УДК 57.084/087/089:636.028

С. В. ГРАБОВСЬКА[1], Ю. Т. САЛИГА[1]

ЗАЛЕЖНІСТЬ РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕСТІВ «ВІДКРИТЕ ПОЛЕ» ВІД ФОРМИ АРЕНИ

Надійшла 26.05.14

Тест «відкрите поле» (ТВП) – один з основних методів, який використовується для оцінювання поведінкової активності та рівня емоційності тварин. Цей тест широко застосовується в токсикологічних та фармакологічних дослідженнях. Досі залишалося відкритим питання, чи може форма арени впливати на результати тестування. Тому ми порівнювали результати згаданого тесту з використанням одних і тих самих лабораторних тварин, ідентичних умов дослідження та майже однакової площі арен круглої та квадратної форми. Вірогідні відмінності було виявлено лише у двох досліджуваних параметрів – частоти реалізації ніркового рефлексу та інтенсивності внутрішньої горизонтальної рухової активності; в інших показників істотних різниць не спостерігалося. Таким чином, загалом можна говорити про досить близьку валідність результатів поведінкових досліджень, проведених у двох згаданих умовах ТВП.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тест «відкрите поле», поведінкові показники, щури.

ВСТУП

Тест «відкрите поле» (ТВП, open field test) – один із найпопулярніших та найвідоміших методів дослідження поведінки тварин – був уведений у наукову практику в 1932 р. відомим американським фізіологом Холлом [1]. В основі цього тесту лежить природний потяг тварин, зокрема гризунів, до дослідження нової території; у тварин з різним рівнем емоційності відповідні поведінкові феномени розрізняються [2]. Найчастіше ТВП використовують для дослідження поведінкових реакцій мишей [3, 4] або щурів; також відомі роботи, виконані на піщанках [5], полівках [6], хом'яках [7], собаках, приматах, рибах [8] та навіть людях (дітях у віці 10 місяців [9]).

Під час процедури тестування тварину вміщують у відкриту зверху та обмежену з боків стінками арену квадратної чи круглої форми; значно рідше використовують прямокутні арени з різним співвідношенням довжин сторін. Матеріал для виготовлення арени в різних роботах широко варіює (пластик, дерево, метал, гума, навіть скло); колір стінок також може бути різним – від білого до чорного [9]. Підлогу арени розмічають на квадрати (у разі квадратної або прямокутної арени) або сегменти (при круглій арені). Як правило, простір арени є порожнім, однак деякі автори поміщають у нього різноманітні сторонні об'єкти (наприклад, дзеркала, шматочки корму, блимаючі лампочки, інших тварин у клітках та ін.). Тривалість тестування однієї тварини звичайно становить 3–5 хв, проте цей період може бути продовжений до 1 год [10] та більше.

Поведінку тварини спостерігають та її показники фіксують безпосередньо в перебігу тесту або здійснюють відеозапис досліду для подальшого аналізу. До основних досліджуваних параметрів відносять горизонтальну рухову активність (кількість перетнутих твариною квадратів чи сегментів), вертикальну рухову активність (кількість стійок на задніх лапах), кількість актів дефекації, уринації та грумінгу (вмивання) [11]. Крім того, горизонтальну рухову активність часто поділяють на зовнішню (перетинання квадратів чи сегментів, що знаходяться біля стінки арени) та внутрішню (вихід тварини на середину арени та перетин центральних квадратів або сегментів), а грумінг – на короткий (два-три рухи лапками навколо голови) та довгий (вісім–10 рухів, перехід на „вмивання" інших частин тіла). Як один із показників дослідницької активності також фіксують так званий нірковий рефлекс (обнюхування ніркоподібних отворів у підлозі та намагання проникнути в них у разі достатніх розмірів). Деякі автори поділяють вертикальну рухову активність на вільну (піднімання на задні лапи без опори) та

[1]Інститут біології тварин НААН України, Львів (Україна).
Ел. пошта: yursalyha@yahoo.com (Ю. Т. Салига).

пристінкову (з опорою на борт арени), фіксують кількість актів уринації [1]. Є роботи, де враховують інші показники поведінки тварин – швидкість рухів, частоту та тривалість зупинок (завмирань), довжину пройденого шляху, тривалість перебування в певних ділянках арени та ін. [6].

Таким чином, відомо багато модифікацій як деталей проведення ТВП, так і приладів (арен), що в ньому застосовуються. У зв'язку з цим виникає логічне запитання – чи можна вважати результати, отримані в різних варіантах ТВП, рівнозначними. У даному аспекті, наприклад, заслуговує на увагу робота Ейлама [6], яка була присвячена вивченню залежності результатів ТВП від розмірів арени. Зазначене дослідження було проведено на мишах-полівках в аренах різного розміру (прямокутні арени шести різних розмірів – від 40 × 60 до 260 × 400 см). Виявилося, що інтенсивність рухової активності тварин у ТВП практично не залежала від розмірів арени, в той час як у просторовоаї організації рухів виявлялася певна залежність. У менших аренах тварини відносно рівномірно переміщалися по всій площі поля, а в більших – переважно рухалися по периметру, біля стінок.

Водночас питання залежності результатів тестування від форми арени поки що залишалося відкритим. Отже, виникало запитання: чи будуть результати, одержані в різних модифікаціях ТВП, ідентичними або можуть існувати певні відмінності, зумовлені формою арени. Ми провели порівняння результатів, отриманих у двох модифікаціях установки тесту «відкрите поле» – з використанням круглої та квадратної арен однакової площі.

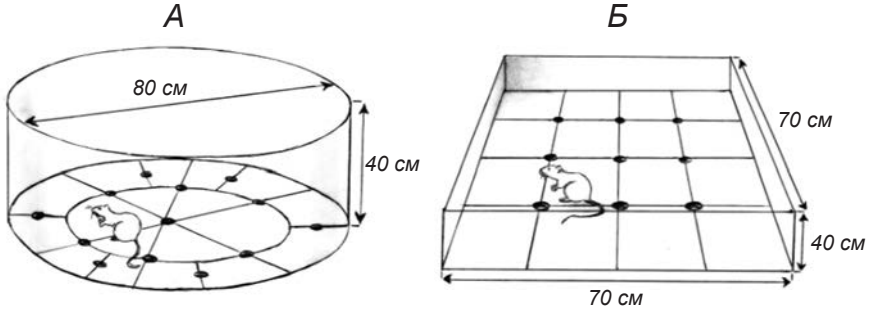
МЕТОДИКА

У роботі було використано дві арени – круглу (рис. 1, *А*) та квадратну (*Б*). Обидві арени було виготовлено з білого пластику, на підлогу нанесено стандартну розмітку: на квадрати у квадратній арені та на сегменти – у круглій. Розміри квадратної арени складали 70 × 70 см, діаметр круглої – 80 см; відповідно площа цих арен була практично однаковою (різниця 2.5 %). Висота стінок в обох арен була однаковою (40 см). На перетинах ліній розмітки в підлозі арен було просвердлено ніркоподібні отвори діаметром 1 см. Режими освітлення, температури, рівень шуму та інші умови при використанні обох арен були ідентичними; тестування проводилося в одному й тому ж самому приміщенні, в той самий час доби (дослід розпочинали об 11.00).

Дослідження виконували на 10 тваринах – статевозрілих білих лінійних щурах лінії Вістар. Перед тестуванням клітки з тваринами заносили в кімнату, де відбувалося тестування, та залишали на 10 хв для хабітуації; в цей час з ними не проводили жодних маніпуляцій (перенесення в іншу клітку, годування та ін.) для уникнення спотворень поведінкових феноменів.

У першій серії тестів тварин по черзі спершу поміщали на 3 хв у квадратну арену, згодом – у круглу і фіксували їх поведінку за допомогою відеокамери для подальшого аналізу досліджуваних параметрів. Тварин, які пройшли тестування, повертали в клітку. Таким чином, між послідовними тестуваннями кожної тварини в двох аренах проходило приблизно півгодини – достатній час для заспокоєння, відпочинку та готовності до нового тестування. У другій серії порядок тестування було змінено: спочатку тварин поміщали в круглу арену, потім – у квадратну. Це було зроблено з метою уникнення залежності результатів від того, чи була тварина поміщена в певну арену спочатку, чи вже проходила тестування в іншій арені. Після тестування кожної тварини арену протирали тканиною, змоченою спиртом, для усунення біологічних слідів.

Загалом було проведено три серії тестів з інтервалом сім днів та ще одну серію з інтервалом один місяць – для дослідження часової динаміки змін поведінкових показників.



Р и с. 1. Схеми арен круглої (*А*) та квадратної (*Б*) форми, використаних у тесті «відкрите поле».

Фіксували та аналізували такі параметри: зовнішню горизонтальну рухову активність (кількість перетнутих квадратів або сегментів у зовнішній, тобто пристінковій, частині арен) та внутрішню горизонтальну рухову активність (кількість перетнутих квадратів чи сегментів у центральній частині цих арен), вертикальну рухову активність (кількість стійок на задніх лапах з опорою на стінку арени чи без неї), кількість актів короткого (два-три „вмивальні" рухи лапами навколо морди) та тривалого (вісім–10 рухів лапами навколо морди, перехід на вмивання живота, геніталій, інших частин тіла) грумінгу, нірковий рефлекс (кількість актів обнюхування ніркоподібних отворів у підлозі арен), кількість актів дефекації, кількість та тривалість завмирань.

Статистичну обробку одержаних числових результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми „Statistica 8.0" (тест ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За більшістю досліджуваних параметрів (зовнішня горизонтальна активність, вертикальна активність, кількість та тривалість короткого грумінгу, кількість актів дефекації, кількість та загальна тривалість завмирань) статистично вірогідних різниць між результатами тестування в квадратній та круглій аренах виявлено не було (рис. 2*, А, В, Г, Д, Е, З*).

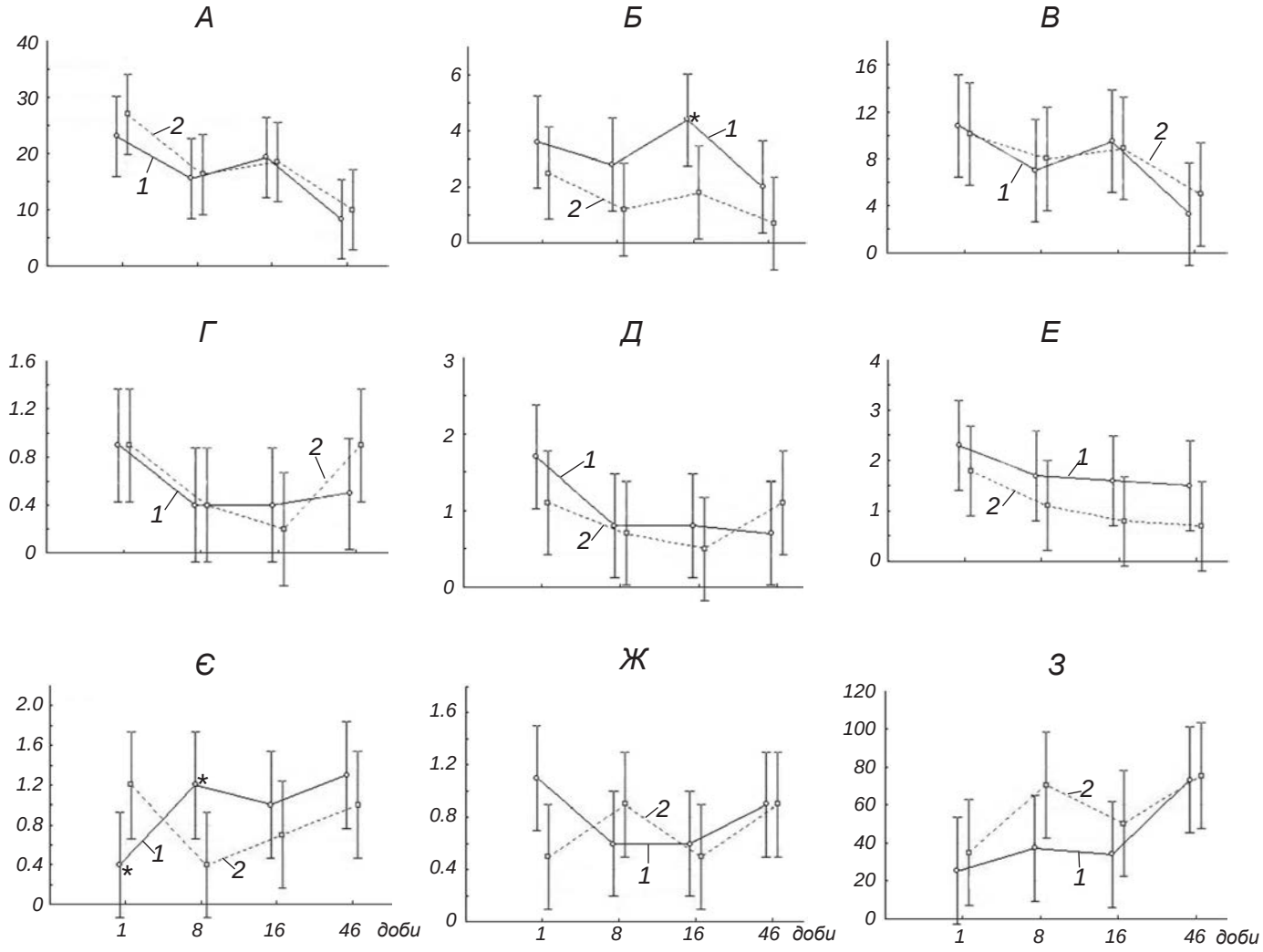
Ми очікували, що в квадратній арені можуть виявитися вищими кількість та тривалість завмирань, адже там тварини інстинктивно можуть шукати прихистку в кутах, відсутніх у круглій арені. Проте різниця за цим параметром у двох аренах не досягала рівня вірогідності, хоча в квадратній арені спостерігалася певна тенденція до більшої тривалості завмирань. Водночас у квадратній арені щури дійсно завмирали саме в кутах, а не в центральній частині та навіть не біля стінок арени на її периферії. У круглій арені завмирання частіше спостерігалися також під стінками. Жодного випадку завмирання в центральній частині як круглої, так і квадратної арени зафіксовано не було. За кількістю окремих завмирань різниці між результатами згаданих тестувань не виявлялося.

У круглій арені відмічалася деяка тенденція до більшої інтенсивності зовнішньої горизонтальної активності, однак різниця не досягала рівня статистичної вірогідності і не може бути однозначно пояснена відмінністю форми поля.

Вірогідні відмінності ($P < 0.05$) спостерігалися щодо проявів «ніркового рефлексу» (кількості актів обнюхування ніркоподібних отворів у підлозі) та інтенсивності внутрішньої горизонтальної активності (кількості перетнутих квадратів або сегментів у центральній частині арени). Показники вказаної горизонтальної активності були вищими в круглій арені протягом усього часу спостережень, проте статистично вірогідно ця різниця виявилася лише в останній серії тестів, проведеній через місяць після третього тестування (рис. 2, *Б*). Відповідно, в круглій арені щури частіше виходили на центральну частину арени, а в квадратній – перебували переважно біля стінок. Можливою причиною цього можуть бути ілюзія більшої відкритості квадратної арени при тій самій площі та відсутність у круглій арені кутів, в яких щури мають схильність ховатися.

Кількість проявів ніркового рефлексу (рис. 2, *Є)* в круглій арені в першій серії тестів була значно нижчою, ніж у квадратній. У другій серії (з інтервалом сім днів) цей показник різко зростав, а в третій – знову дещо знижувався. У квадратній арені спостерігалася діаметрально протилежна динаміка – різке зниження кількості відповідних проявів у другій серії та деяке зростання в третій. У четвертій серії тестів, що проводилася після місячної перерви (для відновлення ефекту новизни), показник в умовах обох арен незначно зростав, залишаючись дещо вищим у круглій арені.

Основними мотиваціями активності тварин в умовах ТВП є два протилежно направлені вроджені потяги щурів – потяг до дослідження нового (неофілія), що є рушійною силою дослідницької активності, та страх нового і невідомого (неофобія), що зумовлює зростання тривожності. Кожна з цих мотивацій відображується в ряді поведінкових параметрів, які фіксуються в тесті. За співвідношенням та часовою динамікою даних параметрів можна судити про рівень тривожності тварин та зміни їх емоційного стану. Тривалий та короткий грумінг, кількість та тривалість завмирань і кількість дефекацій вважаються показниками рівня тривожності. Ці показники прямо корелюють з умовним «індексом емоційності» тварин. Горизонтальна (зовнішня та внутрішня) і вертикальна рухові активності та реалізація ніркового рефлексу є проявами дослідницької активності, причому горизонтальна активність одночасно є показником інтенсивності локомоції. Дані показники обернено корелюють з



Р и с. 2. Часова динаміка параметрів тесту «відкрите поле» в круглій (*1*) та квадратній (*2*) аренах.
А – зовнішня горизонтальна, *Б* – внутрішня горизонтальна, *В* – вертикальна активність; *Г* – довгий, *Д* – короткий грумінг; *Е* – дефекація; *Є* – нірковий рефлекс; *Ж* – кількість завмирань; *З* – загальна тривалість завмирання. Доби вказані від початку експерименту. Наведені значення середніх ± середньоквадратичне відхилення. Зірочками позначені випадки статистично вірогідних різниць ($P < 0.05$).

індексом емоційності та рівнем тривожності щурів.

За роки використання вказаного тесту в низці робіт висловлювались істотні зауваження щодо параметрів, які вивчаються в його рамках. На думку критиків, частота та інтенсивність дефекації та уринації значною мірою залежать від раціону і режиму дня тварини, а грумінг у гризунів спостерігається і в цілком спокійних і звичних умовах [3, 10]. Також зазначали, що у «відкритому полі» тваринам пропонується надто спрощене та неприродне середовище (занадто відкрите, занадто яскраво освітлене, занадто монотонне). Це не сприяє адекватному прояву дослідницьких феноменів та демонстрації нормального (природного) рівня тривожності [13]. У зв'язку з даними обставинами, зокрема, були пропозиції замінити ТВП спостереженням за поведінкою тварин безпосередньо в клітках, де вони утримуються [9]. При цьому спостереження пропонувалося проводити в нічний час, адже щури є нічними або „присмерковими" тваринами. В умовах „відкритого поля" тварини утримуються ізольовано, а для соціальних тварин, якими є щури, ізоляція є потужним стресогенним фактором, істотно впливаючим на поведінку.

Треба визнати, що, незважаючи на певну неоднозначність трактування результатів, ТВП продовжує широко використовуватись у лабораторній практиці для вивчення поведінки і рівня тривожності тварин. Зокрема, він входить у перелік обов'язкових методик доклінічного досліджен-

ня впливу анксіолітичних препаратів, використовується при вивченні тваринних моделей депресії [15–17], наслідків отруєння різноманітними нейротоксичними сполуками, зокрема пестицидами [18–20], а також для визначення впливу на нервову систему таких факторів середовища, як шум [10] та ін.

Звичайно за повторних тестувань тварини поступово звикають до тестової арени; як наслідок показники не тільки тривожності, але й дослідницької активності знижуються. Причиною цього є призвичаїння до нових умов та, відповідно, зменшення мотивації до дослідження арени. Водночас у знайомій обстановці знижується і тривожність тварин, адже вони вже не очікують невідомих небезпек. Таку тенденцію до зниження тестових показників ми спостерігали в цілому і в нашому дослідженні; при цьому подібна тенденція була практично однаковою в умовах як круглої, так і квадратної арени. Відмінності, як уже зазначалося, виявлялися здебільшого щодо частоти «ніркового рефлексу» та інтенсивності внутрішньої горизонтальної активності; за іншими показниками істотних різниць не спостерігалося.

Згідно з одержаними даними, можна стверджувати, що в цілому результати тестувань в обох модифікаціях ТВП кардинально не розрізняються. Отже, обидві форми арени – як круглу, так і квадратну – можна з приблизно однаковою адекватністю використовувати в поведінкових дослідженнях щурів.

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Європейської конвенції "Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей" від 18.03.1986 р. [12], Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики в Києві 2001 р. (протокол № 44 від 28.05.14 засідання Комісії з біоетичної експертизи Інституту біології тварин НААН України).

Автори даної роботи – С. В. Грабовська та Ю. Т. Салига – підтверджують, що в них немає конфлікту інтересів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. C. S. Hall and E. L. Ballachey, "A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology," *Univ. California Publ. Psychol.*, **6**, 1-12 (1932).
2. С. К. Касимова, "Тревожное поведение крыс и его зависимость от режима освещенности", *Совр. пробл. науки и образования*, **2**, 45-47 (2006).
3. V. C. Careau, O. R. P. Bininda-Emonds, G. Ordonez, et al., "Are voluntary wheel running and open-field behavior correlated in mice? Different answers from comparative and artificial selection approaches," *Behav. Genet.*, **42**, 830-844 (2012).
4. L. Ricceri, A. Venerosi, F. Capone, et al., "Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice," *Toxicol. Sci*., **1**, No. 93, 105-113 (2006).
5. N. J. Bridges and N. J. Starkey, "Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety," *Physiol. Behav*., **83**, No. 1, 119-127 (2004).
6. D. Eilam, "Open-field behavior withstands drastic changes in arena size," *Behav. Brain Res*., **142**, 53-62 (2003).
7. G. Lupfer-Johnson, K. L. Hanson, L. E. Edwards, et al., "Social cues influence foraging in dwarf hamsters (Phodopus campbelli)," *J. Comp. Psychol*., **123**, No. 2, 226-229 (2009).
8. H. Richendrefer, S. D. Pelkowski, R. M. Colwill, and R. Créton, "Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae," *Neurotoxicol. Teratol*., **4**, No. 34, 458-465 (2012).
9. S. C. Stanford, "The Open Field Test: reinventing the wheel," *J. Psychopharmacol*., **21**, 134-135 (2007).
10. R. N. Walsh and R. A. Cummins, "The Open-Field Test: a critical review," *Psychol. Bull*., **83**, 482-504 (1976).
11. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991), с. 119-122.
12. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments and Other Scientific Purposes*, Coun. Eur., Strasbourg (1986).
13. G. Genaro and W. R. Schmidek, "Exploratory activity of rats in three different environments," *Ethology*, **106**, 849-859 (2000).
14. S. C. Stanford, "The Open Field Test: reinventing the wheel," *J. Psychopharmacol*., **21**, 134-135 (2007).
15. Y. Hayashi, S. Sogabe, Y. Hattori, and J. Tanaka, "Anxiolytic and hypnotic effects in mice of roasted coffee bean volatile compounds," *Neurosci. Lett*., **531**, No. 2, 166-169 (2012).
16. B. Kumar, A. Jindal, D. K. Pandey, et al., "Antidepressant and anxiolytic-like effects of 4n, a novel 5-HT3 receptor antagonist using behaviour based rodent models," *Ind. J. Exp. Biol*., **50**, No. 9, 625-632 (2012).
17. Z. Zhang, P. Fei, J. Mu, et al., "Hippocampal expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 and neuronal PAS domain protein 4 in a rat model of depression," *Neurol. Sci*., **35**, No. 2, 277-282 (2013).
18. C. López-Granero, F. Cañadas, D. Cardona et al., "Chlorpyrifos-, diisopropylphosphorofluoridate-, and parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: are they mediated by analogous mechanisms of action?" *Toxicol. Sci*., **131**, No. 1, 206-216 (2013).
19. B. R. Mullen, E. Khialeeva, and D. B. Hoffman, "Decreased reelin expression and organophosphate pesticide exposure alters mouse behavior and brain morphology," *ASN Neuro*., **5**, No. 1, 27-42 (2013).
20. Y. Salyha, "Biological effects assessment of chlorpyrifos and some aspects of its neurotoxicity," *Visn. Lviv Univ. Biol. Ser*., **54**, 3-14 (2010).