

РАЗВИТИЕ СИМПТОМОВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА У ТРЕВОЖНЫХ САМЦОВ МЫШЕЙ: ВЛИЯНИЕ ДИАЗЕПАМА**Ирина Леонидовна КОВАЛЕНКО**

Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор нейрогенетики социального поведения; акад. Лаврентьева пр-кт, 10, Новосибирск, 639090, Россия, тел.: +7 383-363-49-65, e-mail: koir@bionet.nsc.ru

Наталья Николаевна КУДРЯВЦЕВА

Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор нейрогенетики социального поведения, зав. сектором, д-р биол. наук; акад. Лаврентьева пр-кт, 10, Новосибирск, 639090, Россия, тел.: +7 383-363-49-65, e-mail: natnik@bionet.nsc.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование: Известно, что нарушения психоэмоциональной сферы у человека могут сопровождаться нарушением социального поведения, снижением общительности и взаимодействия с другими индивидами. Ранее было показано, что хронический социальный стресс, вызванный повторным опытом социальных поражений в 10 ежедневных агонистических взаимодействиях, приводит к развитию состояния тревоги у побежденных самцов мышей. *Целью исследования было изучение* особенностей коммуникативного поведения по отношению к сородичам у тревожных самцов.

Методы: Для формирования состояния тревоги у самцов мышей была использована модель сенсорного контакта. Уровень тревожности оценивали в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Особенности коммуникативного поведения и общительности оценивали в тестах «социальные взаимодействия» и «перегородка» по поведенческой реакции (приближение–избегание) на партнера.

Результаты: Было показано, что тревожные самцы меньше подходят к незнакомому партнеру, демонстрируя поведение избегания при его приближении, исследовательская активность у них снижена. Количество эпизодов демонстрации аутогруминга у тревожных самцов повышено. Диазепам (0,5 мг/кг, в/б), вводимый побежденным животным в течение двух недель, существенно снизил уровень тревожности. При этом самцы после введения препарата меньше избегали партнера при его подходе по сравнению с особями, которым вводили физиологический раствор. Уровень общительности и исследовательская активность были практически полностью восстановлены до контрольного уровня. Диазепам не подействовал на число и длительность актов аутогруминга.

Заключение: Главным фактором, приводящим к выраженному нарушению коммуникативности, является высокий уровень тревожности, формирующийся под влиянием негативного социального опыта. Результаты продемонстрировали сходство выявленных нарушений в социальном поведении у побежденных самцов мышей с симптомами аутистического спектра у людей.

Получена: 06 июня 2010 г.; Принята: 22 июля 2010 г.

Цитирование этой статьи: Психофармакол биол наркол. 2010; 10 (1–2): 2624–2635

Корреспонденцию следует отправлять Наталии Николаевне Кудрявцевой natnik@bionet.nsc.ru

Ключевые слова

симптомы аутистического спектра; тревожность; хронический социальный стресс; модель сенсорного контакта; диазепам; мыши

ВВЕДЕНИЕ

Способность взаимодействовать с себе подобными является необходимой составляющей социального поведения и нормального развития индивида, живущего в сообществе. Полагают, что выраженные нарушения коммуникативности (отсутствие общительности, избегание социальных контактов) могут быть следствием аутизма, который относится к болезням развития нервной системы и проявляется, в основном, у детей в раннем возрасте [обзор, 1]. Аутизм характеризуется отклонениями в социализации и общении, неадекватным социальным поведением, а также ограниченным, повторяющимся поведением [2].

Полагают, что в развитии аутизма большую роль играют гены — взаимодействие многих генов, либо редкие мутации, оказывающие сильный эффект в пренатальном или раннем постнатальном периоде [обзоры, 3, 4, 5]. Однако многократно возросшие за последние годы случаи этого тяжелого заболевания невозможно объяснить только генетическими мутациями или наследственностью [обзор, 6], и необходимо принимать во внимание негативное влияние окружающей среды.

Кроме того, симптомы аутистического спектра могут появляться при самых различных заболеваниях [2], быть следствием нарушений психоэмоциональной сферы или возникать после негативного социального опыта. В этом случае при определенном развитии событий нарушение коммуникативности и социальной активности могут сохраняться длительное время, принимая хронический характер.

В настоящее время экспериментальные исследования сосредоточены на поисках адекватных моделей аутизма, для чего изучаются особенности социального поведения при взаимодействии с сородичами у мышей разных линий [обзоры, 7, 8] или же мышей, например, лишенных какого-либо гена (нокауты) [обзоры, 8, 9].

Степень общительности (коммуникативности) у животных оценивается по времени поведенческого реагирования на другую особь в условиях домашней клетки или на нейтральной территории [9, 10]. Если животные одной линии меньше реагировали на своего сородича, чем особи других линий, то предполагалось, что эта линия может быть использована для изучения механизмов аутизма и поисков способов его лечения.

Однако целенаправленного исследования состояний, сопровождающихся появлением симптомов аутистического спектра, возникших у

животных под влиянием негативных факторов социальной природы, в настоящее время не проводится ввиду отсутствия экспериментальных моделей.

Нами было показано, что хронический социальный стресс, вызванный повторным опытом социальных поражений (*chronic social defeat stress*) в ежедневных агрессивных взаимодействиях, приводит к развитию высокого уровня тревожности и снижению коммуникативности у побежденных самцов [11, 12].

Поведенческая реакция на партнера в соседнем отсеке экспериментальной клетки, разделенной прозрачной перегородкой с отверстиями, у них была существенно ниже по сравнению с поведением контрольных животных. Побежденные самцы переставали реагировать в этой ситуации как на знакомого, так и на незнакомого партнера [обзор, 10], возможно, в результате обучения негативному социальному опыту при взаимодействии с агрессивным партнером в условиях общей клетки, в которой проходили агонистические взаимодействия.

В этой работе были поставлены другие вопросы: влияет ли высокий уровень тревожности у мышей на коммуникативность в новых условиях, не несущих угрозу для особи? Если да, то можно ли нарушения в общительности и социальной активности у мышей рассматривать в качестве симптомов аутистического спектра? Кроме того, необходимо было понять, является ли состояние тревоги главным фактором нарушения социальных взаимодействий?

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животных разводили и содержали в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН при световом режиме 12 : 12 часов (свет : темнота). Стандартный гранулированный корм (НПО «Сельскохозяйственные технологии», Москва) и воду они получали *ad libitum*. После отсаживания от матерей в возрасте 1 мес. мышей содержали в группе по 8–10 особей в клетках 36 × 23 × 12 см до периода половой зрелости. Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 2,5–3 мес. и массой тела 27–32 г.

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (*European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)*).

Формирование тревожного состояния у самцов мышей

Для формирования состояния тревожности у самцов мышей использовали модель сенсорного контакта [13]. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, позволявшей мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращавшей физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (14.00–17.00 час) убирали перегородку, что проводило к межсамцовым конфронтациям. Во время первых 2–3 тестов выявляли победителей (агрессоров), и особей, терпящих поражения (побежденные самцы, жертвы) при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время агрессивных столкновений длились более 3-х минут, взаимодействие самцов прекращали, вновь устанавливая между ними перегородку. В других ситуациях тест продолжался 10 минут. В результате, после 10-ти дней социальных поражений в агонистических взаимодействиях у побежденных особей развивался высокий уровень тревожности [11].

Поведенческие тесты

Тест «перегородка» [обзор, 10] количественно оценивает поведенческую активность самцов возле прозрачной перфорированной перегородки, разделяющей на две половины общую клетку, в реакции на партнера в соседнем отсеке. В данном тесте регистрировали число подходов к перегородке, за которой находился знакомый агрессивный самец, длительность нахождения возле нее в течение 5-минутного наблюдения и среднее время пребывания возле перегородки за один подход. Затем на место знакомого самца (агрессора) подсаживали незнакомого самца и регистрировали те же параметры поведения в течение еще 5 минут. При этом фиксировали периоды когда экспериментальные мыши находились возле перегородки, приюхиваясь к соседу, касались передними лапами или перемещались вдоль нее, грызли отверстия, демонстрируя желание преодолеть перегородку. В качестве незнакомой особи, по отношению к которой изучали поведенческую реакцию у тревожных и контрольных мышей в

тесте «перегородка» и далее в тесте «социальные взаимодействия», мы использовали половозрелых, наивных самцов того же возраста, веса и линии, проживавших до тестирования в группе по 8–10 животных. Тест «перегородка» использовали один раз в конце 10-дневных конфронтаций.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), поведение в котором чувствительно к действию анксиогенных и анксиолитических препаратов, является одним из наиболее общепринятых тестов для оценки тревожного состояния у грызунов [14]. Лабиринт приподнят над полом на 50 см и состоит из двух открытых и двух закрытых (огороженных с трех сторон) рукавов. Тестирование проводили в течение 5 минут в слабо освещенной комнате. Животное помещали в центр лабиринта, носом в закрытый рукав и регистрировали время (длительность) нахождения в открытых рукавах, центре и закрытых рукавах лабиринта (данные представлены в процентах от общего времени тестирования); число выходов/входов в открытые рукава, центр и закрытые рукава, выраженное, как и время, в процентном соотношении; общее число входов/выходов в рукава и центр; число переходов из одного закрытого рукава в другой; число заглядываний под лабиринт и выглядываний из закрытого рукава. После каждого животного лабиринт мыли в нескольких водах и высушивали чистыми салфетками.

Тест «социальные взаимодействия» был разработан нами для количественной оценки социального поведения животных по отношению к незнакомому партнеру. Тест является модификацией аналогичного теста для крыс, который использовался ранее для выявления анксиолитических свойств препаратов [15]. Исследуемую особь и незнакомое самца (тестера) сажали на нейтральную территорию — в чистую клетку размером 36 × 23 × 12 см, помещая их одновременно в противоположные углы клетки. Эта клетка обычно используется для содержания животных и потому не является для них пугающей, в ней не было подстилки, корма и каких-либо других предметов, которые бы могли вызвать исследовательскую активность. При тестировании выделяли следующие формы социального поведения: 1) избегание незнакомое партнера или же замирание при его подходе; 2) общительность — поведение, направленное на приближение к партнеру: подходы, обнюхивание, следование за партнером; 3) исследовательская активность (вставания на задние лапы); 4) аутогруминг, рассматриваемый обычно в качестве показателя смещенной актив-

ности в новых условиях. Оценивали число и суммарное время проявления поведенческих актов за время 10-минутного теста. После тестирования каждой пары животных клетку мыли в нескольких водах и высушивали чистыми салфетками.

Общим правилом в наших экспериментах является использование периода активации перед тестированием поведения, для чего животных приносили в специальную комнату, заменяли обычную крышку клетки на прозрачное оргстекло, и оставляли на 5 минут для привыкания к условиям другого освещения и активации. Во время теста осуществлялась видеозапись поведения животных с последующей обработкой видеоматериалов.

Для ответа на вопрос, является ли состояние тревоги фактором нарушения социальных взаимодействий, был использован анксиолитик диазепам с отслеживанием его влияния на особенности коммуникативного поведения животных в разных тестах. Предварительно подобранную дозу диазепама (в/б, 0,5 мг/кг, «Релиум», Polfa Tarchomin S.A.) начинали вводить мышам после 10 дней социальных взаимодействий.

На период введения препаратов агонистические взаимодействия прекращались (перегородку не убрали). Сравнивали три группы животных: побежденные самцы с хроническим введением физиологического раствора и диазепама в течение 14 дней, а также контрольные особи без опыта социальных взаимодействий.

После установления нормальности распределения в выборках всех исследуемых параметров в соответствии с Shapiro–Wilk's W test, была проведена статистическая обработка данных с применением критерия Стьюдента и корреляционного анализа. Уровень достоверности считали значимым при $p \leq 0,05$. В экспериментальных группах было 12–13 животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест «Перегородка»

Исследование показало, что у побежденных самцов после 10 дней негативного социального опыта число подходов к перегородке в реакции как на знакомого, так и незнакомого самца не отличалось существенно от таковых показателей у контроля ($p > 0,05$). В то же время общее и среднее время пребывания возле перегородки у них были существенно ниже (для всех показателей $p < 0,001$) (рис. 1). После хронического введения диазепама число подходов к перего-

родке в реакции на незнакомого партнера было ниже по сравнению с числом подходов у контроля и побежденных самцов, которым вводили физиологический раствор ($p < 0,001$ и $p < 0,01$, соответственно). При этом параметры общего времени пребывания возле перегородки в реакции на знакомого партнера, а также среднего времени реакции на знакомого и незнакомого партнера стали выше (для всех показателей $p < 0,001$), не отличаясь существенно от контроля ($p > 0,05$).

После введения диазепама общее время пребывания в реакции на незнакомого партнера становилось также существенно больше у побежденных самцов по сравнению с поведением самцов после введения физиологического раствора ($p < 0,01$), однако значение этого показателя все же не достигло контрольного уровня ($p < 0,05$).

Приподнятый крестообразный лабиринт

Опыт социальных поражений привел к изменению основных параметров поведения в тесте ПКЛ, оценивающих состояние тревожности. По сравнению с контролем у побежденных самцов стали ниже значения числа выходов и времени, проведенном в открытых рукавах (выраженные в %, для обоих показателей $p < 0,001$) и в центре ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно) (таблица). Эти показатели для закрытых рукавов у побежденных самцов стали существенно выше (для обоих показателей $p < 0,001$). Значения параметров чисел выглядываний из закрытого рукава, переходов из одного закрытого рукава в другой и заглядываний под лабиринт у побежденных самцов были существенно меньше ($p < 0,01$; $p < 0,001$ и $p < 0,05$, соответственно) по сравнению с контролем.

У побежденных животных с введением диазепама по сравнению с особями с введением физиологического раствора параметры числа выходов ($p < 0,05$) и продолжительности пребывания ($p < 0,001$) в открытых рукавах были выше, а числа заходов и пребывания в закрытых рукавах (для обоих показателей $p < 0,05$) были ниже. Однако по сравнению с контролем у побежденных самцов, которым вводили диазепам, были обнаружены различия по числу заходов и времени пребывания в открытых (для обоих показателей $p < 0,05$) и закрытых ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, соответственно) рукавах лабиринта.

Число выходов и время пребывания в центре после введения диазепама были восстановлены полностью — не было обнаружено различий по этим показателям от контроля ($p > 0,05$), однако

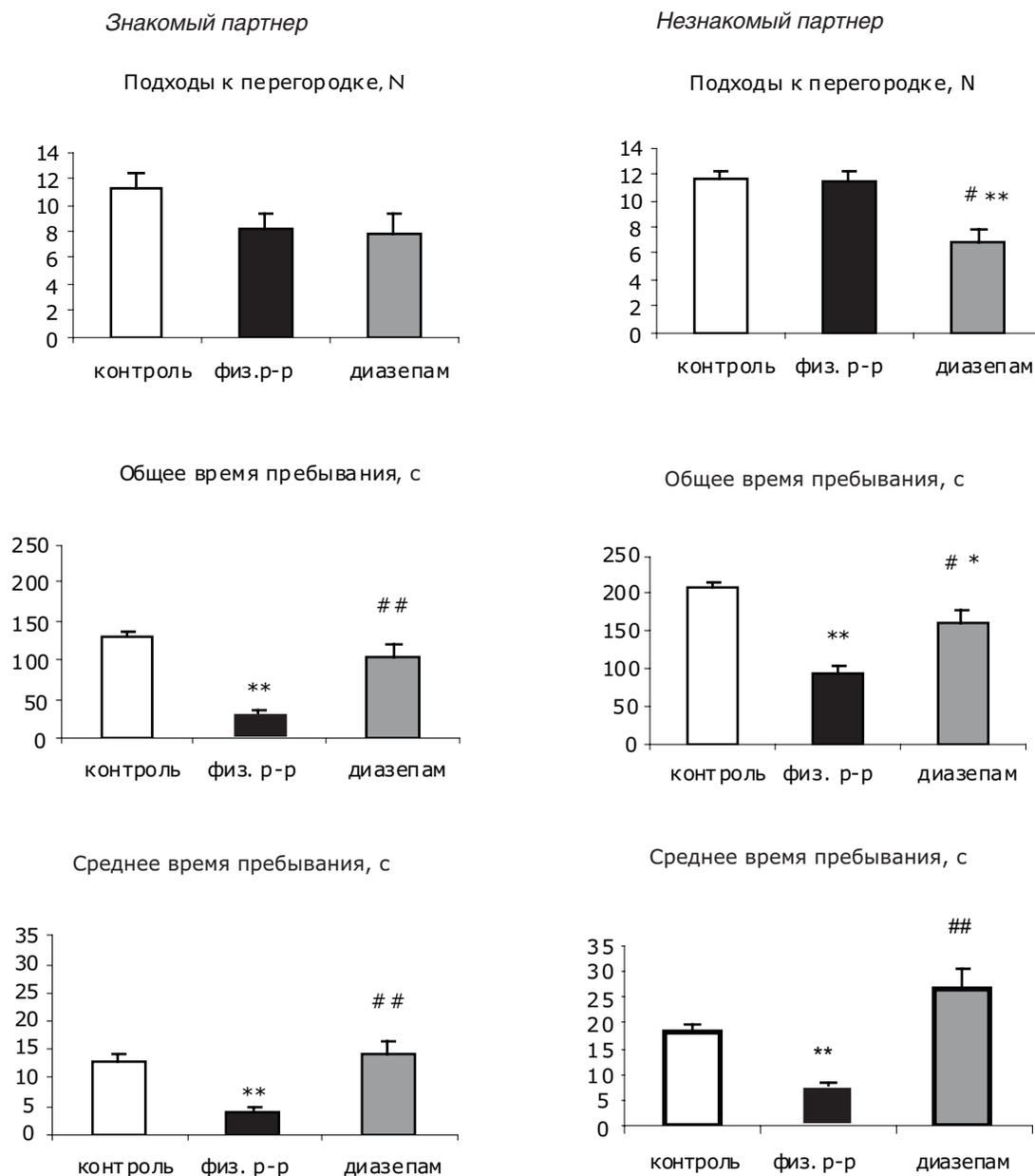


Рис. 1

Поведение самцов мышей экспериментальных групп (контроль, побежденные самцы после хронического введения физ. раствора и диазепама) в тесте «перегородка» в реакции на знакомого и незнакомого партнера: * $p < 0,5$, ** $p < 0,001$ — по сравнению с контролем; # $p < 0,01$; ## $p < 0,001$ — по сравнению с побежденными самцами, получавшими физ. раствор

Fig. 1

Behavior of the controls (контроль) and defeated mice after chronic saline (физ. р-р) and diazepam (диазепам) treatment in the partition test in the reaction to familiar (знакомый) and unfamiliar (незнакомый) partners: * $p < 0.5$, ** $p < 0.001$ — vs controls; # $p < 0.5$, ## $p < 0.001$ — vs defeated mice, treated with saline

Таблица

Поведение самцов мышей экспериментальных групп в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (plus maze test)

Параметры поведения	Контроль (controls)	Побежденные самцы физ. р-р (saline)	Побежденные самцы диазепам (diazepam)
Открытые рукава, %, N	10,7 ± 1,5	2,1 ± 1,2 ***	6,1 ± 1,2 * #
Открытые рукава, %, с	4,9 ± 1,2	0,2 ± 0,1 ***	1,9 ± 0,4 *##
Центр, %, N	45,9 ± 0,7	35,2 ± 4,9*	44,4 ± 1,0
Центр, %, с	13,2 ± 1,0	6,0 ± 1,7 **	10,8 ± 1,6
Закрытые рукава, %, N	43,4 ± 1,5	62,7 ± 4,9 ***	49,5 ± 1,6 ** #
Закрытые рукава, %, с	81,8 ± 1,7	93,8 ± 1,7 ***	87,2 ± 1,8 * #
Выглядывания, N	14,2 ± 1,0	9,7 ± 1,2 **	7,9 ± 1,1 ***
Переходы, N	9,2 ± 0,7	2,5 ± 1,1 ***	4,9 ± 0,9 **
Заглядывания, N	5,3 ± 1,1	2,0 ± 0,6 *	0,8 ± 0,2 ***

Примечание: * — $p < 0,5$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ — по сравнению с контролем (vs controls); # — $p < 0,5$, ## — $p < 0,001$; — по сравнению с побежденными самцами, получавшими физ. раствор (vs saline treated defeated males)

при этом сохранялись различия по числу выглядываний из закрытых рукавов ($p < 0,001$), переходов из одного закрытого рукава в другой ($p < 0,01$) и числу заглядываний под лабиринт ($p < 0,001$).

Социальные взаимодействия

Для того, чтобы оценить характер поведения мышей на нейтральной территории были выделены четыре формы поведения, которые, на наш взгляд, проходят на фоне разных мотивационных составляющих — общительность, избегание, вставания на задние лапы и аутогруминг.

Прежде всего, необходимо было определить ассоциативность этих форм поведения, то есть насколько они являются взаимосвязанными и/или отражают разные формы поведения и мотивационные составляющие. Корреляционный анализ не выявил достоверной взаимосвязи между параметрами (число и длительность) следующих форм поведения у интактных мышей: избегание—общительность, избегание—аутогруминг, избегание—вставание на задние лапы, общительность—аутогруминг, общительность—вставание на задние лапы, аутогруминг—вставание на задние лапы ($p > 0,05$).

Достоверные коррелятивные взаимосвязи были обнаружены между числом актов проявления общительности и вставаний на задние лапы ($R = 0,697$; $p < 0,05$), что свидетельствует об общей мотивационной компоненте этих форм поведения — исследовательской активности. Чтобы определить в какой степени выделенные нами

формы поведения отражают уровень тревожности, был проведен корреляционный анализ основных поведенческих параметров в тестах «социальные взаимодействия» и ПКЛ. У контрольных животных достоверных корреляций между поведенческими параметрами обнаружено не было, за исключением одной — между числом демонстрации поведения избегания и временем, проведенным в центре лабиринта ($R = 0,638$; $p < 0,05$). У животных, потерпевших социальные поражения, были обнаружены достоверные корреляции между параметрами времени избегания и числа заходов в закрытые рукава ($R = 0,805$; $p = 0,002$) и в центр ($R = -0,746$; $p = 0,005$). Число и время демонстрации общительности позитивно коррелировали с числом выходов в центр ($R = 0,617$; $p < 0,033$; $R = 0,658$; $p = 0,020$, соответственно) и отрицательно с числом заходов в закрытые рукава ($R = -0,633$; $p = 0,027$; $R = -0,595$; $p = 0,041$, соответственно). У побежденных самцов, которым вводили диазепам, не было обнаружено каких-либо достоверных корреляций между параметрами теста «социальные взаимодействия» и тестом ПКЛ ($p > 0,05$).

Корреляционный анализ поведенческих параметров в тестах «социальные взаимодействия» и «перегородка» показал, что у контрольных самцов достоверно коррелирующими оказались параметры времени демонстрации общительности и общего времени, проведенного возле перегородки в реакции на незнакомого партнера ($R = 0,766$, $p = 0,010$). У побежденных животных были обнаружены достоверные

корреляции между числом избеганий и средним временем пребывания возле перегородки в реакции на знакомого ($R = 0,749, p = 0,005$) и незнакомого ($R = 0,579, p = 0,048$) партнера. У животных после введения диазепама были найдены достоверные отрицательные корреляции между параметрами общего времени пребывания возле перегородки в реакции на незнакомого партнера и числом избеганий ($R = -0,692, p = 0,009$), а также временем демонстрации аутогруминга ($R = -0,743, p = 0,004$).

Большую часть времени контрольные животные демонстрировали поведение вставания на задние лапы и общительность (39 и 42 %, соответственно), избегание партнера и эпизоды аутогруминга у них были выражены в очень незначительной степени (7 и 11 %, соответственно). У побежденных самцов, наоборот, в поведении

преобладали демонстрация аутогруминга (26 %) и избегания (49 %). Время проявления общительности и вставания на задние лапы составляли 9 и 15 %, соответственно. Диазепам эти соотношения приближал к норме (вставание на задние лапы — 30 % времени, общительность — 36 %, аутогруминг — 20 % и избегание — 14 %).

Эти соотношения между выделенными формами поведения сохранялись и по абсолютным показателям исследуемых параметров (рис. 2). По сравнению с контролем у побежденных самцов было существенно больше число актов и время демонстрации поведения избегания (для обоих показателей, $p < 0,001$), а также длительность демонстрации актов аутогрумингов ($p \leq 0,05$). Показатели общительности — число подходов к партнеру и время пребывания возле него и следования за ним были существенно меньше (для

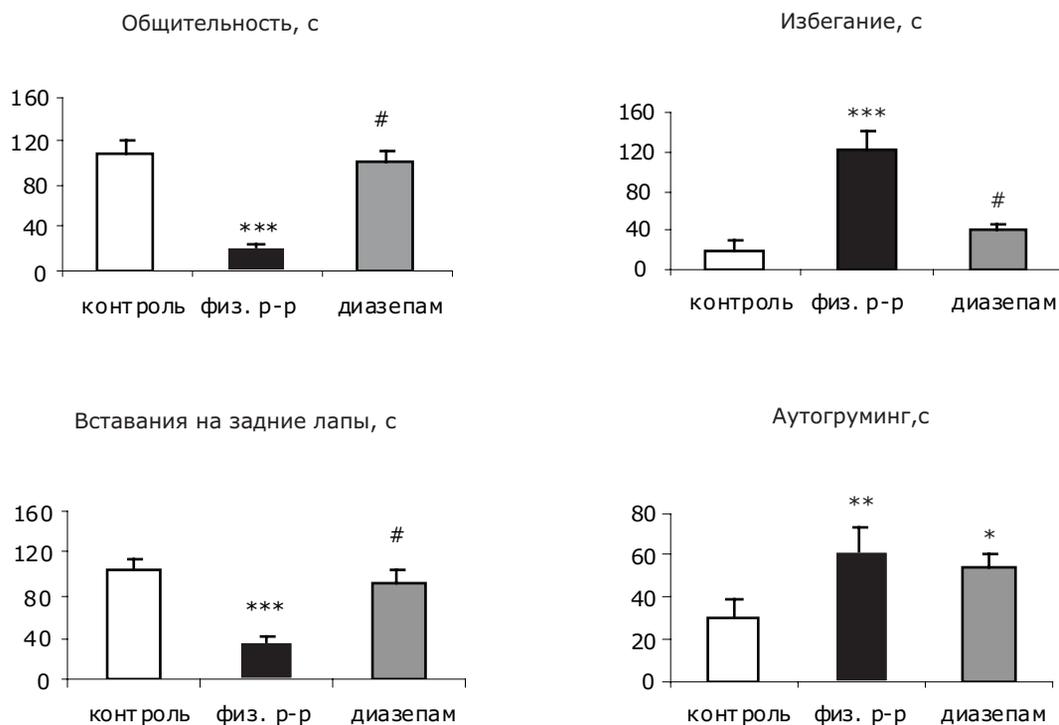


Рис. 2

Поведение самцов мышей экспериментальных групп (контроль, побежденные самцы после хронического введения физ. раствора и диазепама) в тесте «социальные взаимодействия». Представлены данные по времени проявления соответствующих форм поведения: * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ — по сравнению с контролем; # $p < 0,001$ — по сравнению с побежденными самцами, получавшими физ. раствор

Fig. 2

Behavior of the controls (контроль) and defeated mice after chronic saline (физ. р-р) and diazepam (диазепам) treatment in social interaction test: * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ — vs controls; # $p < 0,001$ — vs defeated mice, treated with saline

обоих показателей, $p < 0,001$), также как число и длительность позы «вставания на задние лапы» ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно).

По отношению к побежденным самцам, которым вводили физиологический раствор, параметры числа и времени проявления избегания (для обоих показателей $p < 0,001$) после введения диазепама были ниже, а параметры общительности (для обоих показателей, $p < 0,001$), вставаний на задние лапы ($p < 0,05$ и $p < 0,001$, соответственно) были выше. Число и время демонстрации актов аутогруминга не изменились (для обоих показателей, $p > 0,05$).

Сравнение показателей поведения у животных после введения диазепама с таковыми у контроля показало полное восстановление до нормы времени демонстрации общительности ($p > 0,05$) и избегания ($p > 0,05$), числа и времени вставаний на задние лапы (для обоих показателей, $p > 0,05$). Не достигли уровня контроля после введения диазепама показатель числа демонстрации избегания партнера ($p < 0,01$) и общительности ($p < 0,05$). Данные по показателю числа форм поведения на рисунке не представлены.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как и ранее в наших экспериментах [10–12], повторный негативный опыт социальных взаимодействий привел к развитию у мышей высокого уровня тревожности, оцениваемого основными параметрами теста ПКЛ: число выходов и время нахождения в открытых рукавах и в центре были существенно меньше, а число выходов и время пребывания в закрытых рукавах у побежденных самцов были существенно больше, чем в контроле. Также были снижены число переходов из одного закрытого рукава в другой и параметры риска — число выглядываний из закрытых рукавов и заглядываний под лабиринт. При этом было обнаружено снижение уровня коммуникативности в тесте «перегородка» — время реагирования на знакомого и незнакомого партнера в соседнем отсеке у побежденных животных было существенно ниже, чем у контрольных особей.

Снижение времени поведенческой реакции даже на незнакомого партнера в тесте «перегородка» может быть признаком избегания социальных контактов. Надо отметить, что снижение коммуникативности и повышение тревожности развивается у побежденных самцов с первых дней социальных взаимодействий.

Ранее было показано, что параметры поведения возле перегородки и параметры теста ПКЛ у интактных мышей являются коррелирующими показателями [16]. Это позволило нам утверждать, что поведение возле перегородки в реакции на другого партнера также может отражать и уровень тревожности. Корреляционный анализ показателей теста «социальные взаимодействия», с одной стороны, и показателей тестов «перегородка» и ПКЛ, с другой, не выявил достоверных взаимосвязей у контрольных животных по большинству параметров. Этот факт свидетельствует о том, что поведение в тесте «социальные взаимодействия» изначально не обусловлено состоянием тревоги как таковой, а параметры теста отражают особенности поведения особей в новых условиях нейтральной клетки. Это и понятно, поскольку эмоциональный фон, по крайней мере общительности (подходы к партнеру и следование за ним) и активного избегания и реакция страха — замирание при подходе — противоположный — позитивный и негативный, соответственно. Достоверная корреляция была обнаружена в тесте «социальные взаимодействия» только для показателей времени и числа вставаний на задние лапы и времени демонстрации общительности, что позволяет предположить для этих форм поведения общую мотивационную составляющую — исследовательскую компоненту поведения, проявляющуюся и по отношению к незнакомому партнеру, и по отношению к новой ситуации.

После негативного социального опыта показатели теста «социальные взаимодействия» уже достоверно коррелируют с показателями тревожности в ПКЛ: чем больше такие животные заходят в закрытые рукава и меньше времени проводят в центре, тем больше они избегают партнера при его подходе. Показатели общительности в тесте «социальные взаимодействия» и параметры тревожности в тесте ПКЛ, находятся в обратной зависимости.

Таким образом, данные свидетельствуют о том, что негативный опыт социальных поражений, вслед за развитием высокого уровня тревожности, нарушает и социальные взаимодействия даже по отношению к незнакомому партнеру при взаимодействии с ним на нейтральной территории. Это прямо указывает на состояние тревоги как фактор, приводящий к нарушению социальности животных; снижению общительности и избеганию нового неагрессивного партнера, что может рассматриваться как неадекватное поведение.

Хроническое введение широко используемого анксиолитика диазепама в течение двух недель снижало уровень тревожности, оцениваемый основными показателями теста ПКЛ, хотя и не всегда приближая его к таковому у контрольных животных. Однако нужно отметить, что дополнительные показатели — число выглядываний из закрытых рукавов лабиринта и число заглядываний под лабиринт, которые считаются показателями оценки риска, а также число переходов из одного закрытого рукава в другой практически не изменились под влиянием диазепама, сохраняясь на уровне таковых у побежденных животных с введением физиологического раствора. Это свидетельствует о том, что эти формы поведения вряд ли включают в себя состояние тревоги как мотивационную компоненту поведения.

Под влиянием диазепама коммуникативное поведение в тесте «перегородка» изменяется в позитивную сторону: общее время пребывания возле перегородки стало практически на уровне контроля. После введения препарата число подходов к перегородке в реакции на незнакомого партнера снизилось по сравнению с поведением контрольных животных, однако это произошло за счет увеличения среднего времени пребывания возле перегородки за один подход. Это значит, что интерес к партнеру после диазепама стал даже несколько выше, чем у контрольных животных. Этот факт интересен сам по себе, позволяя предлагать диазепам в качестве препарата, восстанавливающего коммуникативность.

В тесте «социальные взаимодействия» также был выявлен позитивный эффект диазепама. Показатели общительности, исследовательской активности (вставания на задние лапы) и избегания партнера были равны аналогичным параметрам у контроля, возвращаясь после инъекций препарата к норме. Таким образом, данные позволяют сделать вывод, что диазепам, снижая уровень тревожности, значительно улучшает социальную активность и взаимодействие побежденных самцов с сородичами. В целом, можно сделать вывод, что фактором, вызывающим нарушение общительности, по крайней мере в условиях нашей модели, является состояние тревоги. При его купировании восстанавливаются и социальные контакты и интерес к партнеру.

Поскольку нарушения в коммуникативности наблюдаются при аутизме, то возникает вопрос — в какой степени изменения в социальном поведении у мышей, вызванные влиянием негативного социального опыта, соответствуют тому, что на-

блюдается у людей? Согласно международной классификации болезней [2] диагностическим признаком аутизма является триада симптомов: недостаток социальных взаимодействий, нарушенная коммуникативность и высокий уровень повторяющихся форм поведения (*repetitive behavior*). Эти основные симптомы могут сопровождаться ограниченностью интересов и изменением социальной активности. По сути, в поведении побежденных самцов мышей просматриваются все симптомы аутистического спектра. Так, показано нарушение социальных взаимодействий. Побежденные животные демонстрируют, в основном, активные и пассивные формы избегания при подходе незнакомца и низкий уровень общительности, что свидетельствует не только о снижении коммуникативности, но и развитии неадекватного поведения даже по отношению к миролюбивому партнеру в ситуации, не несущей угрозы. Внимания заслуживает поведение аутогруминга, демонстрация которого у побежденных самцов выражена сильнее, чем у контрольных особей. Этот показатель мы рассматриваем, как правило, в качестве показателя смещенной активности у наших животных, помещенных в новые стрессорные условия, но он может быть и маркером появления повторяющихся форм поведения — одного из симптомов аутизма. Отмечают, что после длительного социального стресса наблюдается также дезорганизация этой формы поведения [17]. Надо отметить, что все изменения в поведении, вызванные хроническим социальным стрессом, носят выраженный характер. Они не проходили даже после содержания животных в течение 14 дней без агонистических взаимодействий — различия между поведением у контрольных самцов и побежденных животных все еще оставались значительными. Также у таких животных отмечали и сниженную исследовательскую активность: интерес к незнакомой особи и к новому нейтральному предмету в условиях домашней клетки [18] у них был существенно меньше, чем в контроле.

Таким образом, полученные данные дают основание полагать, что у животных под влиянием негативного социального опыта формируется состояние, при котором проявляются практически все основные симптомы аутистического спектра, появление которых вызвано высоким уровнем тревожности, развившейся в результате хронического социального стресса.

Сходное состояние у людей может быть классифицировано как социальный аутизм, то есть аутизм, вызванный негативным социаль-

ным опытом. Можно также рассматривать нарушения в коммуникативности как симптомы аутистического спектра, которые сопровождают развитие многих заболеваний у людей.

Стоит отметить, что по разным сведениям тревожные расстройства находят у 11–84 % детей с аутистическими симптомами [19, 20]. Хотелось бы обратить внимание на возможность использования нашего подхода и для изучения молекулярных механизмов аутизма или, если говорить осторожнее, молекулярных механизмов развития симптомов аутистического спектра. Наши предыдущие исследования показали, что повторный опыт социальных поражений приводит к увеличению экспрессии генов моноаминоксидазы и серотонинового транспортера в среднем мозге побежденных самцов [21]. Другие авторы также показали изменение экспрессии многих других генов в разных структурах головного мозга у животных после однократного или повторного опыта социальных поражений [22, 23, 24]. При этом, сниженная коммуникативность [25] и измененная экспрессия генов у животных могут длительно сохраняться после прекращения агонистических взаимодействий [22, 26].

Полагают, что аутизм возникает под влиянием взаимодействия множества генов, либо при наличии редких мутаций [3] или эпигенетических изменений [5]. Предлагаются и более сложные механизмы генетических влияний при аутизме [27, 28]. В то же время формируется мнение, что аутизм представляет собой сложное расстройство, вызванное многими причинами, часто действующими одновременно [1], причем, основы расстройства закладываются на ранних стадиях развития [29, 30], возникая, например, под влиянием пренатального стресса [31]. Полагают, что факторами предрасположенности к развитию аутизма или появлению расстройств аутистического спектра могут выступать нарушения в диете, развитие некоторых болезней, токсические воздействия, инфекционные заболевания и множество других причин [обзор, 6]. Складывается впечатление, что необходимо уделять больше внимания внешним факторам среды как возможной причине развития симптомов аутистического спектра, принимая во внимание не только генетические механизмы.

В качестве гипотезы можно предположить, что негативное воздействие, полученное в пренатальном и/или раннем постнатальном периоде развития, может изменять экспрессию некоторых генов, приводя к появлению аути-

стической симптоматики. Изменение экспрессии генов может возникать под влиянием среды и в более поздний период. О возможности такого тотального воздействия свидетельствуют эксперименты по изучению молекулярных последствий хронического социального стресса.

Можно полагать, что изменения функционального состояния «специфических генов аутизма» или генов медиаторных систем, которые вовлечены в механизмы коммуникативности и/или ассоциированных форм поведения и длительно сохраняющие измененную экспрессию, могут создать видимость наследственно-обусловленного дефекта коммуникативности, который при выраженном проявлении может быть диагностирован как аутизм. Эти представления открывают новые перспективы в исследовании молекулярных механизмов аутизма и поиска способов его коррекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Негативный социальный опыт, полученный в агонистических взаимодействиях, приводит к развитию выраженного уровня тревожности, снижению общительности, увеличению поведения избегания других особей, а также появлению повторяющих форм поведения у самцов мышей. Диазепам, вводимый побежденным животным в течение двух недель, существенно снизил уровень тревожности и проявление поведения избегания партнера, а также практически полностью восстановил уровень общительности и исследовательскую активность.

Предполагается, что фактором, приводящим к выраженному нарушению коммуникативности у мышей, является высокий уровень тревожности. Результаты продемонстрировали сходство выявленных изменений в социальном поведении у побежденных мышей с симптомами аутистического спектра у людей.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы благодарят Г.Б. Вишневскую за продуктивное обсуждение статьи.

Исследование проведено при поддержке фонда «Фундаментальные науки — медицине», грант 21.28.

ЛИТЕРАТУРА

2634

1. Happ F., Ronald A. The "fractionable autism triad": a review of evidence from behavioural, genetic, cognitive and neural research. *Neuropsychol Rev.* 2008; 18(4): 287–304.
2. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision: DSM-IV-TR, by the American Psychiatric Association, 943 pp, paper, ISBN 0-89042-025-4, Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000.
3. Abrahams B.S., Geschwind D.H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(5): 341–355.
4. Cook E.H. Genetics of autism. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2001; 10: 333–350.
5. Rapin I., Tuchman R.F. Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. *Pediatr Clin North Am.* 2008; 55(5): 1129–46.
6. Newschaffer C.J., Croen L.A., Daniels J., Giarelli E., Grether J.K., Levy S.E., Mandell D.S., Miller L.A., Pinto-Martin J., Reaven J., Reynolds A.M., Rice C.E., Schendel D., Windham G.C. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health.* 2007; 28: 235–258.
7. Brodtkin E.S. BALB/c mice: low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. *Behav Brain Res.* 2007; 176(1): 53–65.
8. Crawley J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* 2007; (4): 448–459.
9. Moy S.S., Nadler J.J., Young N.B., Noneman R.J., Grossman A.W., Murphy D.L., D'Ercole A.J., Crawley J.N., Magnuson T.R., Lauder J.M. Social approach in genetically engineered mouse lines relevant to autism. *Genes Brain Behav.* 2009; 8(2): 129–142.
10. Kudryavtseva N.N. Use of the "partition" test in behavioral and pharmacological experiments. *Neurosci Behav Physiol.* 2003; 33(5): 461–471.
11. Avgustinovich D.F., Gorbach O.V., Kudryavtseva N.N. Comparative analysis of anxiety-like behavior in partition and plus-maze tests after agonistic interactions in mice. *Physiol Behav.* 1997; 61(1): 37–43.
12. Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F. Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC). *Aggress Behav.* 1998; 24: 271–286.
13. Kudryavtseva N.N. The sensory contact model for the study of aggressive and submissive behaviors in male mice. *Aggress Behav.* 1991; 17(5): 285–291.
14. Rodgers R.J., Cole J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper S.J., Hendrie C.A. (eds). *Ethology and Psychopharmacology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1994: 9–44.
15. File S.E., Hyde J.R.G. Can social interaction be used to measure anxiety? *Brit J Pharmacol.* 1978; 62: 19–24.
16. Kudryavtseva N.N., Bondar N.P., Avgustinovich D.F. Association between repeated experience of aggression and anxiety in male mice. *Behav Brain Res.* 2002; 133(1): 83–93.
17. Denmark A., Tien D., Wong K., Chung A., Cachat J., Goodspeed J., Grimes C., Elegante M., Suciuc C., Elkhatay S., Bartels B., Jackson A., Rosenberg M., Chung K.M., Badani H., Kadri F., Roy S., Tan J., Gaikwad S., Stewart A., Zapolsky I., Gilder T., Kalueff A.V. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behav Brain Res.* 2010; 208(2): 553–559.
18. Липина Т.В., Кудрявцева Н.Н. Изменение исследовательского поведения у самцов мышей линии СВА/Лас под влиянием позитивного и негативного опыта социальных взаимодействий. *Журн высш нервн деят им И.П. Павлова.* 2008; 58(2): 194–201.
19. Gillott A., Furniss F., Walter A. Anxiety in high-functioning children with autism. *Autism.* 2001; 5(3): 277–286.
20. White S.W., Oswald D., Ollendick T., Scahill L. Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Clin Psychol Rev.* 2009; 29(3): 216–229.
21. Filipenko M.L., Beilina A.G., Alekseyenko O.V., Dolgov V.V., Kudryavtseva N.N. Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice. *Neurosci Lett.* 2002; 321(1–2): 25–28.
22. Berton O., McClung C.A., Dileone R.J., Krishnan V., Renthal W., Russo S.J., Graham D., Tsankova N.M., Bolanos C.A., Rios M., Monteggia L.M., Self D.W., Nestler E.J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science.* 2006; 311: 864–868.
23. Boer U., Alejel T., Beimesche S., Cierny I., Krause D., Knepel W., Flugge G. CRE/CREB-driven up-regulation of gene expression by chronic social stress in CRE-luciferase transgenic mice: reversal by antidepressant treatment. *PLoS One.* 2007; 2: e431.
24. Pizarro J.M., Lumley L.A., Medina W., Robison C.L., Chang W.E., Alagappan A., Bah M.J., Dawood M.Y., Shah J.D., Mark B., Kendall N., Smith M.A., Saviolakis G.A., Meyerhoff J.L. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Res.* 2004; 1025: 10–20.
25. Августинович Д.Ф., Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н. Модель тревожной депрессии: персистентность патологии поведения. *Росс физиол журн им И.М. Сеченова.* 2004; 90(10): 1235–1244.
26. Bondar N.P., Boyarskikh U.A., Kovalenko I.L., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Molecular implications of repeated aggression: Th, Dat1, Snca and *Bdnf* gene expression in the VTA of victorious male mice. *PLoS One.* 2009; 4(1): e4190.
27. Beaudet A.L. Autism: highly heritable but not inherited. *Nat Med.* 2007; 13(5): 534–536.
28. Freitag C.M. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry.* 2007; 12(1): 2–22.
29. Arndt T.L., Stodgell C.J., Rodier P.M. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci.* 2005; 23(2–3): 189–199.
30. Kolevzon A., Gross R., Reichenberg A. Prenatal and perinatal risk factors for autism. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161(4): 326–33.

31. Kinney D.K., Munir K.M., Crowley D.J., Miller A.M. Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008; 32(8): 1519–32.

Kovalenko IL, Kudryavtseva NN. [Development of autistic spectrum symptoms under chronic social defeat stress in anxious male mice: effects of diazepam]. *Psychopharmacol Biol Narcol.* 2010; 10(1–2): 2624–2635. Epub 23 July, 2010. Russian

Institute of Cytology and Genetics SD RAS, Neurogenetics of Social Behavior Sector; 10 Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia, tel.: +7 383-363-49-65

CITATION: PSYCHOPHARMACOL BIOL NARCOL. 2010; 10(1–2): 2624–2635. EPUB 2010 JUL 23. RUSSIAN

ABSTRACT

BACKGROUND. It is well known that psychoemotional disorders may be accompanied by decreased sociability in humans. It has been shown that repeated social defeat stress produced by 10 daily agonistic interactions led to development of the pronounced anxiety in

male mice. The paper aimed to study the features of communicative behavior in anxious animals. **METHODS.** The sensory contact model was used to form high level of anxiety in male mice. The level of anxiety was measured in elevated plus-maze test. Communicative behavior was studied in the social interaction and partition tests as a behavioral reaction toward the other partner. **RESULTS.** It has been shown that communication toward familiar and unfamiliar partners and exploratory activity were dramatically decreased in anxious mice. Avoidance of approaching partner and demonstration of self-grooming were significantly increased in animals under repeated social defeats. Chronic diazepam treatment (0.5 mg/kg, i.p., 2 weeks) led to significant decrease of anxiety level and to improvement of communication. Diazepam completely has restored the level of sociability and exploratory activity and reduced avoidance behavior of approaching partner. Diazepam did not affect self-grooming behavior. **CONCLUSIONS.** Main factor which provokes impairment of communication in defeated male mice is the high level of anxiety. Results have demonstrated similarity between changes in social behaviors in anxious animals and symptoms of autistic spectrum disorders in humans. [in Russian with English Abstract]

KEY WORDS: autistic spectrum symptoms; anxiety; chronic social defeat stress; sensory contact model; diazepam; mice

Correspondence to Natalia N. Kudryavtseva
Institute of Cytology and Genetics SD RAS; Neurogenetics of Social Behavior Sector; 10 Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia
email: natnik@bionet.nsc.ru

Epub 2010 July 23. In Russian © PPBN
<http://www.psychopharmacology.ru/index.php/PPBN/article/view/1046>