

**ФИЗИОЛОГИЯ ПОВЕДЕНИЯ;
ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 612.821.6

**АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6 В АРЕНАХ
“ОТКРЫТОГО ПОЛЯ” РАЗНОГО РАЗМЕРА**

© 2012 г. **И. В. Лебедев, М. Г. Плескачева, К. В. Анохин**

*Кафедра высшей нервной деятельности Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Курчатовский Нанобиоинфокогно-центр, Национальный исследовательский центр “Курчатовский
институт”,*

Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва,

e-mail: pleskacheva@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 14.12.2011 г.

Принята в печать 29.02.2012 г.

Характеристики используемой установки влияют на поведение грызунов в “открытом поле”, однако не все эффекты такого рода описаны достаточно полно. Так, данные о влиянии размеров арены на поведение животных немногочисленны и противоречивы. С помощью современных инструментов (система видеотрекинга Noldus EthoVision, программы WinTrack и Segment Analyzer) анализировали особенности поведения мышей C57BL/6 в аренах разного размера, диаметром 35 см (число животных $n = 9$), 75 ($n = 10$), 150 ($n = 10$) и 220 ($n = 10$). Показано, что в аренах большего размера мыши проходят бóльшие расстояния с большей скоростью, увеличивается количество стоек. Горизонтальная и вертикальная активность возрастает непропорционально росту площади арен. Показано, что размер исследуемого пространства влияет на сегментные характеристики маршрута. Комплексный анализ выявил, что структура пространственного поведения мышей в небольших аренах (диаметром 35 и 75 см) принципиально отличается от таковой в аренах большего размера (диаметром 150 и 220 см). Площадь их открытой области велика и, по-видимому, требуется иная по сравнению с малыми аренами организация пространственного поведения, учитывающая “неоднородности” по биологической значимости разных частей пространства.

Ключевые слова: “открытое поле”, пространственное поведение, исследовательская активность, сегментация, мыши C57BL/6.

C57BL/6 Mice Open Field Behaviour Qualitatively Depends on Arena Size

I. V. Lebedev, M. G. Pleskacheva, K. V. Anokhin

Department of Neurobiology, Lomonosov Moscow State University,

Kurchatov Centre of Converging of Nano-, Bio-, Information and Cognitive Sciences and Technologies,

P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow,

e-mail: pleskacheva@mail.bio.msu.ru

Open field behavior is well known to depend on physical characteristics of the apparatus. However many of such effects are poorly described especially with using of modern methods of behavioral registration and analysis. The previous results of experiments on the effect of arena size on behavior are not numerous and contradictory. We compared the behavioral scores of four groups of C57BL/6 mice in round open field arenas of four different sizes (diameter 35, 75, 150 and 220 cm). The behavior was registered and analyzed using Noldus EthoVision, WinTrack and SegmentAnalyzer software. A significant effect of arena size was found. Traveled distance and velocity increased, but not in proportion to increase of arena size. Moreover a significant effect on segment characteristics of the trajectory was revealed. Detailed behavior analysis revealed drastic differences in trajectory structure and number of rears between smaller (35 and 75 cm) and bigger (150 and 220 cm) arenas. We conclude, that the character of exploration in smaller and bigger arenas depends on relative size of central open zone in arena. Apparently its extension increases the motivational heterogeneity of space, that requires another than in smaller arenas, strategy of exploration.

Keywords: open field, spatial behavior, exploratory behavior, trajectory segmentation, C57BL/6.

Проблема влияния на поведение животных различных параметров теста “открытое поле” (ОП) [17] в течение длительного времени привлекала к себе внимание исследователей. Известны многочисленные работы (см. обзоры [5, 6, 29]), показывающие, насколько сильно зависит поведение животных от характеристик установки (размер, форма и высота стенок арены, освещенность и др.). Это, несомненно, затрудняет сравнение данных, полученных разными авторами на разных установках. Кроме того, современные исследователи, располагающие инструментарием для автоматической регистрации траектории и ее детального анализа, сталкиваются с отсутствием материала для трактовки собственных данных и сопоставления их с фактами, полученными другими авторами в прошлом веке, когда техническое оснащение большинства лабораторий не позволяло проводить детальный анализ поведения. Получение новых данных о влиянии характеристик арены ОП на поведение животных с привлечением современных средств регистрации и анализа представляется нам актуальной и важной задачей.

Одним из параметров, влияющих на поведение животных в ОП, является размер арены [29]. Влияние этого фактора на поведение грызунов в ОП изучалось на крысах [8, 22], песчанках [25] и мышах [7, 21, 24]. При увеличении размера арены у животных увеличивалась подвижность, оцениваемая по числу пересекаемых ими квадратов ОП. Мы обнаружили всего две современные работы, в которых сравнивали активность животных в аренах разного размера [15, 16]. Обе выполнены на редко используемой в экспериментах полевке Гюнтера (*Microtus guentheri*, по устаревшей номенклатуре, используемой авторами — *Microtus socialis guentheri*). В отличие от предыдущих работ показано, что у полевок не увеличивается подвижность в аренах больших размеров (2 × 2 м и 2.6 × 4 м) по сравнению с малыми (1 × 1 м и меньше).

Мы выбрали в качестве объекта исследования мышей линии C57BL/6, которых часто используют в различных экспериментах (см., например, обзор [11]).

В экспериментах Д. Эйлама [15, 16] поле, в которое помещали полевок, не было огорожено занавесом. Стенки малого поля полностью закрывали вид комнаты, тогда как в большом они позволяли видеть ее обстановку. Таким образом, в аренах разного размера

животным была доступна и разная зрительная информация. Мы же использовали арены, окруженные шатром из черной ткани. Высоту их стенок подобрали так, чтобы шатер был одинаково виден из всех арен, т.е. в нашем эксперименте арены различались только по размеру.

Применяемый в современных работах метод видеотрекинга позволяет проанализировать показатели, которые трудно или невозможно оценить без регистрации трека — маршрута, пройденного животным: точные значения длины пути, скорости, активность в разных частях арены и др. Однако применение дополнительных методов анализа является скорее исключением, чем правилом. Так, редко используется и метод сегментации, хотя принцип разделения траектории на отдельные фрагменты с получением характеристик каждого из них положен в основу ряда подходов к ее обработке [9, 18, 30]. Метод выделения “сегментов” траектории (побежек, отделенных друг от друга остановками) разработан для детального анализа исследовательского поведения грызунов: крыс [12], мышей [14] и полевок [15]. Согласно установленному алгоритму выделенные сегменты классифицируются на несколько типов по их скоростным характеристикам. Такой подход позволяет перейти от усредненных показателей трека животного к анализу участков пути, имеющих, по предположению авторов, разный этологический смысл. Подобный метод сегментации трека был впоследствии использован при создании программы Segment Analyzer (© Т.В. Мухина, К.В. Анохин, 2002). Опубликованных работ, выполненных с использованием этой программы, немного [1, 10]. Показаны специфические изменения в структуре исследовательского поведения мышей в зависимости от сроков пренатального воздействия на закладку коры [1]. Мы применили Segment Analyzer для анализа треков мышей, тестируемых в аренах разного размера, но по причинам, описанным ниже, использовали другой алгоритм классификации полученных сегментов.

Таким образом, цель настоящего исследования — оценить характеристики траекторий передвижения и другие показатели поведения мышей C57BL/6 в аренах разного размера с помощью системы видеотрекинга и методов сегментации.

МЕТОДИКА

В эксперименте использовали 39 самцов мышей (возраст 3–4 мес.) линии C57BL/6 (питомник “Столбовая”). Животных кормили *ad libitum* стандартным комбикормом с добавлением овощей. Мыши были распределены на четыре группы, каждую из которых тестировали в арене определенного размера: “гр. 35” (число животных $n = 9$, диаметр $D = 35$ см, длина окружности $C = 111$ см, площадь $S = 962$ см², высота стенок $H = 20$ см), “гр. 75” ($n = 10$, $D = 75$ см, $C = 236$ см, $S = 4418$ см², $H = 40$ см), “гр. 150” ($n = 10$, $D = 150$ см, $C = 471$ см, $S = 17672$ см², $H = 60$ см) и “гр. 220” ($n = 10$, $D = 220$ см, $C = 692$ см, $S = 38014$ см², $H = 60$ см).

Стенки арен изготавливали из алюминиевых листов, покрытых тонким пластиком. ОП огораживали шатром из черной ткани. На высоте 2 м от центра арены размещали лампу (40 Вт, 5 лк на уровне пола). Регистрацию траектории животного осуществляли с помощью видеокамер “Sony” (Япония) или “CNB” (Китай) с широкоугольным объективом, расположенных на высоте 2 м от арены, и компьютера с платой видеоввода изображения “Picolo”. Программа EthoVision ver. 3.0 (“Noldus”, Голландия) позволяла сохранять траекторию в виде координат, регистрируемых с частотой 12.5 кадров в 1 с. За поведением животных наблюдали через отверстие в шатре и с помощью двух камер “Sony” (Япония), изображение с которых выводилось на телевизор и переключалось с помощью пульта. Регистрацию частоты и длительности груминга и количества стоек производили вручную (с клавиатуры) с помощью программы EthoVision.

Мышь приносили за 3–5 мин до эксперимента в небольшом непрозрачном боксе с длинной рукоятью и выпускали в центр арены на 20 мин. Животных тестировали однократно. Между попытками пол ОП протирали водой, этиловым спиртом и сухой тканью для устранения запаховых меток. Для нивелирования фактора времени выпуска эксперименты с животными разных групп чередовали. Эксперименты проводили в соответствии с Директивой Европейского Сообщества 86-609 от 24 ноября 1986 г.

Траектории и показатели поведения анализировали с помощью программы EthoVision. Вычисляли длину маршрута, длительность и частоту груминга, количество стоек с опорой и без опоры на борт и показатель “ин-

тенсивности стоек” (отношение числа стоек к длине пути). Анализировали динамику изменения в ходе опыта вертикальной и горизонтальной активности в последовательные 4-минутные интервалы. Отмечали уровень дефекации (число болюсов). В программе WinTrack [30] вычисляли скорость (без учета эпизодов со скоростью ниже 5 см/с).

Для сегментного анализа файлы импортировались в программу Segment Analyzer, которая позволила получить список выделенных сегментов с указанием характеристик (длина сегмента, максимальная скорость, длительность) и наглядное изображение их пространственного распределения. Использовали параметры, установленные по умолчанию (минимальное количество точек в разделяющих сегменты остановках равнялось 5). Программа предусматривает возможность автоматической классификации сегментов по их скоростным характеристикам, однако наши попытки ее применения не были успешными из-за невозможности автоматического выделения аналогичных для всех мышей диапазонов сегментов. В связи с этим мы подобрали собственные параметры классификации. Весь массив сегментов в каждой арене распределили по диапазонам максимальных скоростей. К первому отнесли сегменты, скорость которых не превышала 5 см/с. Ко второму – в интервале от 5 до 10 см/с, к третьему – от 10 до 15 см/с и т.д. Оказалось, что при увеличении размера арены соотношения сегментов различных диапазонов изменяются. Соседние диапазоны со сходным характером изменений объединяли друг с другом. Таким образом установили границы пяти объединенных диапазонов и для сегментов каждого из них оценили скоростные и временные характеристики, а также среднюю протяженность.

Отдельно анализировали активность по зонам арен диаметром 75, 150 и 220 см. В каждой арене выделяли центральную зону диаметром 35 см, пристеночную зону (15 см) и промежуточную зону между ними. Для каждой из них регистрировали длину пути, скорость, время пребывания, долю остановок, расположенных в данной зоне относительно их общего числа. Оценивали пространственное распределение сегментов траектории по зонам в аренах разного размера. Сегменты, пересекавшие границы зон, считались принадлежащими той зоне, где располагалась их большая часть.

Таблица 1. Некоторые характеристики траекторий мышей в аренах разного размера. Здесь и далее указаны средние значения и ошибки средних**Table 1.** Track characteristics in different arenas (mean \pm SEM)

Параметр	35 см	75 см	150 см	220 см
Длина пути (см), отнесенная к площади (см ²)	7.3 \pm 0.4	2.2 \pm 0.1 ***	0.82 \pm 0.06 ##&&&	0.52 \pm 0.03 \$+++xxx
Длина пути, отнесенная к диаметру (см)	200.4 \pm 11.2	129.5 \pm 6.3 ***	93 \pm 7.7 ##&&&	77.4 \pm 4.4 ++xxx
Количество стоек, отнесенное к площади $\times 10^3$	50 \pm 8	10 \pm 1 **	4.0 \pm 0.7 #&&&	1.0 \pm 0.2 \$+++xxx
Количество стоек, отнесенное к диаметру	1.54 \pm 0.20	0.72 \pm 0.08 *	0.51 \pm 0.08 #&&&	0.33 \pm 0.03 \$+++xxx
Интенсивность стоек: количество стоек/длина пути (м)	0.54 \pm 0.09	0.37 \pm 0.06	0.30 \pm 0.05 #&	0.40 \pm 0.04 +x
Дефекация, число болюсов	3.2 \pm 0.8	4.6 \pm 0.5	3.2 \pm 0.6	4.1 \pm 0.5
Длительность груминга, с	22.3 \pm 7.1	25.4 \pm 5.4	23.8 \pm 6.6	26.9 \pm 9.8
Количество актов груминга	6.2 \pm 0.4	7.3 \pm 1.1	5.1 \pm 0.9	6 \pm 2.7

Примечание. Для идентификации различий между парами арен используются следующие символы: отличия гр. 220 от гр. 150 – \$; гр. 220 от гр. 75 – +; гр. 220 от гр. 35 – x; гр. 150 от гр. 75 – #; гр. 150 от гр. 35 – &; гр. 75 от гр. 35 – *. Значимость отличий по критерию Стьюдента для независимых выборок указывается в столбце, соответствующем арене большего диаметра. Различия значимы при $p < 0.05$ (один символ), $p < 0.01$ (два символа) и $p < 0.001$ (три символа).

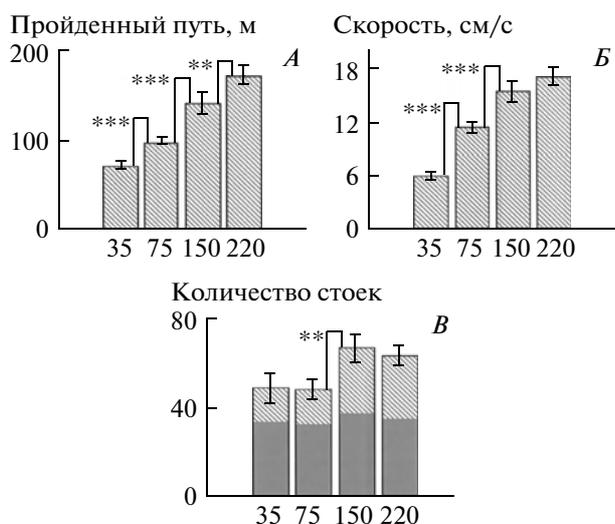


Рис. 1. Основные характеристики активности животных. По оси абсцисс указан диаметр арены, см. На *B* сплошная серая часть столбиков – количество стоек с опорой на борт. *A* – длина пути, м; *B* – скорость, см/с. *B* – количество стоек. Звездочками обозначен уровень значимости отличий по критерию Стьюдента: ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Fig. 1. Characteristics of mouse activity. Four columns on each graph show four experimental groups. 100%-gray parts of columns on graph *B* mark wall rear frequency. *A* – distance, m; *B* – velocity, cm/s; *B* – number of rears. Asterisks mark significance of differences: ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Статистическую обработку материала производили с использованием программ Microsoft Excel 2007 и StatSoft STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мыши по-разному передвигались в ОП разного размера (табл. 1). Пройденный путь и скорость увеличивались с увеличением размера арен (рис. 1, *A*, *B*), но медленнее, чем увеличивался диаметр (соотношение диаметров составляет приблизительно 1 : 2 : 4 : 6) и тем более площадь (табл. 1). Несмотря на увеличение размера ОП, скорости мышей в гр. 150 и гр. 220 не различались. В больших аренах мыши большее число раз поднимались в стойки, и это обусловлено главным образом увеличением количества стоек без опоры на борт (рис. 1, *B*). При этом число стоек в гр. 35 и гр. 75 не различалось, но скачкообразно увеличивалось в больших аренах, где характеристики гр. 150 и гр. 220 также не различались. В то же время показатель интенсивности стоек мало зависел от размеров арены (табл. 1). Так же сходными были уровень дефекации, продолжительность и частота груминга.

В ходе эксперимента снижалась как горизонтальная (длина пути), так и вертикальная активность (число стоек). Дисперсионный

Таблица 2. Особенности двигательной активности мышей в разных зонах арен
Table 2. Characteristics of mouse activity in different arena zones

Параметр	75 см			150 см			220 см		
	прист.	промеж.	центр	прист.	промеж.	центр	прист.	промеж.	центр
Площадь, см ²	2826	628	961.6	6358.5	10342.4	961.6	9655.5	27376.9	961.6
Длина пути, см	5840 ± 374	1302 ± 86 §§	3222 ± 225 ^†	7320 ± 1226	6174 ± 467 ##	612 ± 93 ^^^††	6423 ± 566	10250 ± 73 §§§	680 ± 64 ^^^†††
Длина пути, отнесенная к площади	2.08 ± 0.09	2.07 ± 0.08	3.35 ± 0.22 ^†	1.2 ± 0.2 #	0.60 ± 0.05 \$	0.6 ± 0.1 †	0.59 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.60 ± 0.05 ^
Вертикальная активность, отнесенная к площади	0.01	0.01		6 × 10 ⁻³	3 × 10 ⁻³		3 × 10 ⁻³	1 × 10 ⁻³	
Скорость, см/с	7.9 ± 0.4	10.1 ± 0.4 \$	9.9 ± 0.5 †	10.0 ± 1.1	14.5 ± 1.8 \$	11.4 ± 1.7 ^	12.1 ± 0.5 +	16.9 ± 0.7 \$	12.1 ± 0.6 ^
Время пребывания в зоне, с	884 ± 17	38.4 ± 9.0 §§§	358 ± 45 ^^^†††	705 ± 58 ###	456.7 ± 56 §§	51.32 ± 8.82 ^^^†††	524.2 ± 35.1 \$	596.8 ± 40.5 \$	53.3 ± 5.4 ^^^†††
Доля остановок в зоне, %	65 ± 25.8	(35 ± 25.8)		86.1 ± 10.4	(13.9 ± 10.4)		84.7 ± 11.9	(15.3 ± 11.9)	

Примечание. Указана значимость различий поведения в зонах: центральная от промежуточной – ^; центральная от пристеночной – †; промежуточная от пристеночной – §. Различия значимы по критерию Стьюдента для зависимых выборок при $p < 0.05$ (один символ), $p < 0.01$ (два символа) и $p < 0.001$ (три символа). Другие символы используются так же, как в табл. 1.

анализ их динамики (факторы “диаметр”, “интервал 4 мин”) выявил, что снижение обоих показателей значимо (фактор “интервал 4 мин” $F_4 = 13.9$ при $p < 0.001$; фактор “диаметр” $F_3 = 95$ при $p < 0.01$). Различий по взаимодействию факторов не было. Важно отметить, что интенсивность стоек в ходе опыта не изменялась.

Пространственное распределение активности в пристеночной, промежуточной и центральной зонах различалось в аренах разного размера. В пристеночной зоне поведение мышей было сходным во всех трех аренах по абсолютным показателям: пройденным расстояниям (табл. 2) и количеству стоек с опорой на борт (рис. 1, В). Наибольшая доля остановок животных в аренах приходилась на эту зону, хотя в гр. 75 значительная их часть лежала за ее пределами (табл. 2). Средняя скорость животных в гр. 150 и гр. 220 различалась незначительно, но несколько превыша-

ла показатель гр. 75 и гр. 35. При этом в аренах большего размера мыши проводили в пристеночной зоне меньше времени. Показатели горизонтальной и вертикальной активности, отнесенные к площади этой зоны, снижались по мере увеличения размера арен (табл. 2). В центральной зоне больших арен (гр. 150 и гр. 220) показатели поведения мышей были сходны. В то же время мыши гр. 75 посещали эту зону чаще, проводили там больше времени, проходили больший путь с меньшей, чем мыши гр. 220, скоростью (табл. 2). Наибольшие различия групп зарегистрированы в промежуточной зоне. Увеличение размера арены приводило к увеличению скорости в этой зоне; мыши проводили в ней больше времени и проходили больший путь (табл. 2). Главным образом именно за счет изменения скорости в промежуточной зоне изменялись показатели скорости, вычисленные для всей арены. Здесь мыши пере-

Таблица 3. Характеристики сегментов пяти скоростных диапазонов в аренах разного размера
Table 3. Characteristics of segments in different speed modes

Скоростной диапазон	Характеристика	35 см	75 см	150 см	220 см
Менее 5 см/с	Количество	227.3 ± 30.2	166.3 ± 27.2 *	86.3 ± 21.8 #&&&	68.8 ± 19.9 ++xxx
	Длина, см	2.2 ± 2.1	2.1 ± 1.9	1.9 ± 1.5	2.9 ± 2.2 \$
	Доля от общей длины пути суммарной длины сегментов, %	4.9 ± 0.8	2.6 ± 0.4 *	0.6 ± 0.1 #&&&	0.60 ± 0.04 +xx
От 5 до 10 см/с	Количество	135.6 ± 10.3	81.7 ± 9.4 *	33.7 ± 11.5 #&&&	54.6 ± 13.8 xx
	Длина, см	8.1 ± 4.1	7.2 ± 3.5	6.9 ± 3.3	7.0 ± 2.9
	Доля от общей длины пути суммарной длины сегментов, %	9.9 ± 1.8	4.9 ± 0.8 *	1.07 ± 0.21 #&&&	1.1 ± 0.2 +xx
От 10 до 40 см/с	Количество	289.4 ± 50.3	306.2 ± 47.7	179.3 ± 34.2 #	207.7 ± 21.1
	Длина, см	28.2 ± 11.1	38.1 ± 8.2	53.3 ± 15.1	40.2 ± 12.1
	Доля от общей длины пути суммарной длины сегментов, %	85.1 ± 2.4	88.6 ± 1.5	47.1 ± 6.5 ##&&	37.3 ± 4.7 ++xx
От 40 до 70 см/с	Количество	0	6.6 ± 5.1	48.9 ± 17.7 ##	10.4 ± 5.8 \$
	Длина, см	0	84.2 ± 8.3	223 ± 21 ##	247 ± 44 ++
	Доля от общей длины пути суммарной длины сегментов, %	0	3.7 ± 1.5	50.5 ± 6.4 ###	52.5 ± 3.9 +++
Более 70 см/с	Количество	0	0	1 ± 0.9	17.8 ± 6.2 \$
	Длина, см	0	0	258 ± 51	323 ± 24
	Доля от общей длины пути суммарной длины сегментов, %	0	0	менее 0.6%	8.5 ± 2.5
Все сегменты	Общее количество сегментов	407 ± 26	346 ± 28	298 ± 62	310 ± 10x
	Средняя длина сегмента, с	12 ± 1.2	20 ± 1.8 ***	38.3 ± 4.4 ###&&&	57.4 ± 5.2 \$\$\$+++xx x
	Средняя максимальная скорость сегмента, см/с	9.2 ± 2.2	12.3 ± 1.8	18.1 ± 2.2 #&	25.9 ± 1.9 \$++xx
	Средняя длительность сегмента, с	1.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1 &&##	3.4 ± 0.2 ++xx

Примечание. Символы, обозначающие значимость различий, как в табл. 1 и 2.

мешались быстрее, чем в пристеночной зоне. При этом с увеличением размера арены отношение длины пути к площади зоны снижалось быстрее, чем в пристеночной и центральной зонах.

Сегментный анализ показал, что увеличение размера арен привело к некоторому снижению сегментированности траекторий, животные реже останавливались (табл. 3). На

пространственное распределение остановок влиял размер арены: если у гр. 35 оно было равномерным, то в больших аренах от 65 до 86% остановок располагалось в пристеночной зоне по всему периметру арены (табл. 2). В больших аренах сегменты в среднем имели большую длительность, длину и максимальную скорость (табл. 3), причем скорость сегментов была близкой в гр. 35 и гр. 75 и скач-

ком увеличивалась в больших аренах, достигая максимума в гр. 220. Анализ сегментов в различных скоростных диапазонах показал, что при увеличении размера пространства увеличивается количество сегментов с высокими максимальными скоростями и соответственно их доля в общем числе сегментов (рис. 2, А).

В арене диаметром 35 см представлены сегменты только первых трех скоростных диапазонов, причем по количеству сегментов диапазоны сопоставимы друг с другом (см. табл. 3 и рис. 2, А). Однако на самой скоростной (с максимальной скоростью от 10 до 40 см/с) из них приходится около 85% всего пути (рис. 2, Б).

В арене диаметром 75 см общее количество сегментов снижается, хотя длина пути увеличивается. Это происходит за счет возрастания суммарной длины сегментов диапазона с максимальной скоростью от 10 до 40 см/с, вклад более скоростных сегментов в этой арене еще незначителен (рис. 2). Соотношения сегментов в этой и самой маленькой арене похожи. Мыши крайне редко перемещаются на новых, более высоких скоростях, и общее увеличение их скорости обусловлено удлинением самых быстрых из уже представленных ранее сегментов.

Значительные изменения структуры траектории происходят в арене диаметром 150 см. Длина пути возрастает, но на этот раз не за счет 3-го скоростного диапазона, а за счет появления сегментов со скоростями от 40 до 70 см/с. В этой арене появляется много сегментов 4-го скоростного диапазона, а доля самых медленных снижается. Их вклад в общую дистанцию становится ничтожным: 47% пути животные пробегают со скоростью от 10 до 40 см/с и 50% – со скоростью от 40 до 70 см/с.

В арене диаметром 220 см количество сегментов такое же, как в арене диаметром 150 см, но длина пути больше. Ее увеличение происходит за счет роста числа сегментов самого скоростного диапазона (скорость более 70 см/с).

На рис. 3 представлены примеры траекторий в аренах разного размера и отдельно составляющие их сегменты разных скоростных диапазонов. Изменений соотношений сегментов в ходе опыта обнаружено не было.

Характер пространственного распределения сегментов разных диапазонов различался в аренах разного размера. Если у мышей гр. 35 сегменты равномерно распределены по небольшому пространству арены, то в арене

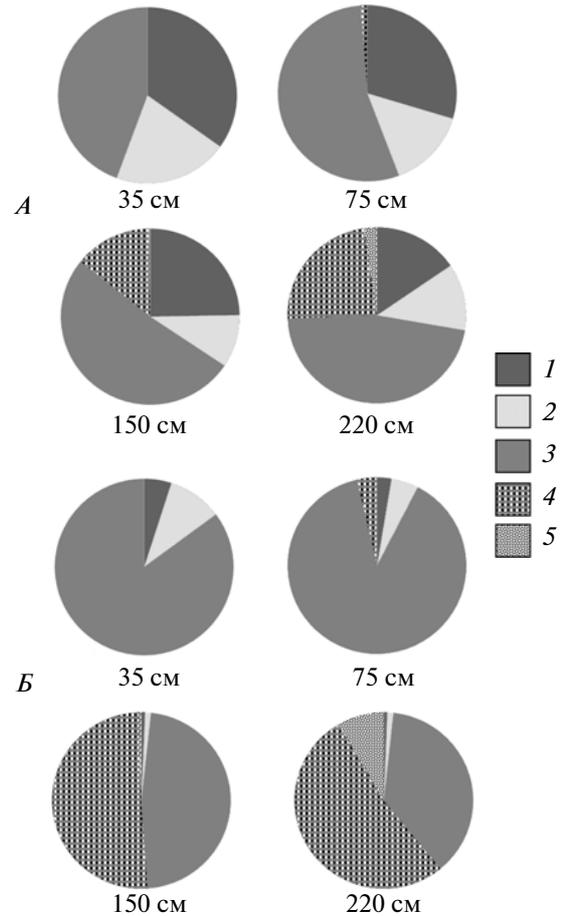


Рис. 2. Соотношения сегментов различных скоростных классов. А – доли сегментов каждого из пяти классов в траекториях в аренах разного диаметра. Б – доли суммарной длины всех сегментов каждого из скоростных диапазонов в общей длине пути.

Fig. 2. Portions of segments for each speed modes: А – number of segments of total quantity. Б – segments total length for the whole pathway.

диаметром 75 см активность в разных ее зонах становится неравномерной: в пристеночной максимальная скорость большинства сегментов была менее 40 см/с, а $78 \pm 7\%$ сегментов со скоростью более 40 см/с располагались в центральной и промежуточной зонах. В гр. 150 распределение медленных (до 40 см/с) сегментов аналогично гр. 75, в то время как только $17 \pm 13\%$ более скоростных сегментов (от 40 до 70 см/с) представлены в центральной и промежуточной зонах, что меньше, чем соответствующий показатель в арене меньшего размера ($p < 0.01$). Единичные сегменты, скорость которых выше 70 см/с, практически все ($97 \pm 3.1\%$) располагались вне при-

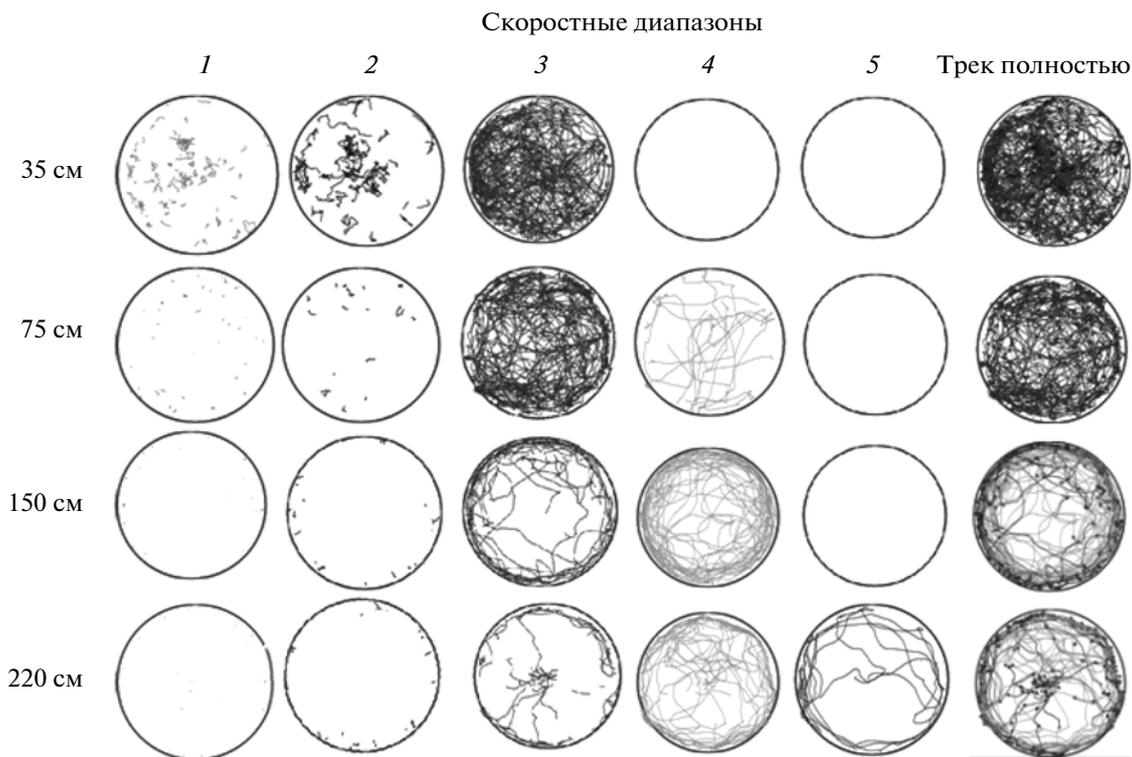


Рис. 3. Характерные примеры траекторий. Каждая из четырех строк содержит пример траектории в арене одного из четырех размеров. В столбцах 1–5 представлены отдельно сегменты для каждого скоростного диапазона, в столбце 6 представлены общие виды траекторий.

Fig. 3. Sample tracks. Every line contains the example of one track. Columns from 1 to 5 contain selected segments from 1–5 speed modes. Column 6 contains total tracks.

стеночной зоны арены. В гр. 220 появляются в заметном количестве сегменты с максимальной скоростью более 70 см/с, и они представлены во всех трех зонах арены. Сегменты более медленных скоростных диапазонов распределены практически так же, как в арене диаметром 150 см. Из рис. 3 видно, что в аренах большего размера сегменты каждого нового скоростного диапазона появляются в первую очередь в центральной части арены, а затем распространяются на периферию.

Таким образом, характер поведения мышей в аренах разного размера существенно различался. В аренах 150 и 220 см изменился характер исследовательской активности, увеличилось общее число стоек за счет стоек без опоры на борт. Изменилась структура траектории: увеличилась длина пути и скорость, уменьшилось количество остановок, появились сегменты новых скоростных диапазонов и изменился характер распределения траектории по пространству арены. Остались неизменными показатели длительности и частоты грумминга, уровень дефекации. Латентный пе-

риод начала движения возрос с увеличением размера арены лишь незначительно. В больших аренах животные были менее активны в зонах, отдаленных от стенки арены.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мыши C57BL/6 активно передвигались в аренах ОП, что согласуется с данными о характерном для них высоком уровне исследовательской активности [11, 27]. В ходе 20 мин тестирования горизонтальная и вертикальная активность животных снижалась, независимо от размера арены. Характеристики такого снижения сходны с показанными другими авторами на мышях C57BL/6 [28].

Поведение мышей в разных аренах различалось. В аренах большего размера мыши проходили большие расстояния с большими скоростями. Само по себе повышение их активности с увеличением размеров пространства подтверждает данные, полученные на лабораторных мышях-альбиносах (на гибридах линий A/HeJ, LG/J, BALB/cJ и других в

аренах диаметром 41 и 83 см [7] и линии Н в аренах размером 8 × 24 см, 16 × 48 см и 32 × 96 см [21]), крысах и монгольских песчанках [29]. Однако отметим, что в нашем случае характеристики двигательной активности выросли значительно медленнее, чем диаметр и, тем более, площадь арены и ее зон. Отметим, что в других экспериментах на мышах в арене диаметром 83 см мыши пересекали почти в 2 раза больше квадратов, чем в арене в 2 раза меньшего диаметра [7]. Возможно, это связано с линейными особенностями мышей C57BL/6 (см., например, [23]).

Эффекты увеличения подвижности в аренах больших размеров слабо проявляются у полевок в экспериментах Д. Эйлама и его коллег [15, 16]. Объясняя противоречие с имеющимися в литературе данными, они указывают, что этот эффект все же наблюдался, но не достигал границы значимости. Однако в действительности результаты, приведенные в статьях, отличаются от тех, что получены на других видах [7, 21, 29] не только уровнем значимости. В некоторых описанных Д. Эйламом опытах длина маршрута с увеличением размеров арены не возрастала вовсе. Можно предположить, что отсутствие этого эффекта вызвано высоким уровнем тревожности полевок в эксперименте, который проводился при ярком освещении (две лампы по 300 Вт). Сходный феномен наблюдали и у мышей при тестировании их в аренах с высокой освещенностью [7, 21, 24].

В нашем эксперименте (в условиях умеренной освещенности поля и при наличии занавеса, за которым мыши не видели экспериментатора) продолжительность и частота груминга, не различавшиеся в разных аренах, были несколько ниже, чем обычно наблюдаются у мышей C57BL/6 (например, [20]), а замирание практически отсутствовало. Мыши продемонстрировали невысокий уровень дефекации по сравнению с показанным другими авторами у той же линии [3, 26]. С учетом принятой интерпретации показателей груминга и дефекации [5] этот результат может указывать на невысокий уровень тревожности, облегчающий проявление исследовательской активности. Очевидно, именно с этим связано увеличение подвижности с увеличением размера пространства. Об этом же свидетельствует и повышение количества стоек. Этот показатель обычно используется как мера исследовательской активности гры-

зунов [2, 29], которая высока у мышей линии C57BL/6.

Наши данные показали, что увеличение вертикальной активности происходит главным образом за счет стоек без опоры на борт, тогда как и на окружность длиной 1 м, и на окружность длиной 6.9 м приходилось одинаковое количество стоек с опорой на борт, сходное с тем, что показано другими авторами на беспородных мышах (арена 40 × 40 см) [4]. К сожалению, в большинстве работ по ОП количество стоек либо не анализируется вовсе, либо анализируется без разделения на стойки с опорой и свободные стойки. Наши данные подтверждают полезность такого анализа. Разница в количестве стоек без опоры в малых и больших аренах позволяет предположить различия в организации исследовательской активности в аренах диаметром менее 75 см и более 150 см.

Нами обнаружено, что с увеличением размеров арены возрастает пространственная неравномерность активности мышей. Если в малых аренах поведение в разных зонах в значительной степени сходно, то в больших активность в пристеночной зоне и открытой части поля различается существенно и по целому ряду показателей. Активность возрастает не столько из-за изменения площади как таковой, сколько из-за увеличения протяженности открытых частей пространства. На это указывает тот факт, что в пристеночной зоне в отличие от остальной арены абсолютные значения длины пройденного пути и число стоек не изменялись, несмотря на увеличение площади.

Как известно, для грызунов характерен выраженный тигмотаксис в ОП [29] и, вероятно, область около стенки воспринимается ими как более комфортная. По-видимому, ее мотивационная значимость мало зависит от протяженности. Поэтому в этой зоне общий характер поведения в больших аренах не изменяется, а исследовательская активность перераспределяется так, чтобы покрыть всю окружность арены. Косвенно этот результат подтверждается экспериментом на полках Д. Эйлама, который показал, что количество остановок в пристеночной зоне не зависит от размера арены [16].

Иначе изменяется поведение в открытой части поля. В больших аренах ее протяженность сильно возрастает. Хотя животные наращивают активность, обследуя эту зону, ряд

показателей поведения свидетельствует о том, что стратегия передвижения формируется под воздействием не только стремления исследовать эту область, но и условий, провоцирующих тревожность. А уровень тревожности тем выше, чем больше размер открытого пространства. Видимо, в больших аренах, где площадь открытой области велика, требуется иная по сравнению с малыми аренами организация пространственного поведения, включающая оценку “неоднородности” разных частей пространства по биологической значимости. Проведенный нами сегментный анализ позволил получить дополнительные подтверждения этому.

В литературе данных по сегментации треков для сравнения с нашими данными крайне мало. Нами показано, что в больших аренах животные реже останавливались, трек был менее сегментирован. На полевках получен противоположный результат [15], который может быть следствием высокого уровня тревожности и более выраженной реакции замирания (см. выше). Однако в другом эксперименте тех же авторов полевки в большой арене останавливались меньше, чем в малой [16]. К сожалению, Д. Эйлам, ограничиваясь результатами автоматического анализа, не приводит других характеристик поведения (груминг, стойки, замирание, дефекация), что затрудняет анализ противоречий, возникающих при сравнении результатов.

Соотношение сегментов разных скоростных диапазонов в аренах разного размера было различным. Подобного анализа не приводится в работах Д. Эйлама. Однако в статье других авторов [19] упоминается результат сравнения двух работ, выполненных на крысах Sprague-Dawley. В одной из них поведение крыс регистрировали в небольшом боксе [12], а в другой — в большой арене ОП [19]. Эти авторы проводили автоматическую сегментацию траектории, а затем для каждого животного классифицировали сегменты на несколько скоростных диапазонов (по значению максимальной скорости сегмента): самые медленные, самые быстрые и один или два промежуточных. При этом абсолютные значения скоростей сегментов каждого из диапазонов могли различаться у разных животных. Сравнение показало, что соотношение долей сегментов разных скоростных диапазонов достаточно постоянно и не зависит от целого ряда параметров — дозы введенного вещества (амфетамин, фенциклидин), разме-

ра и формы исследуемого животными пространства. Это несоответствие нашим данным можно объяснить. Во-первых, авторы приводят данные, полученные на крысах, а наша работа выполнена на мышах. Во-вторых, что более существенно, мы применяли другой метод классификации сегментов, использующий оценку соотношения абсолютных скоростных характеристик сегментов. Предложенный группой авторов метод классификации [12, 13] хотя и позволяет не устанавливать произвольно условные границы скоростных диапазонов, имеет, по-видимому, существенные ограничения. Во-первых, метод не проявляет чувствительности к важным факторам: дозе введенного вещества и размеру ОП. Это заставляет усомниться в реальной связи получаемых показателей со сложными процессами контроля пространственного поведения, которые в значительной степени зависят и от обстановки, и от вводимых веществ. Во-вторых, его удастся применить не ко всем экспериментальным объектам, что было обнаружено в наших предварительных экспериментах на мышах и полевках. Используемый нами метод предполагает большее вмешательство экспериментатора в момент подбора параметров анализа, но хорошо выявляет изменения в поведении, связанные с размером исследуемого пространства и, по-видимому, в большей степени универсален. Наши данные сегментного анализа показали существенные различия в структуре траекторий животных в аренах разного диаметра и позволили определить, за счет чего происходит увеличение скорости и длины пути.

Нам представляется важным тот факт, что диапазон сегментов с максимальными скоростями от 10 до 40 см/с и длиной 30–50 см во всех аренах составляет значительную долю как по количеству сегментов, так и по их длине, что указывает на важное место этого типа перемещений в организации исследовательской стратегии животных в пространстве арен.

Анализ пространственного распределения сегментов различных скоростных диапазонов ранее никем не проводился. Однако самое общее сопоставление данных по самой большой арене, основанное на примерах наглядного представления сегментов разных диапазонов [14, 16], провести можно. Так, самые медленные сегменты (1-й тип по [14] и 1–2-й диапазоны в нашей работе) и остановки сосредоточены в основном на периферии арены. То же самое показано в экспериментах на

полевках [16]. Высокоскоростные длинные сегменты, по нашим данным, составляют значительную часть маршрута вне пристеночной зоны больших арен. Их, вероятно, следует интерпретировать как результат взаимодействия исследовательской мотивации и ограничений, связанных с тревожностью. По-видимому, характеристики составляющих трек перебежек планируются в соответствии со свойствами пространства, которое необходимо преодолеть животному. То, что разнообразие сегментов увеличивается с увеличением размера открытого пространства, возможно, отражает большую “неоднородность” больших арен, разные части которых различаются по биологической значимости (потенциально более или менее опасные для животного).

Сами по себе характеристики нормальной сегментной структуры траектории перемещающегося животного могут рассматриваться как полезный измеряемый поведенческий признак, возможно, чувствительный к различным модельным воздействиям. Однако, к сожалению, в рамках настоящей работы сложно привязать сегменты разных диапазонов к конкретному поведению. Проведенный нами сегментный анализ позволил описать закономерности изменения структуры траектории при увеличении размера арены, однако подробная интерпретация подобных данных требует применения дополнительных средств полуавтоматической регистрации и анализа поведения. Установление соответствий между сегментными характеристиками траектории и распознаваемыми человеком последовательностями поведенческих актов следует считать важной методической задачей.

Тем не менее полученные нами факты, несомненно, свидетельствуют о том, что размер “открытого поля” может качественно изменить поведение животных, и это необходимо учитывать при сравнении и трактовке данных, полученных на аренах разного размера.

ВЫВОДЫ

1. Размер арены “открытого поля” влияет на двигательную активность мышей. В аренах большего диаметра они проходят большие расстояния с большими скоростями, причем увеличение этих показателей не пропорционально увеличению размеров арен.

2. Поведение мышей в аренах малого (диаметр 35 и 75 см) и большого (диаметр 150 и

220 см) размера качественно различается по целому ряду показателей. В больших аренах (в особенности диаметром 220 см) по сравнению с малыми в значительном количестве представлены высокоскоростные перебежки, позволяющие животным быстро преодолевать большое открытое пространство. В аренах большего размера вертикальная и горизонтальная активность выше и неоднородно распределена по разным частям пространства: по мере удаления от стенок активность снижается.

3. По-видимому, увеличение открытого пространства усиливает неоднородность по биологической значимости разных частей арены, что приводит к изменению исследовательской стратегии мышей.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №10-04-00891-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобанов А.Р. Развитие поведения в гнездовом периоде у мышей C57BL/6 с нарушениями закладки коры под действием цитозинарабинозы на разных этапах эмбриогенеза: Дис.... канд. биол. наук. М.: Филиал учреждения Российской Академии наук Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Пушкинский государственный университет федерального агентства по образованию”: 2010. 177 с.
2. Мешкова Н.Н., Федорович Е.Ю. Ориентировочно-исследовательская деятельность, подражание и игра как психологические механизмы адаптации высших позвоночных к урбанизированной среде. М.: Аргус, 1996. 376 с.
3. Михеев Ш.Б., Шабанов П.Д. Межполушарная асимметрия индивидуального поведения у мышей. Асимметрия. 2009. 3 (2): 32–40.
4. Новиков В.Е., Арбаева М.В., Парфенов Э.А. Влияние антигипоксанта PQ226 на поведение мышей в “открытом поле”. Психофарм. и биол. наркологию. 2005. 5 (3): 979–983.
5. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. Anim. Behav. 1973. 21 (2): 205–235.
6. Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. 1999. 13 (Chap. 4.11): 738–749.
7. Blizard D.A. Situational determinants of open-field behaviour in *Mus musculus*. Br. J. Psychol. 1971. 62 (2): 245–252.
8. Broadhurst P.L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. Br. J. Psychol. 1957. 48 (1): 1–12.
9. Brudzynski S.M., Krol S. Analysis of locomotor activity in the rat: parallelism index, a new measure of

- locomotor exploratory pattern. *Physiol. Behav.* 1997. 62 (3): 635–642.
10. *Cherepov A.B., Mukhina T.V., Anokhin K.V.* Automatic segmentation of mouse behavior during video tracking in home cages. 5th Intern. Conf. on Methods and Techniques in Behav. Res. Wageningen, 2005: 403.
 11. *Crawley J.N., Belknap J.K., Collins A., Crabbe J.C., Frankel W., Henderson N., Hitzemann R.J., Maxson S.C., Miner L.L., Silva A.J., Wehner J.M., Wynshaw-Boris A., Paylor R.* Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology. (Berl)* 1997. 132 (2): 107–124.
 12. *Drai D., Benjamini Y., Golani I.* Statistical discrimination of natural modes of motion in rat exploratory behavior. *J. Neurosci. Methods.* 2000. 96 (2): 119–131.
 13. *Drai D., Golani I.* SEE: a tool for the visualization and analysis of rodent exploratory behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001. 25 (5): 409–426.
 14. *Drai D., Kafkafi N., Benjamini Y., Elmer G., Golani I.* Rats and mice share common ethologically relevant parameters of exploratory behavior. *Behav. Brain Res.* 2001. 125 (1–2): 133–140.
 15. *Eilam D.* Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav. Brain Res.* 2003. 142 (1–2): 53–62.
 16. *Eilam D., Dank M., Maurer R.* Voles scale locomotion to the size of the open-field by adjusting the distance between stops: a possible link to path integration. *Behav. Brain Res.* 2003. 141 (1): 73–81.
 17. *Hall C.S.* Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* 1934. 18 (3): 385–403.
 18. *Hines D.J., Whishaw I.Q.* Home bases formed to visual cues but not to self-movement (dead reckoning) cues in exploring hippocampectomized rats. *Eur. J. Neurosci.* 2005. 22 (9): 2363–2375.
 19. *Kafkafi N., Mayo C., Drai D., Golani I., Elmer G.* Natural segmentation of the locomotor behavior of drug-induced rats in a photobeam cage. *J. Neurosci. Methods.* 2001. 109 (2): 111–121.
 20. *Kalueff A.V., Tuohimaa P.* Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Res.* 2004. 1028 (1): 75–82.
 21. *Krsiak M., Janku I.* Measurement of pharmacological depression of exploratory activity in mice: a contribution to the problem of time-economy and sensitivity. *Psychopharmacology.* 1971. 21 (2): 118–130.
 22. *Montgomery K.C.* The relation between exploratory behavior and spontaneous alternation in the white rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1951. 44 (6): 582–589.
 23. *Moy S.S., Nadler J.J., Young N.B., Perez A., Holloway L.P., Barbaro R.P., Barbaro J.R., Wilson L.M., Threadgill D.W., Lauder J.M., Magnuson T.R., Crawley J.N.* Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav. Brain Res.* 2007. 176 (1): 4–20.
 24. *Nagy Z.M., Forrest E.J.* Open-field behavior of C3H mice: Effect of size and illumination of field. *Psychonom. Sci.* 1970. 20 (1): 19–21.
 25. *Oldham J., Morlock H.* The effects of open-field size on activity in the Mongolian gerbil. *Psychonom. Sci.* 1970. 20 (5): 290–295.
 26. *Savignac H.M., Dinan T.G., Cryan J.F.* Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav. Neurosci.* 2011. 5: 13–18.
 27. *Van Abeelen J.H.* Genetics of rearing behavior in mice. *Behav. Genet.* 1970. 1 (1): 71–76.
 28. *Voikar V., Koks S., Vasar E., Rauvala H.* Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol. Behav.* 2001. 72 (1–2): 271–281.
 29. *Walsh R.N., Cummins R.A.* The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* 1976. 83 (3): 482–504.
 30. *Wolfer D.P., Madani R., Valenti P., Lipp H.P.* Extended analysis of path data from mutant mice using the public domain software Wintrack. *Physiol. Behav.* 2001. 73 (5): 745–753.