

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11


№ госрегистрации

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

 С.О.Бачурин

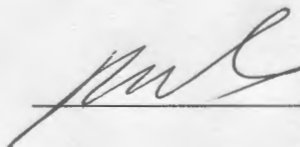
«декабрь» 2015 г.



**«МЕТОДИКА ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
В ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА»**

СТП-14.621.21.0008.09-2015

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

 С.Г. Ключков

« _____ » 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. Наименование методики измерений	3
2. Назначение методики измерений и область применения	3
3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений.....	4
5. Требования к показателям точности измерений.....	4
6. Условия содержания животных и проведения измерений.	4
6.1. Параметры окружающей среды.....	4
6.2. Параметры содержания животных.....	4
6.3. Подготовка животных к фенотипированию.....	5
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса	5
7.1. Реактивы.....	5
7.2. Животные, материалы для их содержания.....	6
7.3. Оборудование	6
8. Операции при поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса	7
8.1. Формирование групп животных для проведения эксперимента	7
8.2. Проведение варианта теста водного лабиринта Морриса	7
9. Обработка и оформление результатов измерений.....	8
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	8
11. Требования к квалификации операторов.....	9
12. Валидация методики поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса	10
12.1. Условия содержания экспериментальных животных	10
12.2. Введение веществ.....	10
12.3. Установка для водного лабиринта Морриса	11
12.4. Обучение мышей в водном лабиринте Морриса.....	11
12.5. Статистическая обработка данных.....	12
12.5. Результаты	13

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.09-2015 устанавливает методику «Методика поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса.

Основными областями применения данной методики являются нейронауки и фармакологические науки. Поведенческое фенотипирование в лабиринте Морриса модельных животных как генномодифицированных, так и подверженных действию специфических нейротоксинов позволяет оценить валидность выбранной модели по когнитивной симптоматике, а также позволяют выявить потенциальные лекарственные препараты для лечения соответствующих заболеваний, связанных с нарушениями когнитивных функций.

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по

межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений.

Неснижаемая численность животных для теста лабиринте Мориса, с учетом естественной убыли животных – 9 особей в каждой группе.

6. Условия содержания животных и проведения измерений.

6.1. Параметры окружающей среды

Диапазон температуры окружающей среды для проведения измерений – 18-24°C, влажность 40-70%.

Световой цикл состоит из 12 часов дня и 12 ночи, день начинается в 8 часов и заканчивается в 20 часов.

6.2. Параметры содержания животных

Мыши по 9 особей в каждой группе рассаживаются в отдельные клетки микроизоляторы OneCage не более, чем по 5 штук в каждой при свободном подступе к воде и пищи.

В качестве подстилки используется лигноцель ВК-8-15 производства ООО «ФАРМВИЛАР».

Сбалансированный по пищевым веществам и витаминам комбикорм стерильный для СПФ животных - мышей и крыс торговой марки «Чара»,

производитель – Ассортимент-Агро, автокловированный при 121 °С. Должен быть сертификат соответствия производителя, удостоверение о качестве корма с указанием даты выпуска и срока годности. Потребление корма производится из расчета на одну мышь в сутки, по контрольному взвешиванию корма раз в неделю.

Вода центрального водоснабжения ГОСТ 52180 «Вода питьевая» очищенная от механических примесей, микроорганизмов, железа, хлора и токсических веществ и подвергается автоклавированию при 120 °С.

6.3. Подготовка животных к фенотипированию

Поступившие животные до начала эксперимента содержатся 5 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. За это время у животных контролируются возможные признаки отклонения в состоянии здоровья.

Животные распределяются по группам, используя в качестве критерия массу тела, индивидуальные значения массы тела не должны отклоняться более чем на $\pm 20\%$.

Животные индивидуально маркировались ушными клипсами с уникальными номерами, кроме того, на каждой клетке с животными имеется карточка с указанием номера клетки, дозы вещества, вида и линии животных, номера исследования, номера протокола, руководителя.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Мориса

7.1. Реактивы

для моделирования нарушений когнитивных функций могут быть использованы различные нейротоксины, в том числе и:

- - Скополамин, Sigma-Aldrich, США
- - Ацетилхолин-азиридиinium хлорид (AF64), Sigma-Aldrich, США
- - Пентобарбитал натрия (Euthatal, США)

7.2. Животные, материалы для их содержания

- Мыши линии C57Bl6 (возраст от 3 до 6 месяцев), могут быть использованы другие линии мышей, в том числе и генно-модифицированные в зависимости от задачи исследования
- микроизоляторы OneCage, Lab. Products inc., США
- LIGNOCEL Rinofix MK 2000, JRS, Германия или лигноцель ВК-8-15, ООО «ФАРМВИЛАР»
- сбалансированный по пищевым веществам и витаминам комбикорм стерильный для СПФ животных - мышей и крыс торговой марки «Чара», производитель – Ассортимент-Агро, автокловированный при 121 °С

7.3. Оборудование

- - Бассейн для теста Морриса для мышей белого цвета, высота 40 см, диаметр 150 см. с водонагревателем и контролем температуры, Open Science, Россия
- - Цифровая видеосистема со стационарным штативом (совместимая с ANY-maze™), VS1304-S, видеокамера с интерфейсом USB и Система видеонаблюдения ANY-maze™, подсоединённая к компьютеру с установленным программным обеспечением ANY-maze.
- - Комната с регулируемой освещённостью и установленными ориентирами
- - Весы для взвешивания мышей

- - Стереотаксис для мышей, David Kopf Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument

8. Операции при поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса

8.1. Формирование групп животных для проведения эксперимента

В случае использования химической модели нейродегенерации/когнитивных нарушений вещество, позволяющее получить модель исследуемого заболевания (скополамин, AF64a или другие) под эфирным или пентобарбиталовым наркозом вводили грызунам либо подкожно (скополамин) либо в боковые желудочки мозга с помощью установки стереотаксиса, группе контрольных животных инъецировали искусственную СМЖ.

В каждом опыте животных разделяют по группам:

в случае химического моделирования нейродегенерации и исследования действия соединений - группа контрольных животных («Контроль»), группа животных только с модельным веществом (МВ) и группы животных, получавших исследуемое вещество (ИВ).

При фенотипировании генно-модифицированных животных использовали группы этих животных и животных стоковой линии без генных модификаций, в случае исследования влияния соединений добавляют группы с введением ИВ стоковой линии и генно-модифицированным животным.

Группы должны быть идентичны по возрасту и рандомизированы по весу с отличием, не превышающим 15%.

8.2. Проведение варианта теста водного лабиринта Морриса

Обучение. На определённый в протоколе исследования день после начала введения ИВ или одновременно (далее этот день обозначается как 1-й день обучения) мышей обучают с двумя сессиями в день нахождение невидимой

(1-3 см под водой) платформы в бассейне, предъявляя им по две 60 секундных попытки в день с разных позиций.

Тестирование. Заплыв на воспроизведение без платформы. В последний день эксперимента проводят 90-секундную тест-сессию без платформы после сессии напоминания по описанной выше схеме, но без введения препаратов.

Впоследствии возможен повтор тестирования после периода забывания при постановке задач исследования долговременной памяти.

Изменяемые параметры. В запланированные по протоколу исследования дни после начала обучения проводили видеосъемку. Компьютерный анализ позволяет рассчитывать следующие основные параметры:

- пройденную дистанцию;
- латентный период нахождения платформы;
- число входов в верный квадрант;
- время, проведенное в верном квадранте;
- число пересечений области платформы;
- латентный период первого входа в область платформы.

9. Обработка и оформление результатов измерений.

Первичная обработка, систематизация и архивирование данных осуществляется с помощью пакета программы ANY-maze. Анализ данных проводят с помощью GraphPad Prism 5.00 для Windows (Сан-Диего, США). Данные нормализуются к контролю и представляются как средние значения \pm средняя ошибка.

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации

(ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, ознакомленные с правилами работы с животными и соблюдающие положения комиссии по биоэтике, освоившие метод в процессе тренировки.

12. Валидация методики поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса

Целью данного исследования была валидация методики поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса в условиях моделирования амнезии введением скополамина и изучение эффекта аналога Димебона (АД) в дозах 0,05 мг/кг и 0,25 мг/кг на пространственную память мышей.

12.1. Условия содержания экспериментальных животных

Мыши самцы линии C57Bl6 в возрасте 3 месяцев содержались поодиночке с момента транспортировки из питомника «Пущино» и в течение всего эксперимента. Животные находились в стандартных лабораторных условиях ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% влажности, при свободном доступе к воде и пище) при цикле освещения 12:12 часов (выключение света в 19:00). С целью минимизации возможного влияния окружающей обстановки животные из экспериментальных групп тестировались в темноте во время светлого периода цикла освещения (с 9:00 до 18:00).

Мыши были рандомизированы по весу и разделены на 4 ниже представленные группы:

- Контроль -растворитель, 11 животных
- Контроль-скополамин (скополамин 0,1 мг/кг/день, п/к), 11 животных
- Скополамин + АД-0,05 (скополамин 0,1 мг/кг/день, п/к + АД в дозе 0,05 мг/кг/день, в/б), 11 животных
- Скополамин + АД-0,25 (скополамин 0,1 мг/кг/день, п/к + АД в дозе 0,25 мг/кг/день, в/б), 11 животных

12.2. Введение веществ

Гидрохлорид скополамина вводился подкожно в объеме 0,01 мл/кг, АД растворяли в воде и вводили внутривентрикулярно в объеме 0,01 мл/кг.

12.3. Установка для водного лабиринта Морриса

Экспериментальная установка состояла из бассейна белого цвета, диаметром 150 см и высотой 40 см, была наполнена водой на 31 см. Платформа из такого же материала и цвета что и бассейн была диаметром 10 см и высотой 30 см была покрыта водой на 1 см. Четыре позиции платформы (северо-запад, северо-восток, юго-запад и юго-восток) были равно отдалены от бортиков и центра бассейна. Позиции запуска мышей располагались на северной, южной, западной и восточной точках бортика бассейна – между проекциями позиций платформы.

Четыре визуальные подсказки размером 50x50 см разных форм располагались на расстоянии 80 см от центра лабиринта. Интенсивность освещения составляла 30 Лкс, лампы располагались таким образом, чтобы предотвратить отблески на воде. Мыши помещались в комнату за 1 час до начала теста. Компьютер был удален от лабиринта.

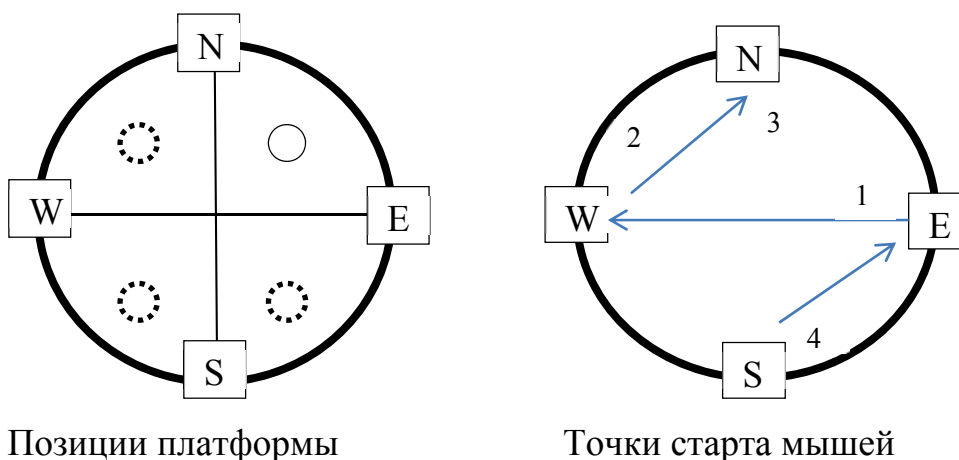


Рис. 1. Схема установки и точек запуска мышей в водном лабиринте Морриса.

12.4. Обучение мышей в водном лабиринте Морриса

Трехмесячные мыши линии C57Bl6 обучались по протоколу с 2 сессиями в день в водном лабиринте Морриса в течение 5 дней. Согласно протоколу, четыре экспериментальные группы были случайно разделены на 4

позиции платформы, дважды в день с промежутком 60 мин мыши помещались в бассейн для поиска платформы на 60 секунд. Первые 4 дня за 30 мин до первой сессии всем мышам, кроме контрольной группы, вводили скополамин в дозе 0,1 мг/кг и растворитель для контрольной группы или DF302 экспериментальных группах в дозах 0,05 мг/кг и 0,25 мг/кг. На пятый день проводили 90-сек. тест-сессию без платформы после сессии напоминания по описанной выше схеме, но без введения препаратов.

12.5. Статистическая обработка данных

Анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 5.00 для Windows (Сан-Диего, США) с использованием варианта ANOVA непараметрического дисперсионного анализа Крускаль-Уоллиса и апостериорного критерия Данна, уровень доверия – 95% (* - $p < 0,05$).

12.5. Результаты

Эффект скополамина и АД на дистанцию, пройденную до нахождения платформы

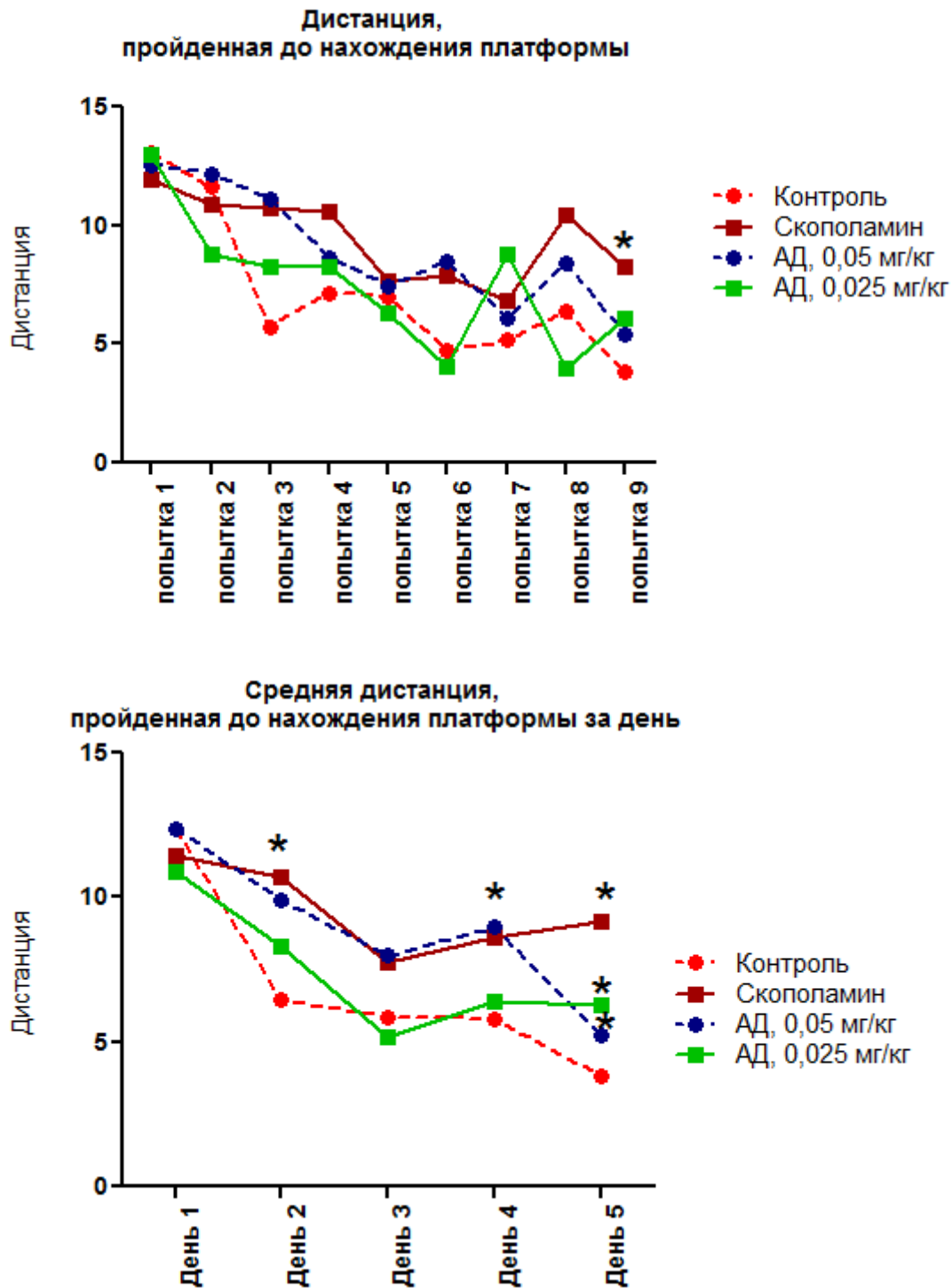


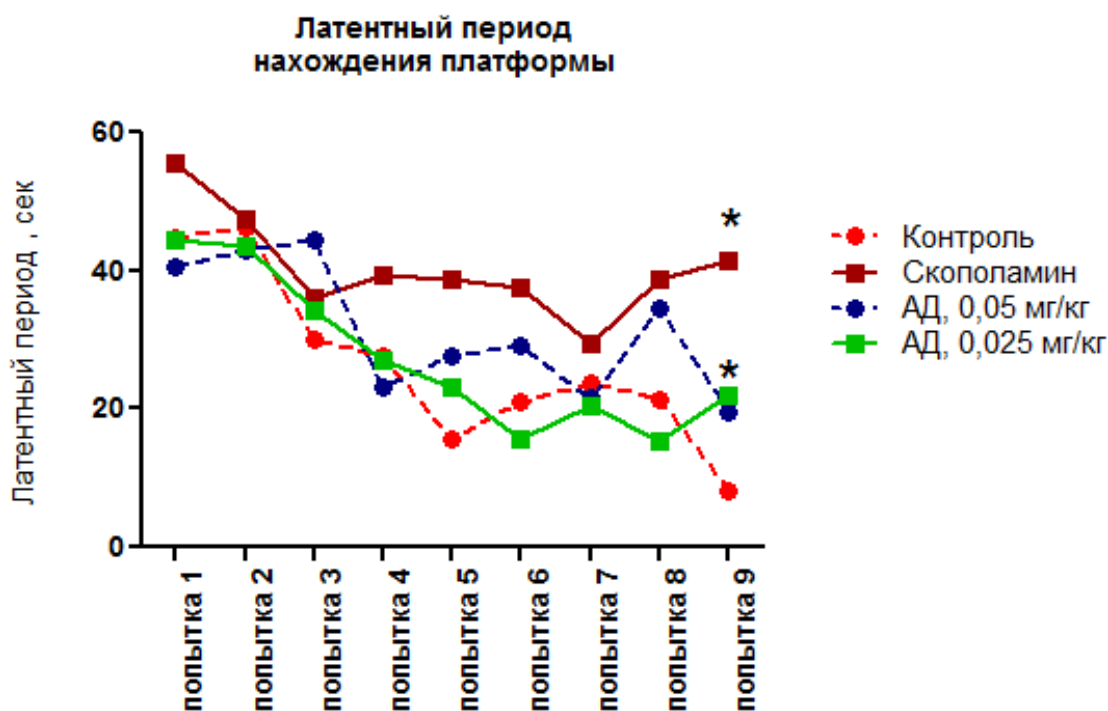
Рис. 2 Влияние модельного нейротоксина скополамина и когнитивного стимулятора - аналога димебона (АД) на дистанцию, пройденную до

нахождения платформы в течении одной попытки или среднедневную. * - $p \leq 0.05$

Скополамин не значительно изменял дистанцию, пройденную мышами в каждой попытке поиска платформы, достигнув достоверного увеличения только на 9 попытке, введение АД не привело к достоверным изменениям этого параметра у мышей ни по сравнению с контрольной группой, ни по сравнению с мышами, получавшими скополамин.

Однако при расчёте средней дистанции, пройденной до нахождения платформы за день выявляется достоверное снижение скорости уменьшения дистанции, пройденной до нахождения платформы за день по сравнению с контролем у группы, получавшей скополамин, а АД достоверно дозозависимо снизил среднюю дистанцию за день по сравнению с этой группой.

Эффект скополамина и АД на латентный период нахождения платформы



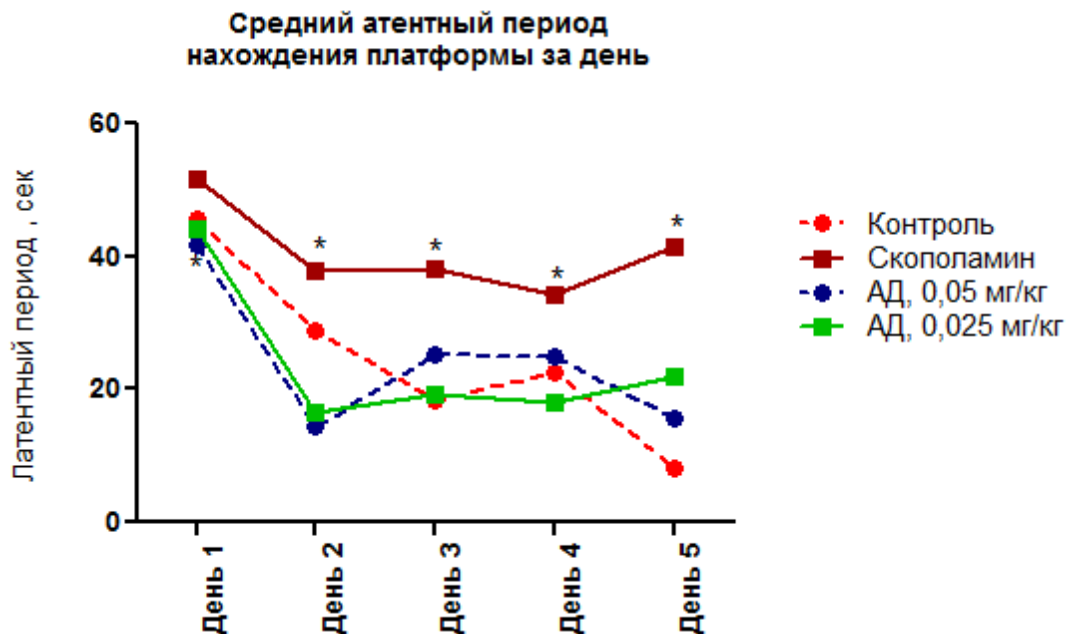


Рис. 3. Влияние модельного нейротоксина скополамина и когнитивного стимулятора - аналога димебона (АД) на латентный период нахождения платформы. * - $p \leq 0.05$

Выявлено очевидное уменьшение латентного периода нахождения платформы с увеличением обучающих сессий в контрольной группе и группах, получавших АД на фоне введения скополамина, при значительно более длительном латентном периоде в группе мышей с введением только скополамина, достоверно отличающийся в 9 попытке, что свидетельствует об амнезирующем эффекте скополамина и тенденции к снижению эффекта скополамина в присутствии АД.

Эффект скополамина и АД на показатели пространственной памяти мышей в сессии тестирования

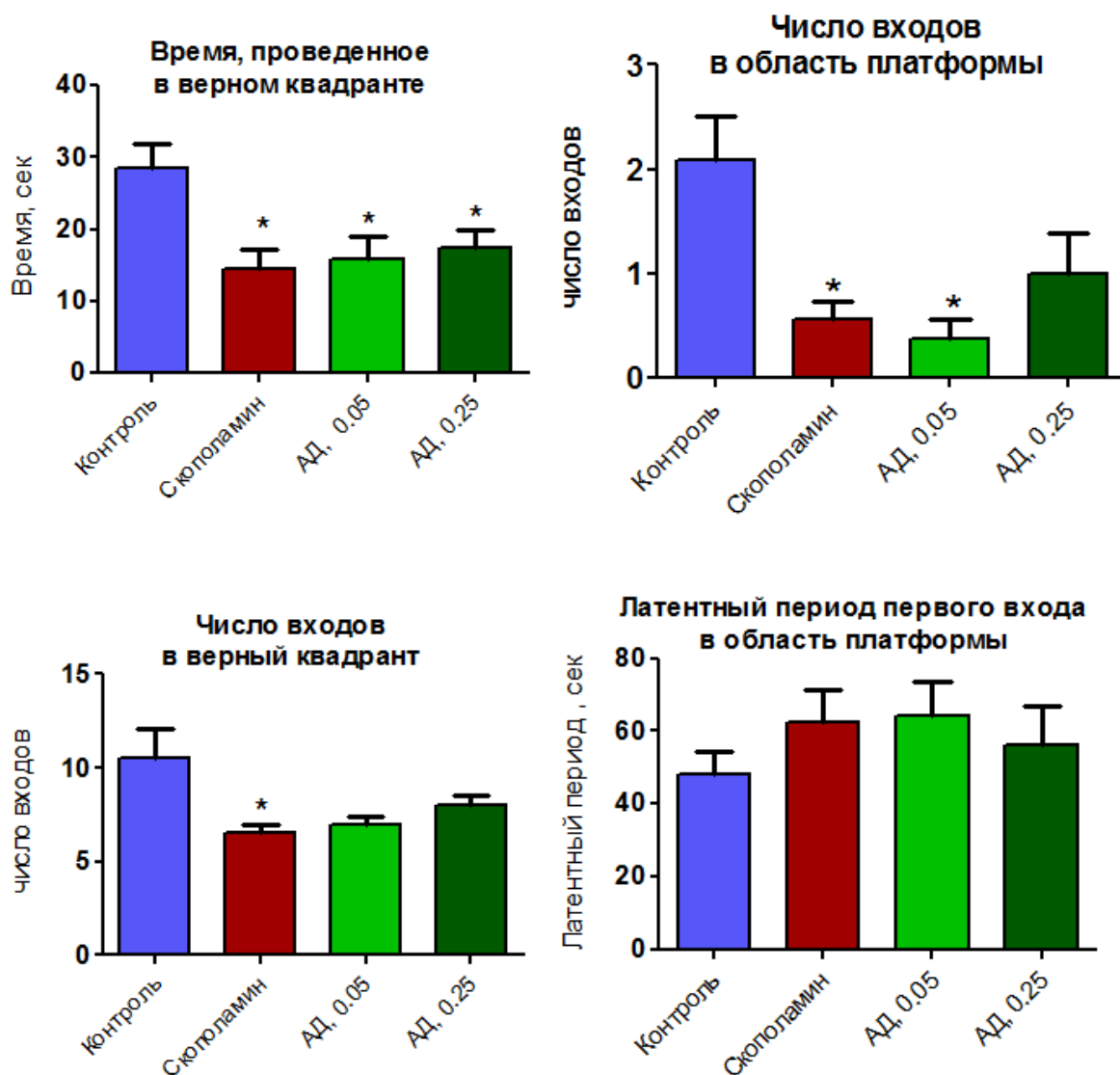


Рис. 4. Влияние модельного нейротоксина скополамина и когнитивного стимулятора - аналога димебона (АД) показатели пространственной памяти мышей в сессии тестирования. * - $p \leq 0.05$

В данном исследовании выявлен достоверный эффект скополамина на показатели пространственной памяти во время сессии тестирования, нужно отметить достоверное снижение числа входов как в верный квадрант, так и в область нахождения платформы и достоверное снижение времени, проведенном в верном квадранте в группах, получавших скополамин. Эти данные свидетельствуют о снижении пространственной памяти мышей, получавших инъекции скополамина.

Аналог известного когнитивного стимулятора димебона (АД) проявляет тенденцию к ослаблению амнезирующего эффекта скополамина: в присутствии АД наблюдается дозозависимое увеличение числа входов как в верный квадрант, так и в область нахождения платформы и увеличение времени, проведенном в верном квадранте по сравнению с группой, получавшей только скополамин.

Таким образом, известный нейротоксин скополамин, вызывающий симптоматику амнезии, в условиях валидируемой методики поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса также показал значительный подавляющий эффект на память животных. Также на основании полученных данных можно предположить неярко выраженный когнитивно-стимулирующий эффект АД в исследуемых дозах.

Вывод: Валидация описанного варианта методики поведенческого фенотипирования модельных животных в лабиринте Морриса подтверждает высокую значимость этого метода для оценки когнитивных функций мозга животных.