

Касенов Б.Ж.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУОК-ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ЖИВОТНЫХ ОТРАВЛЕННЫХ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

B.Zh. Kasenov

### APPLICATION OF ACS-TEST FOR EVALUATION OF ETHOLOGICAL INDICATORS OF ANIMALS POISONED BY SALT OF HEAVY METAL

УДК: 569.323.4:615.777.9-099:591.51:57.083.184.185

Показано изменение поведения крыс в СУОК-тесте при комбинированном отравлении оксидом кадмия и ацетатом свинца. Введение тяжелых металлов привело к быстрому развитию тревожности в СУОК-тесте, что проявилось в резком снижении двигательной активности животных, снижении скорости передвижения и большем количестве замираний. Ключевые слова: кадмий, свинец, двигательная активность, скорость передвижения, СУОК тест.

*Change of behaviour of rats in the Suok-test is shown at the combined poisoning cadmium oxide and by acetate of lead. Introduction of heavy metals has led to fast development of uneasiness in the Suok-test that was showed in sharp decrease in impellent activity of animals, decrease in speed of movement and a lot freezing.*

**Keywords:** cadmium, lead, impellent activity, speed of movement, SUOK-test

**Введение.** Для решения важных биомедицинских задач по изучению причин болезней человека служат экспериментальные модели патогенеза на животных. Современная экспериментальная медицина нуждается в биоэтичных, чувствительных, гибридных и валидных моделях позволяющих более точно оценивать поведение животных. Суок-тест позволяет оценивать одновременно: 1) тревогу; 2) моторные дисфункции; 3) мотовестибулярные аномалии; 4) феномен стресс-индуцированной мотосенсорной дезинтеграции [1]. В настоящее время Суок-тест успешно используется для исследования на крысах и мышах в ряде лабораторий мира, в том числе России, Украины, Финляндии, Германии, Ирландии и США [2].

**Материал и методы.** Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах, м.т. 180-220 гр. Животные представляли две серии количеством 10 голов в каждой. Контрольные животные получали физ. р-р. при помощи зонда, в эквивалентных соотношениях. Металлы вводили последовательно, раздельно по 1 мг/кг м.т. оксид кадмия и ацетат свинца 10 мг/кг в течение 2<sup>х</sup> недель через зонд в/ж.

Метод основан на тестировании животного на приподнятой 3 метровой горизонтальной аллее шириной 6 см. Стандартный период тестирования составляет 5 мин. При помощи нарисованных маркером линий аллея разделена на равные 15-см сегменты и зафиксирована на высоте 20-25 см при помощи двух опор-ножек. Способность СТ

параллельно оценивать вестибуло-моторные функции у крыс (по количеству падений и числу соскальзывания задних лап) фактически приближает данную модель к вращающемуся или неподвижному ротору – традиционному тесту для оценки моторных функций у крыс и мышей [3,4]. СТ в черно-белой модификации аналогичен СТ и основан на использовании яркого направленного света (4 лампы 40 Вт зафиксированные над уровнем теста) для освещения половины (аверсивный освещенный отсек) находящегося в темной комнате шеста. В результате вторая половина шеста остается затемненной, являясь гораздо менее аверсивной для животного [5]. Исследования проведены в СТ черно-белой модификации. Все результаты представлены в виде средней и ошибки средней. Статистическую обработку данных проводили с помощью методов непараметрической статистики, по U критерию Манна-Уитни. Был принят уровень достоверности различий  $p \leq 0,05$  [6].

#### Результаты исследования и обсуждение.

Горизонтальная активность животных представлена в таблице 1. Десять контрольных животных в течение 5 минут пересекли  $67,7 \pm 4,2$  сегмента, тогда опытные крысы  $20,6 \pm 1,75$  сегментов. При подсчете перемещений в белом отсеке животные прошли  $48,4 \pm 4,23$  и в черном отсеке  $19,3 \pm 2,09$  сегмента. Введение комбинации металлов изменило соотношение активности в отсеках, больше перемещений у опытных крыс наблюдалось в черном отсеке  $12,2 \pm 1,12$  по сравнению с белым  $8,4 \pm 0,94$  сегментов.

Таблица 1  
Горизонтальная активность регистрируемая  
в черно-белом СТ

Показатели	Контрольные	Опытные
Суммарно по тесту	$67,7 \pm 4,2$	$20,6 \pm 1,75^*$
Белый отсек	$48,4 \pm 4,23$	$8,4 \pm 0,94^*$
Черный отсек	$19,3 \pm 2,09$	$12,2 \pm 1,12^*$
<b>Примечание:</b> - достоверность различий по сравнению с контролем * $p \leq 0,05$		

Оформление данных в виде графической информации в процентном соотношении горизонтальной активности в белом и черном отсеках приведено на рисунке 1.

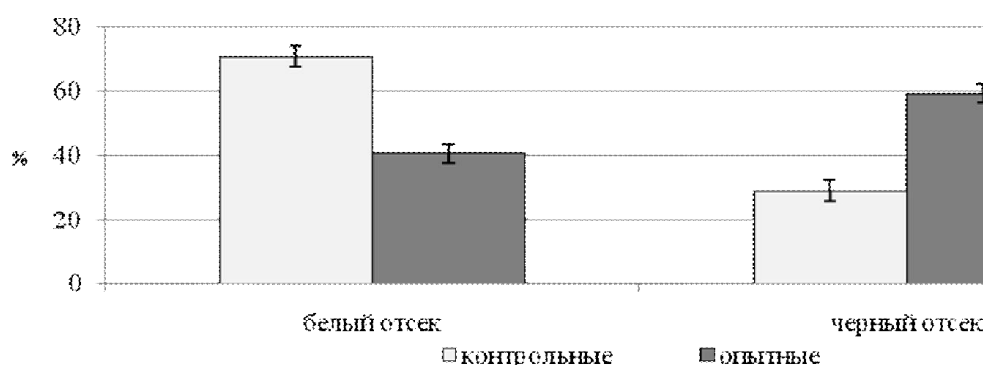


Рисунок 1 - Процент горизонтальной активности в черно-белом СТ

Вертикальная активность у контрольных животных  $10,7 \pm 0,88$  стоек была значительно выше, чем у опытных  $3,3 \pm 0,3$  сегмента (таблица 2). Отмечено предпочтение контрольными животными белого отсека, так количество стоек в нём  $9,4 \pm 0,7$ , а в черном  $1,3 \pm 0,36$ . Опытные животные в белом отсеке вставляли на задние конечности  $0,3 \pm 0,21$  раза, тогда как в черном отсеке  $3,0 \pm 0,14$  раз, что значительно больше, чем у контрольных крыс.

Таблица 2

**Вертикальная активность регистрируемая в черно-белом СТ**

Показатели	Контрольные	Опытные
Суммарно по тесту	$10,7 \pm 0,88$	$3,3 \pm 0,3^*$
Белый отсек	$9,4 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,21^*$
Черный отсек	$1,3 \pm 0,36$	$3,0 \pm 0,14^*$

**Примечание:** - достоверность различий по сравнению с контролем \*  $p \leq 0,05$

После подсчета заглядываний вниз нами отмечено количественное преобладание у контрольных крыс исследовательского поведения (таблица 3)  $7,8 \pm 0,32$  против  $6 \pm 0,42$  у опытных. При этом наблюдении количество заглядываний вниз у опытных крыс в черном отсеке преобладало по сравнению с этой формой поведения в белом отсеке.

Таблица 3

**Число исследовательских заглядываний вниз в Суок-тесте**

Показатели	Контрольные	Опытные
Суммарно по тесту	$7,8 \pm 0,32$	$6,0 \pm 0,42^*$
Белый отсек	$6,7 \pm 0,39$	$2,4 \pm 0,22^*$
Черный отсек	$1,1 \pm 0,23$	$3,6 \pm 0,47^*$

**Примечание:** - достоверность различий по сравнению с контролем \*  $p \leq 0,05$

Количество направленных в стороны движений головой при вытянутом положении тела (зрительное и ольфакторное сканирование, а также активные движения вибрисами) не имело разницы суммарно по тесту (таблица 4). Однако при сравнении в белом

и черном отсеке, нами обнаружена, аналогия с вертикальной и горизонтальной активностью, когда контрольные животные активны в белом отсеке  $10,4 \pm 0,7$  против  $5,5 \pm 0,5$  движений, а опытные в черном  $7,8 \pm 0,46$  против  $2,7 \pm 0,51$  движений у контрольных крыс.

Таблица 4

**Число исследовательских ориентаций в черно-белом Суок-тесте**

Показатели	Контрольные	Опытные
Суммарно по тесту	$13,1 \pm 0,64$	$13,3 \pm 0,63$
Белый отсек	$10,4 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,5^*$
Черный отсек	$2,7 \pm 0,51$	$7,8 \pm 0,46^*$

**Примечание:** - достоверность различий по сравнению с контролем \*  $p \leq 0,05$

В существующих поведенческих тестах по степени подавленности исследовательской активности традиционно оценивается тревожность [7,8].

Результаты полученные в черно-белом Суок-тесте подводят нас к решению о том, что комбинация тяжелых металлов введенная в организм животных привела к снижению исследовательского поведения. Оценивая данные с позиции состояния поведения характеризуемого как тревожное, можно предполагать, что комбинация кадмия и свинца способствует облегченному развитию тревоги в условиях новизны.

При обсчете процента времени проведенного в белом и черном отсеках, обнаружено, что контрольные животные провели больше времени в белом отсеке, чем в черном. Введение комбинации кадмия и свинца привело к тому, что крысы чаще находились в черном отсеке, чем в белом.

Десять контрольных крыс провели суммарно в белом отсеке  $192,1 \pm 8,67$  сек, и в черном отсеке  $107,9 \pm 8,67$  сек. Тогда как опытные животные пробыли  $106,1 \pm 6,6$  сек в белом и  $193,9 \pm 6,6$  сек в черном отсеке.

Рассматривая временные и пространственные отношения исследовательской активности у животных в черном и белом отсеках, мы записали несколько не привычные факты. Обычно освещение

является для грызунов фактором, который они избегают, стараясь перебежать в затемненное пространство. При анализе такого интересного поведения, нами был рассмотрен распорядок работы вивария. Включение света ежедневно совпадало с кормлением животных и уборкой клеток, на основе такого сочетания нам представляется, что свет вместо аверсивного раздражителя приобрел черты стимулирующего исследовательское и пищевое поведение.

При оценке двигательной активности важно рассматривать ещё один физический параметр, как средняя скорость движения по аллее. Измеряется параметр отношением между пересеченными сегментами и разницей времени между затраченным на движение и остановки. В среднем за 1 сек контрольное животное проходило  $0,22 \pm 0,01$  сегмента в секунду, при этом скорость в белом отсеке была несколько выше, чем в черном,  $0,25 \pm 0,02$  против  $0,19 \pm 0,03$ . Животные отравленные комбинацией кадмия и свинца передвигались медленнее, чем контрольные в 3,5 раза.

Рассматривая параметры Суок-теста отражающие эмоциональное состояние животных, Калуев А. предлагает подсчет времени выхода из центральной зоны, после посадки крыс на аллею, обозначенный как латентность выхода. У контрольных животных он равнялся  $3,5 \pm 0,22$  сек, а у опытных удлинился до  $28 \pm 1,47$  сек. По нашему представлению, опытным животным понадобилось для адаптации и начала движения более продолжительное время, что предположительно можно характеризовать как некое состояние «нерешительности» возникающее в ответ на новизну.

Остановка более 1 сек или «фризинг» рассматривается как показатель сильного стресса, вызванного помещением животного в незнакомую обстановку [9]. Крысы реагируют замиранием на новые, потенциально опасные стимулы. Самое простое решение - поместить животное в ярко освещенную камеру, которая значительно больше, чем клетка, где живет крыса [10]. Так как, неподвижность можно рассматривать как симптом страха, а интенсивность страха вызванного стандартным стимулом, отражает эмоциональное состояние животного. При этом процент остановок в белом отсеке у контрольных составил  $82 \pm 0,08$  %, а в черном  $18 \pm 0,08$  %, у опытных крыс в белом отсеке  $70 \pm 0,06$  %, а в черном  $30 \pm 0,06$  %. При измерении среднего расстояния между остановками у контрольных животных оно было  $36,5 \pm 4,55$ , а у опытных  $4,67 \pm 0,48$  сегмента. В белом отсеке животные контрольной группы останавливались через  $33,4 \pm 4,4$  сегмента, а в черном через  $5,8 \pm 2,67$ . Животные получавшие комбинацию кадмия и свинца в белом отсеке останавливались через  $2,7 \pm 0,34$ , а в черном через  $6,4 \pm 1,74$  сегмента.

При подсчете количества актов груминга, обозначаемых авторами теста как смешенная активность, разницы между сериями животных не обнаружено  $4,2 \pm 0,24$  у контрольных против  $4,4 \pm 0,3$  у опытных.

Эмоциональные состояния также сопровождаются различными, вегетативными явлениями (ускорение сердечного ритма, гальваническая кожная реакция, расширение зрачков и т. д.). Вегетативная функция, которую удобно учитывать вместе с измерением активности - это дефекация / 18/. Животные, которые меньше передвигаются и у которых наблюдается большая дефекация в ситуации открытого поля, считаются более эмоциональными, чем которые много передвигаются, но имеют низкий уровень дефекации [11]. Частота уриаций, также как и частота дефекаций отражает эмоциональное состояние животных и зависит от вегетативной регуляции. Вероятно такая же по значению реакция будет и в условиях Суок-теста. Так по количеству болюсов между контрольной и опытной группами различий не замечено. Однако акт дефекации у контрольных был чаще в белом отсеке  $2,3 \pm 0,15$ , чем в черном  $0,7 \pm 0,15$ . У опытных в белом отсеке  $0,5 \pm 0,16$ , при  $2,4 \pm 0,3$  в черном. Дефекация у контрольных животных началась  $3,6 \pm 0,13$  мин, тогда как у опытных  $0,91 \pm 0,11$  мин. Количество уриаций между сериями не имело разницы. Весьма важный показатель контраст между белым и черным отсеками регистрируемый под обозначением – переходов через центр аллеи. Контрольные животные переходили центральную зону  $5,9 \pm 0,23$  раз, а опытные  $2,8 \pm 0,2$  раз.

При прохождении аллеи моторных дисфункций и мото-вестибулярных аномалий не обнаружено, так как количество соскальзывания лап было одинаковым. В основополагающих работах К. Монтомери [12] постулируется ведущая роль баланса мотиваций – стремления исследовать новизну (неофилия) и страха перед ней (неофобия, тревога) – в формировании поведения животного в данных условиях. От того в какую сторону (под влиянием внешних и внутренних факторов) сдвинут этот баланс, в итоге зависит результирующее поведение животного в незнакомой ситуации [13].

**Заключение.** Таким образом, при наблюдении за поведением крыс в условиях Суок-теста, было замечено, что контрольные животные в сравнении с опытными были активнее, что проявилось в большем количестве пересеченных сегментов на аллее, преобладании средней скорости движения. Опытные животные демонстрировали низкую исследовательскую активность, характеризующуюся по количеству вертикальных стоек, заглядыванию вниз, ориентациям. Введение комбинации кадмия и свинца привело к тому, что у крыс увеличилось количество замираний, снизилось количество переходов через центральную зону.

**Литература:**

1. Калуев А.В., Туохимаа П. Суок тест - новая поведенческая модель тревоги. *Нейронауки*. 2005. №1 (1). – С.17-24
2. Калуев А.В. Принципы экспериментального моделирования тревожно-депрессивного патогенеза. *Нейронауки*. 1(3) – 2006. – С. 34-56
3. Crawley J.N., Belknap J.K., Collins A. et al. Behavioural phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies // *Psychopharmacol.* – 1997. – 132. – P. 107-124.
4. Crawley J.N., Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice // *Horm. Behav.* – 1997. – 31. – P. 197-211.
5. Kalueff A.V., Lou YR., Laaksi I., Tuohimaa P. Increased anxiety in mice lacking vitamin D receptor gene // *Neuroreport*. – 2004. – 15. – P. 1271-1274
6. Математическая статистика для психологов. Учебник / О.Ю. Ермолаев - 2-е изд. испр. - М. Московский психолого-социальный институт. Изд. Флинта. 2003 - 336 с.
7. Bourin M., Hascoet M. The mouse light/dark box test // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – 463. – P. 55-65.
8. Paulus M.P., Dulawa S.C., Ralph R.J., Geyer M. Behavioural organization is independent of locomotor activity in 129 and C57 mouse strains // *Brain Res.* – 1999. – 835. – P. 27-36
9. Walsh R., Cammins R. The open-field test: A critical review // *Psychl. Bull.* – 1976. – Vol.83. – P. 482–504
10. Hall C.S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. comp. physiol. Psychol.*, 1936, – Vol.22. – P. 345-352
11. А. В. Мельников, М. Р. Новикова, М. А. Куликов. Сравнение поведения в тесте «открытого поля» крыс линии wistar и белых беспородных крыс. - <http://mosmedclinic.ru/> VI Международная междисциплинарная конференция по биологической психиатрии «Стресс и поведение» 26 октября 2001, Москва, Россия Гостиница «Университетская»
12. Montgomery K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior // *J. Comp. Physiol. Psychol.* – 1955. – 48. – P. 254-260
13. Калуев А.В. Стресс. Тревожность. Поведение. – Киев: КСФ, 1998. – 98 с.

**Рецензент: д.мед.н., профессор Арзыматова Л.**

---