



Конференция GLP-PLANET IV
Методики поведенческих экспериментов в работе с животными



Стандартизация теста «Открытое поле»

Арутюнян Сона Смбатовна

научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии и токсикологии,
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

Санкт-Петербург 2023

Нормативные аспекты

ISO/IEC 17025

Верификация (verification)

Валидация (validation)



Применимо к аналитическим и биоаналитическим методикам

ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
CDER Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry

А что насчет поведенческих методик?



Единые требования по валидации физиологических/поведенческих методик отсутствуют!

Стандартизация как единообразии процедуры проведения и оценки выполнения теста.

Открытое поле у каждого свое...

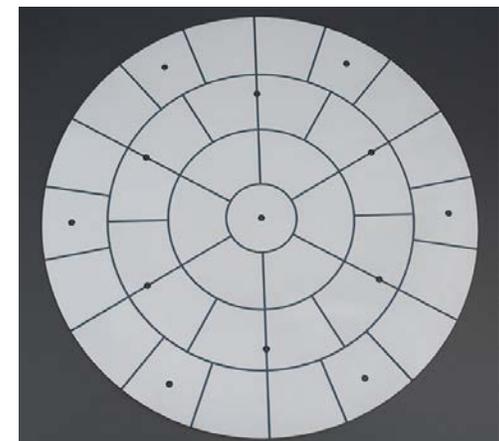
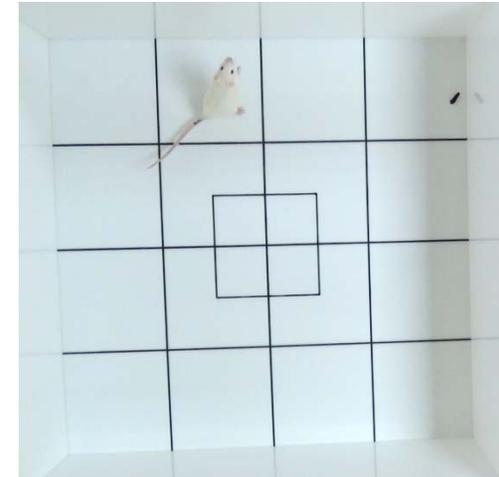
Открытое поле - широко используемый, простой и крайне вариативный тест

Под разные задачи можно использовать различные модификации:

- размер установки
- форма установки (квадратная, круглая)
- с норками или без
- тип освещенности (белый, красный свет)
- интенсивность освещенности
- панель регистрируемых показателей
- время тестирования
- кратность тестирования (однократное, повторное)

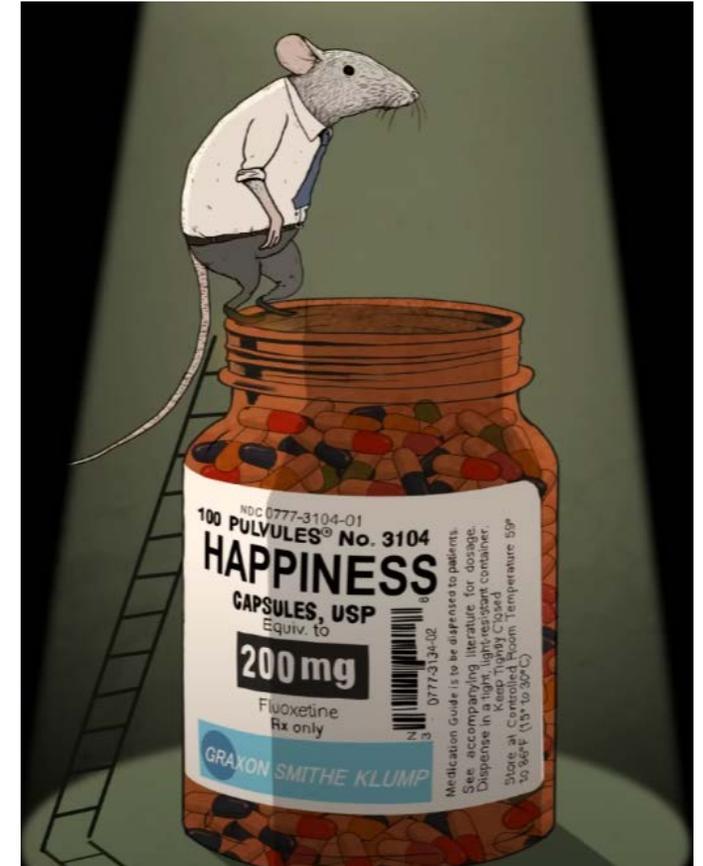


Необходимость стандартизации теста **в конкретных условиях и под конкретные задачи!**



Открытое поле в токсикологии

- Тест рекомендован в качестве контролируемого физиологического параметра в токсикологических исследованиях (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова, 2012)
- Используется «рутинный» вариант теста
- Хороший скрининговый инструмент для выявления нейротоксических эффектов по показателям двигательной, исследовательской активности и эмоциональности
- Что можно увидеть? Снижение/повышение локомоторной активности, стереотипии, тревожное поведение
- Но! Не показывает влияние ЛС на когнитивные функции



Открытое поле в токсикологии

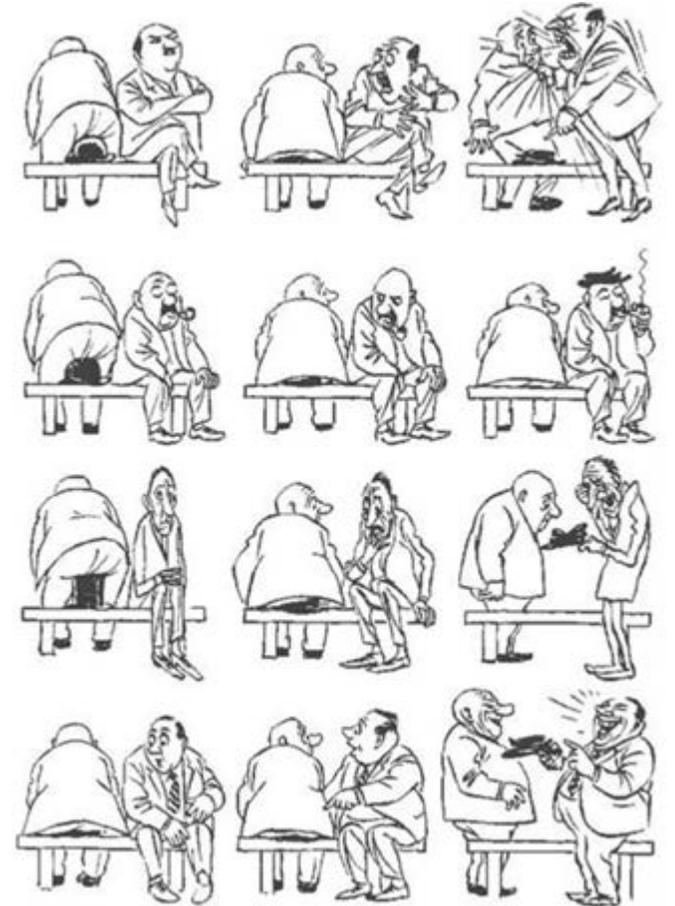
Почему важна стандартизация теста в данном контексте?

Конечная цель стандартизации - это установление физиологических норм для возможности корректно оценивать и интерпретировать полученные данные в дальнейших исследованиях.

Нормы нужны? Есть же контрольная группа!

В токсикологических исследованиях мы имеем дело с

- малыми выборками
 - генетически гетерогенными животными (аутбредные)
- «активные» и «пассивные» типы поведения



Факторы, влияющие на тест

Биологические факторы

- Вид, линия, пол, возраст животных
- Ранний период жизни (срок отъема от матери)
- Циркадные ритмы
- Сезонность

Химические факторы

- Запахи от других животных
- Запахи от персонала, работающего с животными
- Дезинфектанты

Физические факторы

- Температура, влажность, атмосферное давление
- Шум, вибрация
- Освещенность (тип света и интенсивность)

Факторы среды

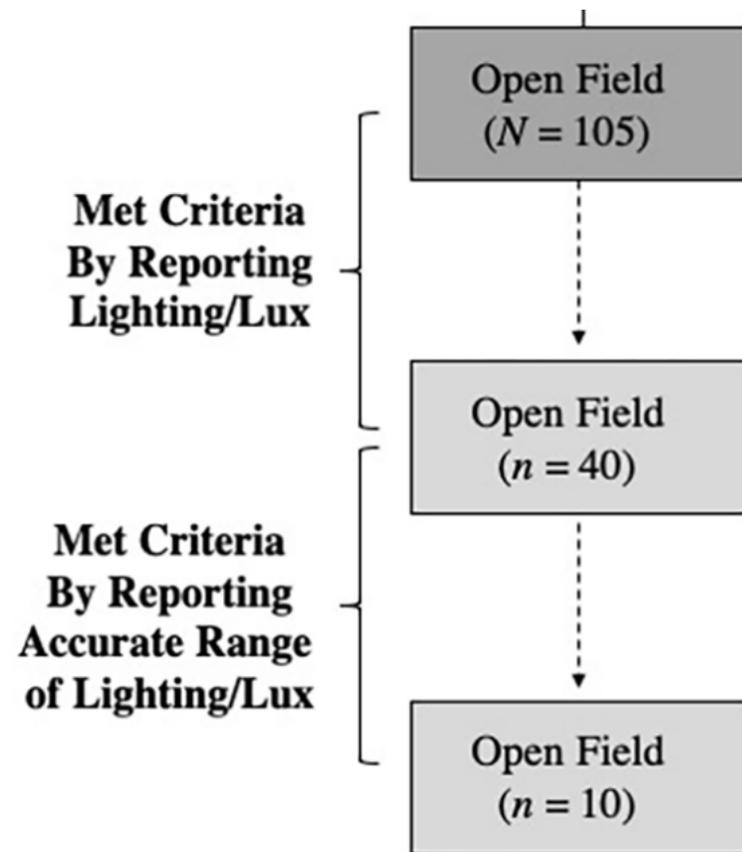
- Условия содержания, уход, хэндлинг

**ПРОСТИ ЧТО ПРОШЕЛ ТРИ КВАДРАТА
НА МЕНЯ ЧТО-ТО ПОВЛИЯЛО...**



ЭТО ПОВТОРИТСЯ

Освещенность



Balb/c mice (Estork et al., 2016)	300
Sprague Dawley rats (Kuniishi et al., 2017)	300
C57Bl/6J mice (Khalil and Fendt, 2017)	300
Wistar rats (Casarrubea et al., 2017)	300
Wistar rats (Kawabe, 2017)	300
Sprague Dawley rats (Blume et al., 2018)	250–300
Sprague Dawley rats (Robinson et al., 2018)	530
California mice (Perea-Rodriguez et al., 2018)	1,400
Long Evans rats (Hetzler et al., 2019)	635
Long Evans rats (Neuwirth et al., 2019b)	300

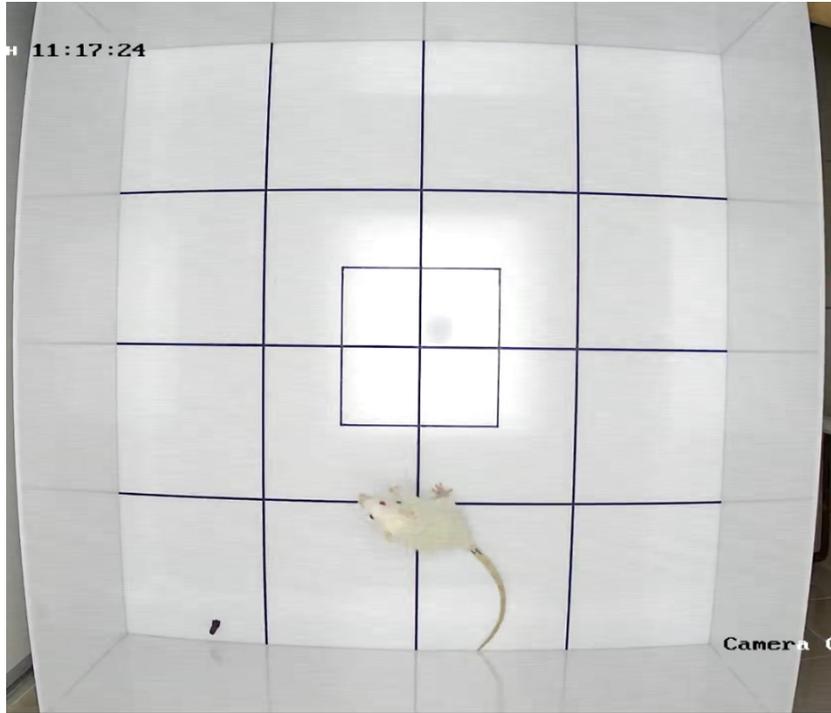
Neuwirth L. S. et al. Under or Absent Reporting of Light Stimuli in Testing of Anxiety-Like Behaviors in Rodents: The Need for Standardization // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2022.

Материалы и методы

Вид	Крысы Wistar	Режим освещенности	Количество крыс	
Пол	Самцы и самки		самцы	самки
Возраст	10-11 недель	Белый свет (240-290 лк)	25	25
Масса тела	278-367 г (самцы) 200-297 г (самки)	Красный свет (40-50 лк)	25	25

Дни эксперимента	Количество животных, тестируемых в день
день 1	15 самцов (белый свет)
	15 самцов (красный свет)
день 2	10 самцов (белый свет)
	10 самцов (красный свет)
день 3	15 самок (белый свет)
	15 самок (красный свет)
день 4	10 самок (белый свет)
	10 самок (красный свет)

Материалы и методы



- Предварительно хэндлированные животные
- Адаптация в помещении – 30 минут
- Тестирование в первой половине дня (10:00-13:00)
- Установка – квадратная площадка 80×80×30 см
- Тестирование в течение 3 минут
- Регистрация вручную, в режиме реального времени
- «Рутинная» панель параметров:
 - Количество центральных посещений
 - Количество пересеченных квадратов
 - Количество пристеночных и свободных стоек
 - Количество актов груминга
 - Количество мочевых точек
 - Количество болюсов дефекации
- Удаление запахов, 3% перекись водорода

Результаты

Показатели M±SEM, Me(Q1;Q3)	Белый свет		Красный свет	
	самцы (n=25)	самки (n=25)	самцы (n=25)	самки (n=25)
Пересеченные квадраты	25,4±2,43 Cv=48%	43,2±3,81* Cv=44%	36,4±3,65[#] Cv=50%	46,4±2,85* Cv=31%
Пристеночные стойки	6,4±0,53 Cv=41%	12,6±0,93* Cv=37%	9,0±1,20 Cv=67%	13,7±1,31* Cv=48%
Центровые посещения	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (1,0;3,0)
Свободные стойки	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (0,0;3,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (0,0;4,0)
Груминг	5,0 (5,0;8,0)	4,0 (3,0;6,0)	3,0 (2,0;9,0)	5,0 (4,0;7,0)
Мочевые точки	1,0 (0,0;3,0)	1,0 (0,0;3,0)	1,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;2,0)
Болюсы дефекации	3,0 (2,0;4,0)	3,0 (2,0;5,0)	2,0 (1,0;4,0)	3,0 (0,0;5,0)

1 – * – статистически значимые различия при сравнении самцов и самок (t-тест, p<0,05);

2 – # – статистически значимые различия при сравнении двух видов света (t-тест, p<0,05).

Результаты

Показатели (min-max)	Белый свет		Красный свет	
	самцы (n=25)	самки (n=25)	самцы (n=25)	самки (n=25)
Пересеченные квадраты	9-53	17-94	3-77	22-82
Пристеночные стойки	3-12	5-22	0-20	4-30
Центровые посещения	0-3	0-5	0-5	0-4
Свободные стойки	0-6	0-11	0-8	0-15
Груминг	0-12	0-16	0-13	1-10
Мочевые точки	0-10	0-8	0-5	0-7
Болюсы дефекации	0-6	0-9	0-7	0-7

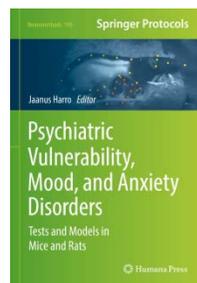
Опыт межлабораторных сличений

Место проведения	Пол	Группа	Количество посещенных квадратов	Количество пристеночных стоек
АО НПО ДОМ ФАРМАЦИИ (освещенность 380 лк)	самцы крыс (n=20)	1	24,3±2,5 (Cv=47%)	10,4±0,8 (Cv=36%)
	самки крыс (n=20)	2	32,3±2,1 (Cv=47%)	13,9±1,1 (Cv=47%)
ФГБОУ ВО СПХФУ (освещенность 395 лк)	самцы крыс (n=20)	3	39,0±2,4 (Cv=28%)	11,4±0,6 (Cv=25%)
	самки крыс (n=20)	4	23,6±2,5 (Cv=47%)	10,7±1,0 (Cv=41%)

Ковалева М.А., Ивкин Д.Ю., Макарова М.Н. Неопубликованные данные по межлабораторной валидации теста «Открытое поле» для крыс

Open fields (unlike wheels) can be any shape but still miss the target

S. Clare Stanford *Department of Pharmacology, University College London, London, UK.*



The Open Field Test

[Vootele Võikar](#) & [S. Clare Stanford](#)

Protocol | [First Online: 01 October 2022](#)

«Поведение — это не простой инструмент, как например, измерение активности отдельных нейронов мозга. Мы всегда должны помнить, что поведение является результатом влияния множества различных факторов. Таким образом, мы должны **знать об этих факторах, отслеживать их и контролировать их как можно лучше**»



Решение за подробным описанием
методов и тщательным
документированием процессов



Спасибо за внимание!

