

НОВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПРОГРАММЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Г. М. Молодавкин, Т. А. Воронина¹

Разработаны программы для ввода в компьютер результатов визуальной регистрации во время эксперимента поведения животных в тестах вынужденного плавания по Порсолту, открытого поля и поднятого крестообразного лабиринта, условного рефлекса пассивного избегания. Согласно программам каждому поведенческому акту соответствует нажатие экспериментатором определенной клавиши на клавиатуре компьютера с последующим вычислением средних значений регистрируемых параметров и их стандартных отклонений, которые в виде таблиц могут быть выведены на экран монитора, распечатаны на принтере, записаны в дисковый файл. Дисковые файлы могут быть импортированы в офисные программы Microsoft WinWord, Microsoft Excel и др. Описанные программы повышают производительность труда и точность исследования при изучении поведения животных. Программы протестированы в лаборатории психофармакологии ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН и показали высокую надежность.

Ключевые слова: методы исследования, визуальное наблюдение, компьютерная обработка результатов исследования

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на бурное развитие и широкое распространение в последнее время точных инструментальных методов исследования (биохимических, радиолигандных, электрофизиологических и др.) в нейробиологических науках важную роль продолжают играть методы, в которых события отслеживаются и регистрируются визуально. Такие методы (метод вынужденного плавания Порсолта [6], тест открытого поля, метод поднятого крестообразного лабиринта [5]) используются как для предварительного исследования активности фармакологических веществ при проведении скрининга, так и для изучения механизмов их действия при сочетании этих простых поведенческих тестов с более сложными (биохимическими, радиолигандными, электрофизиологическими и др. [3, 7]). Регистрация данных в таких поведенческих тестах, как правило, проводится вручную, при этом запись предварительно ведется на листках. В некоторых случаях в протоколы заносятся специальные значки, которые расшифровываются, затем заносятся в рабочую тетрадь и только после этого обрабатываются статистически. Естественно, что такие способы регистрации и обработки информации трудоемки, и нередко ограничивают пропускную способность исследований, использующих эти методы в сочетании с другими. В настоящее время не представляется возможным полностью отка-

заться от визуальных наблюдений, так как самые современные методы регистрации событий, например, с помощью телекамер, не дают возможности распознавать все необходимые параметры поведения животных. Поэтому даже в новейших разработках в этой области обязательно присутствие человека, который должен указать прибору, какие именно поведенческие акты следует регистрировать и обрабатывать. Большие возможности в этой области предоставляет современная компьютерная техника, позволяющая создавать программы, сочетающие точность визуальных наблюдений и возможности компьютеров по обработке и оценке их результатов.

В связи с этим целью настоящего исследования явилась разработка и тестирование программ для обработки результатов поведенческих экспериментов в тесте вынужденного плавания по Порсолту, методах открытого поля, поднятого крестообразного лабиринта, условного рефлекса пассивного избегания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При создании программ наблюдения за животными была использована способность компьютера реагировать на нажатие клавиш клавиатуры, заложенная во всех языках программирования высокого уровня [1, 2, 4], которая может быть реализована в версиях этих языков, работающих под управлением операционной системы ДОС и под управлением Windows. В этом случае при нажатии на любую клавишу, назначенную при написании программы, компьютер реагирует действием (одним или целым их каскадом), описанным в

¹ Лаборатория психофармакологии (руководитель — проф. Т. А. Воронина) ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



Рис. 1. Блок-схема программы для регистрации длительности неподвижности при изучении поведения животных во время вынужденного плавания по Порсолту.

программе. Это может быть изменение состояния каких-то переменных, запуск таймера или внешних устройств, запуск на выполнение какой-то подпрограммы.

Наиболее проста в реализации программа регистрации длительности неподвижности животных в тесте вынужденного плавания (тест Порсолта), используемом для изучения антидепрессивного эффекта веществ. Согласно этому тесту основным показателем является длительность иммобилизации животных, который и был взят за основу при построении алгоритма обработки событий при их визуальной регистрации. Блок-схема такой программы приведена на рис. 1. Программа состоит из трех основных частей: блока начальных установок, собственно программы обработки нажатий на клавиши “6” и “3” и блока обработки и вывода полученной информации и завершения программы. В блоке начальных установок с помощью системного календаря и часов компьютера без вмешательства экспериментатора устанавливается дата проведения эксперимента и время начала наблюдения за каждым животным в группе. Наблюдатель вводит количество и вид животных, их пол и возраст, название и дозу исследуемого вещества, длительность наблюдения за каждым животным и краткую характеристику

группы животных (например, линия или вид стресса, которому они подвергались).

Затем после нажатия клавиши “Пробел” запускается таймер длительности наблюдения и начинается собственно опыт. В этом случае в начале каждого периода неподвижности наблюдатель нажимает клавишу “6”. Это приводит к увеличению на одно значение переменной “numimob%”, в которой записывается число периодов неподвижности, и к запуску таймера измерения ее длительности. Когда животное вновь начинает двигаться, наблюдатель должен нажать клавишу “3”, что приводит к остановке таймера измерения длительности периода неподвижности и записи (в режиме суммации) полученного значения в переменную “dlitperiodv”, в которой регистрируется общая длительность неподвижности животного за период наблюдения. Затем производится проверка показаний таймера длительности наблюдения: если его значение меньше времени, установленного в начале эксперимента, программа продолжает работать и ожидает следующего периода неподвижности. Если значение, записанное в таймере, равно длительности наблюдения, программа переходит к наблюдению за следующим животным в группе. Таким образом, информация, получаемая по каждому животному в программе (учитывается не только общая длительность неподвижности, но и число ее периодов), избыточна по сравнению с описанием метода, предложенным его авторами [6], в котором учитывается только общая длительность неподвижности. Такая избыточность позволяет ввести новые критерии оценки активности фармакологических веществ. Когда будут проведены наблюдения за всеми животными данной группы, программа переходит к выполнению последнего блока и выводит на экран монитора таблицу с данными по каждому животному и вычисляет средние и стандартные отклонения по всей группе, которые также выводятся на экран в виде другой таблицы. Затем эти данные можно распечатать на принтере или/и записать в текстовый файл. Поскольку в таблицы входят дата эксперимента и данные о начале наблюдения за каждым животным, они могут быть использованы в качестве протокола экспериментов. Таблицы, записанные в файлы, могут быть импортированы в другие программы (Microsoft WinWord, Microsoft Excel и др.), на их основе составляются рисунки.

Программа, работающая по такому алгоритму, может быть написана на любом языке программирования: Basic, Pascal, C. На рис. 2 приведен листинг основного цикла программы, написанной на языке Quick Basic v. 4.5 [1]. Вся программа не может быть приведена, так как ее объем превосходит объем статьи. Вдобавок к перечисленным выше свойствам она дает возможность обработки активности нескольких групп животных без выхода из программы. В качестве примера ее использования в таблице приведены результаты опыта по изучению влияния на вынужденное плавание у крыс антидепрессанта amitriptилина и пси-

хостимулятора кофеина. Из результатов следует, что оба вещества значительно снижают длительность неподвижности крыс в условиях вынужденного плавания. Однако число эпизодов неподвижности значительно выше в случае использования антидепрессанта. Это может свидетельствовать о том, что антидепрессанты приводят к поиску новой стратегии поведения выхода из авersiveивной ситуации, в то время как стиму-

Влияние amitриптилина и кофеина на длительность неподвижности при вынужденном плавании

Дата эксперимента: 04-14-2004

Вид животных — крысы

Пол животных — самцы

Возраст животных — 5 мес

Число животных в группе — 5

Исследуемое вещество и доза: контроль, —

Длительность наблюдения за одним животным — 10 мин

Жив. N	Тнач.набл.	Масса	Ч. неподв.	Дл. неподв.
1	13:30:25	205	16	290,52
2	13:45:34	180	11	295,73
3	13:59:43	210	8	253,53
4	14:15:00	185	7	303,14
5	14:28:11	190	10	326,61

Влияние физиол. раствора (–) на поведение самцов-крыс при вынужденном плавании

Исследуемый показатель; Среднее; Станд. Откл.

Число эпизодов неподвижности; 10,40; 3,51

Длительность неподвижности; 293,91; 26,46

Исследуемое вещество и доза: amitриптилин, 15 mg/kg

Жив. N	Тнач.набл.	Масса	Ч. неподв.	Дл. неподв.
1	09:34:16	225	14	78,34
2	09:46:24	205	14	93,36
3	09:55:18	220	15	67,44
4	10:09:04	190	11	135,09
5	10:21:19	195	17	118,21

Влияние amitриптилина (15 mg/kg) на поведение самцов-крыс при вынужденном плавании

Исследуемый показатель; Среднее; Станд. Откл.

Число эпизодов неподвижности; 14,20; 1,94

Длительность неподвижности; 98,49; 22,82

Исследуемое вещество и доза: кофеин, 20 mg/kg

Жив. N	Тнач.набл.	Масса	Ч. неподв.	Дл. неподв.
1	11:57:49	195	3	72,39
2	12:10:55	210	2	55,08
3	12:21:49	205	3	94,16
4	12:34:15	210	1	81,44
5	12:47:19	180	3	105,21

Влияние кофеина (20 mg/kg) на поведение самцов-крыс при вынужденном плавании

Исследуемый показатель	Среднее	Станд. Откл.
Число эпизодов неподвижности	2,40	0,80
Длительность неподвижности	81,66	17,34

```

startexp$ = TIME$
startexp$(i) = startexp$
starttime = TIMER
observsec = observdur * 60
finishtime = starttime + observsec
c = finishtime - 1

DO

choice$ = INKEY$

IF choice$ = "6" THEN
  numimmob% = numimmob% + 1
  start = TIMER
  a = VAL(choice$)
END IF

IF choice$ = "3" THEN
  finish = TIMER
  totaltime = finish - start
  dlitnepodv = dlitnepodv + totaltime
  a = VAL(choice$)
END IF

b = TIMER

IF a = 6 AND b >= c THEN
  finish = b
  totaltime = finish - start
  totaldlitnepodv = totaldlitnepodv + totaltime
EXIT DO
END IF

LOOP WHILE TIMER <= finishtime

```

Рис. 2. Листинг (на языке Microsoft QBasic v. 4.5) основного цикла программы для регистрации длительности неподвижности при изучении поведения животных во время вынужденного плавания по Порсолту.

ляторы просто повышают двигательную активность животных.

Описанная программа может быть использована во всех случаях, когда надо регистрировать длительность какого-то одного временного интервала. Например, после незначительной модификации ее можно применять для контроля обучаемости животных при выработке условного рефлекса пассивного избегания. Для этого достаточно создать еще одну переменную и записывать в нее длительность латентного периода захода в темный отсек (один из важных критериев выработки рефлекса, оцениваемый во время его тестирования), измеряемую с помощью внутренних часов компьютера. Измерение другого важного критерия выработки рефлекса (длительности пребывания в темной камере) уже заложено в программе.

Аналогично построены программы для регистрации событий в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта.

Для исследования поведения животных в открытом поле производится обработка нажатий на клавиши "5" для регистрации горизонтальной активности (пересечение квадратов), "2" — для регистрации вертикальной активности (вертикальные стойки), "4" — для регистрации исследовательской активности (изучение отверстий), "6" — для регистрации числа актов груминга и запуска отсчета длительности его интервала и "3" — для останова таймера подсчета длительности акта груминга и записи общей длительности груминга. Кроме того, в конце наблюдения за каждым животным

следует подсчитать и ввести в программу число фекальных болюсов. Такой набор клавиш обеспечивает регистрацию традиционного набора показателей активности животных в открытом поле. В настоящее время нередко используют расширенные, нестандартные наборы показателей. Для их регистрации можно ввести в программу процедуры обработки дополнительных клавиш. В дополнение к данным, непосредственно зарегистрированным наблюдателем, с помощью компьютера можно получить дополнительную информацию. Например, зная число квадратов, пересеченных животным за время наблюдения, и длину стороны квадрата, можно, используя программу, вычислить путь, пройденный животным, а разделив это значение на длительность наблюдения, можно вычислить среднюю скорость, развиваемую животным.

Для изучения поведения животных в тесте поднятого крестообразного лабиринта, широко используемого для оценки анксиолитических свойств препаратов, необходимо регистрировать несколько событий (число входов в открытые и закрытые рукава лабиринта) и 2 временных интервала (длительность пребывания животных в открытых и закрытых рукавах). Важным критерием, характеризующим боязнь высоты, является число свешиваний за края открытых рукавов лабиринта во время пребывания в них. Кроме того, как и в тесте открытого поля, в конце наблюдения за каждым животным в программу заносится число фекальных болюсов, отдельно для открытых и закрытых рукавов. Поэтому в данной программе обрабатываются нажатия на пять клавиш: “2” и “4” для регистрации числа выходов в открытые рукава лабиринта и начала и конца пребывания в них, “3” и “6” — для регистрации числа выходов в закрытые рукава лабиринта и начала и конца пребывания в них. Клавиша “5” используется для регистрации числа свешиваний. Привести в статью листинги последних трех программ не представляется возможным, поскольку объем каждой из них значительно превышает объем статьи.

COMPUTER SOFTWARE FOR DATA ACQUISITION DURING BEHAVIORAL TESTS

G. M. Molodavkin and T. A. Voronina

Laboratory of Psychopharmacology, Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

A special program package has been developed for input the results of visual monitoring of the behavior of animals during the Porsolt (forced swim) test, open field test, elevated cross labyrinth test, and passive avoidance reflex test into a personal computer (PC) for the subsequent data processing. According to the adopted procedure, all behavioral events are registered by a researcher using the corresponding keys on the PC keyboard. Then, the program calculates the mean values and their standard deviations and presents the results of data processing in the form of tables and graphs on display. The data can be also printed and stored on disk. The disk files can be imported into other programs (Microsoft Office, Microsoft Excel, etc.) for further processing. The proposed software facilitates the procedure and increases the accuracy of experiments. The programs were successfully verified in the laboratories of the Zakusov Institute of Pharmacology.

Все описанные программы могут быть представлены в виде исполняемых файлов (с расширением “exe”) и надежно работают как под управлением операционной системы ДОС, так и под управлением Windows. Для успешной работы с ними надо обязательно иметь обученных наблюдателей, так как нажатия на клавиши придется производить вслепую, обратив все внимание на животных, и хорошую “неразболтанную” клавиатуру (чтобы избежать ложных срабатываний, приводящих к искажению результатов).

ВЫВОДЫ

1. Разработаны программы для ввода в компьютер и полной обработки результатов визуальной регистрации поведения животных в тестах вынужденного плавания по Порсолту, открытого поля и поднятого крестообразного лабиринта, условного рефлекса пассивного избегания, работающих под управлением операционных систем ДОС и Windows.

2. Программы протестированы в лаборатории психофармакологии ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Заварзина РАМН и показали высокую надежность. Они значительно повышают производительность труда при исследовании поведения животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. А. Зельднер, *Quick BASIC для носорога*, АБФ, Москва (1994).
2. К. Паппас, У. Мюррей, *Visual C++*. Руководство для профессионалов. Пер. с англ. BHV, Санкт-Петербург (1996).
3. С. Б. Середенин, Ю. А. Бледнов, Ю. А. Наговицина, *Бюл. экспер. биол.*, **114**(11), 459 – 461 (1992).
4. В. В. Фараонов, *Турбо Паскаль 7.0. Практика программирования*, Нолидж, Москва (2001).
5. S. E. File, *Behavioural Brain Research*, **58**(1 – 2), 199 – 202 (1993).
6. R. D. Porsolt, G. Anton, N. Blavet, and M. Jalfre, *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 379 – 391 (1978).
7. L. Rago, A. Adojaan, J. Harro, and R. A. Kiivet, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **343**, 301 – 306 (1991).

Поступила 16.11.04.