

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
_____ 2014 г.



«Методика поведенческого фенотипирования модельных животных в
«О-образном приподнятом лабиринте»»

СТП-14.621.21.0008.01-2014

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.


С.Г. Ключков
« 30 » декабря 2014 г.

Черноголовка, Московская обл. 2014

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Наименование методики измерений	4
2.	Назначение методики измерений и область применения	4
3.	Нормативные ссылки	4
4.	Погрешность измерений	5
5.	Условия измерений	5
6.	Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым в методике поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»	7
6.1.	Реактивы	7
6.2.	Материалы	7
6.3.	Оборудование	7
6.4.	Требования к рабочему месту и экспериментальной камере (клетке для содержания)	7
7.	Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»	8
7.1.	Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в процедуре поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»	8
7.2.	Дизайн эксперимента по оценке поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»	8

8.	Порядок выполнения измерений - поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»	17
8.1.	Операции по порядку проведения поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»	17
9.	Обработка и оформление результатов измерений	17
10.	Требования безопасности, охраны окружающей среды	18
11.	Требования к квалификации операторов	18
12.	Валидация метода поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте» при однократном введении Имипрамина	20

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ устанавливает Методику поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте».

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру использования теста «О-образный приподнятый лабиринт» для оценки уровня тревожности грызунов.

Основной областью применения данной методики является исследования в сфере экспериментальной фармакологии (оценка специфического и общетоксического эффекта).

Методика применима при оценке общетоксического и специфического действия фармакологических препаратов.

3. Нормативные ссылки

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

- Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др) 2012.- 994 с.;
- ГОСТ 15.101-98 «Система разработки и постановки продукции на производство. Основные положения. Порядок выполнения научно-исследовательских работ»;
- ГОСТ 7.32-2001 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления»;

- Федеральный закон от 12.04.2010г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»;
- Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. «Об утверждении правил лабораторной практики»;
- Приказ Минздравсоцразвития России №750н от 26 августа 2010 г. «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов»;
- ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения. ОСТ 64-02-003-2002" (утв. распоряжением Минпромнауки России от 15.04.2003 N P-10);
- Государственная фармакопея Российской Федерации выпуски XI и XII.

4. Погрешность измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с суммарной относительной погрешностью $\pm 15,2\%$ при доверительной вероятности 0,95.

5. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- отсутствие посторонних шумов;
- температура окружающего воздуха (18-26)°С;
- атмосферное давление 84,0 - 106,7 кПа (630 - 800 мм рт. ст.);
- относительная влажность воздуха 30-70 %;

- воздухообмен: 10 – 15 объёмов помещений в час в СПФ зоне 20 объёмов в час;
- напряжение в сети питания переменного тока (220 ± 22) В;
- частота переменного тока 50 ± 1 Гц

Механические воздействия, внешние электрические и магнитные поля, влияющие на работоспособность, должны быть исключены.

6. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым в методике поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»

6.1. Реактивы

- дезинфицирующий раствор (Глютекс 0,5 %, этанол 70%).

6.2. Материалы

- салфетка для протирания камеры, рабочей поверхности;
- бланки для заполнения первичных данных;
- перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3-88.

6.3. Оборудование

- люксметр для измерения освещения;
- секундомер;
- экспериментальная камера «приподнятый О-образный лабиринт» (фирмы OpenScience).

6.4. Требования к рабочему месту и экспериментальной камере (клетке для содержания)

- освещённость в центре огороженного пространства составляет 12 Лк, не огороженного – 25 Лк.;

- камера устанавливается на две специальные подставки (ящики черного цвета) на высоте 50 см над полом, причем закрытые участки располагаются на подставках, а открытые – над полом.

7. Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»

7.1. Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в процедуре поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте».

Рабочие растворы готовят в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики.

В случае необходимости рН растворов контролируют при помощи рН-метра.

7.2. Дизайн эксперимента по оценке поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте».

Тестируемый препарат будет вводиться самцам мышей возрастом 19 недель перорально (зондом в желудок) ежедневно в течение 15 дней в дозах, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные группы и дозы препарата Антистресс

Группа	№ жив.	Объем введения (мл/кг)	Концентрация (мг/мл)
1 контроль	01 - 08	10	

2 Антистресс 1,6 мг/кг	11 - 18	10	0,16
3 Антистресс 16 мг/кг	21 - 28	10	1,6
4 Серенцо 0,55 мг/кг	31 - 38	10	0,055
5 Имипрамин 10 мг/кг	41 - 48	10	1,0

Контрольным животным будет дана дистиллированная вода из расчета 0,1 мл на 10 г. веса. В течение всего исследования у животных планируется регистрация веса тела, потребление корма и воды. В этот же период будет изучено влияние тестируемого вещества на тревожность, состояние беспомощности, мышечную силу и выносливость мышцей в соответствующих физиологических тестах.

Планируемый эксперимент будет выполняться в два этапа, на первом этапе - оценка тревожного поведения мышцей в неблагоприятных условиях (открытое, приподнятое и освещенное пространство), при остром и многократном введении исследуемого препарата Антистресс и препаратов сравнения. По окончании 1-го этапа, после 15-го введения препаратов будут изучены локомоторные функции мышцей – мышечная сила и выносливость. На втором этапе планируется изучение влияния исследуемого препарата на поведение животных в условиях стрессирующего воздействия.

Схематически работу можно представить следующим образом:

ЭТАП 1

Предварительно до начала введения соединений и еженедельно определяется масса тела и суточное потребление воды и корма. Далее, 4 рандомизированные по весу группы мышей (по 8 особей) подвергаются внутрижелудочному введению растворов по схеме:

1 гр. – дистиллированная вода (dH₂O);

2 гр. – Антистресс, в дозе 1,6 мг/кг;

3 гр. – Антистресс, в дозе 16 мг/кг;

4 гр. – Серенцо, в дозе 0,55 мг/кг.

Спустя 40 мин после 1-го, 7-го и 14-го введения исследуемых препаратов проводится оценка уровня ситуативной тревожности, т.е. реакция мышей на моделируемые неблагоприятные, ограничивающие факторы по тестам «приподнятый О-образный лабиринт» и «темно-светлая камера». На 15-день эксперимента, через 40 мин после 15-го введения изучается влияние препаратов на мышечную силу в тесте «сила хватки» и координацию движений в тесте «перевернутая сетка».

ЭТАП 2

В данном этапе исследование принимают участие 5 групп мышей:

1 гр. – дистиллированная вода (dH₂O);

2 гр. – Антистресс, в дозе 1,6 мг/кг;

3 гр. – Антистресс, в дозе 16 мг/кг;

4 гр. – Серенцо, в дозе 0,55 мг/кг.

5 гр. – Имипрамин, в дозе 10 мг/кг.

Введение исследуемого препарата и референс-агентов, также как и в первой стадии эксперимента, продолжается 15 дней (приложение №11). С 9-го по 13 дни ежедневно, через 40 мин после инъекций, проводится моделирование поведения иммобильности – состояние выученной беспомощности с использованием стрессирующего воздействия в виде 6-минутного подвешивания мыши за хвост, одновременно со стрессорным влиянием в

первые 6 минут тестирования замеряется время неподвижного состояния – состояния иммобильности, которое характеризуется как бездействие. На 14 и 15 день проводится тест Порсолта «принудительное плавание», который является чувствительным к действию антидепрессантов [Dalvi, Lucki, 1999; Porsolt et al., 1977a; 1978a] и используется для оценки состояния иммобильности у животных [Kudryavtseva et al., 1991; Cryan et al., 2002; обзор Cryan, Mombereau, 2004].

По истечении 15-дневного срока введения тестируемого вещества, животные подвергаются CO₂-эвтаназии (СОП Viv_12).

Тестируемое вещество

Антистресс является новым потенциальным препаратом фармакологической группы анксиолитиков.

Прием, учет и хранение

Хранение фармацевтической субстанции осуществляется при комнатной температуре. Прием, регистрацию, учет и хранение тестируемого и контрольного веществ осуществляется провизором. Резервные образцы тестируемого вещества и компонентов контрольного вещества сохраняются как архивные образцы при соблюдении условий хранения.

Подготовка доз для введения

Приготовление доз для введения осуществляется провизором ежедневно непосредственно перед введением животным в соответствии с письменной методикой. Растворы для введения представляют собой водный раствор, в дистиллированной воде. Приготовление доз основывается на объемах и дозах, представленных в таблице 1. Расчеты по приготовлению доз приложены в папку первичных данных по исследованию.

Действия с остатками вещества

По окончании исследования неиспользованные остатки сухого вещества передаются в архиве на хранение.

Животные

В исследовании используются животные вида *Mus Muskulus* cf. (мышь: самцы) линии CD1 (Sprague-Dawley) возрастом 19 недель. В конце периода введения вещества возраст животных - 21 неделя. Данные массы тела животных при формировании групп и в период исследования прикладываются в папку по исследованию. Количество самцов принятых/использованных -72/72.

Источник животных

Животные были получены из лицензированного источника, имеющего действующую AAALAC аккредитацию - НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (МО, г. Пущино). Сопутствующая документация от производителя, подтверждающая SPF- статус животных, данные по контролю их здоровья приложены в папку первичных документов по исследованию. При приеме животных ветеринаром проводится внешний осмотр животных и подтверждается отсутствие отклонений в состоянии их здоровья.

Карантин/Адаптация

Животные проходят адаптацию /акклиматизацию в карантине в течении 5 дней до начала введения вещества. В течение карантинного периода проводится ежедневный внешний осмотр животных, с целью выявления возможных отклонений в состоянии их здоровья в соответствии с СОП Viv_03. Результаты осмотра животных в карантине представляются в папку по исследованию.

Распределение по группам

Животных отбирают в экспериментальные группы таким образом, чтобы среднее значение массы тела животных статистически не варьировало между группами, как описано в СОП Viv_29.

Идентификация

Животных идентифицируют в соответствии СОП Viv_11 цветными метками. Каждому животному присваивается индивидуальный

идентификационный номер, фиксируемый на карточке клетки. На этикетке также указывается номер исследования, ф.и.о. руководителя исследования, номер группы, пол животных.

Содержание и уход

Условия содержания животных соответствуют стандарту «ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Содержание животных и манипуляции с ними проводятся в виварии ИФАВ РАН. Все процедуры по рутинному уходу и манипуляции проводятся в соответствии с СОП лаборатории фармакологии ИФАВ РАН.

Параметры окружающей среды

Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды (18-26°C и 30-70% относительная влажность). В комнатах содержания животных поддерживается режим освещения «день-ночь» (12 часовой цикл). В микроизоляторах обеспечивается 45-ти кратная смена объема воздуха в час.

Клеточные системы

Животных в исследовании содержатся индивидуально в вентилируемых микроизоляторах типа One Cage (Lab. Products inc., США) на подстиле в стандартных условиях вентиляции.

Подстил

В качестве подстила используется коммерческий подстил LIGNOCEL Rinofix МК 2000 (JRS, Германия), представляющий специально приготовленные гранулы из кукурузных початков. Смена подстила осуществляется 1 раз в 2 недели, при условии сохранения резерва гигроскопичности.

Корм

Для кормления животных используется стандартный гранулированный корм «Чара» (Ассортимент Агро, Россия), который давался *ad libitum*. Контроль работы автоклава при стерилизации кормов проводится с помощью термо-

тест-полосок при каждом цикле автоклавирования. Результаты контроля работы автоклава и анализа корма хранятся в документации лаборатории.

Вода

Для поения животных используется автоклавированная водопроводная вода, прошедшая цикл дополнительной очистки от избыточных солей жесткости и ионов железа. Вода *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками.

Процедура введения веществ

Тестируемое и контрольное вещества вводятся животным ежедневно 15 дней. Введение осуществляется зондом в желудок. Введение проводится в одно и тоже время в первой половине дня. Объем вводимого препарата не превышает 10 мл/кг веса животного. Объемы и концентрация раствора вводимой фармацевтической субстанции корректируются еженедельно в соответствии с приростом массы тела, чтобы поддерживать постоянный уровень дозы вещества по отношению к массе тела животного. Препарат вводится в 2-х дозах.

Введение испытуемого препарата осуществляется в полном соответствии с СОП Viv_13 "Манипуляции с лабораторными животными" и с существующими нормативными документами: «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (под ред. Хабриева Р.У. – М.: «Медицина». – 2005. – 832 с.), приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. «Об утверждении правил лабораторной практики», ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Т.А.Гуськова «Токсикология лекарственных средств». М., 2003, И.П.Западнюк и др. «Лабораторные животные» Киев. 1983.

Используется кратковременная фиксация животных, ее продолжительность не более 10 сек., т.е то времени, которого достаточно для введения *per os* испытуемого препарата. Все животные проходят процедуру адаптации,

которая будет заключаться в неоднократной фиксации животного в течение 10-15 сек.

Наблюдения и измерения в ходе исследования

Клинические наблюдения

Период клинического наблюдения для основных групп животных составляет 15 дней.

Клинический осмотр каждого животного проводится перед первым введением и в последующем 1 раз в неделю в течение всего исследования. Он включает подробный осмотр животных в руках и на площадке. Регистрируемые признаки: изменения в коже, мехе, глазах, слизистых оболочках, появление секретов и экскретов, изменения походки, позы и реакции на взятие в руки. Отмечается проявление и выраженность автономной активности (лакримация, пилоэрекция, размер зрачка, необычный характер дыхания), а также общая подвижность и исследовательская активность, уринация, дефекация.

Масса тела

Масса тела регистрируется при формировании групп, перед первым введением препаратов и далее 1 раз в неделю (7-й, 14-й, дни). Данные об изменении массы тела в процессе исследования прикладываются в папку по исследованию.

Потребление корма

Потребление корма определяется для каждого животного еженедельно.

Физиологические показатели

Исследование тревожности мышей

О-образный приподнятый лабиринт. Это одна из распространённых дополнительных моделей для исследования тревожного поведения животных. Тест моделирует у животного ситуацию балансирования между жаждой исследования неизвестных областей и неохобией. Мыши обычно избегают опасных областей, представленных открытыми секторами О-образного лабиринта, и предпочитают безопасные места, такие как огороженные стенками сектора. Через некоторое время тревога

преодолевается тягой к исследованию (Shepherd, J. K. *et al.*, 1994; Konig, M. *et al.*, 1996). В тесте используется стандартный о-образный лабиринт (OpenScience, Россия, фото 6) для тестирования мышей. Освещённость в центре огороженного пространства составляла 150 лк, не огороженного – 25 лк. Мышь помещали в центр огороженного сегмента и в течение 5 мин регистрируются: латентное время выхода всеми лапами в не огороженный сегмент; количество выходов и общее время, проведённое в не огороженном сегменте (СОП Res_07).



ФОТО №6

Эвтаназия

Животные основных групп на 15-й день исследования подвергаются эвтаназии помещением в CO₂-камеру (СОП V_13).

Статистический анализ

Для всех количественных данных вычисляется групповое среднее арифметическое (M) и стандартная квадратичная ошибка (SEM). Статистический анализ проводился с помощью программы Statistic Base for Windows on Russian, 6.4 version. Анализ выполнялся для каждой группы отдельно. Различия выявлялись при $p < 0.05$ уровне значимости, тенденции при уровне значимости $p < 0,1$ с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок, непараметрического U- критерия Манна-Уитни.

Архив

По завершении итогового отчета все первичные данные по исследованию и необходимые материалы, включая ниже перечисленные, хранятся в архиве лаборатории фармакологии ИФАВ РАН в течение 3-х лет.

- Протокол, изменения, отклонения
- Данные о веществе
- Данные на животных, включая данные о состоянии здоровья от поставщика
- Распределение по группам
- Записи приготовления вещества для введения
- Записи введения
- Записи наблюдения за животными и клинического осмотра
- Масса тела
- Потребление корма
- Письма и другая письменная информация, касающаяся исследования
- Итоговый отчет

8. Порядок выполнения измерений - поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»

8.1. Операции по порядку проведения поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте»

- мышь помещают в центр огороженного сегмента, экспериментатор сразу отходит от клетки за смотровое стекло.

- регистрируется латентное время выхода на неогороженный сектор, количество выходов на неогороженный сектор и время, проведенное там. Эксперимент длится в течение 5 минут.
- по окончании 5 минут животное вынимается из установки и помещается в свою домашнюю клетку.
- после каждого животного камера обрабатывается дезинфицирующим раствором и насухо вытирается.
- после окончания эксперимента рабочее место обрабатывается дезинфицирующим раствором.

9. Обработка и оформление результатов измерений

Статистический анализ результатов происходит с использованием t-критерия Стьюдента при $p < 0,05$ с помощью программы Statistica 6.0

По итогам анализа составляют письменное заключение об уровне тревожности грызунов в тесте «О-образный приподнятый лабиринт», оформленное в виде документа Word или Power Point.

Результат считается отрицательным, если латентное время выхода на неогороженный сектор, количество выходов на неогороженный сектор и время, проведенное там в опытной группе не отличается от контроля. В случае, если латентное время выхода на неогороженный сектор, количество выходов на неогороженный сектор и время, проведенное там в опытной группе достоверно отличается от контроля, в отчете должны быть представлены данные (отдельно по каждому параметру) по уровню тревожности.

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007; требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации к приборам.

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.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, опыт работы с животными, изучившие требования настоящего стандарта, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.

12. Валидация метода поведенческого фенотипирования модельных животных в «О-образном приподнятом лабиринте» при однократном введении Имипрамина.

Тест приподнятый О-образный лабиринт показал, что в группе мышей, которой вводили препарат Имипрамин в дозе 10 мг/кг, отмечается тенденция к увеличению количества выходов в неогороженный участок лабиринта относительно группы контроля (табл. 2). Это, может свидетельствовать о снижении уровня тревожности мышей под влиянием препарата Имипрамин в дозе 10 мг/кг. В подтверждение этому предположению служит и то, что у этой группы животных наблюдался достоверное ($p < 0,05$) повышение количества выглядываний относительно контроля, а также максимальное количество выходов (табл. 2) и увеличение времени нахождения в светлом отсеке относительно контроля (табл. 2). В группе мышей, которым вводили Имипрамин в дозе 10 мг/кг наблюдалось незначительное увеличение латентного периода выхода в неогороженный участок (табл. 2).

Табл. 2 Тест «О-образный приподнятый лабиринт»

№ жив.	Латентное время выхода в неогороженный участок, сек	Количество выходов в неогороженный участок, сек	Продолжительность нахождения в неогороженном участке, сек	Выглядывания	Продолжительность 1 выхода
Дист.Н₂О по 0,1 мл на 10 г веса per os					
m	199,2	1,5	5,9	8,1	2,0
sem±	41,46	0,76	3,29	1,56	0,85
Имипрамин 10 мг/кг per os					
m	199,9	2,8	8,1	7,1	1,1
sem±	50,00	1,37	3,98	1,09	0,55