

СТП-14.621.21.0008.01-2014

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 ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДВИГАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У
МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ В ТЕСТЕ ПЕРЕВЕРНУТАЯ СЕТКА»

СТП-14.621.21.0008.02-2014

Ответственный исполнитель
Заведующий лабораторией,
к.б.н.

 С.Г. Ключков
«30» декабря 2014 г.

Черноголовка, Московская обл. 2014

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 измерений | 4 |
| 7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для теста «перевернутая сетка»..... | 4 |
| 7.1. Материалы | 4 |
| 7.2. Оборудование | 4 |
| 8. Операции при выполнении измерений в тесте «перевернутая сетка»..... | 4 |
| 9. Обработка и оформление результатов измерений..... | 8 |
| 10. Требования безопасности, охраны окружающей среды | 8 |
| 11. Требования к квалификации операторов | 8 |
| Валидация методики инструментального анализа двигательной функции у модельных животных в тесте «перевернутая сетка»..... | 9 |

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.01-2014 устанавливает методику «Методика инструментального анализа двигательной функции у модельных животных в тесте перевернутая сетка»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру использования теста «перевернутая сетка» для анализа координации движения и равновесия животных путем способности их к удержанию на перевернутой сетке.

Основными областями применения данной методики являются нейронауки (оценка состояния нервной системы модельных животных, установление стадии нейрональной патологии, разработка новых терапевтических средств).

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 «перевернутая сетка», с учетом естественной убыли животных – 11 особей в каждой группе.

6. Условия измерений

Координация движений и равновесие животных определяется в тесте на способность к удержанию на перевернутой сетке. Используется максимальное время удержания 60 сек в одной из трех попыток. Для статистической обработки используется максимальное значение времени нахождения на сетке до падения.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для теста «перевернутая сетка»

7.1. Материалы

Подстил

7.2. Оборудование

Секундомер

Весы

Сетка размером 40 см x 40 см с диаметром ячеек 1 см.

8. Операции при выполнении измерений в тесте «перевернутая сетка»

8.1 Получить у руководителя исследования (ответственного исполнителя) список зашифрованных животных.

8.2 Животных перед экспериментом принести в комнату для исследований.

8.3 Взвесить первое животное и посадить его в центр сетки.

8.4 Осторожно перевернуть сетку и установить на две опоры над клеткой с толстым слоем подстила (не менее 30 см) на высоте не менее 50 см. Включить секундомер.

8.5 После падения животного выключить секундомер. Если животное удерживается на сетке более 60 с, также остановить эксперимент.

8.6 Наблюдать животное в течение 3-х попыток. Перерыв между попытками должен составлять не менее 30 мин.

8.7 Подписать бланк исследования, поставить дату выполнения эксперимента.

8.8 Результаты исследований предоставить руководителю исследования (ответственному исполнителю).

Этапы проведения теста «перевернутая сетка» приведены на рисунке 1.

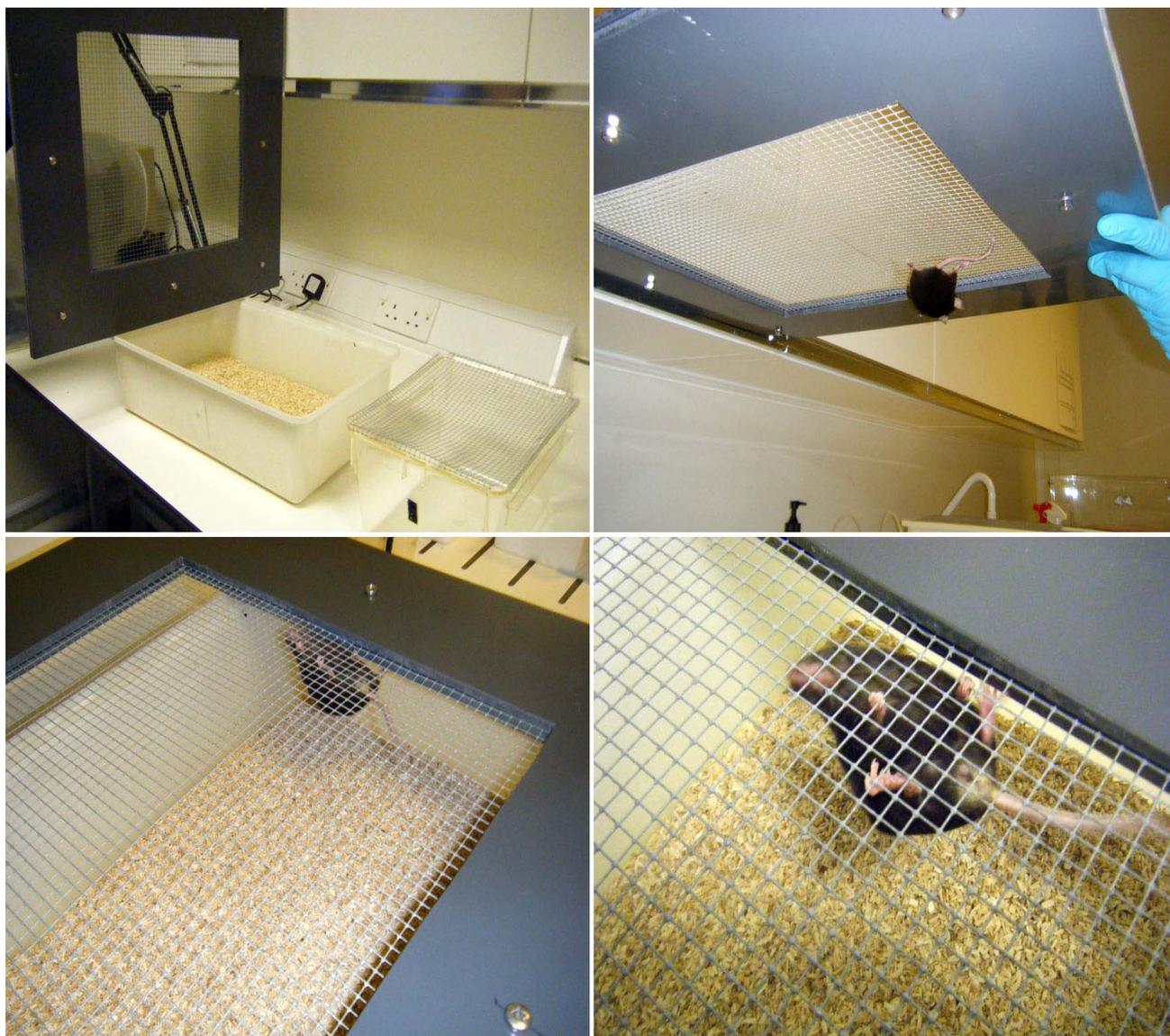


Рисунок 1 – Тест «перевернутая сетка» для определения двигательной функции мышей: основные этапы.

Клетки

Мыши по 11 особей в каждой группе рассаживаются в отдельные клетки микроизоляторы OneCage не более, чем по 5 штук в каждой при свободном подступе к воде и корму.

Подстил

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

Корм

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

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

Параметры окружающей среды

Световой цикл состоит из 12 часов дня и 12 ночи, день начинается в 6 часов и заканчивается в 18 часов. Мыши содержатся в помещении, где температура воздуха составляет 18-24°С, влажность 40-70%.

Адаптация

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.

Распределение по группам.

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

Идентификация

Животные индивидуально маркировались ушными клипсами 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.

Эвтаназия

В конце эксперимента животное подвергается медикаментозной эвтаназии путем внутривентрикулярного введения летальной дозы пентобарбитала натрия.

9.Обработка и оформление результатов измерений

Статистическая обработка осуществляется с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.1, MSExcel 2007 и ImageJ. Первичная обработка, систематизация и архивирование данных осуществляется с помощью пакета MSExcel.

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, опыт работы с лабораторными животными, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.

Валидация методики инструментального анализа двигательной функции у модельных животных в тесте «перевернутая сетка»

Тест «перевернутая сетка» применялся для анализа двигательной функции трансгенных животных линии $\text{tau}^{\text{P301S}}$, который проводили ежемесячно, начиная с третьего месяца жизни. Было показано, что у трансгенных мышей с возрастом происходит прогрессивное ухудшение баланса, координации и мышечной силы. Животные, получавшие нейропротекторный препарат димебон, по способности удерживаться на перевернутой сетке не отличались от животных контрольной группы на 3-м и 5-м месяце, однако показали достоверные отличия на 4-м и 6-м месяце жизни (Рисунке2).

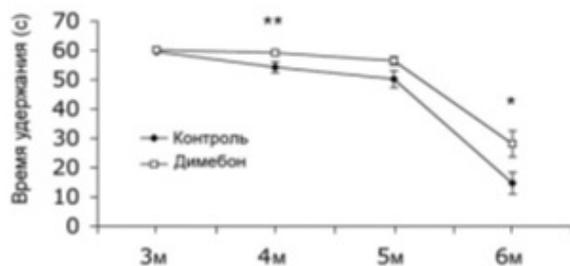


Рисунок 2 – Сравнение показателей баланса и координации движений в тесте «перевернутая сетка» у $\text{tau}^{\text{P301S}}$ мышей разного возраста, хронически получавших димебон (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$) и контрольной группы. Возраст указан в месяцах.

Таким образом, димебон существенно замедляет прогрессию моторной дисфункции, развивающейся вследствие накопления агрегированных форм белка tau.