

# ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОВЕДЕНИЯ ЗДОРОВЫХ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА И КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ В «ОТКРЫТОМ ПОЛЕ»

УДК 591.55:591.2—006

Поступила 28.01.2010 г.



**Н.В. Вдовина**, к.б.н., доцент кафедры биомедицины<sup>1</sup>;  
**Е.С. Клинцева**, к.б.н., ассистент кафедры биологии<sup>2</sup>;  
**Т.Г. Щербатюк**, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород;

<sup>2</sup> Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

С помощью использования методики «открытого поля» в предложенной авторами модификации выявлены особенности поведения (возрастные и в процессе развития экспериментальных опухолей — лимфосаркомы Плисса и гепатомы-27) у крыс разного возраста. Установлено, что динамика изменения тактик поведения в возрастных группах отличалась: в группе молодых животных обнаружено повышение всех видов активности в 12-й день после трансплантации опухоли, а у взрослых особей такого явления не выявлено. Трансплантация гепатомы-27 менее, чем лимфосаркома Плисса, повлияла на показатель исследовательской активности.

**Ключевые слова:** «открытое поле», гепатома-27, лимфосаркома Плисса.

## English

## Investigation of the healthy rat of different age and rat-tumor-carrier behavior peculiarities in the «open field»

**N.V. Vdovina**, c.b.s., assistant professor of a biomedicine chair<sup>1</sup>;

**E.S. Klintsova**, c.b.s., assistant of a biology chair<sup>2</sup>;

**T.G. Sherbatyuk**, B.D., professor, head of a biology chair<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod state university, N. Novgorod;

<sup>2</sup> Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

The peculiarities of behavior (the age ones and in a process of the experimental tumor development — the Pliss lymphosarcomas and hepatomas-27) in rats of different age are revealed with a use of the «open field» method in a presented by authors modification. It is established, that a dynamics of the behavior tactic alteration in the age groups differed: an increase of all the types of activity on the 12th day after the tumor transplantation is found in a group of young animals, and such a phenomenon is not revealed in the adult specimen. A transplantation of a hepatoma-27 has lesser influenced a value of research activity than the Pliss lymphosarcoma.

**Key words:** open field, hepatoma-27, Pliss lymphosarcoma.

Для контактов: Щербатюк Татьяна Григорьевна, тел. моб. +7 910-383-22-91, e-mail: ozone\_stg@mail.ru.

Для экспериментальной онкологии большое значение имеет поиск методик исследования, позволяющих сократить количество животных, необходимых для изучения различных аспектов опухолевого роста и оценки эффективности терапевтических воздействий. Мы предположили, что в этих целях является перспективным анализ поведенческих реакций животных, в частности исследование их активности в «открытом поле» (ОП) [1].

Это предположение основано на следующих известных данных. С одной стороны, в ходе развития опухоли отмечаются характерные для этого процесса временные изменения особенностей снабжения глюкозой и кислородом тканей организма и опухоли [2]. Причем динамика этих процессов индивидуальна. Это позволяет предполагать существование временной динамики изменений энергетического обмена в различных участках организма при развитии опухоли. Кроме того, в соответствии с «нейрогенной» теорией рака в ходе канцерогенеза меняется активность клеток такого отдела мозга, как гипоталамус [3], и происходят характерные изменения в ЦНС, которые проявляются в поведении [4].

С другой стороны, установлено, что животные с различными типами поведения отличаются особенностями энергетического обмена в мозге [5], печени [6]. Кроме того, характерные изменения поведенческих реакций, в том числе и в тесте «открытое поле» [7—9], позволяют предполагать, что они также могут служить индикатором изменения баланса медиаторов в ЦНС и вегетативной нервной системе (ВНС).

**Цель исследования** — проанализировать динамику поведения в «открытом поле» животных разного возраста до и после трансплантации экспериментальной опухоли.

**Материалы и методы.** Для создания модели неоплазии использовали опухолевые штаммы «гепатома-27» (Г-27) и «лимфосаркома Плисса» (ЛФС), приобретенные в НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина. В ОП исследовалась динамика поведения 74 белых беспородных крыс. Из них 20 животных были в возрасте 9 мес (группа В — взрослые), остальные 54 крысы — в возрасте 3 мес (группа М — молодые).

До трансплантации опухолевого штамма ЛФС все животные группы В тестировались в двух сериях опытов по 3 дня с интервалом между сериями 15 дней. Часть животных группы М (25 особей) тестировались в одной серии 3 дня подряд.

Штамм ЛФС трансплантировали через 15 дней после окончания 2-й серии тестирования 10 животным в группе В (подгруппа ВЛ) и трехдневной серии тестирования 10 животным группы М (подгруппа МЛ). После трансплантации лимфосаркомы животных подгрупп ВЛ и МЛ исследовали в ОП на 3, 6, 8, 12 и 13-й день.

Штамм Г-27 прививался 25 особям из группы М (подгруппа МГ). Поведение животных подгруппы МГ и 5 крыс группы М (подподгруппа МИ — интактные) исследовали за день до трансплантации опухоли. Тестирование в ОП всех этих животных повторяли на следующий и на 12-й день после прививки. Из животных подгруппы МГ 7 особей составляли контрольную группу (группа МГК),

остальным, начиная со следующего дня после прививки, делали инъекции: 7 крысам вводили озонированный физиологический раствор, 5 особям — химиопрепарат 5-фторурацил, у 6 крыс чередовали дни введения ОФР и химиопрепарата.

При исследовании поведения в ОП протоколировали количество посещенных квадратов, стоек, чисток, останков, движений на месте, элиминации. При обработке результатов рассчитывали такие суммарные показатели, как ИА (исследовательская активность — сумма количества пересеченных квадратов, движений на месте и стоек), Ц (количество посещений центральных квадратов), СА (смещенная активность — сумма чисток, чиханий, сидений на месте), Э (элиминационная активность — сумма уринаций и дефекаций).

После анализа упорядоченных рядов значений показателей в группах В и М в разные дни тестирования для показателя ИА выделили 3, а для остальных показателей — 2 диапазона их значений. В зависимости от значений показателя животных характеризовали следующим образом: пассивными считали животных при ИА менее 30 действий, а активными — при ИА более 60 действий. При значениях показателя ИА в диапазоне 30—60 действий активность животных оценивали как среднюю. Если животные посещали более 2 центральных квадратов, их называли смелыми, остальных именovali осторожными.

При значениях показателя СА более 8 действий животных оценивали как тревожных, а остальных считали уверенными. При наличии элиминации показатель имел знак «+», а при отсутствии — «-». Совокупность этих показателей характеризовала тактику поведения. При анализе полученных результатов учитывали индивидуальные варианты изменения тактики поведения в различные дни тестирования, выявляли наиболее часто встречающиеся варианты тактик в каждой группе и подгруппе в разные дни тестирования до и после трансплантации опухолевых штаммов.

Математическая обработка результатов исследования проводилась с использованием непараметрических методов математической статистики — точного метода Фишера (ТМФ) [10].

**Результаты.** При сравнении тактик поведения животных групп М и В **до привития опухоли** выявлены следующие различия. В 1-й день тестирования наиболее распространенной тактикой поведения молодых крыс была АСМТ+ (активные, смелые, тревожные животные). В последующие дни у них наблюдался резкий спад активности. К 3-му дню тестирования 72% животных стали пассивными. Среди них наиболее часто встречалась такая тактика, как ПОУ (пассивные, осторожные, уверенные животные). Среди молодых животных 5 особей тестировались не 3 дня подряд, а только 2 с интервалом в 12 дней. При таком режиме тестирования через 12 дней большинство из них (80%) проявляли среднюю активность.

У взрослых животных во все дни в обоих случаях тестирования до трансплантации опухоли редко встречались особи с высоким показателем ИА (их число не превышало 15%). Разница в поведении в 1-й и 3-й день

первого тестирования была менее выражена, чем у молодых: в 1-й день 50% животных проявляли среднюю ИА, а 45% были пассивными. Среди них у 60% показатель СА был менее 8 действий («уверенные»). В 3-й день тестирования средняя активность была у 30% животных, а 70% оставались пассивными. Наиболее распространенной тактикой (40%) была ПОУ.

Таким образом, на 3-й день первого тестирования в ОП отмечалось одинаковое количество пассивных животных среди здоровых крыс обеих возрастных групп. Вместе с тем выявлены отличия в результатах первого и второго трехдневного тестирования в группе В. Они выражались в динамике количества животных в выделенных диапазонах значений показателей, а также в соотношении животных с различными тактиками поведения в разные дни тестирования. Так, если в 3-й день первого тестирования 70% животных были пассивными и 40% — тревожными, то в 3-й день второго тестирования их было 35 и 65% соответственно. Наиболее распространенной тактикой в последний день второго тестирования была ССмТ (среднеактивные, смелые, тревожные животные) — у 45% особей, в 3-й день первого тестирования она наблюдалась только у 15% животных (по ТМФ  $p=0,05$ ).

Тестирование животных группы МИ с интервалом в 12 дней также выявило различия в их активности в 1-й и 12-й дни тестирования. Через 12 дней животные не «забыли» предыдущего опыта — их двигательная активность была ниже, чем в условиях «новизны».

**После трансплантации ЛФС** в обеих подгруппах (МЛ и ВЛ) уже на 3-й день после прививки большинство животных (80 и 90% соответственно) были пассивными. Причем, если в 3-й день тестирования до прививки (активность минимальна в обеих группах) показатель ИА был менее 19 действий у 60% молодых и 40% взрослых особей, то после прививки животных с такой активностью стало 70 и 80% соответственно.

Динамика показателя ИА после прививки у молодых и взрослых крыс несколько отличалась. В подгруппе МЛ наибольшее количество пассивных особей (80%) было на 3-й день после прививки, а в ВЛ — на 12-й и 13-й дни после прививки (100%). Наименьшее количество пассивных особей в подгруппе МЛ (40%) наблюдалось в 12-й день после прививки, но в 13-й день их количество вновь возросло до 70%. В подгруппе ВЛ наименьшее количество пассивных крыс (70%) было на 8-й день после прививки. Наиболее выражены различия в активности животных подгрупп МЛ и ВЛ в 12-й день после прививки (по ТМФ  $p=0,025$ ).

Динамика показателя СА после прививки в обеих группах проявлялась в следующем: если в 3-й день после прививки тревожными были 60% особей подгруппы ВЛ и 30% — МЛ, то в 6-й и 8-й дни количество тревожных животных стало минимальным в обеих подгруппах (20%) с увеличением их числа в 12 (13)-й день до 60% (50%) в подгруппе МЛ и до 50% (40%) — ВЛ соответственно.

Динамика количества посещений центра в подгруппах МЛ и ВЛ также отличалась. При приблизительно одинаковом количестве животных в разных подгруппах,

посещавших центр в 3-й день тестирования до прививки, в 3, 6 и 8-й дни после прививки животные группы МЛ посещали центр меньше, хотя в 12-й день центральные квадраты посетило уже 80% особей.

Отличия динамики в количестве элиминации в подгруппах ВЛ и МЛ до и после прививки были следующими. В 3-й день тестирования до прививки в группах М и В количество животных с Э+ было 80 и 55% соответственно. Но среди крыс, которым впоследствии была привита ЛФС, у большинства молодых (90%) наблюдалась элиминация (Э+), а у большинства взрослых — отсутствовала (Э- у 80% особей) (по ТМФ  $p=0,025$ ). В 3-й день после прививки эти различия сохранялись (по ТМФ  $p=0,05$ ). Но в 6-й день количество животных, у которых наблюдалась элиминация (Э+), в обеих подгруппах стало одинаковым — 30%. В 8-й день в обеих группах их количество снизилось до 10, а на 12-й день увеличилось до 70%.

Таким образом, после прививки ЛФС в подгруппах МЛ и ВЛ наиболее выражены отличия в количестве животных тревожных (в подгруппе ВЛ их больше) и элиминирующих (в подгруппе ВЛ их меньше) в 3-й день. К 12-му дню различия наиболее выражены в количестве смелых особей (их больше в подгруппе МЛ). Сравнение в подгруппах динамики тактик поведения показало, что, как и в последний день тестирования до прививки (активность у большинства животных в этот день была наименьшей), в обеих подгруппах на 3-й день после прививки наиболее распространенной тактикой была ПОУ, но при этом значения показателя ИА были чаще менее 19 действий. Отличия в тактике поведения были наиболее выражены в 12-й день (по ТМФ  $p=0,025$ ): у животных МЛ преобладала тактика С(П)См (среднеактивные, смелые животные), а в подгруппе ВЛ — ПО (пассивные, осторожные животные). В 13-й день отличия между подгруппами не были выражены. К этому дню одно животное из подгруппы ВЛ погибло (оно отличалось от остальных более высокой исследовательской активностью во втором тестировании до трансплантации опухоли по сравнению с первым тестированием и высоким значением ИА в 8-й день тестирования после прививки).

Сравнение поведения молодых животных на 12-й день **после трансплантации Г-27 и ЛФС** позволило обнаружить следующие различия. Несмотря на то, что после трансплантации ЛФС в 12-й день наблюдалась наиболее высокая после привития активность, активными были только 10% особей. Среди животных с Г-27 на 12-й день после трансплантации опухоли были активными 60% (из 7 особей) без воздействий (группа МГК) и 40% особей при воздействиях. При воздействиях по сравнению с контролем было больше животных как с высокими, так и с низкими значениями показателя ИА. Причем среди здоровых крыс (группа МИ), тестируемых одновременно с опухоленосителями, при повторном тестировании через 12 дней активных животных не было — большинство (4 из 5 особей) проявляли среднюю активность. При развитии ЛФС с 3-го по 12-й день после прививки увеличивалось количество животных с высокими значениями показателя СА (тревожных).

У особей с Г-27 оно выражено не менялось, и в 12-й день после трансплантации опухоли тревожных было меньше, чем в группе с ЛФС. Причем если в группе МГК их количество было таким же, как и в группе МЛ, то у животных с Г-27, подвергавшихся воздействиям, количество тревожных особей было меньше (70 и 33% соответственно).

Кроме того, если в 12-й день после трансплантации опухоли количество элиминирующих крыс в подгруппе МЛ и во всей подгруппе МГ было одинаковым, то в контрольной подгруппе их было несколько больше (на 20%).

Таким образом, используемая методика позволила выявить особенности поведения крыс после трансплантации им различных опухолевых штаммов и при различных воздействиях у животных в процессе развития гепатомы.

**Обсуждение.** В доступной литературе авторами не обнаружено данных о применении в экспериментальной онкологии методики «открытое поле» для оценки динамики изменений в организме животных в ходе развития опухоли, хотя тестирование в ОП применяют для оценки эффективности различных воздействий на организм, в том числе и на организм животных-опухоленосителей. Причем, используя ОП для наблюдений за поведением животных, большинство исследователей подсчитывают лишь «общую», «вертикальную» и «горизонтальную» активность, что, на наш взгляд, сужает информативность метода. Поэтому мы, зарегистрировав все виды активности животных, наблюдающейся в ОП, сгруппировали данные в четыре показателя — ИА, СА, Ц, Э. Предполагалось, что совокупность этих показателей и их динамика будут отражать индивидуальные особенности реакции животных на перемещение их из клетки в условия ОП. Показатель ИА — это характеристика локомоционной и исследовательской активности, как вертикальной, так и горизонтальной, как в ближней зоне — движения на месте, так и на всей доступной территории. Показатель СА — это образцы поведения, менее, чем двигательная активность, адекватные «контексту» опыта, — сидение на месте и чистки. Поэтому мы сочли возможным именовать их «смещенная активность». Показатели Ц и Э, как считается [1], связаны с выраженностью эмоций и характеризуют смелость и страх. Не отрицая взаимосвязи этих показателей с эмоциональной реакцией, мы считаем, что показатель Ц — это часть исследовательской активности (поэтому он входит в показатель ИА), а также «индикатор» малой выраженности эмоций. В отношении показателя Э мы решили, что его в сочетании с другими — ИА, Ц — можно использовать как показатель активности ВНС. Совокупность этих показателей и их динамика при различных условиях опытов, как мы предполагали, может характеризовать индивидуальные особенности реакции животных на изменения в окружающей среде и в их организме, а также позволит выявлять различия в выборках животных.

Полученные результаты подтвердили эти предположения. Они дают возможность сделать вывод о наличии возрастных и индивидуальных различий в реакции здоровых животных «на новизну». У молодых особей эта

реакция в 1-й день тестирования и ее «спад» в последующем ярко выражены. Взрослые животные в условиях «новизны» в большинстве своем более осмотрительны, их активность в 1-й день тестирования ниже, чем у молодых; во 2-й день у многих она не уменьшается, а увеличивается, снижаясь к 3-му дню. В поведении в ОП взрослых крыс более выражены индивидуальные особенности. Повторные тестирования и у взрослых (трехдневная серия опытов через 15 дней после окончания первого трехдневного тестирования), и у молодых животных (однодневное тестирование с интервалом в 12 дней) выявили, что все они не «забывают» результатов 1-го дня тестирования («новизны»). Эти данные необходимо учитывать при использовании методики ОП в экспериментальной онкологии. Целесообразно, проводя исследования животных в ОП до воздействий, выбрать для опытной и контрольной групп таких животных, которые сходны не просто по уровням их двигательной активности, но и по тактикам поведения (по сочетанию 4 показателей), в том числе по редко встречающимся тактикам. Эти группы должны сохраняться до окончания исследований, что позволит выявить индивидуальные особенности реакции организма животного на развитие опухоли.

Полученные результаты позволили также установить следующие особенности в реакции организма животных на трансплантацию опухолей различных штаммов. Если реакция на «новизну» в окружающей среде у молодых и взрослых крыс отличалась, то реакция на изменения в их внутренней среде — трансплантацию им опухолевого штамма ЛФС — была сходной. В обеих возрастных группах резко уменьшились значения показателя ИА и увеличились — показателя СА. Вместе с тем в группе молодых животных чаще встречались особи со средним и высоким значением ИА и СА в один из дней после трансплантации. Кроме того, динамика изменения тактик поведения в возрастных группах отличалась: в группе молодых крыс обнаружено повышение всех видов активности в 12-й день после трансплантации опухоли, а у взрослых такого явления не выявлено. Трансплантация штамма Г-27 менее, чем ЛФС, повлияла на показатель ИА, но к 12-му дню среди животных-опухоленосителей, особенно после воздействий, было относительно меньше особей со средними значениями его. Причем у многих животных показатель ИА имел не только более низкие, но и более высокие значения, чем до трансплантации.

**Заключение.** Использование методики «открытое поле» в предложенной модификации (подсчет показателей ИА, СА, Ц и Э, анализ изменений каждого из них в выборке и в их совокупности у животных («тактика поведения»)) позволило выявить возрастные особенности и особенности развития экспериментальных опухолей (лимфосаркомы Плисса и гепатомы-27).

Для повышения информативности в экспериментальной онкологии метода «открытое поле» целесообразно уточнить взаимосвязь образцов поведения в «открытом поле» и их динамики с различными биохимическими показателями, в том числе с балансом медиаторов в ЦНС и уровнем некоторых гормонов.

Это позволит использовать данный метод не только для оценки эффективности различных воздействий, но и для исследования динамики изменений в организме животного в ходе развития опухоли, а также будет способствовать значительному уменьшению количества животных, необходимых для проведения экспериментов.

### Литература

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М: Высшая школа; 1991; 399 с.
2. Кавецкий Р.Е. Реактивность организма и опухолевый рост. Киев: Наукова думка; 1981; 235 с.
3. Кайдун С.П. Теоретические представления о механизме канцерогенеза (неврогенная теория происхождения опухолей). СПб; 1996; [www.mechnik.spb.ru](http://www.mechnik.spb.ru).
4. Марасанов С.Б. Корреляция психоэмоциональной сферы и иммуноаллергологического статуса у больных раком легких. Вопросы онкологии 1999; 45(3): 254—256.
5. Саркисова К.Ю., Ноздрачева Л.В., Куликов М.А. Взаимосвязь между индивидуальными особенностями поведения и показателями энергетического метаболизма мозга у крыс. Журнал ВНД 1991; 41(5): 963—969.
6. Крачковский М.Э. и др. Особенности некоторых биохимических процессов в печени крыс с различными типами поведения в открытом поле. Журнал ВНД 1989; 39(3): 506—512.
7. Кулагин Д.А., Болондинский В.К. Нейрохимические аспекты эмоциональной реактивности и двигательной активности крыс в новой обстановке. Успехи физиологических наук 1986; 17(1): 92—109.
8. Чичинадзе К.Н., Гачечиладзе Л.Ф. Агрессивное поведение, его адаптационная функция и механизмы развития психосоматических патологий и болезней адаптации. Журнал физиологии ВНД 2006; 56(1): 18—129.
9. Данилова Н.Н. Функциональные состояния организма: механизмы и диагностика. М: Изд-во МГУ; 1985; 285 с.
10. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавание патологических процессов. Л: Медицина; 1978; 296 с.