных показателей общей двигательной активности (снизилась до уровня крыс из сообщества по сравнению с тестированием на 66-й день жизни) и эмоциональности. Неожиданно, в 13 раз возрастал показатель «замирание» в сравнении с крысами, выращенными в сообществе (группа 1, сообщество). Однако данный показатель в изолированном виде не может

однозначно характеризовать поведение животных. В приподнятом крестообразном лабиринте значительно возрастала анксиогения (см. табл. 3) со снижением груминговых реакций. В тесте «интродер-резидент» резко снизились коммуникационные компоненты поведения, что, возможно, связано не только с изоляцией, но и с повторной ситуацией тестирования (см. табл. 4). Тестирование УРПИ, как и в тесте на 66-й день показало уровень воспроизведения навыка ниже, чем у крыс из сообщества (табл. 5).

Трифтазин в дозе 0,35 мг/кг, вводимый в течение 8 дней (второй цикл введения) незначительно повышал двигательную активность крыс-изолянтов, существенно не меняя их исследовательское поведение и эмоциональность. В данном случае наблюдается эффект привыкания к препарату. В приподнятом крестообразном лабиринте трифтазин практически восстанавливал у крыс-изолянтов тип поведения, характерный для крыс из сообщества (группа 3), то есть устранял анксиогению. В тесте «интродер-резидент» трифтазин растормаживал общительность крыс-изолянтов до уровня крыс из сообщества и увеличивал компоненты агрессивного поведения. Это весьма характерно для низких доз нейролептиков. Как уже отмечалось выше, у крыс-изолянтов (контроль, группа 2) была выявлена умеренная амнезия навыка УРПИ (см. табл. 5), тестируемого через 10 дней после обучения (второе тестирование). Трифтазин в дозе 0,35 мг/кг несколько сглаживал этот отрицательный эффект.

Таким образом, более длительное введение нейролептика трифтазина (0,35 мг внутрь, 8 дней вторым циклом, всего 13 дней с перерывом в 2 дня) растормаживает двигательное поведение крыс-изолянтов. Препарат восстанавливал социальную коммуникацию животных, но не улучшал сохранение навыка пассивного избегания.

Поведение крыс-изолянтов (группа 2) на 86-й день жизни (69-й день социальной изоляции) характеризовалось значительным снижением двигательной, исследовательской активности (см. табл. 1) и эмоциональности (табл. 2) в сравнении с крысами, выращенными в сообществе (группа 1). В приподнятом крестообразном лабиринте анксиогения сменилась на умеренный анксиолитический эффект (табл. 3) со снижением груминговых реакций. В тесте «интродер-резидент» были снижены коммуникационные компоненты поведения, как и на 76-й день тестирования (табл. 4). И, наконец, тестирование УРПИ, в отличие от 76-го дня показало высокий уровень воспроизведения навыка, как у крыс из сообщества (табл. 5).

Трифтазин в дозе 0,35 мг/кг, вводимый в течение 9 дней (третий цикл введения) не менял двигательного и исследовательского поведения с резким подавлением груминговых реакций крыс-изолянтов (группа 3). Следовательно, сохранялся отмеченный ранее эффект привыкания к введению препарата. В приподнятом крестообразном лабиринте трифтазин вызывал анксиогенный эффект, снижая втрое время пребывания крыс в открытых рукавах лабиринта (табл. 3), хотя на 76-й день жизни отмечали устранение анксиогении. В тесте «интродер-резидент» трифтазин (табл. 4) практически не выявлял никаких эффектов. В отличие от тестирования на 76-й день жизни, крысы-изолянты на 86-й день жизни демонстрировали 100%-е воспроизведение навыка пассивного избегания, то есть полное восстановление памяти после введения трифтазина.

Таким образом, длительное введение нейролептика трифтазина (0,35 мг внутрь, 3 цикла: 5+8+9 дней с 2 перерывами в 2 и 1 день) приводило к эффекту привыкания от препарата. Важно подчеркнуть, что трифтазин проявлял транзиторный умеренный анксиогенный эффект. В тесте УРПИ в группе введения трифтазина выявлено восстановление памяти, как и в контрольной группе 2 (изоляция).

Обсуждение результатов исследования

Использование модели социальной изоляции крыс от сородичей с ограничением сенсорной информации в раннем постнатальном периоде (с 17-го дня жизни, времени возможного самообеспечения животного) позволило смоделировать определенный поведенческий синдром, которым ранее мы назвали синдромом социальной изоляции [10]. Он включает двигательную гиперактивность, ограничение исследовательской активности, элементы тревожности, депрессивности, агрессии, что условно можно оценивать как эмоциональную неустойчивость и истощаемость, и, наконец, снижение когнитивных функций, что в наших опытах проявлялось тенденцией к нарушению сохранения УРПИ у крыс-изолянтов. Все эти признаки с высокой степенью очевидности можно рассматривать как прототип СДВГ или РАС, учитывая, что первые признаки нарушения поведения в наших опытах были зарегистрированы у неполовозрелых крысят в возрасте немногим более 2 мес. (66-й день жизни и 49-й день социальной изоляции). В дальнейшем, при последовательном тестировании через 10 дней, поведение крыс-изолянтов (группа 2) на 76-й день жизни (59-й день социальной изоляции) характеризовалось снижением

исследовательской активности при сохранении двигательной активности и эмоциональности в сравнении с крысами, выращенными в сообществе (группа 1). В приподнятом крестообразном лабиринте сохранялась умеренная анксиогения со снижением груминговых реакций. В тесте «интродер-резидент» были снижены коммуникационные компоненты поведения. Тестирование УРПИ показало уровень воспроизведения навыка ниже, чем у крыс из сообщества. Наконец, на 3-й срок исследования (на 86-й день жизни или 69-й день социальной изоляции) поведение крыс-изолянтов, практически достигших половозрелости, характеризовалось значительным снижением двигательной, исследовательской активности и эмоциональности в сравнении с крысами, выращенными в сообществе (группа 1). В приподнятом крестообразном лабиринте анксиогения сменилась на умеренный анксиолитический эффект со снижением груминговых реакций. В тесте «интродер-резидент» были снижены коммуникационные компоненты поведения, как и на 76-й день тестирования. И, напротив, тестирование УРПИ, в отличие от 76-го дня показало высокий уровень воспроизведения навыка, как у крыс из сообщества.

Следовательно, мы видим определенную динамику в формировании СДВГ у крыс: на ранних сроках (у крыс-подростков) у крыс-изолянтов на первый план выходят двигательная гиперактивность и снижение исследовательских компонентов поведения, умеренная анксиогения, усиливающаяся ко второму тестированию, снижение общительности и когнитивных характеристик (сохранение УРПИ). В дальнейшем, с половым созреванием и повторным тестированием двигательная гиперактивность нивелируется, анксиогения сменяется анксиолитическими проявлениями, коммуникационные компоненты поведения и исследовательская активность остаются на низком уровне, а воспроизведение навыка пассивного избегания восстанавливается до уровня крыс из сообщества. То есть, применимость методики социальной изоляции как модели СДВГ определяется возрастом до полового созревания у крыс – это период от 1 до 3 мес. жизни. Это в целом напоминает динамику СДВГ у человека: в подростковом периоде регистрируют двигательную гиперактивность и снижение когнитивных компонентов поведения, а в период половозрелости гиперактивность устраняется, но ей на смену приходит эмоциональная неустойчивость, что проявляется развитием психосоматических расстройств [1].

Нейролептик трифтазин (0,35 мг/кг), вводимый в течение 5 дней до тестирования крыс-изолянтов на 66-й день жизни (49-й день социальной изоляции) существенно не менял двигательное поведение крыс, но подавлял все формы исследовательского поведения, растормаживал груминговые реакции и эмоциональность, но нарушал сохранение УРПИ. С увеличением продолжительности введения нейролептика трифтазина (8 дней вторым циклом, всего 13 дней с перерывом в 2 дня) незначительно растормаживалось двигательное поведение крыс-изолянтов. Стало заметным, что на фоне введения трифтазина развиваются элементы привыкания. При этом трифтазин восстанавливал социальную коммуникацию животных, но не улучшал сохранение навыка пассивного избегания. Завершающий цикл введения исследованных препаратов (+9 дней) в целом подтвердил данные, что длительное введение нейролептика трифтазина приводит к эффекту привыкания от препарата. Трифтазин проявлял умеренный анксиогенный эффект. Кроме того, введение и трифтазина не оказывало влияния на воспроизведение навыка в тесте УРПИ.

Отдельно следует оговорить динамику воспроизведения УРПИ при ее последовательном тестировании. Через сутки после обучения навык УРПИ воспроизводился достаточно активно, а у крыс-изолянтов отмечена лишь тенденция к нарушению ее воспроизведения. Повторное тестирование, как правило, дает напоминающий эффект, что проявляется лучшим воспроизведением навыка. В наших опытах на 67-й день жизни (50-й день изоляции) у крыс-изолянтов регистрировали амнезию УРПИ, которая проявлялась снижением латентного периода захождения в темную (опасную) камеру установки. Нейролептик трифтазин усугублял амнезию навыка пассивного избегания. Однако амнезия УРПИ устранялась в период третьего тестирования, что подтверждает флуктуирующую динамику воспроизведения УРПИ при последовательном тестировании, отмеченную в ряде исследований [10, 11]. Такой характер колебания воспроизведения навыка авторы связывают с динамикой функционирования холинергической системы головного мозга, имея в виду время синтеза (обновления) активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Этот фермент имеет наивысшую активность в дни, кратные 7 и 14, то есть на 7-14-28-й дни. Исключением, напротив, являются 3-10-21-й дни, когда реакция, как правило, воспроизводится с низкими показателями. Не исключено, что некие сходные черты наблюдается и в случае воспроизведения УРПИ в наших опытах, когда тестирование осуществляли на 67-й (1-й день), 76-й (+9) и 86-й (+21) дни жизни. Хотя следует отметить, что выраженных флуктуаций, возможно, зависящих от активности ацетилхолинэстеразы в наших опытах явно не наблюдалось.

Выводы

1. В эксперименте на крысах-подростках (2 мес.) формируется СДВГ, если животные выращиваются в условиях полной изоляции от сородичей и частичной сенсорной депривации с 17-го дня жизни. СДВГ у крыс характеризуется двигательной гиперактивностью, снижением исследовательской активности, появлением элементов тревожности, депрессивности, агрессии и снижением когнитивных функций. Этот фон можно рассматривать как исходный для оценки психофармакологического действия исследованных препаратов.
2. Длительное введение трифтазина (0,35 мг/кг) существенно не меняет двигательного поведения крыс, но подавляет все формы исследовательского поведения, растормаживает груминговые реакции и эмоциональность и нарушает сохранение УРПИ. Удлинение сроков введения трифтазина приводит к растормаживанию двигательных реакций, а в дальнейшем – к появлению феномена привыкания.

Литература (references)

1. Глушенко В.В. Рациональная фармакотерапия гиперкинетического расстройства у подростков: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб.:ВмедА, 2015. – 42 с. [Glushchenko V.V. *Ratsionalnaya farmakoterapiya giperkineticheskogo rasstroistva u podrostkov (doct. dis)*. Rational pharmacotherapy of hyperkinetic disorder in adolescents (Author's Abstract of Candidate Thesis) . – St.Petersburg, 2015. – 42 p. (in Russian)]
2. Глушенко В.В., Шабанов П.Д. Минимальная дисфункция мозга. – М.: Бином, 2013. – 320 с. [Glushchenko V.V., Shabanov P.D. *Minimal'naya disfunktsiya mozga*. Minimal disfunction of the brain. – Moscow: Binom Publ., 2013. – 320 p. (in Russian)]
3. Лавров Н.В., Шабанов П.Д. Расстройства аутистического спектра: этиология, лечение, экспериментальные подходы к моделированию // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т.16, №1. – С. 21-27. [Lavrov N.V., Shabanov P.D. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2018. – V.16, N1. – P. 21-27. (in Russian)]
4. Михеев В.В., Шабанов П.Д. Фармакологическая асимметрия мозга. – СПб.: Элби-СПб, 2007. – 384 с. [Mikheev V.V., Shabanov P.D. *Farmakologicheskaya asimmetriya mozga*. Pharmacological asymmetry of the brain. – St. Petersburg: Elbi-SPb, 2007. – 384 p. (in Russian)]
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya. Pod redaktsiei A.N.Mironova*. Manual for preclinical investigation of the drugs. Part 1. Ed. By A.N. Mironov. – Moscow: Grif and K, 2012. – 944 p. (in Russian)]
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В.П. Фисенко. – М.: МЗ РФ, 2000. – С. 114-120. [*Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novikhlekarstvennykh sredstv. Pod redaktsiei V.P. Fisenko*. Manual for experimental (preclinical) investigation of the new drugs. Ed. by V.P. Fisenko. – Moscow, 2000. – P. 114-120 (in Russian)]
7. Шабанов П.Д. Психофармакология. – СПб.: Н-Л, 2008. – 362 с. [Shabanov P.D. *Psikhofarmakologiya*. Psychopharmacology. – St. Petersburg: N-L Publ., 2008. – 362 p. (in Russian)]
8. Шабанов П.Д. Наркология. Изд. 2-е испр. и доп. – М.: Гэотар-Медиа, 2012. – 832 с. [Shabanov P.D. *Narkologiya. Izdanie 2-e, ispravlennoe i dopolnennoe*. Narcology. 2nd ed. – Moscow: Geotar-Media, 2012. – 832 p. (in Russian)]
9. Шабанов П.Д., Бородин Ю.С. Нарушения памяти и их коррекция. – Л.: Наука, 1989. – 150 с. [Shabanov P.D., Borodkin Y.S. *Narusheniya pamyati i ikh korrektsiya*. Memory disorders and their correction. – Leningrad: Nauka Publ., 1989. – 150 p. (in Russian)]
10. Шабанов П.Д., Мещеров Ш.К., Лебедев А.А. Синдром социальной изоляции. – СПб.: Элби-СПб, 2004. – 208 с. [Shabanov P.D., Meshcherev S.K., Lebedev A.A. *Sindrom sotsial'noi isolyatsii*. Syndrome of social isolation. – St. Petersburg: Elbi-SPb, 2004. – 208 p. (in Russian)]
11. Deutsch A.J. Short-term memory. – New York: Academic Press, 1971. – 256 p.

Информация об авторах

Шабанов Петр Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», заведующий кафедрой фармакологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России. E-mail: pdshabanov@mail.ru

Егерева Екатерина Александровна – аспирант отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». E-mail: kotya_eg@mail.ru

Лебедев Андрей Андреевич – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru