

Особенности проведения поведенческих тестов на лабораторных животных при исследованиях специфической активности

Киселева Н.М., Борозденко Д.А., Шмиголь Т.А., Негребецкий В.В.

*(ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, НИИ трансляционной медицины, отдел
медицинской химии и токсикологии, каф. фармакологии пед.ф.)*

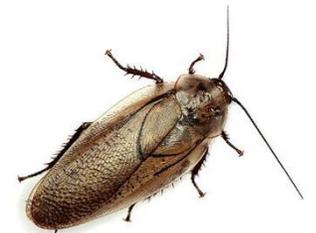
01 ноября 2019 г

- Изучение поведения и когнитивных функций – достаточно сложны:
 - ✓ Временные затраты
 - ✓ Интерпретация результатов

- Имеют ряд особенностей как при планировании исследования, так и при проведении тестов

Наиболее часто используемые биомодели для исследования поведения и КОГНИТИВНЫХ функций

- Крысы
- Мыши
- Рыбы - *Danio rerio* (zebrafish)
- Насекомые (тараканы – тропический пепельно-серый (*Nauphoeta cinerea*); ручейники)
- Кошки
- Собаки
- Приматы



Классификация

Психотропные средства

Психолептические средства	Психоаналептические средства
<ul style="list-style-type: none">● Антипсихотики● Анксиолитики и снотворные● Нормотимики (тимоизолептики)	<ul style="list-style-type: none">● Антидепрессанты● Психостимуляторы● Нейрометаболические стимуляторы (ноотропные средства, церебропротекторы, адаптагены)*
<p>*Данная группа отнесена к психоаналептикам условно</p>	

Регулирующие документы

- Гайды – разработаны не для всех методик
- Используем статьи различных исследователей
- Миронов ≠ Хабриев

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944

С. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств
2. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью
3. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств
4. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств
5. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств
6. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия
7. Методические рекомендации по доклиническому изучению аддиктивного потенциала лекарственных средств
8. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств для лечения алкоголизма
9. Методические рекомендации по изучению местноанестезирующей активности лекарственных средств
17. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005, - 832 с.

Часть 1. Доклинические исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний центральной и периферической нервной системы

1. Методические указания по изучению **нейролептической** активности фармакологических веществ
2. Методические указания по изучению **антидепрессантной** активности фармакологических веществ
3. Методические указания по изучению **транквилизирующего (анксиолитического)** действия фармакологических веществ
4. Методические указания по изучению снотворной активности фармакологических веществ
5. Методические указания по изучению **противосудорожной** активности фармакологических веществ
6. Методические указания по изучению **антипаркинсонической** активности фармакологических веществ
7. Методические указания по изучению **ноотропной** активности фармакологических веществ
8. Методические указания по экспериментальному доклиническому **изучению аддиктивного потенциала** фармакологических средств, обладающих психоактивными свойствами
9. Методические указания по экспериментальному изучению препаратов **для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени**
10. Методические указания по **изучению обезболивающего** (морфиноподобного) действия и налоксоноподобной активности фармакологических веществ
11. Методические указания по изучению препаратов для лечения **алкоголизма**
12. Методические указания по изучению препаратов для лечения **наркоманий и токсикомании**
13. Методические указания по изучению **местноанестезирующей** активности фармакологических веществ

Расчет количества животных

Расчет статистическая мощность

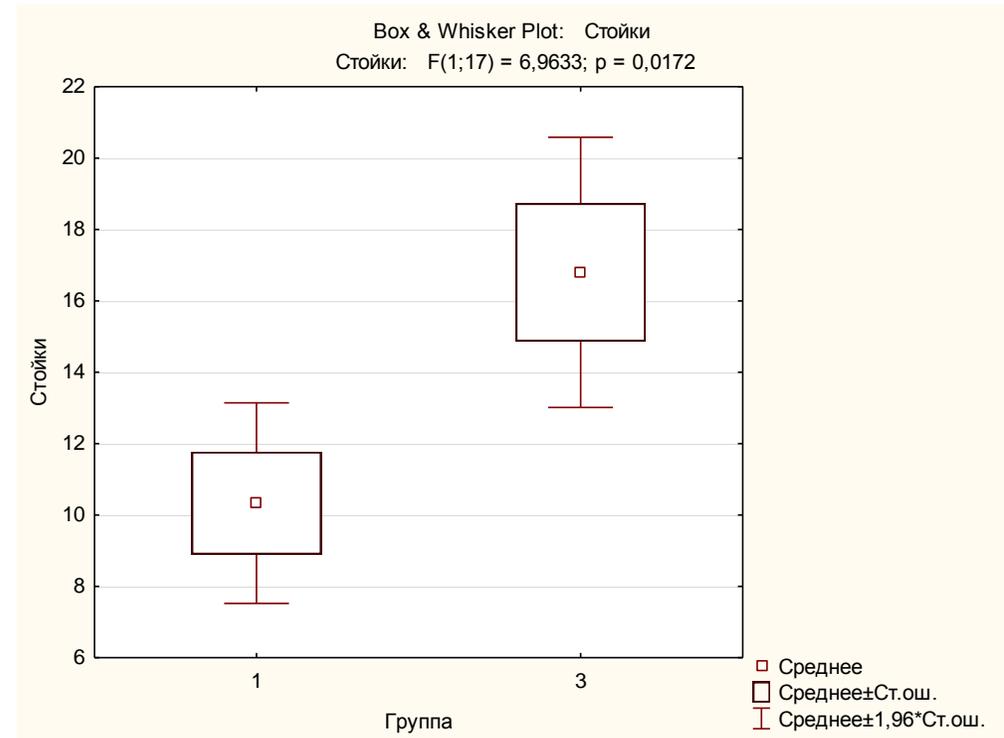
- понять, переменные какого типа (количественные, качественные, и т.д.) будут измерять эффект в данном исследовании
- оценить величину различий между эффектами, приемлемую для данного исследования выбрать подходящий статистический критерий для последующего анализа интересующих событий, это определит выбор конкретных формул для расчета
- оценить по данным литературы, **пилотному исследованию** или результатам сходных исследований величины показателей, входящих в выбранные для расчета формулы

<http://statistica.ru/local-portals/medicine/example/636/>

Пример: Исследование поведения в открытом поле

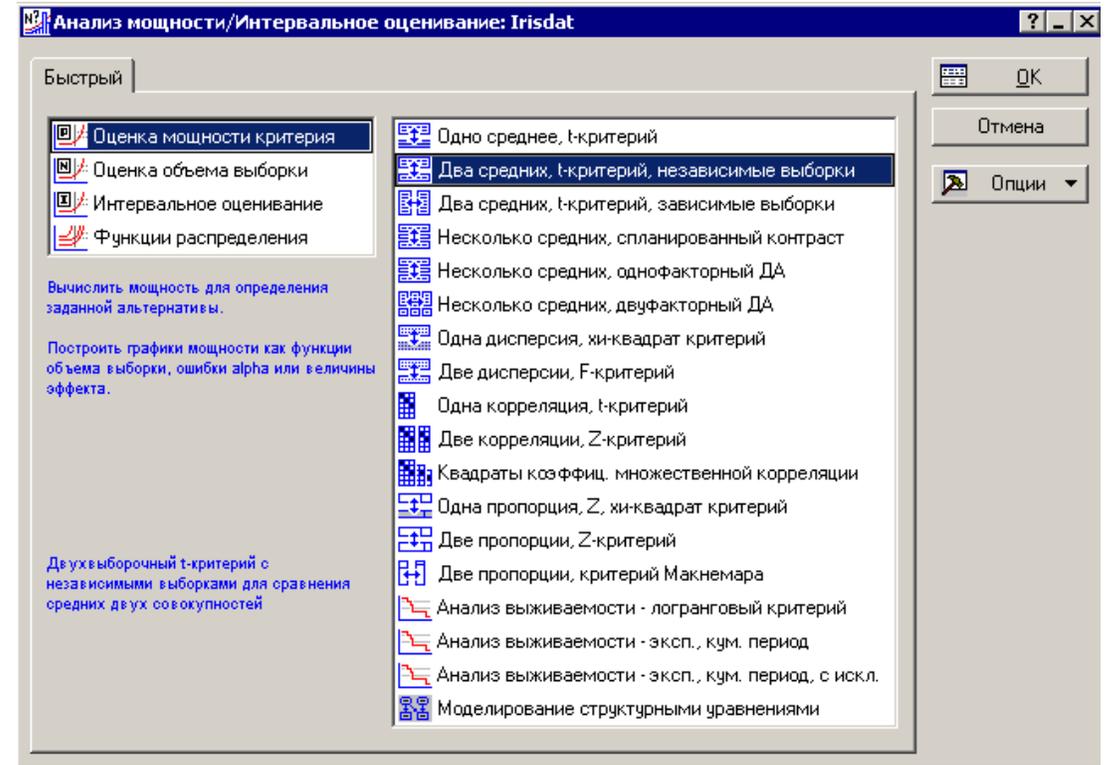
$p = 0,0172$

предварительный вывод:
крысы группы 3 значительно
активнее крыс 1 группы.



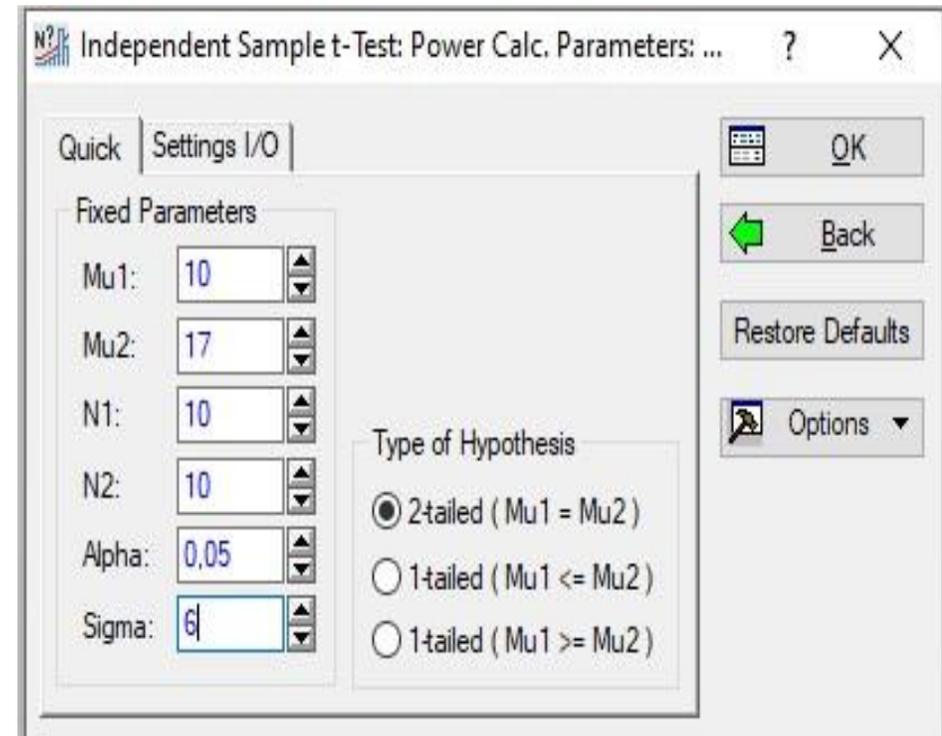
Пример:

- Проводим анализ мощности проведенного исследования:
- В программном пакете Statistica выбираем пункт анализ мощности.



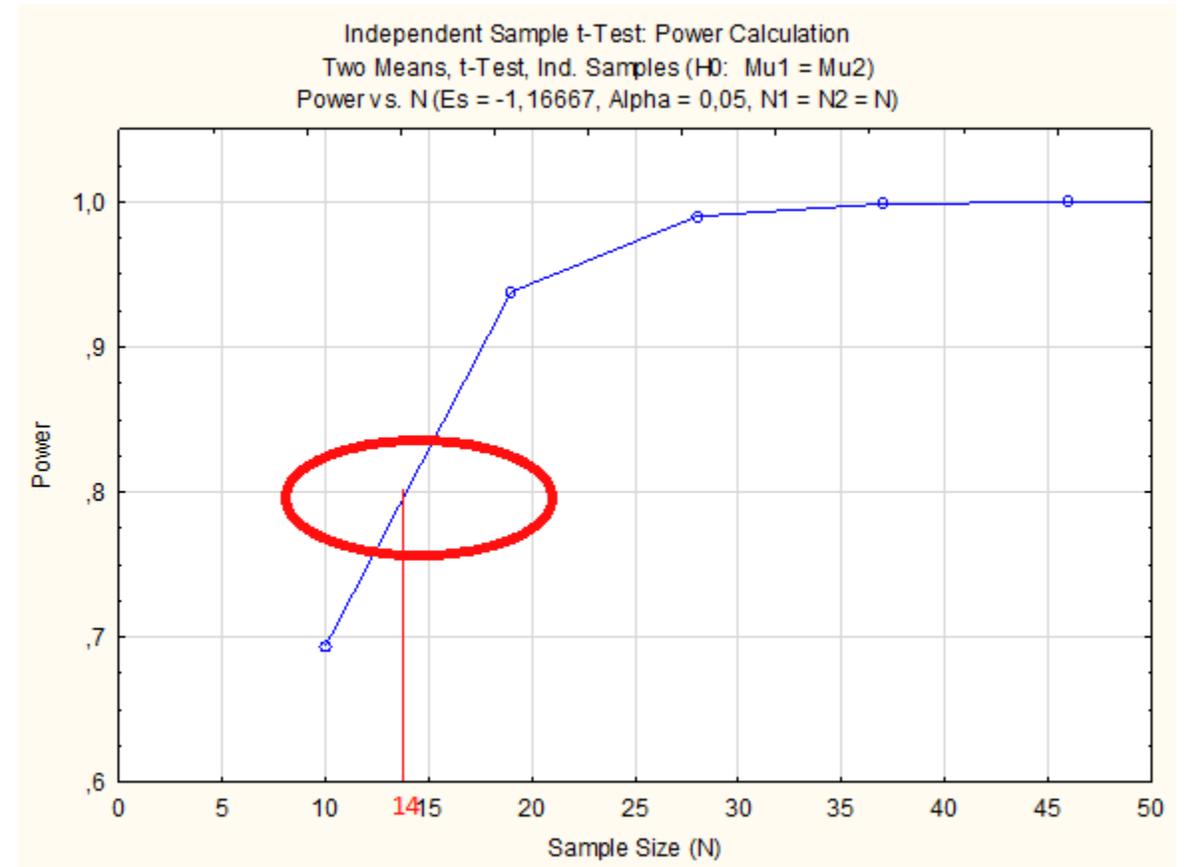
Пример:

- ✓ Вводим соответствующие значения:
- μ_1 и μ_2 значения средних в группе 1 и 3.
- N – объем выборки – в данном случае 10 животных в группе.
- Альфа – ошибка первого рода (α) – 0,05.
- И стандартное отклонение в нашем случае – 6.
- ✓ Получаем результат – мощность исследования 0,69. Что означает, что в 31% случаев мы не находим существующее различие между группами.
- ✓ Приемлемой мощностью считается **0,8 и выше.**



Пример:

- Строим график зависимости мощности исследования от выборки:
- Из графика видно, что уровень мощности в 0,8 достигается при 14 животных в группе.

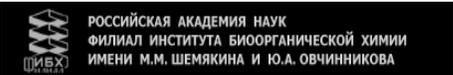


Таким образом для расчета

- Определяется критерий и нулевая гипотеза.
- Зависимость эффекта от индивидуальных особенностей особи
- Исследуется мощность и требуемый объем выборки для обнаружения эффекта на разумном уровне. (по результатам пилотных или подобных исследований). Животных должно быть **ДОСТАТОЧНО** для статистических исследований!
- Группы не менее 12-14, а в ряде случаев и больше
- **Увеличить** рассчитанные по формулами значения объема с учетом возможного исключения в процессе исследования

Поставщик

Поскольку поведенческие особенности могут зависеть от особенностей генотипов животных на протяжении всего исследования желательно иметь одного поставщика животных

-  Питомник лабораторных животных «ПУЩИНО»
-  Филиал "Столбовая" ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА»
-  Charles River Laboratories
-  Российский национальный центр генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

Подготовительный период

- Handling (приручение к рукам)
- Заранее приносить животных в помещение, где будут тестироваться животные
- Предварительное тестирование в установке «Открытом поле» позволяет сформировать идентичные по поведению группы животных и позволяет оценить в дальнейшем действие препарата на конкретное животное
- Палитра поведенческих тестов

Человек или машина?

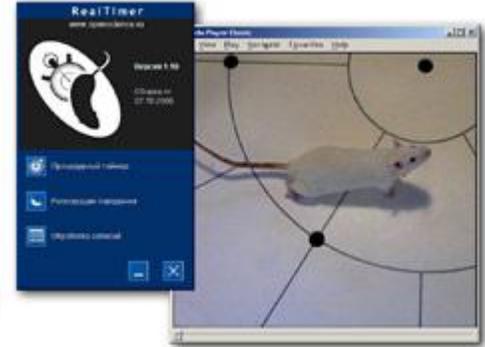


Глаза

- Трудоемкий процесс
- Последовательный процесс

- Возможность визуально разделить близкие по двигательной активности акт

Автоматические системы



Человек или машина?



Глаза

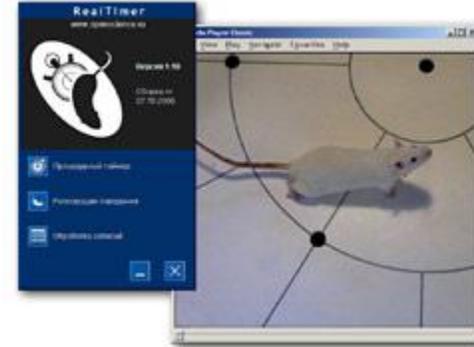
- Трудоемкий процесс
- Последовательный

- Возможность визуально разделить близкие по двигательной активности акт

Автоматические системы

- Процесс наблюдения и подсчета параметров
- Может наблюдать, записывать и обрабатывать параметры многих животных одновременно

- Невозможность оценки близких по двигательной активности параметров без доп. оборудования



Исследование поведения

- Ориентировочно-исследовательское поведение
- Анксиолитическая активность
- Антидепрессивная активность

Исследование когнитивных функций

- УРПИ
- УРАИ
- Выработка пищедобывательных рефлексов

Неврологический дефицит

- Шкала
- Суживающаяся дорожка

Исследование поведения

Открытое поле

Тест "Открытое поле" предназначен для изучения поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях и позволяет оценить:

- выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов
- уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного
- стратегию исследовательского/оборонительного поведения;
- привыкание (habituation);
- запоминание обстановочных стимулов
- симптомы неврологического дефицита;
- локомоторную стереотипию



Natalia Sestakova, Angelika Puzserova, Michal Kluknavsky, and Iveta Bernatova Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide
Interdisciplinary Toxicology Sep 2013; 6(3): 126-135. Open Access

Открытое поле

Тест "Открытое поле" предназначен для изучения поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях и позволяет оценить:

- выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов;
- уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного;
- стратегию исследовательского/оборонительного поведения;
- привыкание (habituation);
- запоминание обстановочных стимулов;
- симптомы неврологического дефицита;
- локомоторную стереотипию



- Для различных задач можно использовать различные модификации установки:
 - ✓ маленьким или большим,
 - ✓ круглым или квадратным,
 - ✓ с крышкой и без нее,
 - ✓ с наличием или отсутствием отверстий в полу установки
 - ✓ разной освещенностью
 - ✓ Для исследования ноотропной активности можно использовать многократные посадки животного в установку (Platel et al., 1984 г)

Норковая камера



- Установка "Норковая камера" предназначена для исследования уровня тревожности и ориентировочно-исследовательской активности грызунов
- Аналог открытого поля

Т. И. Кудякова, Н. Ю. Сарычева, А. А. Каменский ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ
ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС
ПОСЛЕ УДАЛЕНИЯ ВОМЕРОНАЗАЛЬНОГО ОРГАНА (ВНО)// ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ
НАУК, 2007, том 414, № 6, с. 845-849

Приподнятый крестообразный лабиринт



Установка "Приподнятый крестообразный лабиринт" предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности и позволяет оценить:

- уровень **тревожности** животного
- симптомы неврологического дефицита
- привыкание (habituation).

Alicia A. Walf and Cheryl A. Frye The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nature Protocols 2, 322-328 (2007)



Тест «светло-темнового выбора»



Установка "Темно-светлая камера" предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности и позволяет оценить:

- предпочтение темноты и света;
- выраженность и динамику поведения "выглядывания";
- привыкание (habituation).

- Темно-светлая камера также необходима для типирования животных (по предпочтению темноты и света) перед проведением тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте.

Michel Bourin, Martine Hascoe The mouse light/dark box test. European Journal of Pharmacology 463 (2003) 55-65

Natalia Sestakova, Angelika Puzserova, Michal Kluknavsky, and Iveta Bernatova Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. Interdisciplinary Toxicology Sep 2013; 6(3): 126–135. Open Access



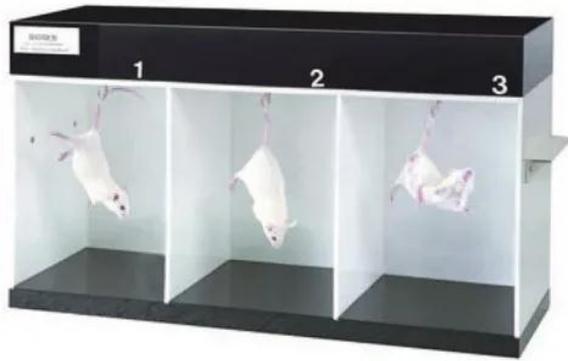
Плавательный тест по Porsolt



- Тест предназначен для выявления:
- антидепрессантной активности
- психостимулирующей активности, а также
- позволяют оценить способность животных к обучению (в том числе в связке с тестом 'Экстраполяционное избавление')

Porsolt R.D., Pichon M.Le., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. / Nature, 1977, v. 266, pp 730-732.

Commons, K. G., Cholanians, A. B., Babb, J. A., & Ehlinger, D. G. (2017). The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. ACS chemical neuroscience, 8(5), 955-960.



Подвешивание за ХВОСТ

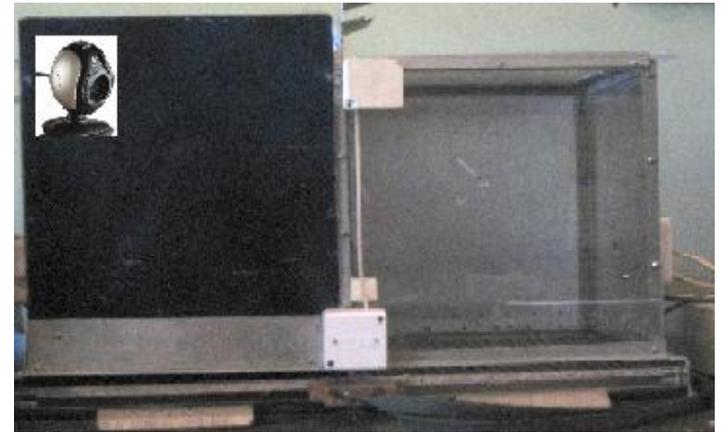


Тест подвешивания за хвост применяется для выявления и исследования **антидепрессантов**.

Adem Can, # David T. Dao, # Chantelle E. Terrillion, Sean C. Piantadosi, Shambhu Bhat, and Todd D. Gould The Tail Suspension Test J Vis Exp. 2012; (59): 3769.

Исследование КОГНИТИВНЫХ функций

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)



- Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) – является базисной моделью для оценки влияния веществ на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и при амнезии
- Позволяет оценить влияние фармакологически-активных веществ на нарушение когнитивных функций

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005, - С. 309 – 311.

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — С.278 - 280

Условный рефлекс активного избегания (УРАИ)



- модель двустороннего избегания негативного воздействия в челночной камере (шаттл-бокс) - один из наиболее широко используемых вариантов УРАИ, который широко применяется для оценки действия веществ на процесс обучения и памяти
- влияния веществ на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и при амнезии
- позволяет создать модели обратимых функциональных нарушений, изменения условия эксперимента, что позволяет оценить способность животного к решению более сложных задач в условиях переменного стресса
- позволяет оценить влияние фармакологически-активных веществ на нарушение когнитивных функций

Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005, - С. 311.

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — С.280 – 281.

Экстраполяционное избавление



Установка предназначена для изучения когнитивных функций грызунов в условиях острого стресса и позволяет оценить:

- индивидуальные различия когнитивного стиля решения задачи (поиска пути избавления из острой стресс-ситуации);
- становление когнитивных функций в онтогенезе;
- влияние фармакологически-активных веществ на нарушение когнитивных функций

Nina A. Bondarenko. Anxiety and the Problem of “Inattentive” Animals in Water Maze Tests. The Russian Journal of Cognitive Science, 2017, vol. 4 (4), pp. 45 – 51

T-образный лабиринт (один из вариантов выработки пищедобывающего рефлекса)



Установка позволяет исследовать рабочую память грызунов, лежащую в основе поведения чередования рукавов (спонтанного или подкрепленного) и чувствительную к дисфункции септо-гиппокампальной системы.

Deacon R.M.J. (2006) Appetitive position discrimination in the T-maze. Nature Protocols. 1(1), 13-15

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — С.282.

Неврологический дефицит

Неврологическая шкала mNSS

Тест	Баллы	Крыса №
Мышечный статус Гемиплегия: Подвешивание крысы за хвост	«И»	
Сгибание передних конечностей	1	
Сгибание задней конечности	1	
Наклон головы $>10^\circ$ по вертикальной оси в течение 30 с	1	
Поза крысы на полу	«ИЛИ»	
Нормальная походка	0	
Неспособность идти прямо	1	
Кружение на стороне пареза	2	
Падение на стороне пареза	3	

M. Lu, J. Chen, D. Lu, L. Yi, A. Mahmood, M. Chopp, Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells., J. Neurosci. Methods. 128 (2003) 183–90.

Сенсорные тесты:	«И»	
Размещение на поверхности по зрительным и тактильным контролем	1	
Прприоцептивный тест (нажатие на лапу поверхностью)	1	
Баланс на палке:	«ИЛИ»	
Устойчивое балансирование	0	
Захват перекладины	1	
Обнимает и падает одна лапа	2	
Обнимает и падают 2 лапы или держится (>60 s)	3	
Падение (>40 s)	4	
Падение (>20 s)	5	
Падение, нет попыток к балансировке (<20 s)	6	
Отсутсвие рефлексов	«И»	
С ушной раковины	1	
Корнеальный	1	
Стартл рефлекс	1	
Судороги миоклонус, дистонии	1	
Максимум баллов		18
Сумма баллов		



Сужающаяся дорожка



- установка "Beam-walking" или "Сужающаяся дорожка" предназначена для оценки моторного дефицита главным образом задних конечностей и в меньшей степени передних.
- Тест широко используется при моделировании различных патологических состояний мозга, связанных с повреждением моторной коры

Д. Н. Силачѳв, М. И. Шубина, С. С. Янкаускас, В. П. Мкртчян, В. Н. Манских, М. В. Гуляев, Д. Б. Зоров. ОЦЕНКА СЕНСОМОТОРНОГО ДЕФИЦИТА В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ИШЕМИИ/ГИПОКСИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС ЖУРНАЛ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ, 2013, том 63, №3, с. 405–416

Благодарю за внимание!

kiseleva.67@mail.ru

