

Приподнятый крестообразный лабиринт

Методический семинар



ООО «НПК Открытая Наука»

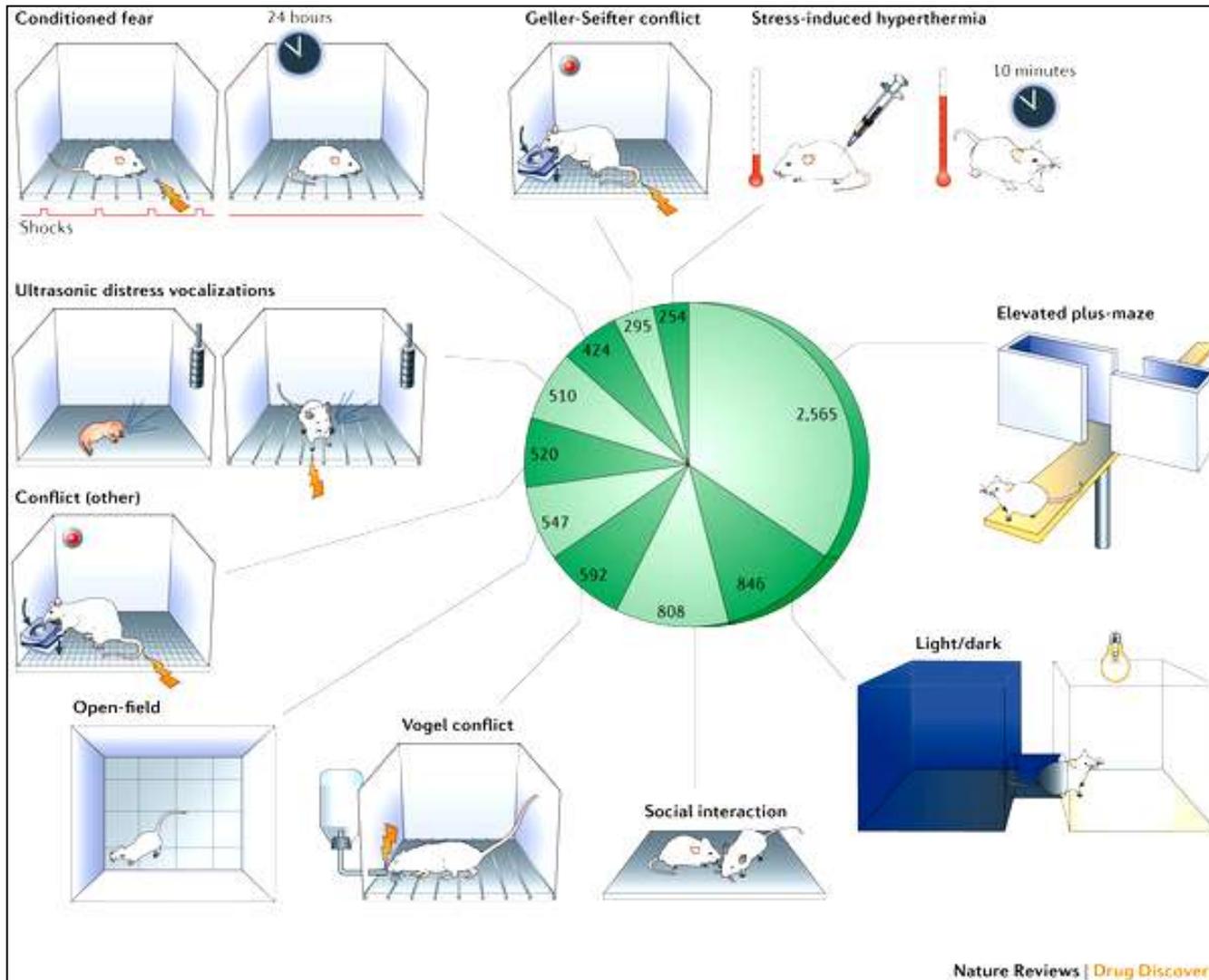
при поддержке



НП «Объединение специалистов
по работе с лабораторными
ЖИВОТНЫМИ» www.ruslasa.ru

Докладчик: Н. А. Бондаренко

Популярность

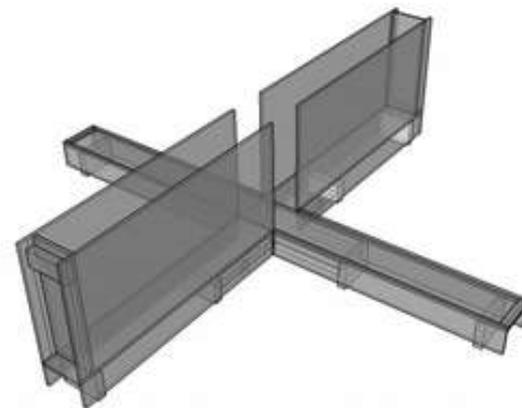
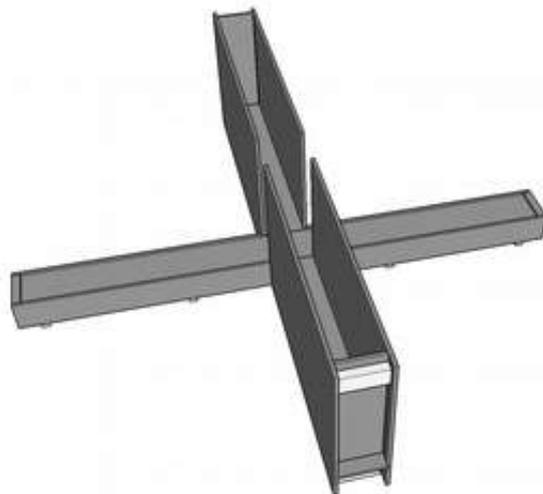


50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery

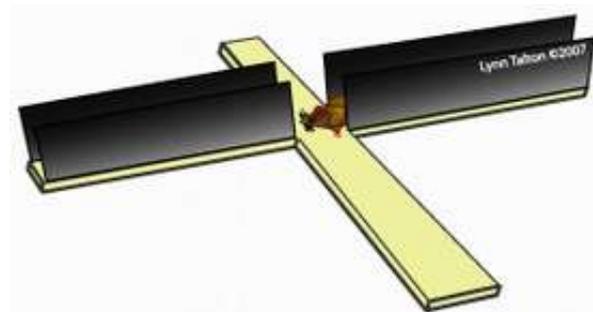
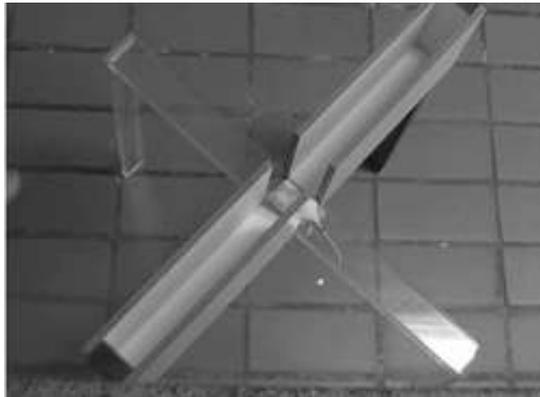
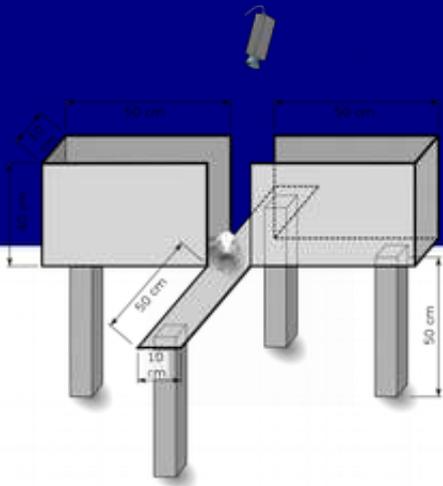
Guy Griebel & Andrew Holmes

Nature Reviews Drug Discovery
12, 667–687 (2013)
doi:10.1038/nrd4075

Приподнятый крестообразный лабиринт



Модели



Главные достоинства процедуры:

- 1) Простой, быстрый тест**
- 2) Не требуется предварительного обучения животных или применения сильных стрессогенных стимулов**
- 3) Надежная процедура для изучения как самой тревожности животных, так и действия на нее фармакологических препаратов.**

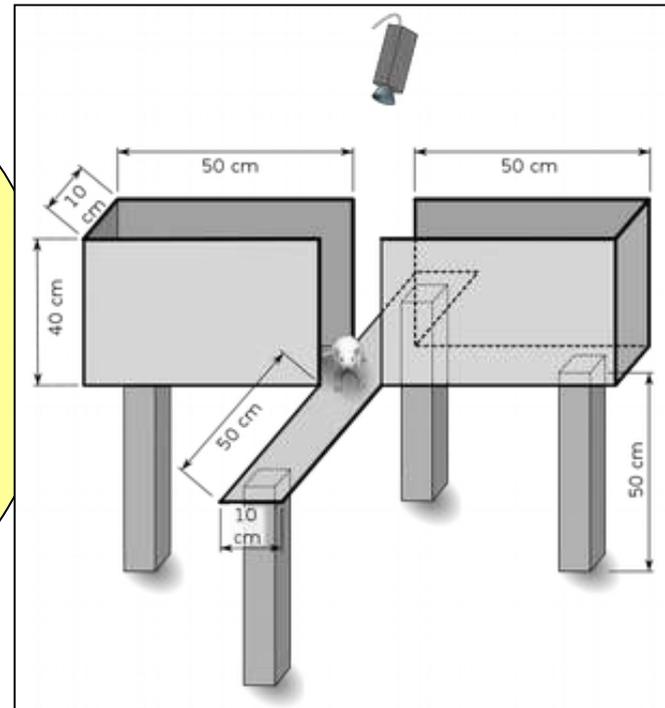
Информация

Handley SL, Mithani S.
Effects of α -adrenoreceptor
agonists and antagonists in a
maze-exploration model of 'fear'-
motivated behaviour. Naunyn-

Schmeideberg's Arch Pharmacol. 1984;327:1-5.

*Если животное тревожно,
то оно имеет врожденную
тенденцию
предпочитать
темные закрытые места
освещенным открытым
местам.*

*В этом контексте
тревогоподобное
поведение измеряется
степенью избегания
открытых рукавов
лабиринта.*



Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. and Briley, M. (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a **measure of anxiety** in the rat". *J. Neurosci. Methods* 14: 149-67.

Теория:

Тревожность человека и тревого-подобное состояние животных

Принципы моделирования нормальной и патологической тревожности человека на животных

Приподнятый крестообразный лабиринт как тест для выявления тревого-подобного состояния у грызунов

Разберемся?

Если животное тревожно, то оно имеет врожденную тенденцию предпочитать темные закрытые места освещенным открытым местам. В этом контексте тревого-подобное поведение измеряется степенью избегания открытых рукавов лабиринта.

Практика:

Факторы, влияющие на поведение грызунов в ПКЛ

Феномен «толерантности с одной пробы»

Стандартизация эксперимента: «СОП»

Определение



Тревога —

беспочвенное неопределенное волнение, предчувствие опасности, грозящей катастрофы с ощущением внутреннего напряжения, боязливого ожидания; может осознаваться как беспредметное беспокойство

Клиника тревожности (*DSM-IV*)

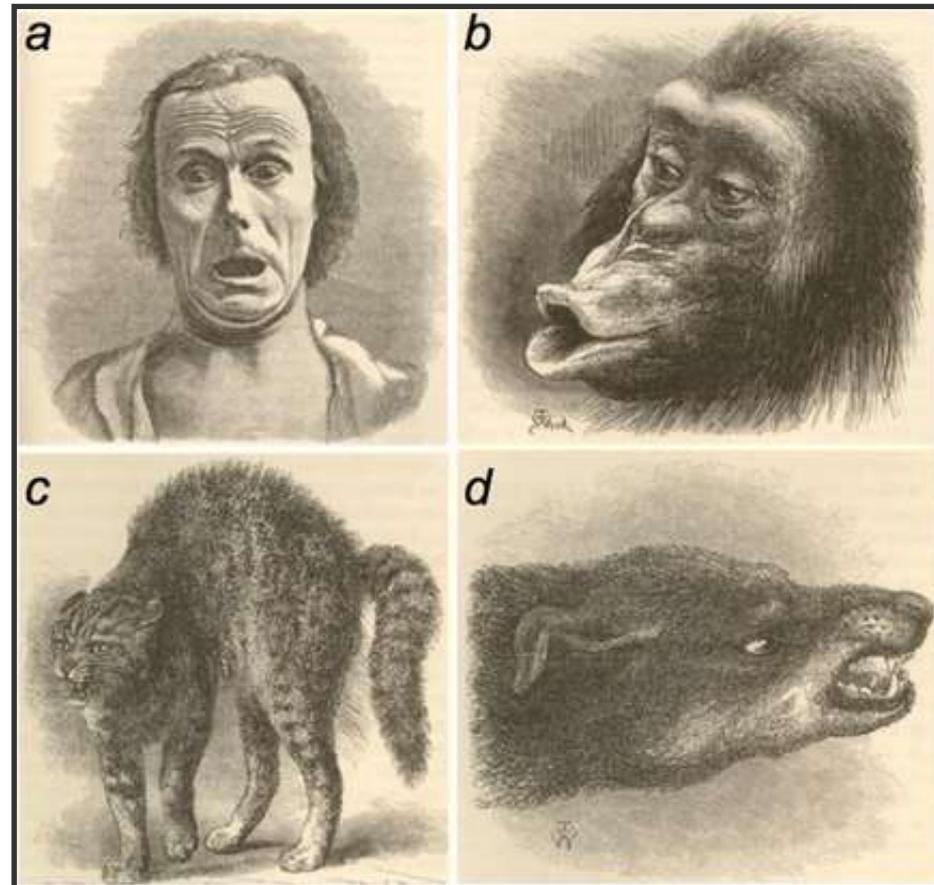
- Тревожное расстройство (общая тревожность, *generalized anxiety*) длится не менее 6 мес.
- Специфические фобии (*Specific phobias*) тревога, вызванная специфическими объектами или событиями, в том числе социофобия.
- Паника (*Panic attacks with or without agoraphobia*) или тревога при попадании в субъективно неизбежную ситуацию
- Посттравматическое стрессорное расстройство (ПТСД) (*Posttraumatic stress disorder (PTSD)*) характеризуется повторным переживанием психотравмирующих событий, гипервозбудимостью и избеганием стимулов, ассоциирующихся с травмой.
- Острое стресс-расстройство (*Acute stress disorder*) сходно с ПТСД, но возникает в первые несколько месяцев после инцидента.
- Невроз навязчивых состояний (*Obsessive compulsive disorder (OCD)*)

Pharmacol Ther. 2010 December; 128(3): 460–487.. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.011
Therapeutic Utility of Non-Peptidic CRF1 Receptor Antagonists in Anxiety, Depression,
and Stress-Related Disorders: Evidence from Animal Models
John H. Kehne, Ph.D.1,* and Christopher K. Cain, Ph.D.2,3

Теория базовых эмоций

Darwin, in his 1872 monograph *The Expression of the Emotions in Man and Animals*,

биологически базовыми эмоциями являются постольку, поскольку основываются на психологических механизмах, возникших в эволюции в процессе естественного отбора.



Cell. 2014 Mar 27; 157(1):187–200.
doi: 10.1016/j.cell.2014.03.003

**A Framework for Studying Emotions
Across Phylogeny**

David J. Anderson^{1,3,4} and Ralph
Adolphs^{1,2,4}

Тревога и страх



Разграничение тревоги и страха традиционно базируется на критерии, введенном в психиатрию К. Ясперсом (1948), в соответствии с которым тревога ощущается вне связи с каким бы то ни было стимулом («свободно плавающая тревога»), в то время как страх соотносится с определенным стимулом и объектом («опредмеченная», конкретизированная тревога).

Условия возникновения тревоги

- Тревога возникает как «страх первичной эмоции». В ее механизм включены когнитивные функции
- Тревога возникает в ситуации потенциальной (вероятной) опасности
- Тревога возникает при наличии определенной «психометрической дистанции» от опасности



АНТРОПОМОРФИЗМ?



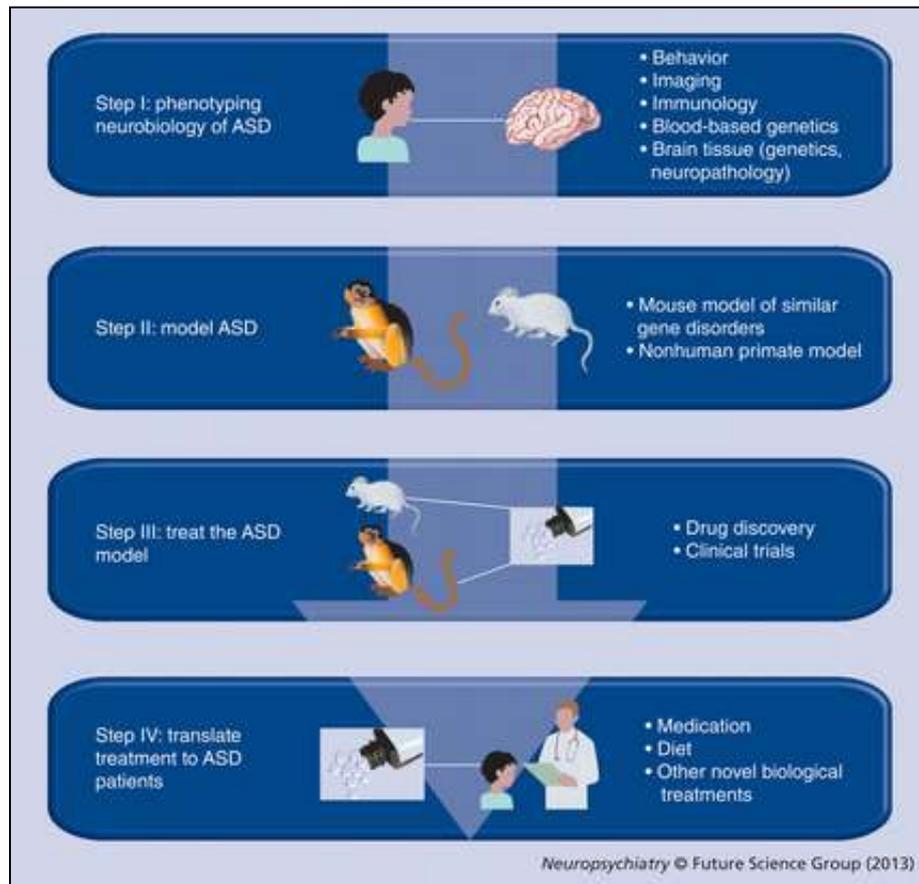
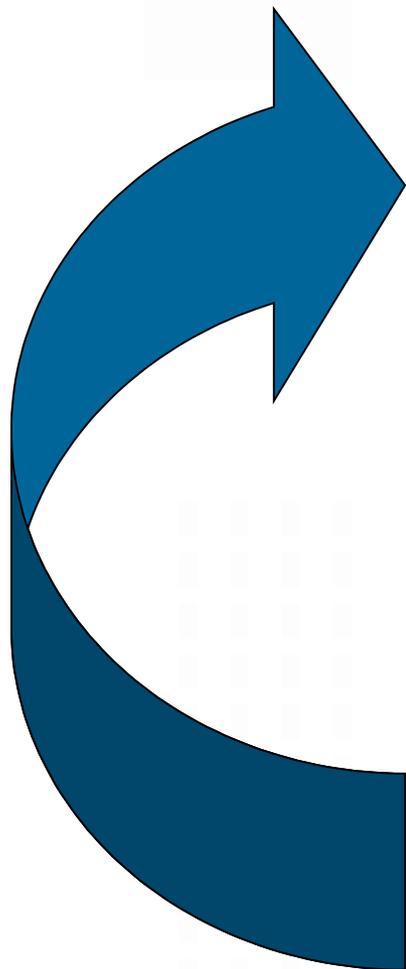
- **Могут ли животные так же переживать тревогу, как и человек, и как мы можем измерить их тревожность, если не умеем думать «как крысы».**

Panksepp Jaak

Cross-Species Affective Neuroscience Decoding of the Primal Affective Experiences of Humans and Related Animals

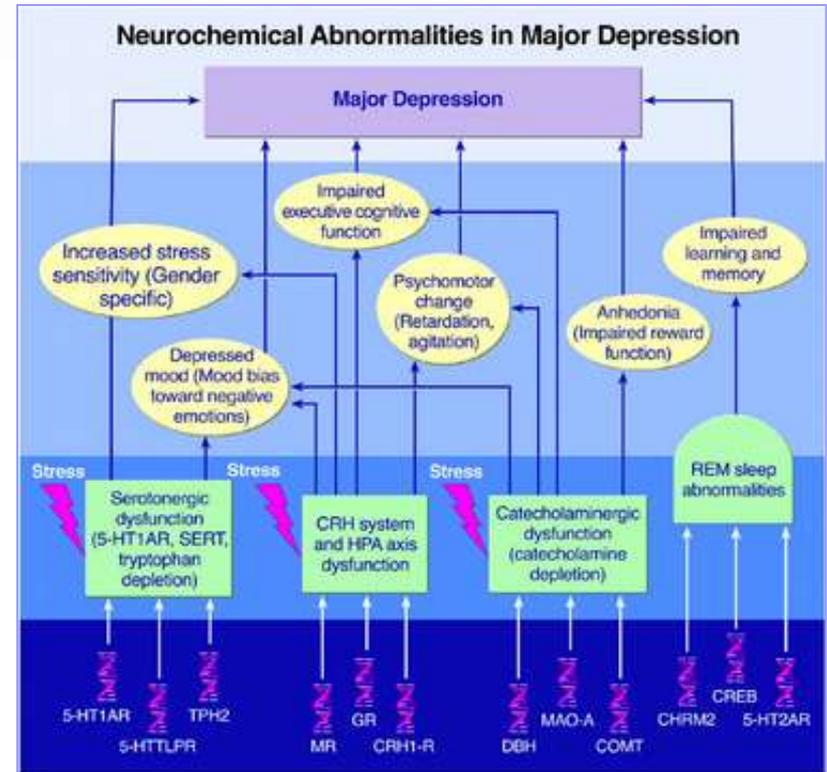
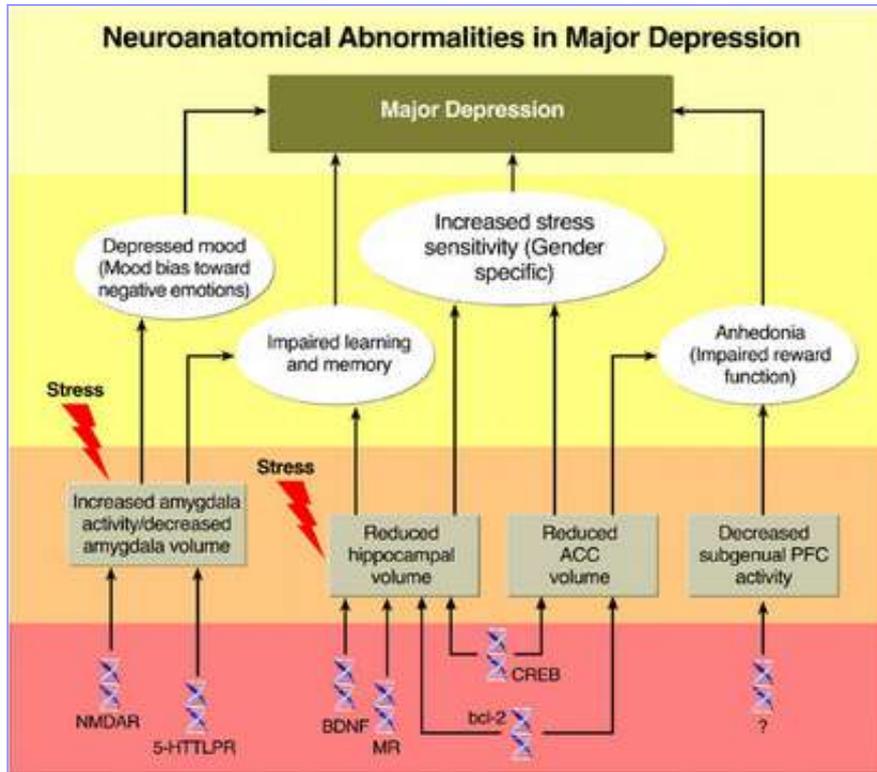
PLoS One. 2011; 6(9): e21236.

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ: от человека к крысе – и обратно.



Neuropsychiatry (London).
Apr 2013; 3(2): 159–168.
doi: 10.2217/npv.13.18
PMCID: PMC3757943
NIHMSID: NIHMS489607
**Is 'bench-to-bedside'
realistic for autism? An
integrative neuroscience
approach**
Melissa D Bauman and
Cynthia M Schumann

Эндотип



Neuropsychopharmacology (2004) **29**, 1765–1781, doi:10.1038/sj.npp.1300506

Discovering Endophenotypes for Major Depression

Gregor Hasler, Wayne C Drevets, Husseini K Manji and Dennis S Charney.

Истоки трансляционной фармакологии

Arch Gen Psychiatry. **1969**; 21(2):240-8

Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research.

McKinney WT Jr, Bunney WE Jr.

Psychol Bull. **1973** Apr;79(4):243-51.

Shock-motivated avoidance and the analysis of behavior.

Olton DS.

Perspect Biol Med. **1974**; 17(4):529-42

Animal models in psychiatry.

McKinney WT Jr.

Psychopharmacology (Berl). **1984**; 83(1):1-16.

The validity of animal models of depression.

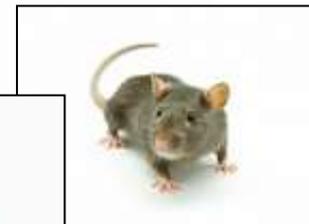
Willner P.

«Внешняя» валидность модели

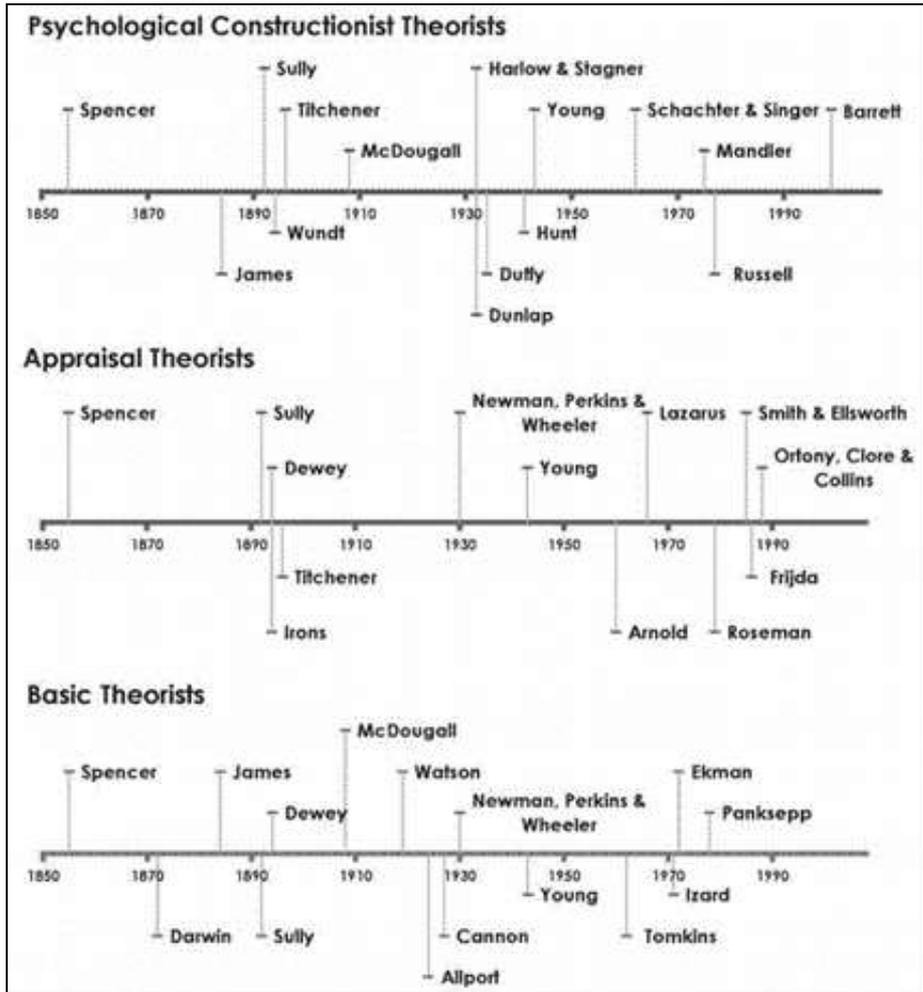
**1. Сходство симптомов
(face validity)**

**2. Сходство этиологии
(constructive validity)**

**3. Сходство результатов
терапии
(predictive validity)**



Теории возникновения эмоций



Emot Rev. 2009 October 1; 1(4): 316–339.
doi: 10.1177/1754073909338877

**Reconstructing the Past: A Century of Ideas
About Emotion in Psychology**

Maria Gendron and Lisa Feldman Barrett

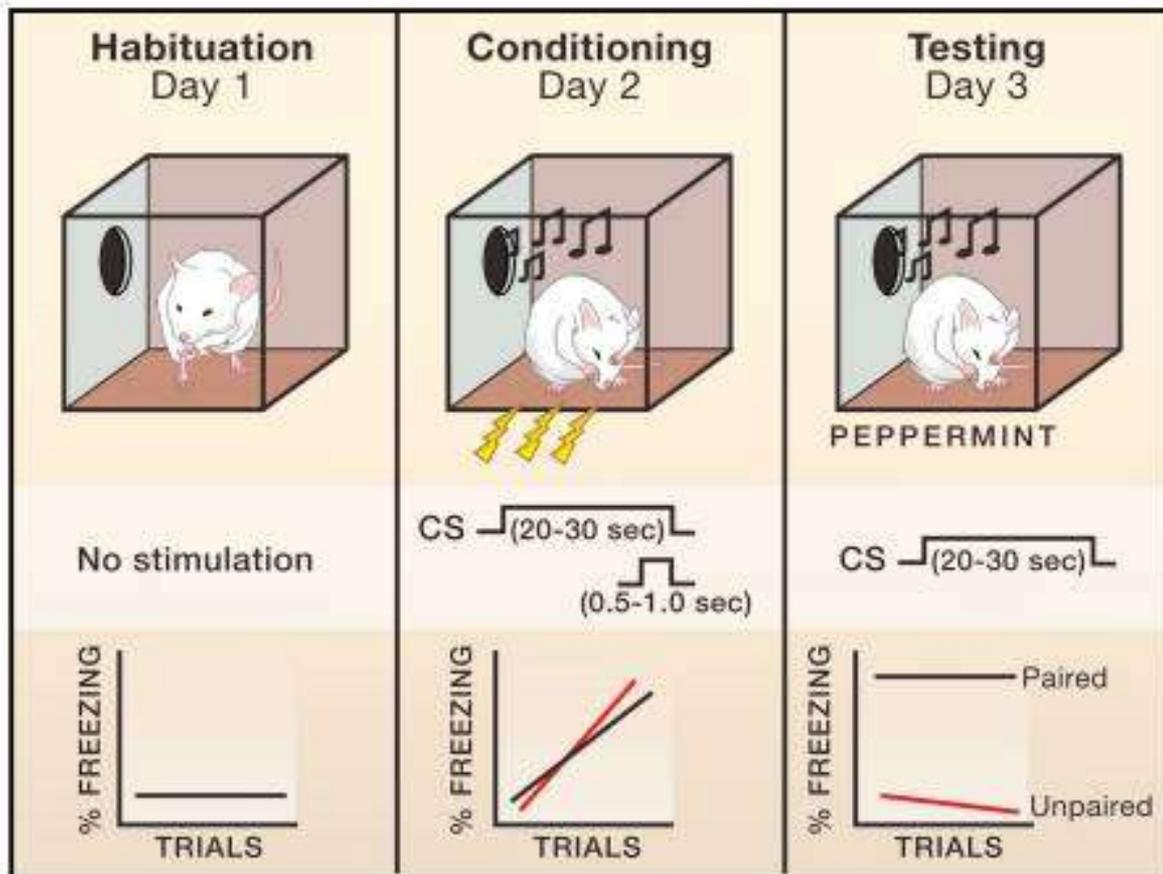
Теории возникновения тревожности: Россия

Условно эмоциональная реакция
(Fear conditioning) **И.П. Павлов**

Конфликт **И.П. Павлов**

Память и ожидание
(Memories and anticipation)
П.К. Анохин, П.В. Симонов

Условно эмоциональная реакция



PLoS Biol. 2009 April; 7(4):
e1000089.
Published online 2009 April 21.
doi: 10.1371/journal.pbio.1000089
PMCID: PMC2671558

From Rapid Place Learning to
Behavioral Performance: A Key
Role for the Intermediate
Hippocampus

Tobias Bast,^{1,2*} Iain A Wilson,^{1†}
Menno P Witter,^{3,4} and Richard G.
M Morris¹

Montgomery, K. C.

Journal of Comparative and Physiological Psychology, Vol 48(4),
Aug 1955, 254-260. <http://dx.doi.org/10.1037/h0043788>

«Давая возможность животным исследовать закрытый или открытый приподнятый рукава лабиринта, мы можем изучать их исследовательскую мотивацию в ситуациях с различной интенсивностью страха. Новые для животного ситуации могут индуцировать у них конфликт мотиваций страха и исследования. В дальнейшем было обнаружено, что сила мотивации страха в новой ситуации снижается как функция длительности экспозиции к новизне.»



Условия возникновения тревоги

- Тревога возникает как «страх первичной эмоции». В ее механизм включены когнитивные функции
- Тревога возникает в ситуации потенциальной (вероятной) опасности
- Тревога возникает при наличии определенной «психометрической дистанции» от опасности



Валидизация ПКЛ: фармакология

TABLE 1. *Drugs that have been Reported to Alter Anxiety in Humans*

	Efficacy	Site/Mechanism of action
Anxiolytics		
Benzodiazepines	+++	BDZ-receptors
Barbiturates	+++	Barbiturate-site
Ethanol	+++/-	??
Buspirone	+++a	5-HT _{1a} receptors
Clonidine	+/-	α_2 -adrenoceptors
Imipramine	+++a	Monoamine reuptake inhibition
Nicotine	+	Nicotinic receptors
Propranolol	++	β -adrenoceptors
MAOIs	+++a	MAO inhibition
Anxiogenics		
FG 7142	++	BDZ-receptors
Pentylenetetrazole	++	Picrotoxin site
Caffeine	++	Adenosine receptors
Yohimbine	+	α_2 -adrenoceptors?

a = only active following chronic treatment.

Pharmac. Ther., Vol. 46, pp. 321-340, 1990
Printed in Great Britain. All rights reserved

0163-7258/90 \$0.00 + 0.50
© 1990 Pergamon Press plc

Specialist Subject Editor: S. E. File

ETHOLOGICALLY-BASED ANIMAL MODELS OF
ANXIETY DISORDERS

RICHARD G. LISTER

Теория:

Тревожность человека и тревого-подобное состояние животных

Принципы моделирования нормальной и патологической тревожности человека на животных

Приподнятый крестообразный лабиринт как тест для выявления тревого-подобного состояния у грызунов

Разберемся?

Если животное тревожно, то оно имеет врожденную тенденцию предпочитать темные закрытые места освещенным открытым местам. В этом контексте тревого-подобное поведение измеряется степенью избегания открытых рукавов лабиринта.

Практика:

Факторы, влияющие на поведение грызунов в ПКЛ

Феномен «толерантности с одной пробы»

Стандартизация эксперимента: «СОП»

<http://www.ucalgary.ca/runcore/files/runcore/elevated-plus-maze.pdf>

- **Принести мышей в экспериментальную комнату по крайней мере за 30 минут до тестирования, чтобы они могли адаптироваться к новой обстановке.**
- **Протирать лабиринт 70% спиртом до и после каждой посадки, чтобы убрать следы животного.**
- **Поместить мышь на площадку, соединяющую открытый и закрытый рукава, мордой в сторону рукава, противоположного экспериментатору**
- **Позволить мыши свободно исследовать лабиринт в течении 5-10мин.**
- **Анализ данных обычно включает регистрацию числа заходов в открытые и закрытые рукава или времени пребывания в них.**
- **Заходом в рукав считается пересечение его границы всеми четырьмя лапами.**

1. Принести мышей в экспериментальную комнату по крайней мере за 30 минут до тестирования, чтобы они могли адаптироваться к новой обстановке.



Факторы, влияющие на результаты экспериментов



Behav Brain Funct. 2009; 5: 11. doi: 10.1186/1744-9081-5-11 PMID: PMC2669803

Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders

F Josef van der Staay, 1 Saskia S Arndt, 2 and Rebecca E Nordquist¹

A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze

S. Mechiel Korte^{a,*}, Sietse F. De Boer^b

TABLE 1
Fear potentiation in rats, as measured in the elevated plus-maze, can be produced by different stressors

Housing	Stressor	Time interval (stressor-test)	Percent time in open arms	Refs.
Group	restraint	< 1 min	↓	Heinrichs et al. (1994)
Group	restraint	24 h	↓	Martijena et al. (1997), Mendonca and Guimaraes (1998)
Group	forced swim	< 1 min	↓	Heinrichs et al. (1994)
Group	partial water immersion	15 min	○	Falter et al. (1992)
Group	social defeat	ca. 5 min	↓	Heinrichs et al. (1992, 1994)
Isolation	social defeat	14 days	↓	Ruis et al. (1999)
Group	social defeat	14 days	○	Ruis et al. (1999)
Group	isolation	2–24 h	↓	Maisonnette et al. (1993)
Isolation	regrouping	2 h	↔	Maisonnette et al. (1993)
Group	cat (predator stress)	30–60 min and lasting 3 weeks	↓	Adamec and McKay (1993), Adamec and Shallow (1993)
Isolation	cat odour	1 h	↓	Zangrossi and File (1992)
Isolation	cat odour	24 h	○	Zangrossi and File (1992)
Isolation	inescapable shock	< 1 min, 24–72 h	○	Steenbergen et al. (1991)
Group	inescapable shock	1 min, 24 h, 7 days	○	Korte et al. (1999)
Group	prior shock box	< 1 min	↓	Korte et al. (1999)

Fear potentiation is expressed as decreased (↓) percent time in open arms of the plus-maze. ↔ means normalisation of percent time in open arms exploration, while ○ means no effect.

Эксперимент



Видеосистема для автономной съемки



Освещение для видеосистемы



Измерение освещенности люксметром



Переноска для лабораторных животных



Клетка для содержания грызунов



Манипуляции с животными при помощи цилиндра



Камеры для индивидуальной рассадки животных

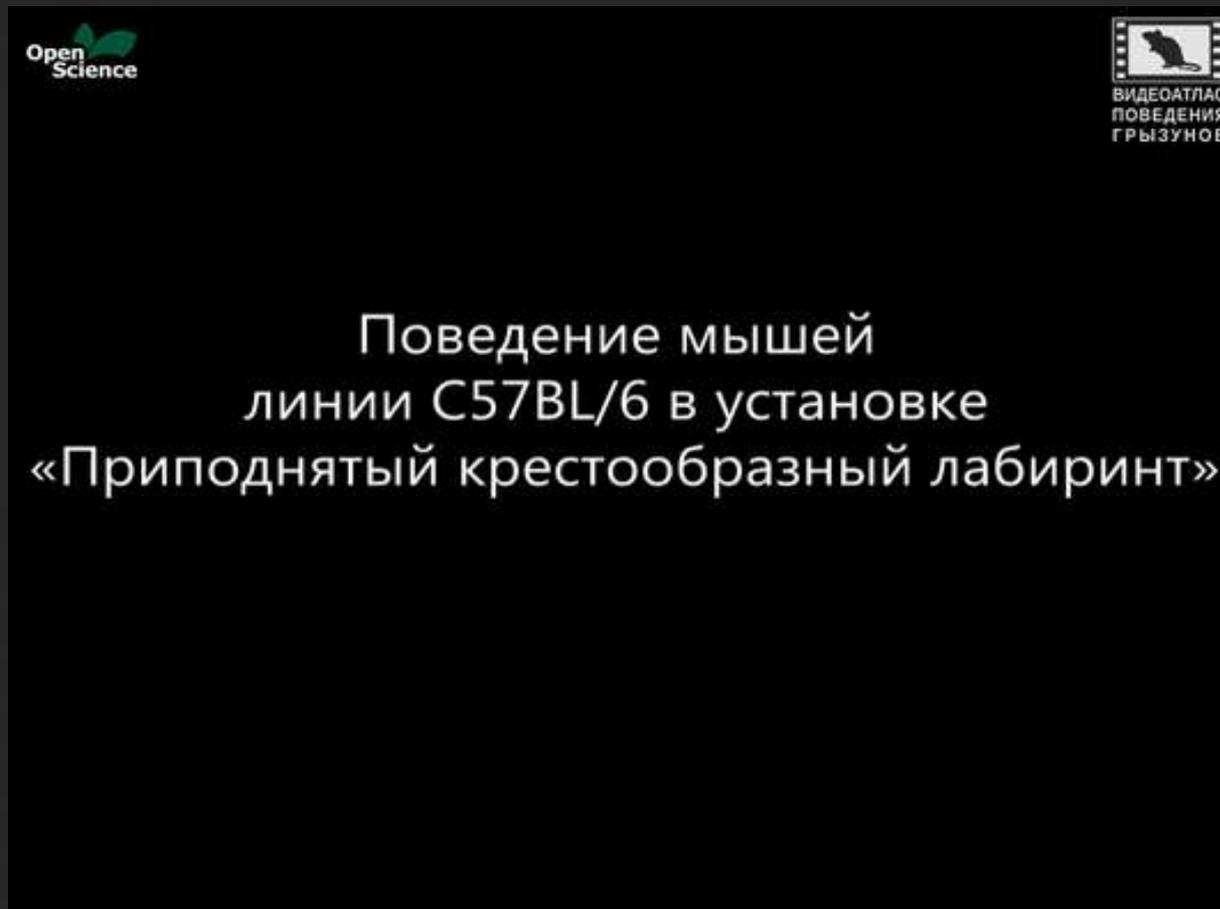
2. Поместить мышь на площадку, соединяющую открытый и закрытый рукава, мордой в сторону рукава, противоположного экспериментатору.



Посадка мыши в установку
«Приподнятый крестообразный лабиринт»
с помощью цилиндра

Съёмка проводилась в Виварно-экспериментальном комплексе
ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»

Позволить мыши свободно исследовать лабиринт
в течение 5 – 10 минут



Съёмка проводилась в Виварно-экспериментальном комплексе
ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»

3. Анализ данных обычно включает регистрацию числа заходов в открытые и закрытые рукава или времени пребывания в них.
Заходом в рукав считается пересечение его границы всеми четырьмя лапами.



Поведение мышей
линии C57BL/6 в установке
«Приподнятый крестообразный лабиринт»:
замедленное воспроизведение

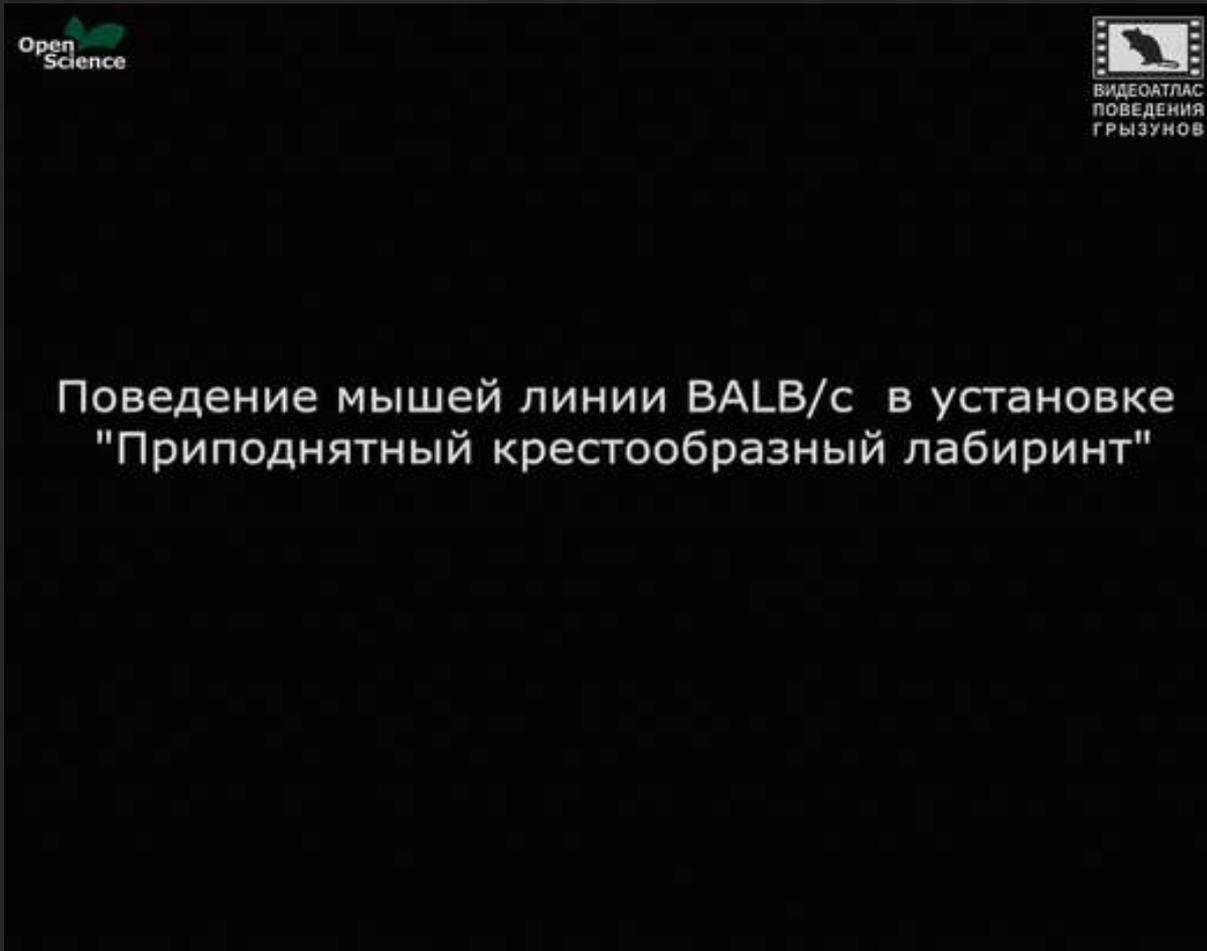
Съёмка проводилась в Виварно-экспериментальном комплексе
ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»

Генетические модели повышенной тревожности

- **BALB/c (мыши).** Высокий (по сравнению с мышами линии C57Bl/6) уровень тревожного поведения в открытом поле, темно-светлой камере, и приподнятом крестообразном лабиринте.
- **Wistar-Kyoto (WKY) (крысы).** Сниженная активность в открытом поле, сильнее, чем крысы линии Sprague-Dawley склонны к образованию стресс-вызванных язв желудка.
- **LAB/НАВ (крысы, мыши).** Повышенный уровень тревожного поведения в приподнятом крестообразном лабиринте и темно-светлой камере.

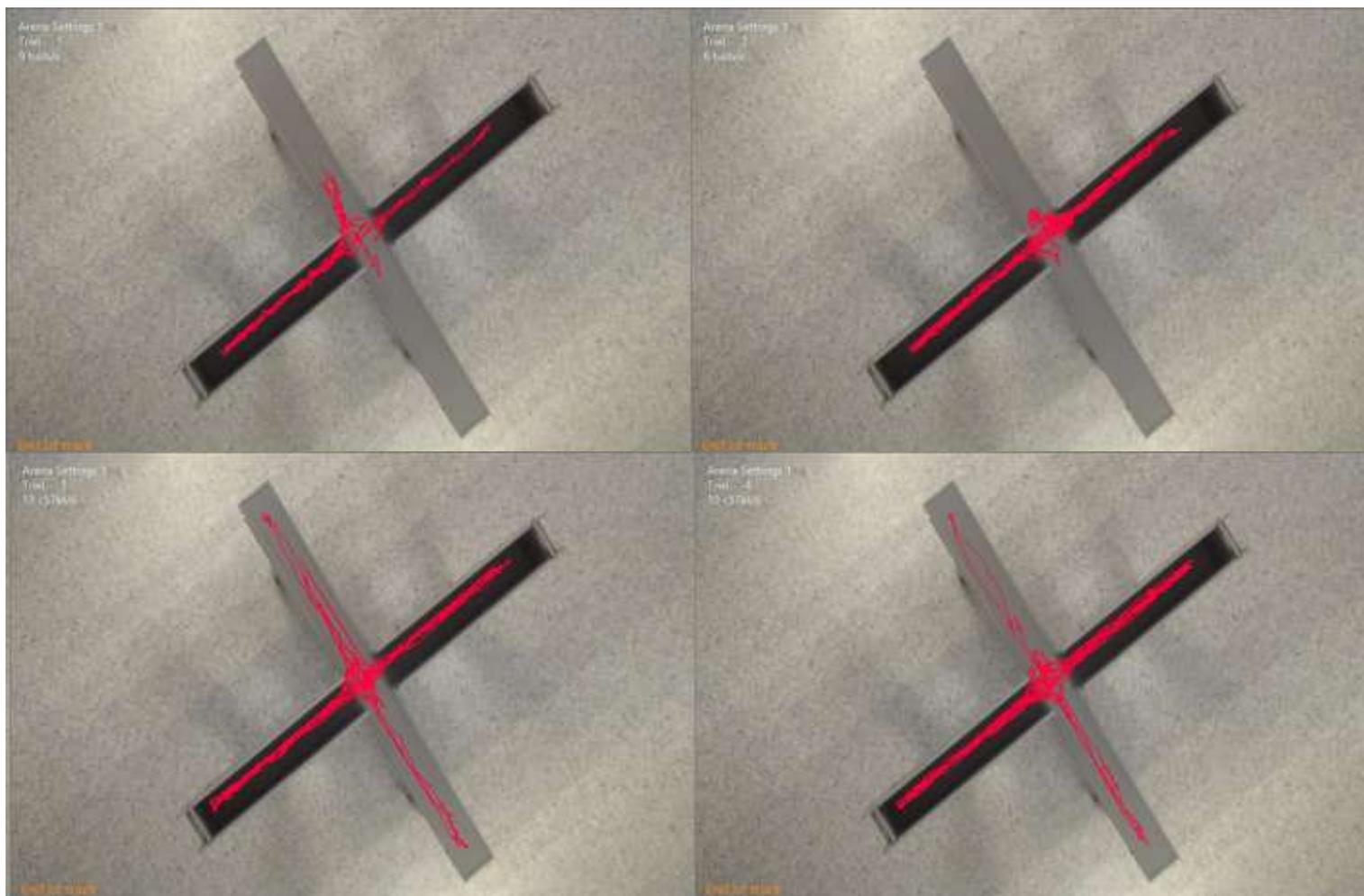


Поведение мышей линии BALB/c в «Приподнятом крестообразном лабиринте»



Съёмка проводилась в Виварно-экспериментальном комплексе
ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»

Мыши BALB/C и C57BL/6



Валидизация теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» для выявления уровня тревожности у крыс и мышей

СИМПТОМЫ

- Мыши и крысы избегают посещения открытых рукавов лабиринта. Другие проявления страха (замирание и дефекация) усиливаются в открытых и снижаются в закрытых рукавах лабиринта.

терапия

- Анксиогенные вещества снижают, а анксиолитики-увеличивают процент времени, которое животные проводят в открытых рукавах.

этиология

- Предпочтение открытых рукавов наблюдается у тех же животных, которые демонстрируют частые выходы в центр в тесте «яркое освещенное открытое поле». Уровень кортикостерона в плазме крови положительно коррелирует с выраженностью поведения «заглядывания» в открытый рукав.

Nature Protocols 2, - 322 - 328 (2007)

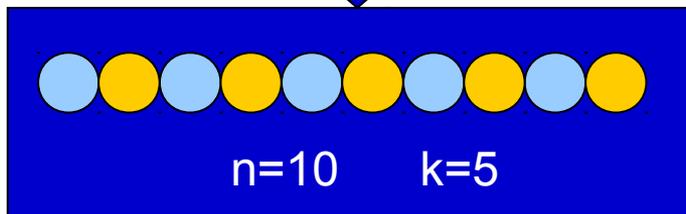
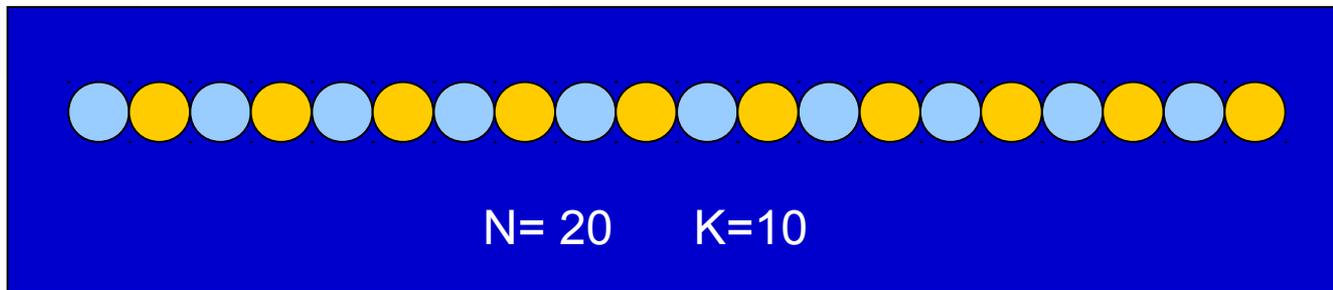
doi:10.1038/nprot.2007.44

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents

Alicia A Wolf & Cheryl A Frye

Вероятность вытащить "к" желтых шаров из ящика, где "К" желтых шаров (а всего "N")

Обработка данных

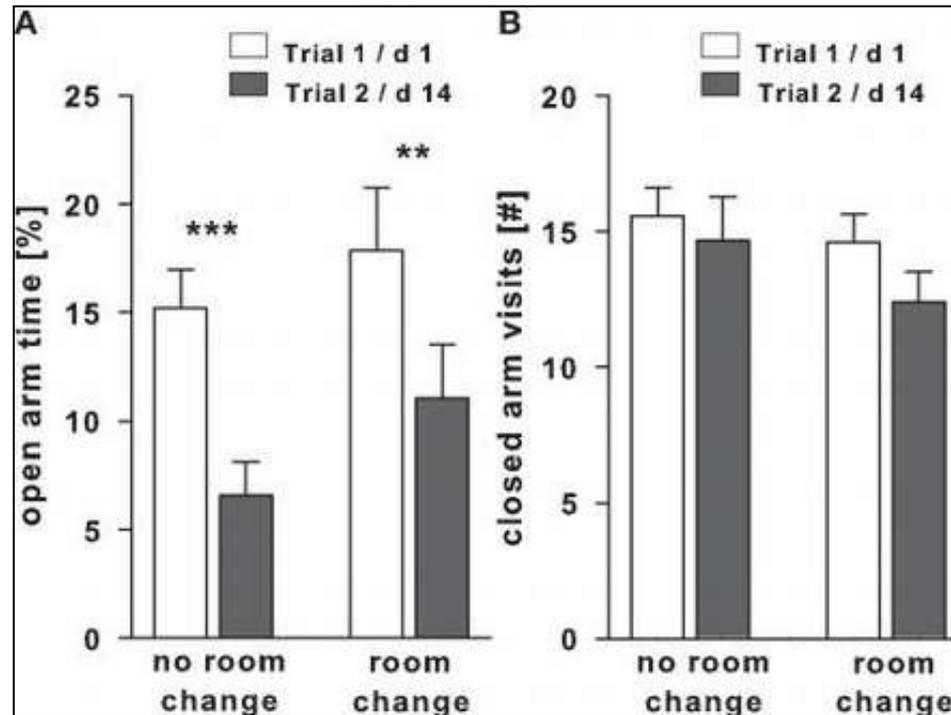


$$P(k, n, K, N) = \frac{C_K^k + C_{N-K}^{n-k}}{C_N^n}$$

$$C_N^n = \frac{N!}{n! * (N-n)!}$$

P=0.34

Обучение в ПКЛ: «толерантность с одной пробы»



Difference in (A) open arm time (%) and (B) number of visits into the closed arms in two groups of drug-naive rats tested on trial 2 (day 14) in either the same room or with a room change.

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents
Alicia A Walf and Cheryl A Frye

- **1. Перед работой убедитесь, что лабиринт очищен и высушен, а видеосистема слежения готова к использованию.**
- **2. Перед началом тестирования введите в протокол информацию о теме эксперимента, дате, инициалам экспериментатора, номеру животного и его состоянии.**
- **3. Животное, находящееся в индивидуальной транспортной клетке, занесите в экспериментальную комнату.**

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents

Alicia A Walf and Cheryl A Frye

- 4. Возьмите животное из клетки и посадите в центральную часть установки (на стыке открытого и закрытого рукавов). Морда животного должна быть обращена к открытому рукаву и в сторону, противоположную от экспериментатора, чтобы оно в начале движения животное не сталкивалось с рукой экспериментатора
- 5. В момент посадки животного запустите видеосистему слежения и таймер, установленный на 5 мин. Не рекомендуется запускать видеосистему слежения прежде, чем животное будет посажено в лабиринт. Видеосистема слежения будет автоматически записывать поведение животного в открытых и закрытых рукавах. Экспериментатор должен одновременно записывать число заходов в рукава и время, проведенное в открытых рукавах на специальных листах, ориентируясь на показания таймера.
- 6. В конце 5-мин тестирования удалите животное из лабиринта и верните его в транспортную клетку.
- 7. Очистите лабиринт сухими бумажными полотенцами перед посадкой следующего животного.
- **Важно! Выходом в открытый рукав считается момент, когда все четыре лапы животного находятся в открытом рукаве.**
- **Важно! Экспериментатор должен избегать лишних движений и не шуметь.**

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents

Alicia A Walf and Cheryl A Frye

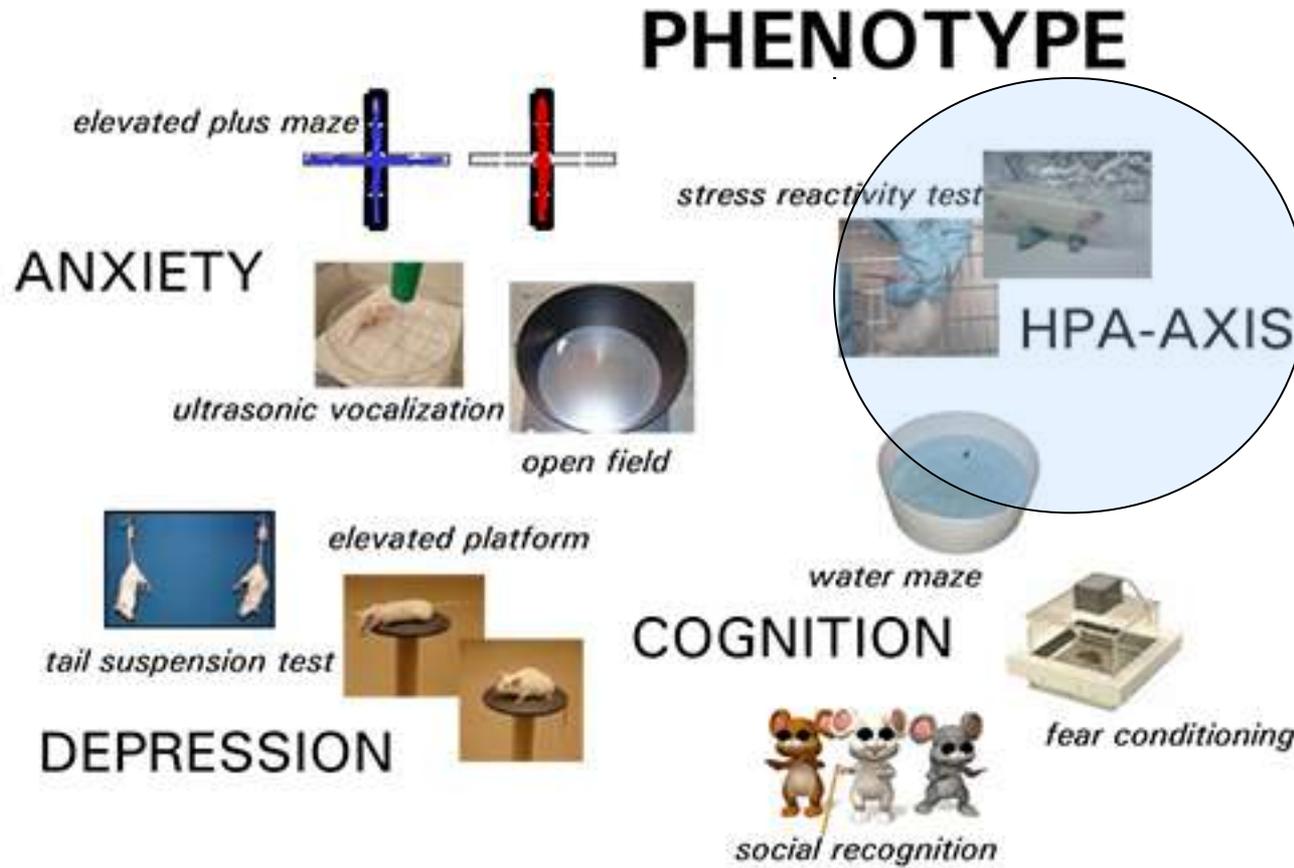
Проблемы.

- **Животное бегаёт вдоль бортика открытого рукава.** Такое поведение в норме может наблюдаться менее чем у 1% особей. В этом случае экспериментатор должен быстро приподнять животное и повторно посадить его на то же место, продолжив регистрацию. При последующей обработке данных такое животное должно быть исключено из эксперимента.
- **Животное неподвижно сидит в открытом рукаве.** Такое поведение в норме может наблюдаться у 1% особей. Такое поведение замирания может возникнуть в ответ на резкий звук и считается самостоятельным типом поведения, если его длительность превышает 100 сек (треть времени тестирования). Это должно быть отмечено экспериментатором, а полученные данные исключаются из обработки. Для снижения риска возникновения поведения замирания в лабиринте, экспериментатор должен избегать шума и движения. В нашей лаборатории мы информируем сотрудников, находящихся за пределами комнаты о необходимости соблюдать тишину. Кроме того, экспериментальная комната находится на расстоянии 25м от других помещений, а животные в их жилых клетках заблаговременно перевозятся к месту эксперимента на специальной тележке.

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents
Alicia A Walf and Cheryl A Frye

- Чтобы избежать различного рода обучения, а также стрессогенных воздействий, влияющих на поведение животных в лабиринте, важно, чтобы все экспериментальные животные были перед экспериментом рассажены в индивидуальные транспортные клетки (как это делается в нашей лаборатории), либо все животные вплоть до начала тестирования оставались в жилой клетке. Это соответствует основному принципу этологического анализа – соблюдение идентичности условий для всех животных.

HAB/LAB mice as an animal model to simulate anxiety disorders and comorbid depression



Благодарим за внимание

