

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ» ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПОРНЫХ РЕАКЦИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ\***

**Г.И. Новиков, Н.В. Павлова, Н.М. Зеленкова, Т.Р. Мошонкина**

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Новая экспериментальная установка типа «открытое поле» предназначена для использования в экспериментальной физиологии и медицине для исследования степени поражения или восстановления функции поддержки веса тела у лабораторных животных. В статье описан принцип работы установки. Приведен пример использования установки в исследованиях роли опорных реакций в регуляции локомоции у крыс с полной перерезкой спинного мозга.

**Ключевые слова:** лабораторные животные; локомоторная активность; опорная функция; экспериментальная установка «открытое поле».

В физиологии движений термином «опорные реакции» обозначают реакции организма, направленные на поддержку веса тела и сохранение позы. Выявлено, что опорные реакции оказывают влияние на структуру мышц [2], организацию двигательных рефлексов спинного мозга [7] и сложно организованных движений в целом [5; 8]. Исследование опорных реакций невозможно без контроля и анализа взаимодействия опорной поверхности стоп с опорой. Изучению процесса взаимодействия стопы человека с опорой посвящено очень много исследований, и только в 2010 г. опубликована серия статей на эту тему [9; 12; 13; и т.д.]. Исследований, связанных с анализом взаимодействия плантарной поверхности стоп с опорой проведенных на животных, практически нет. Это обусловлено, с нашей точки зрения, с отсутствием доступных адекватных методов и устройств. Если для исследований, проводимых на крупных приматах, можно использовать системы, аналогичные установкам, предназначенным для регистрации опорных реакций у людей [14; 15], то для традиционных лабораторных животных это невозможно. Для объективизации наблюдений при исследовании опорных реакций у животных используется латеральная видеосъемка, когда камеры располагают сбоку от животных, чтобы зафиксировать положение суставов во время движения. При этом животное (мышь, крыса, кошка) обычно фиксируют (подвешивают) над движущейся лентой тредбана так, чтобы задние конечности опирались

---

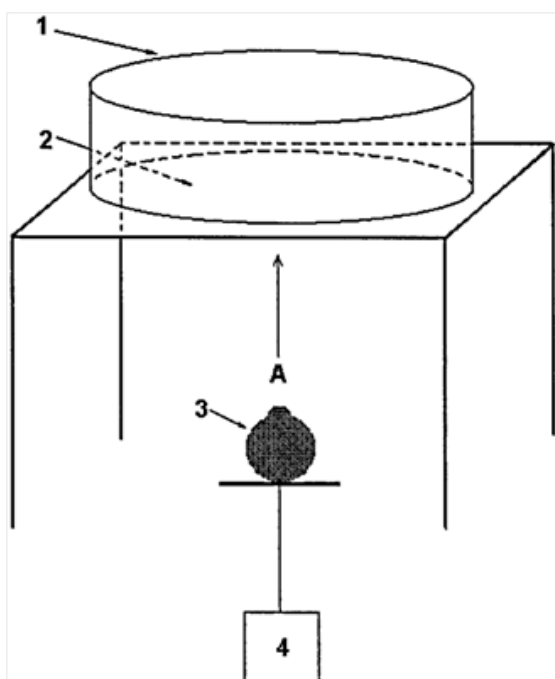
\* Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №10-04-00982-а)

на ленту тредбана [10; 11]. Это метод кинематического анализа движений. Он имеет ряд ограничений: он трудоемкий и дорогостоящий, так как экспериментальная установка включает в себя тредбан, устройство, фиксирующее животное, видеокамеру с высоким разрешением и нестандартно большой частотой кадров, чтобы записать все детали перемещения суставов. После записи видеопленки происходит покадровый анализ изображений. Кроме того, туловище животного подвешено на специально разработанном креплении. Это обстоятельство осложняет интерпретацию экспериментальных результатов из-за неестественного положения животного. Единственная известная система анализа походки у незафиксированных в подвеске животных (Gait Analysis System for Rodents, Digi Gait™, США) задает направление и скорость движения животных направлением и скоростью движения бегущей дорожки (10×61 см<sup>2</sup>), что ограничивает сферу применения этого устройства, т. к. невозможно регистрировать взаимодействие стопы с опорой в стандартных поведенческих тестах (лабиринт, открытое поле и др.). Кроме того эта система трудно доступна из-за большой стоимости.

Цель работы – исследование движений при отсутствии супраспинальных влияний, функция поддержки веса тела является необходимым элементом локомоции у наземных животных и регистрация взаимодействия стопы с опорой очень важна при изучении этой функции. Для исследования степени поражения (или степени восстановления) функции поддержки веса тела задними конечностями у крыс и мышей широко применяется БББ-шкалирование (BBB-scale) [6]. Это поведенческий тест, предназначенный для исследования движений задних конечностей после травмы спинного мозга. Животное помещают в манеж диаметром около 1 м, так называемое «открытое поле» [16], и двое исследователей наблюдают за движениями задних конечностей во время свободного перемещения животного. Возможные движения задних конечностей прошкалированы от 0 до 21 балла (от отсутствия движений до подошвенной постановки стоп и координированных движений конечностей). По сравнению с кинематическим анализом движений, БББ-шкалирование менее трудоемкое, значительно дешевле, животные во время тестирования находятся в естественной для них позе. Однако процедура шкалирования может быть субъективной, плохо поддается документированию. Необходимо было разработать устройство, позволяющее наблюдать движения животного в «открытом поле» и одновременно регистрировать взаимодействия стопы с опорой.

Мы разработали устройство [4], состоящее из манежа с прозрачным ограждением и прозрачным дном (рис. 1). Манеж служит «открытым полем», куда помещают животных. Дно манежа диаметром 85 см изготовили из прозрачного 8-мм поливинилхлорида, стенки высотой 30 см – из 2-мм оргстекла. Под манежем, в центре, разместили

вэб-камеру (Logitech-QuickCam Pro 1000). Объектив видеокамеры снизу нацелен на «открытое поле», которое должно полностью попадать в объектив видеокамеры. Видеоизображение передавали на компьютер (HP Compaq nx 7400) для сохранения и последующего анализа. Для записи движений использован стандартный драйвер вэб-камеры. Перед тестированием подошвенную поверхность стоп исследуемых конечностей окрашивали быстросохнущим красителем для того, чтобы цвет метки контрастировал с окраской шерсти животного. С этой целью был использован черный фломастер на спиртовой основе. После высыхания красителя животное помещали в «открытое поле» и начинали запись на видеокамеру. Длительность наблюдения и записи – 4 мин, что соответствует длительности наблюдения при БББ-шкалировании. Прозрачные стенки и дно «открытого поля» позволяли наблюдать за животными во время передвижений и проводить БББ-шкалирование.



Р и с . 1 . Схема открытого поля для регистрации опорных реакций:  
1 – прозрачные борта, 2 – манеж, «открытое поле», 3 – цифровая видеокамера,  
4 – компьютер; вид по стрелке А приведен на рис. 4

Устройство было апробировано в исследовании роли опорных реакций в организации локомоторных движений на экспериментальной модели спинализированных крыс с денервацией задних конечностей.

Исследования проведены на взрослых самках крыс линии Sprague-Dawley массой 200–220 г. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. IV, ст. 10, 4679/11 ГК от 1.12.1999 г.».

Эксперименту предшествовал двухнедельный период адаптации животных. Полную перерезку спинного мозга на уровне Th9-Th10 проводили стандартным способом [3]. Животные были разделены на три группы: 1) первая контрольная (перерезка спинного мозга); 2) вторая контрольная (ложнооперированные, перерезка спинного мозга, *nervus suralis* билатерально открывали, поднимали на крючке, но не перерезали); 3) экспериментальная (перерезка спинного мозга и билатеральная перерезка *n. suralis*).

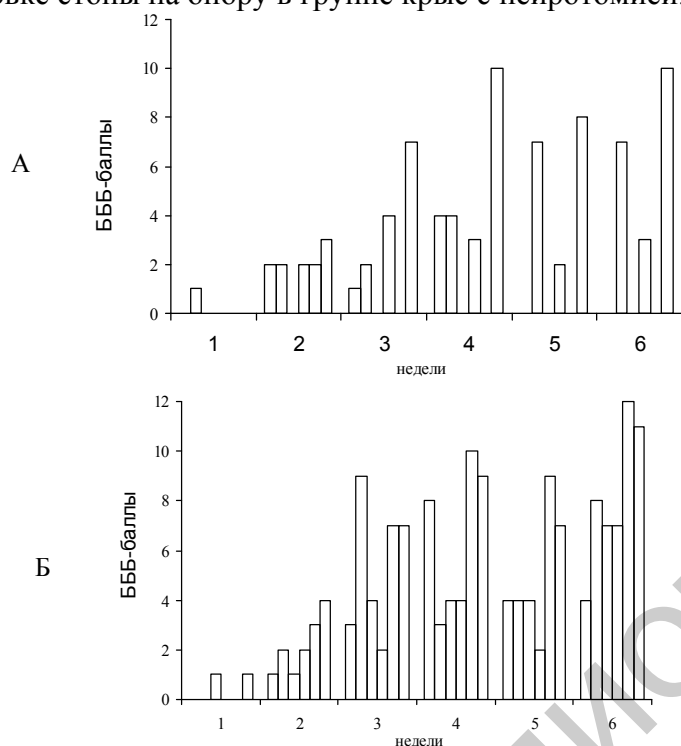
Через сутки начинали тренировки всех крыс на тредбане. В процессе тренировки воспроизводились движения, повторяющие нормальный цикл шага, т. е. с плантарной постановкой задних лап на опору. Тренировки проводили 5 раз в неделю по 15 мин на протяжении 6 недель. Степень восстановления движений определяли еженедельно, на протяжении 6 недель после перерезки спинного мозга, используя стандартную БББ-шкалу, проводя измерения в разработанном устройстве с использованием видеорегистрации. Статистическую обработку результатов проводили по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Обследования крыс экспериментальной группы по БББ-шкале показали, что через 6 недель максимальный результат составляет 9 баллов (плантарная постановка стопы в состоянии спокойной стойки или постановка стопы на тыльную поверхность с поддержкой веса тела во время ходьбы) (рис. 2). Такой результат зарегистрирован у единственной крысы. У всех остальных показатели находятся в диапазоне от 0 баллов (отсутствие движений) до 4 баллов (слабые движения во всех трех суставах). Во второй контрольной группе спинализированных крыс с интактным *n. suralis* характеристики распределены между 2 баллами (интенсивные движения в одном суставе и слабые движения во втором суставе) и 10 баллами (периодическая плантарная постановка стопы с поддержкой веса тела во время ходьбы). Оценки по БББ-шкале для тренированных спинализированных крыс повторяют ранее полученные результаты [1]. К 6-й неделе после спинализации и длительных тренировок на тредбане у крыс с нейротомией заметно хуже характеристики двигательной активности, чем у крыс с интактным *n. suralis*.

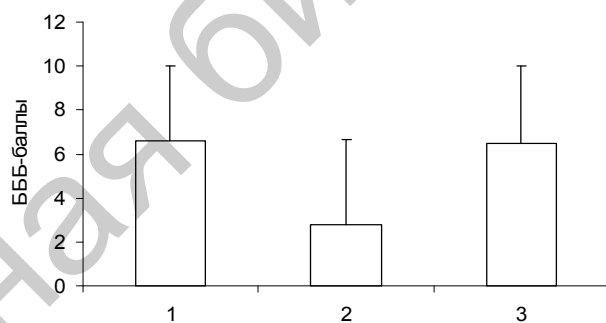
Результаты для первой контрольной группы (ложнооперированные крысы) на рис. 2 не приведены. Они практически не отличаются от результатов первой контрольной группы. Усредненные результаты БББ-шкалирования для всех групп крыс показаны на рис. 3.

Анализ локомоторной активности спинализированных тренированных крыс с нейротомией и с интактным *n. suralis*, оцененной по БББ-шкале, приводит к выводу, что перерезка *n. suralis* приводит к снижению оценок локомоторной активности. Однако различия между

группами, оцененные непараметрическим критерием Манна-Уитни недостоверны. Можно говорить о тенденции к снижению локомоторной активности, к отсутствию функции поддержки веса тела при плантарной постановке стопы на опору в группе крыс с нейротомией.



Р и с . 2. Баллы БББ-шкалы, зарегистрированные за весь период исследования у крыс экспериментальных групп:  
 А – спинализированные с билатеральной нейротомией n. suralis,  
 Б – спинализированные с интактными нервами задних конечностей;  
 нулевые баллы (отсутствие движений задних конечностей) не показаны



Р и с . 3. Усредненные оценки по БББ-шкале для спинализированных крыс через 6 недель после операции и тренировок на тредбане:  
 1 – с интактным n. suralis, 2 – ложнооперированные,  
 3 – с билатеральной нейротомией n. suralis;  
 вертикальные линии показывают стандартное отклонение

Предложенный нами метод видеорегистрации в открытом поле, позволил обнаружить случаи плантарной постановки стопы на опору через 5 и 6 недель тренировки. На рис. 4 представлен кадр видеозаписи крысы с частичным восстановлением функции поддержки веса тела. Стрелка указывает на левую заднюю конечность, повернутую подошвенной поверхностью стопы к опоре. Правая задняя конечность повернута тыльной поверхностью стопы к опоре. В обеих контрольных группах у крыс было зарегистрировано по 3 и более случаев плантарной постановки стопы на опору, если оценки по БББ-шкале у них были 9 или 10. У крыс с нейротомией плантарная постановка стопы не была зарегистрирована ни разу. Следовательно, нейротомия *n. suralis* приводит к нарушению опорных реакций.

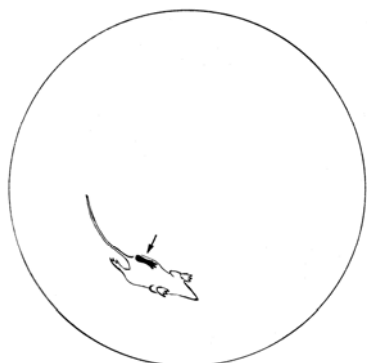


Рис. 4. Крыса из первой контрольной группы в «открытом поле» для регистрации опорных реакций (схема): стрелка указывает на подошвенную постановку стопы

В ходе исследований роли опорных реакций в организации локомоции было протестировано два метода регистрации локомоторного поведения. Методом БББ-шкалирования было показано, что билатеральная нейротомия *n. suralis* приводит к ухудшению восстановления локомоции и функции поддержки веса тела. Однако различия между оценками локомоторной активности между контрольной и экспериментальной группами статистически недостоверны. Результат может быть связан как с тем, что афферентные волокна *n. suralis* не являются единственным источником об опоре, так и с несовершенством использованного метода, с тем, что БББ-шкалирование лишь косвенно оценивает опорные реакции. В то же время предложенный метод видеорегистрации в «открытом поле» убедительно показал, что у крыс с перерезкой *n. suralis* функция поддержки веса тела с плантарной постановкой стопы не восстановилась.

Таким образом, предложенный метод видеорегистрации в «открытом поле» является наглядным и малозатратным способом исследования опорных реакций у животных.

### Список литературы

1. *Гилерович Е.Г., Мошонкина Т.Р., Павлова Н.В., Федорова Е.А., Новиков Г.И., Герасименко Ю.П., Отеллин В.А.* Морфофункциональные характеристики дистального отдела спинного мозга после его полной экспериментальной перерезки с последующей тренировкой животного на тредбане // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2008. Т. 44, № 6, С. 636–642.
2. *Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С.* Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 5. С. 508–521.
3. *Мошонкина Т.Р., Гилерович Е.Г., Федорова Е.А., Авелев В.Д., Герасименко Ю.П., Отеллин В.А.* Морфо-функциональные основы восстановления локомоторных движений у крыс с полной перерезкой спинного мозга // Бюл. эксперимент. биол. медицины. 2004. Т. 138, № 8. С. 225–229.
4. Открытое поле для лабораторных животных: пат. 89327 Российская Федерация / Новиков Г.И., Мошонкина Т.Р.; патентообладатель УРАН ИФ РАН; опубл. 10.12.2009. 1 с.
5. *Томиловская Е. С., Киренская А. В., Лазарев И. А., Новотоцкий-Власов В.Ю., Козловская И.Б.* Влияние безопорности на характеристики пресаккадических ЭЭГ-потенциалов у испытуемых с разным профилем асимметрии // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т. 42, № 5. С. 14–18.
6. *Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C.* A sensitive and reliable loco-motor rating scale for open field testing in rats // J. Neurotrauma. 1995. Vol. 12, № 1. P. 1–21.
7. *Conway B.A., Knikou M.* The action of plantar pressure on flexion reflex pathways in the isolated human spinal cord // Clinical Neuroph. 2008. Vol. 119. P. 892–896
8. *Eils E., Noltea S., Tewesa M., Thorwestenb L., Völkerb K., Rosenbauma D.* Modified pressure distribution patterns in walking following reduction of plantar sensation // J. Biomech. 2002. Vol. 35, iss. 10. P. 1307–1313.
9. *Goffar S.L., Naylor J., Reber R.J., Rodriguez B.M., Christiansen B.C., Walker M.J., Miller R.B., Teyhen D.S.* Dynamic plantar pressure changes during loaded gait // US Army Med. Dep. J. 2010. July-September. P. 77.
10. *Ichiyama RM, Gerasimenko Y, Jindrich DL, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR.* Dose dependence of the 5-HT agonist quipazine in facilitating spinal stepping in the rat with epidural stimulation // Neurosci. Lett. 2008. Vol. 438, № 3. P. 281–285.
11. *Leon R.D. de, Hodgson J.A., Roy R.R., Edgerton V.R.* Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats // J. Neurophysiol. 1998. Vol. 79. P. 1329–1340.
12. *Morrison K.E., Hudson D.J., Davis I.S., Richards J.G., Royer T.D., Dierks T.A., Kaminski T.W.* Plantar pressure during running in subjects with chronic ankle instability // Foot Ankle Int. 2010. Vol. 31, № 11. P. 994–1000.
13. *Natali A.N., Forestiero A., Carniel E.L., Pavan P.G., Dal Zovo C.* Investigation of foot plantar pressure: experimental and numerical analysis // Med. Biol. Eng. Comput. 2010. Vol. 48, № 12. P. 1167–1174.
14. *Vereecke E., D'Août K., De Clercq D., Van Elsacker L., Aerts P.* The

- relationship between speed, contact time and peak plantar pressure in terrestrial walking of bonobos // *Folia Primatol* (Basel). 2004. Vol. 75, № 4. P. 266–278.
15. Vereecke E., D'Août K., Van Elsacker L., De Clercq D., Aerts P. Functional analysis of the gibbon foot during terrestrial bipedal walking: plantar pressure distributions and three-dimensional ground reaction forces // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2005. Vol. 128, № 3. P. 659–669.
16. Walsh R.N., Cummins R.A. The Open-Field test: a critical review // *Psychol. Bull.* 1976. Vol. 83, № 3. P. 482–504.

**EXPERIMENTAL INSTALLATION «OPEN FIELD»  
FOR INVESTIGATION OF PLANTAR PRESSURE  
IN LABORATORY ANIMALS**

**G.I. Novikov, N.V. Pavlova, N.M. Zelenkova, T.R. Moshonkina**

Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint-Petersburg

New experimental installation like «open field» intended for experimental physiology and medicine for investigation of the degree of body weight support lesion and recovery. Principle of the installation operation presented. An example of the installation usage in the investigation of the plantar pressure involvement in locomotion recovery after complete lesion of the spinal cord presented.

**Keywords:** *laboratory animals; locomotion; body weight support; experimental installation «open field».*

*Об авторах:*

НОВИКОВ Геннадий Петрович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, УРАН Институт физиологии им И.П. Павлова РАН, e-mail: tm@pavlov.infran.ru

ПАВЛОВА Наталья Владимировна – младший научный сотрудник, УРАН Институт физиологии им И.П. Павлова РАН, e-mail: dakmin1@mail.ru

ЗЕЛЕНКОВА Нина Михайловна – младший научный сотрудник, УРАН Институт физиологии им И.П. Павлова РАН, e-mail: tm@pavlov.infran.ru

МОШОНКИНА Татьяна Ромульевна – кандидат биологических наук, УРАН Институт физиологии им И.П. Павлова РАН, e-mail: tmoshonkina@gmail.com