

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

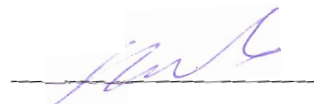
2014 г.



**«Методика поведенческого фенотипирования модельных  
животных в темно-светлой камере»»**

СТП-14.621.21.0008.05-2014

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 темно-светлой камере»	6
6.1.	Реактивы	6
6.2.	Материалы	6
6.3.	Оборудование	6
6.4.	Требования к рабочему месту и экспериментальной камере (клетке для содержания)	6
7.	Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения методики поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»	7
7.1.	Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в методике поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»	7
7.2.	Дизайн эксперимента по поведенческому фенотипированию модельных животных в темно-	7

	светлой камере»	
8.	Порядок выполнения измерений в методике поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»	15
8.1.	Операции по порядку проведения методики поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»	16
9.	Обработка и оформление результатов измерений	16
10.	Требования безопасности, охраны окружающей среды	17
11.	Требования к квалификации операторов	17
12.	Валидация методики поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере» при однократном введении Имипрамина	17

## **1. Наименование методики измерений**

Настоящий документ устанавливает методику поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере».

## **2. Назначение методики измерений и область применения**

Настоящая методика описывает процедуру использования теста «тёмно-светлая камера» для оценки уровня тревожности грызунов.

Основной областью применения данной методики является исследование 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  $\pm$  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 темно-светлой камере»**

**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 (фирмы OpenScience).
- 

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

- освещение над светлым отсеком должно быть 150 Лк. Не должно быть никаких посторонних шумов;

- камера должна стоять на ровной поверхности темным отсеком к экспериментатору.

**7. Операции при подготовке к выполнению измерений - порядок выполнения методики поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»**

**7.1. Операции по подготовке реактивов и материалов к использованию в методике поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере».**

Рабочие растворы готовят в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики.

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

**7.2. Дизайн эксперимента по поведенческому фенотипированию модельных животных в темно-светлой камере».**

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 мышей в соответствующих физиологических тестах.

Планируемый эксперимент будет выполняться в два этапа, на первом этапе - оценка тревожного поведения мышей 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 мышей – 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 (dH<sub>2</sub>O);
- 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 (dH<sub>2</sub>O);
- 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 поведение 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 CO<sub>2</sub>-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. (мыши: 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 термотест-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 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**

Тёмно-светлая камера. Данный тест применяется в настоящее время как основная модель оценки тревожного поведения грызунов. Камера состоит из темного и "безопасного" отсека и ярко освещенного открытого отсека, образующего, таким образом, зону "отвращения" (Crawley, J. and Goodwin, F. K., 1980). Модель создает конфликтную ситуацию для мыши, которая склонна исследовать незнакомую область, однако, первоначально хочет избежать неизвестного (неофобия). Интервал времени, проведенного в тёмном отсеке, коррелирует с уровнем тревожности, тогда как число выходов и время обследования освещённого отсека – показатели склонности к риску и исследовательской активности (Bourin, M. and Hascoet, M., 2003). Для теста используется стандартная тёмно-светлая камера (OpenScience, Россия) (фото 5). Освещённость светлого отсека составляла 150 лк. Мышь помещается в тёмный отсек. В течение 5 мин регистрируются следующие параметры: латентное время выхода всеми лапами в светлый отсек; количество выходов; общее время, проведённое животным в светлом отсеке (СОП Res\_08).



ФОТО №1

### **Эвтаназия**

Животные основных групп на 15-й день исследования подвергаются эвтаназии помещением в CO<sub>2</sub>-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 в методике поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»**

### **8.1. Операции по порядку проведения методики поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере»**

- Животное помещается в темный отсек установки.
- Регистрируют латентное время выхода в светлый отсек, количество выходов в светлый отсек, количество выглядываний из темного отсека и продолжительность нахождения в светлом отсеке в течение 5 минут.
- По окончании 5 минут животное вынимается из установки и возвращается в свою домашнюю клетку.
- После каждого животного камера обрабатывается дезинфицирующим раствором и насухо вытирается.
- После тестирования всех животных, 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 «тёмно-светлая камера», оформленное в виде документа Word или Power Point.

Результат считается отрицательным, если латентное время выхода в светлый отсек, количество выходов в светлый отсек, количество выглядываний из темного отсека и продолжительность нахождения в светлом отсеке в течение 5 минут в опытной группе не отличается от контроля. В случае, если латентное время выхода в светлый отсек, количество выходов в светлый отсек, количество выглядываний из темного отсека и продолжительность нахождения в светлом отсеке в течение 5 минут



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 методики поведенческого фенотипирования модельных животных в темно-светлой камере» при однократном введении Имипрамина.**

В тесте «темно-светлая камера» под действием Имипрамин 10 мг/кг уменьшается *латентный период выхода* в светлый отсек. Многократное введение препарата Имипрамин в дозе 10 мг/кг приводит к увеличению количества выходов в светлый отсек, повышенное время нахождения в светлом отсеке относительно контроля (табл. 2).

В данном эксперименте Имипрамин проявляет анксиолитическую активность.

ТаблТест «Темно-светлая камера»

	Латентное время выхода в неогороженный участок, сек	Количество выходов в неогороженный участок, сек	Продолжительность нахождения в неогороженном участке, сек	Выглядывания	Продолжительность 1 выхода
<b>Дист.Н<sub>2</sub>О по 0,1 мл на 10 г веса per os</b>					
<b>m</b>	<b>157,9</b>	<b>1,9</b>	<b>11,6</b>	<b>5,0</b>	<b>3,9</b>
<b>sem±</b>	<b>45,69</b>	<b>0,77</b>	<b>4,63</b>	<b>0,38</b>	<b>1,47</b>
<b>Имипрамин 10 мг/кг per os</b>					
<b>m</b>	<b>130,4</b>	<b>2,8</b>	<b>29,5</b>	<b>3,4</b>	<b>8,9</b>
<b>sem±</b>	<b>42,26</b>	<b>1,13</b>	<b>11,60</b>	<b>0,75</b>	<b>2,41</b>