

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.П. КОРОЛЕВА»
(САМАРСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ЛАБОРАТОРНЫЕ КРЫСЫ: СОДЕРЖАНИЕ, РАЗВЕДЕНИЕ И БИОЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПО ФИЗИОЛОГИИ ПОВЕДЕНИЯ

Рекомендовано редакционно-издательским советом федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» в качестве учебного пособия для обучающихся по основным образовательным программам высшего образования по направлениям подготовки 06.03.01 и 06.04.01 Биология, 37.03.01 Психология

САМАРА
Издательство Самарского университета
2021

УДК 57.082(075)

ББК 28ся7

Л125

Авторы: *В.И. Беляков, Е.М. Инюшкина, Д.С. Громова, А.Н. Инюшкин*

Рецензенты: канд. биол. наук, доц. Е. С. К о р ч и к о в,

канд. биол. наук, доц. Е. В. А н т и п о в

Л125 Лабораторные крысы: содержание, разведение и биоэтические аспекты использования в экспериментах по физиологии поведения: учебное пособие / В.И. Беляков, Е.М. Инюшкина, Д.С. Громова [и др.]. – Самара: Издательство Самарского университета, 2021. – 96 с.

ISBN 978-5-7883-1612-3

В учебном пособии рассматриваются актуальные вопросы, связанные с различными аспектами использования лабораторных крыс при проведении медико-биологических исследований. Особое внимание уделяется проблеме соблюдения стандартов биоэтики при организации подобных научных работ. Приводится описание классических поведенческих установок для грызунов и рекомендации по их использованию.

Пособие предназначено для обучающихся биологических факультетов университетов, медицинских вузов, а также научных работников. Пособие будет полезным при организации учебно-методической и научной деятельности обучающихся (в т.ч. с использованием современных дистанционных технологий).

Подготовлено на кафедре физиологии человека и животных.

УДК 57.082(075)

ББК 28ся7

ISBN 978-5-7883-1612-3

© Самарский университет, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1. Общие сведения о крысах	5
2. Линии животных и их характеристика	12
3. Лабораторные животные и правила их содержания	17
4. Кормление лабораторных крыс	20
5. Разведение лабораторных крыс	24
6. Биометрические показатели лабораторных крыс	34
7. Характеристика некоторых показателей гомеостаза	40
8. Биоэтические аспекты использования лабораторных животных в медико-биологических исследованиях	46
9. Рекомендации по организации поведенческих исследований	49
10. Методы изучения поведения грызунов в биомедицинских исследованиях	50
11. Основные тесты для исследования поведения грызунов	53
12. Практические работы по изучению поведения животных с использованием тестовых установок	73
13. Способы моделирования некоторых физиологических и патологических состояний у животных	84
14. Примерный перечень научно-исследовательских работ с использованием основных поведенческих методик	87
Список литературы	88

Введение

В настоящее время вопросы, связанные с изучением поведения, становятся всё более актуальными. Ни одна наука биологического и медицинского комплекса не может обойтись без знаний об основных принципах организации и функционирования высшей нервной деятельности.

Применение батареи поведенческих тестов является необходимым при проведении доклинических испытаний, изучении механизмов протекания высших психических функций на различных этапах онтогенеза, влиянии на них средовых факторов и действии лекарственных препаратов.

Внедрение новых образовательных технологий в высшей школе требует от обучающихся навыков планирования и выполнения научных и учебных экспериментов, которые способствуют формированию такого вида профессиональной деятельности, как научно-исследовательская. Для достижения поставленной цели необходимо адекватно выбирать методы исследования и уметь правильно интерпретировать полученные данные. В настоящем пособии приводятся современные методики для изучения поведения в модельных экспериментах. Использование настоящего издания в учебном процессе может способствовать формированию у обучающихся биологических, психологических и медицинских факультетов целого ряда компетенций, определённых Федеральным Государственным Образовательным Стандартом.

1. Общие сведения о крысах

Крысы относятся к роду *Rattus*, семейству мышьеобразных (*Muridae*). Для экспериментальных исследований в лабораториях используют белых крыс, которые являются альбиносами черной (*Rattus Rattus*) и серой (пасюк – *Rattus Norvegicus*).

Крыса серая, пасюк (*Rattus Norvegicus*) широко распространена по всему земному шару. Длина тела до 24 см, вес до 500 г. Хвост всегда короче тела, до 19,5 см длиной. Морда сравнительно тупая и широкая; ушная раковина небольшая. Окраска меха не серая, а, скорее, серо-бурая. Среди основной массы волос выделяются более длинные и блестящие остевые волосы. Мех на брюшке состоит из белых с темными основаниями волос. Граница между окраской боков и брюшка обычно хорошо выражена. Молодые крысы почти серые; с возрастом в окраске усиливается рыжина. Череп пасюка отличается от черепов других крыс почти прямыми теменными гребнями. В кариотипе 42 хромосомы. При благоприятных условиях жизнедеятельности период полового возбуждения (течки) у самок крыс повторяется каждые 6-10 дней и продолжается около суток. Беременность протекает 21-25 дней. Крысята рождаются голыми и слепыми, весом 3-5 г. Они быстро растут и прибавляют в весе, достигая к месячному возрасту 35-45 г. К 3 месяцам жизни их вес уже составляет 120-140 г. Самки способны размножаться до двухлетнего возраста. В течение года при достаточном питании самка может принести до 50-80 крысят, а потомство от одной пары крыс может составить порядка 1000 голов. Продолжительность жизни серых крыс – около 3-4 лет.

Подвиды (линии) серой крысы

Внутри вида *Rattus Norvegicus* выделяют 2 основные линии: восточноазиатскую (*Rattus Norvegicus sagaco*) и индийскую (*Rattus Norvegicus norvegicus*).

Представители первой – аборигены Восточного Китая, естественным образом заселившие прилегающие районы. Они отличаются меньшими размерами, относительно коротким хвостом (70 % длины тела), буровой окраской и её выраженной

сезонной сменой. Обитают в Восточной Азии: Забайкалье, Дальний Восток, остров Сахалин, северо-восточная Монголия, Центральный и Восточный Китай, полуостров Корея, острова Хоккайдо и Хонсю (Япония). Все остальные территории заселены преимущественно представителями второй линии, которая сформировалась из приморских популяций *Rattus Norvegicus* сагасо около 2000 лет назад.

Образ жизни серой крысы

Серая крыса – исходно околоводный вид, в природе обитающий по берегам разнообразных водоёмов. Благодаря склонности к всеядности, высокой исследовательской активности, быстрой обучаемости и высокой плодовитости она адаптировалась к жизни в антропогенных ландшафтах и непосредственно в постройках человека. В настоящее время по характеру связи с человеком выделяют 3 экологические зоны проживания крыс:

1) северная зона, где крысы круглый год живут в человеческих постройках;

2) средняя (переходная) зона, где летом они заселяют природные биотопы, в том числе литоральные, а на зиму возвращаются в постройки. Лишь часть крыс иногда остаётся зимовать в природных условиях; круглогодичны только поселения на крупных городских свалках. В европейской части ареала южная граница этой зоны проходит примерно по линии Харьков – Саратов – Нижний Новгород, за Уралом – по 50° с. ш.;

3) южная зона, где значительная часть популяции круглый год живёт вне построек. На территории России это низовья Волги и Дона, а также исходный ареал на юге Дальнего Востока и на острове Сахалин, где крысы постоянно живут вдали от жилья, являясь естественным компонентом околоводных экосистем.

Серые крысы предпочитают населять пологие берега водоёмов с хорошими защитными условиями – густой растительностью, пустотами в почве и т. п. В природных условиях роют довольно простые норы длиной 2-5 м и глубиной до 50-80 см. Внутри норы сооружают гнездовые камеры диаметром около 30 см. В качестве строительных материалов для гнезда используют любые доступные средства: траву, листья, перья и шерсть, тряпки и бумагу. В низовьях рек в период паводка живут в дуплах или

строят на деревьях простые гнёзда из веток. В антропогенных ландшафтах заселяют берега искусственных водоёмов, огороды, сады и парки, пустыри, места отдыха людей (например, пляжи), свалки, канализации, края «полей фильтрации». Обязательным условием является близость воды. В городах порой поднимаются в зданиях до 8-9 этажа, однако предпочитают селиться в подвальных помещениях и на нижних этажах жилых и складских построек, где доступные пищевые запасы и бытовые отходы обеспечивают им кормовую базу. Проникают в шахты рудников, в тоннели и шахты метро, на транспортные средства. В горах (Большой Кавказ) встречаются до 2400 м над уровнем моря в жилищах и до 1400 м над уровнем моря на огородах.

Активность серых крыс преимущественно сумеречная и ночная. Поселяясь вблизи человека, пасюк легко приспособливается к его активности, изменяя свой суточный ритм. Ведёт как одиночный, так и групповой, а в природе и колониальный образ жизни. Внутри группы существуют сложные иерархические отношения с доминированием самцов. Самый сильный и крупный самец возглавляет иерархию. Группа владеет территорией размером до 2000 м², которую метит запаховыми метками и защищает от вторжения чужаков. При недостатке пищи городские крысы зачастую не удаляются от своего гнезда дальше 20 м.

У серых крыс отсутствует пространственный консерватизм, и они охотно расселяются по новым территориям. Это подвижные животные, обладающие незаурядными физическими данными. При необходимости крыса может развить скорость до 10 км/ч, преодолевая на ходу барьеры высотой до 80 см (с места могут прыгать до 1 метра). Ежедневно крыса пробегает от 8 до 17 км. Они хорошо плавают (могут находиться в воде до 72 часов) и ныряют, подолгу держась в толще воды и даже лова там добычу. Зрение у крыс слабое. Угол зрения составляет всего 16° и обеспечивает небольшой охват пространства; этот недостаток компенсируется частым вращением головы. Крысы воспринимают голубовато-зелёную часть спектра света и в основном всё видят в сером цвете. Красный цвет означает для них полную темноту. Чувство обоняния развито хорошо, но на небольших расстояниях. Слышат звуки частотой до 40 кГц (человек – до 20 кГц), чутко

реагируют на шорохи, но чистые тона не различают. Могут селиться и успешно размножаться как в холодильниках с постоянной низкой, так и в котельных с высокой температурой. Легко выдерживают очень высокий уровень радиации (до 300 рентген/час), при этом способны ощущать рентгеновские лучи при помощи обоняния, улавливая запах озона.

Питание серых крыс

Серая крыса отличается от большинства грызунов повышенной животнойностью – в рационе ей непременно необходимы животные белки. В природе среди животных кормов на первом месте стоят рыба и земноводные, а также моллюски на Дальнем Востоке. Пасюки активно охотятся на мелких грызунов и насекомых, разоряют наземные гнёзда птиц. Крысы, живущие по берегам незамерзающих морей, круглый год питаются морскими выбросами. Из растительной пищи употребляют семена, зерно, сочные части растений. Рядом с человеком пасюки питаются всеми доступными пищевыми продуктами, а также отбросами, кормами скота и птицы; нередок фекальный тип питания. Запасы делают довольно редко.

В сутки каждая крыса потребляет 25-30 г пищи, за год съедая 7-10 кг продуктов. Голодание серые крысы переносят тяжело и погибают без пищи через 3-4 дня. Ещё быстрее они гибнут без воды. Каждая крыса за сутки выпивает 30-35 мл воды; поедание влажных кормов снижает потребность в воде до 5-10 мл в сутки. Экспериментально удалось выяснить, что крысы могут нормально существовать при потреблении кормов, содержащих более 65 % влаги. Если влажность кормов составляет 45 %, крысы гибнут через 26 суток, а при 14 % влажности кормов через – 4-5 суток.

Размножение и продолжительность жизни серых крыс

Репродуктивный потенциал серой крысы крайне высок. В природе крысы размножаются в основном в тёплый период года; в отапливаемых помещениях размножение может продолжаться круглый год. В первом случае выводков обычно 2-3, во втором – до 8 в год; количество детёнышей колеблется от 1 до 20, в среднем – 8-10. Уже через 18 часов после родов самки опять входят в эструс

и снова спариваются. Наблюдаются 2 пика: весенний и осенний. Обилие животных кормов повышает интенсивность размножения; возрастает она и после неполной дератизации, компенсируя потери популяции.

Во время эструса самка спаривается с несколькими самцами. Беременность длится 22-24 дня; у кормящих самок может растянуться до 34 дней. Детёныши при рождении весят 4-6 г; они голые, слепые и с закрытыми слуховыми проходами. Самка очень заботливо относится к детёнышам, постоянно их вылизывает и поддерживает в гнезде чистоту. Молоко у неё очень питательное – в нём содержится более 8 % белков, 9 % жиров, 4 % лактозы. Часто несколько самок занимают одно выводковое гнездо и совместно занимаются потомством. Самцы в выращивании детёнышей не участвуют. Глаза у крысят открываются на 14-17 день. В 3-4 недели они становятся самостоятельными. Самки достигают половой зрелости в возрасте 3-4 месяцев, однако до 6 месяцев к размножению приступает только 1 % самок. 92 % самок остаются яловыми до годовалого возраста. Чем старше становятся самки, тем выше их плодовитость.

В природе пасюки живут до 3 лет, хотя 95 % особей редко доживает до 1,5 лет из-за высокой смертности молодняка, хищников и каннибализма. В естественных биотопах и агроценозах становятся добычей многих хищных млекопитающих и птиц; в постройках – домашних кошек и собак. Систематическое уничтожение крыс ведёт человек. В лаборатории при хорошем содержании серая крыса доживает до 3-4 лет.

Крыса черная (Rattus Rattus) родом из Южной Азии (Индии); широко распространена в странах Западной Европы, Северной Африки и Южной Азии. Встречается в южных районах России.

Длина тела у наиболее крупных представителей в среднем 19 см, длина хвоста 22,5 см, а вес около 200 г. Встречаются два подвида черной крысы: александрийская и среднеазиатская. Первый подвид распространен в городах Черноморского побережья; его представители по размерам несколько уступают среднеазиатским. Хвост густо покрыт волосами; обычно он

длиннее тела, до 28,8 см (133 % длины тела). Мордочка у неё уже, а ушные раковины больше и круглее, чем у пасюка. Для чёрных крыс Европы характерен естественный полиморфизм окраски меха; чаще всего встречаются 2 варианта окраски:

1) верх тела тёмно- или чёрно-коричневый с зеленоватым металлическим блеском остевых волос; на боках окраска светлеет; брюшная сторона пепельно- или грязно-серая;

2) окраска верха тела как у серой крысы, но обычно светлее и желтее; брюшная сторона беловатая, иногда желтоватая.

Образ жизни черной крысы

Этот теплолюбивый, по происхождению тропический вид на большей части ареала связан с жилищами человека, причём предпочитает приморские города и населённые пункты по берегам крупных рек. Природные биотопы в течение круглого года населяет только в условиях мягкого климата (включая Черноморское побережье Кавказа). В отличие от пасюка менее связан с водой, населяет леса, сады и заросли кустарников до 1500 м над уровнем моря (Закавказье). Временных переселений в природные биотопы как пасюк или домовая мышь не совершает.

Способность к активному расселению у черной крысы ниже, чем у серой. Обычно пассивно расселяется с помощью водного транспорта. Для чёрных крыс очень типично постоянное обитание на морских и речных кораблях; здесь она преобладает над пасюком, составляя не менее 75 % от общего числа корабельных крыс. На суда проникает как активно, по швартовым и трапам, так и пассивно – с грузами. В жилищах человека, в отличие от пасюка, придерживается верхних этажей, вплоть до чердачных помещений; таким образом, при совместном обитании эти виды разобщены территориально. Раньше, когда в деревнях крыши делали из соломы, чёрные крысы очень часто поселялись в них; отсюда одно из названий вида – кровельная крыса. Является естественным компонентом природных экосистем Кавказа и Крыма.

В природе черная крыса нор, как правило, не роет, а обитает в дуплах или устраивает на деревьях шарообразные гнёзда из веток, похожие на гнёзда сорок. Очень хорошо лазает, в природе

нередко ведёт полудревесный образ жизни, но плавает редко. Активна преимущественно ночью. Подобно серым крысам, чёрные крысы живут группами, в которые входят взрослые особи обоего пола и молодняк. Внутри группы устанавливаются иерархические отношения с доминированием одного самца. Две или три самки обычно доминируют над остальными членами группы за исключением старшего самца. Чёрные крысы менее агрессивны, чем пасюки; самки агрессивней самцов. В случае опасности они стараются скрыться от преследователя и лишь будучи пойманы пускают в ход зубы.

Питание черных крыс

В природе в питании чёрных крыс преобладают растительные корма (семена, орехи, плоды). Животная пища (беспозвоночные) играет небольшую роль. А на кораблях и в постройках человека питаются тем же, что и люди. В день одна крыса съедает 15 г пищи и выпивает 15 мл воды.

Размножение и продолжительность жизни черных крыс

Плодовитость чёрной крысы несколько ниже, чем у пасюка, что сказывается на её конкурентоспособности. Самки приносят не более 5 помётов в год; в природных стациях, даже в условиях тёплого климата, чёрные крысы зимой не размножаются, поэтому в природе число помётов ограничено 2-3. Величина выводка колеблется от 2 до 11 детёнышей, она выше у крыс, живущих в постройках. Пик размножения приходится на лето-осень; в октябре число беременных самок резко падает. Беременность длится 21-29 дней; новорожденные слепые и голые. Глаза у них открываются на 15-й день. Самостоятельными крысята становятся в 3-4 недели; половой зрелости достигают в 3-5 месяцев. Продолжительность жизни в природе – всего год, со смертностью 91-97 %. В неволе доживают до 4-х лет.

2. Линии животных и их характеристика

Развитие современной физиологии и её интеграция в клинику, фармакологию, патологическую физиологию и другие прикладные науки требуют высокой точности и воспроизводимости экспериментов за счет уменьшения влияния генетических различий между особями, и для этого в лабораториях используют чистые линии животных. Чистая линия – группа организмов, имеющих некоторые признаки, которые полностью передаются потомству в силу генетической однородности всех особей.

В 1909 году сотрудницей Вистаровского института (Пенсильвания, США) доктором Хелен Кинг была получена первая чистая линия крыс King Albino, которую затем переименовали в линию PA. Это были обычные альбиносы. На сегодняшний день в мире существует около 1 тыс. линий крыс и более 10 тыс. линий мышей, включая не только аутбредные и инбредные, но также трансгенные и нокаутные линии. Наиболее часто в биомедицинских исследованиях используют широко распространенные линии крыс Wistar и SD и мышей Balb/C и CD-1.

Существует несколько путей получения определенных линий лабораторных животных:

1. Аутбридинг – это метод разведения животных посредством скрещивания неродственных организмов, в том числе и принадлежащих к разным линиям/породам и даже видам. Потомков такого типа скрещивания называют гибридами, они превосходят по ряду признаков обе родительские формы. Основным следствием аутбридинга является скрытие рецессивных признаков за счет перехода их в гетерозиготное состояние. С другой стороны, при аутбридинге появляется возможность образования новых, зачастую неожиданных комбинаций генов, которые могут вызвать как лучшие, так и худшие сочетания признаков. В этом случае также нельзя предсказать возможность передачи этих сочетаний по наследству. Эти особенности аутбредных линий следует учитывать при проведении экспериментов и для воспроизводимости результатов использовать животных-гибридов только 1-го поколения (F1).

2. Инбридинг – близкородственное скрещивание. Инбредные животные гомозиготны и генетически однородны, что обеспечивает получение полноценных воспроизводимых результатов и возможность их повторения в любой лаборатории. Генетическая однородность позволяет расходовать меньшее число животных для получения доказательных результатов. В инбредных линиях генетическая однородность, или гомозиготность, животных сохраняется постоянным спариванием родных братьев и сестер в племенном ядре линии. Каждый инбредный штамм – это уникальное сочетание генетического материала, порождающее уникальный фенотип. Многие такие фенотипные черты полезны в исследованиях, некоторые позволяют вывести «модели» болезней, прочие дают полезные физиологические, анатомические или поведенческие характеристики, которые представляют одну из самых полезных инбредных черт.

3. Трансгенные животные. Трансгенные формы несут сегмент чужой ДНК, который введен в геном путем гомологичной рекомбинации, вставкой инфекционным агентом – ретровирусным вектором или негомологичной вставкой (микроинъекцией в пронуклеус).

4. Нокаутные животные. Нокаутные формы получают микроинъекцией генетически измененных эмбриональных стволовых клеток в бластоцисту хозяина. Разрушение, замещение или удвоение гена в стволовых клетках производят путем гомологичной рекомбинации между экзогенной ДНК и эндогенным геном (например, блокированием работы целевого гена встройкой гена резистентности к неомицину). На моделях трансгенных и «нокаутных» животных было показано, что развитие опухоли может быть результатом мутации в генах, играющих ключевую роль в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток.

5. Коизогенные животные. Коизогенными (или конгенными) называют генетически идентичные линии, различающиеся только по одному локусу. Истинная коизогенность возможна только в случае единичной мутации в инбредной линии. Изогенное состояние достигается путем введения гена одной линии на генетическую основу другой линии.

6. Рандомбредные животные. Неинбредные, нелинейные животные закрытых колоний размножаются по определенной, в большинстве случаев – ротационной системе, обеспечивающей рандомизацию скрещиваний. Каждая такая колония характеризуется определенными частотами генов и генотипов, животные гетерозиготны по неопределенному числу генов, и поэтому сама колония и каждая выборка из нее генетически гетерогенны. Животные этой категории фенотипически менее однородны, чем гибриды. Необходимым условием сохранения биологических особенностей нелинейных животных и воспроизводимости результатов экспериментов является поддержание гетерозиготности при сохранении стабильности генетической структуры колонии.

7. Стандартные животные. Животные из закрытых колоний, размножаемые по ротационной системе на протяжении не менее 4 поколений при потере гетерозиготности менее 1 % на поколение, принято считать стандартными.

Некоторые примеры использования чистых линий грызунов показаны в табл. 1.

Таблица 1. **Использование некоторых линий грызунов в биомедицинских исследованиях**

Примеры использования	Линии
<i>Крысы</i>	
Иммунодефицитные	Rowett, Fuzzy, Shorn
Инсулинрезистентные	BB/Wor
Онкогенные	Lewis
Грызуны с ожирением	Zucker
Трансгенные со специальными свойствами	Wistar GFP
Для изучения заболеваний сердечно-сосудистой системы и гипертонической болезни	SHR

<i>Мыши</i>	
Иммунодефицитные	nu, scid
Инсулинрезистентные	NOD
С повышенной способностью к регенерации	MRL
С повышенной способностью к обучению	Doogie
С увеличенной мышечной массой	Myostatin-knockout

Крысы линии Zucker – классическая модель для исследования ожирения, гипертонии, сахарного диабета II типа и нарушений функции сердца. У представителей этой линии существует рецессивная мутация *fa* (англ. *fatty* – жирный) в гене *Lep^r*, кодирующем рецептор гормона насыщения – лептина. Эта мутация приводит к замене аминокислоты глутамина на пролин в рецепторе. В результате в организме этих животных происходит синтез мутантного рецептора, который встраивается в мембрану клеток гипоталамуса, в результате чего лептин не может связаться со своим рецептором и в мозг не поступают сигналы насыщения. Интересно, что у крыс Zucker подавлено физиологическое состояние «бей или беги». Следовательно, их можно использовать для исследования заболеваний, вызванных нарушениями на уровне взаимодействия «гормон – рецептор».

Крыса Кавасаки (*shaking rat* Kawasaki, SRK) впервые была описана в 1988 году. Мутацией в гене, кодирующем белок рилин, обуславливает дрожание крысы. Этот белок отвечает за миграцию нервных стволовых клеток в период созревания плода, а также некоторое время после рождения. Во взрослом мозге рилин играет большую роль в формировании памяти. У крыс Кавасаки вследствие мутации понижен уровень рилина. Его недостаток приводит к нарушениям строения мозга, аномальному поведению и дрожащей походке. Грызуны с описанной мутацией являются хорошей моделью для изучения роли рилина в патогенезе различных пороков развития мозга из-за нарушения миграции нейронов. Так, уже показано, что шизофрения и аутизм связаны с недостатком рилина; болезнь Альцгеймера же, наоборот, сопровождается его избыт-

ком. Это позволяет уже на ранних стадиях развития предсказать будущие патологии человека и начать профилактику болезней.

Крыса RCS (от Royal College of Surgeons) – первое известное животное с наследственной дегенерацией сетчатки. Эта линия была выведена более шестидесяти лет назад в Королевском колледже хирургии в Эдинбурге. Впервые в 2000 году был установлен генетический дефект, вызывающий это заболевание. Ученым удалось выявить у крыс RCS мутацию в гене *Mertk*, в результате которой погибают фоторецепторы. Уже к трехмесячному возрасту животные абсолютно слепы.

Первой моделью для изучения болезней старческого возраста стали крысы линии OXYS, полученные в 1975 году в Институте цитологии и генетики СО РАН. Эти животные могут помочь исследовать механизмы развития сенильных болезней, разработать способы их профилактики и лечения и, вероятно, создать препараты, которые позволят продлить жизнь. К тому же крыс OXYS можно рассматривать как универсальную модель для исследования процесса старения глаза.

3. Лабораторные животные и правила их содержания

В научных исследованиях используется не менее 250 видов животных. Условно их делят на традиционные, т.е. наиболее часто используемые в экспериментах, и нетрадиционные, периодически используемые. К традиционным относятся: мыши, крысы, кролики, морские свинки, хомяки, кошки, собаки, обезьяны и пр. К нетрадиционным – песчанки, суслики, рыбы, опоссумы, броненосцы и т.д.

В настоящее время, во всём мире наиболее часто используемыми объектами в экспериментальной науке выступают мыши (преимущественно в Великобритании и США) и крысы. Предпочтение отдаётся этим животным потому, что они имеют небольшой размер, низкую стоимость на рынке, их легко содержать и разводить.

Для экспериментальных исследований в нашей стране в лабораториях используют белых крыс, которые являются альбиносами черной (*Rattus Rattus*) и серой (пасюк – *Rattus Norvegicus*). Успешное содержание и разведение лабораторных крыс зависит от хорошо устроенного помещения питомника и вивария. Виварий отличается от питомника тем, что в нем содержатся подопытные животные, а в питомнике животные разводятся. Помещение вивария должно быть открытым для прямых солнечных лучей, защищено от холодных ветров и не подтопляться дождевыми и талыми водами. Виварий должен быть удален от места скопления мусора. Благоустроенный виварий должен иметь следующие помещения:

- 1) основное для содержания подопытных животных;
- 2) карантинное помещение;
- 3) изолятор для больных животных;
- 4) помещение для дезинфекции клеток;
- 5) помещение для приготовления кормов, мойки посуды, кладовой и холодильника.

Общий объем вивария должен соответствовать норме: 3,5 м² на 15 крыс.

В виварии клетки устанавливаются на расстоянии 20-30 см от наружных стен и не менее 40 см от источников отопления; ширина проходов между клетками – не менее 1 м. Клетки для крыс следует размещать в 2-3 яруса таким образом, чтобы они были хорошо освещены. Ни в коем случае клетки не должны стоять на земле или на полу.

Для профилактики при входе в виварий и каждое его помещение должен находиться коврик из плотной мешковины, которую периодически смачивают 3-5 % раствором лизола или креолина. Коврик может быть и резиновым с рядом углублений, в которые заливается дезинфицирующий раствор. Рядом с ручком всегда должны находиться мыло и раствор для дезинфекции рук.

Необходимо постоянно проветривать помещение вивария. Наиболее благоприятной является влажность воздуха 30-50 % при температуре 18-20 градусов по Цельсию. В помещении нельзя создавать сквозняков. Естественная вентиляция допустима в небольших по площади вивариях, в больших – необходимо применять приточно-вытяжную вентиляцию.

Для согревания вивария рекомендуется центральное водяное отопление. При этом температура поверхности отопительного прибора не должна превышать 70 градусов по Цельсию, чем достигается более равномерное прогревание помещения и устраняется запах от сгорания пыли. Клетки с животными расставляются не ближе 40 см от отопительной системы.

Одним из главных условий успешного содержания и разведения крыс является правильная организация кормления. Перед раздачей кормов необходимо промывать кормушки горячей водой, а несколько раз в месяц их необходимо подвергать дезинфекции. Корм, не съеденный животными и убранный из кормушек, вновь скармливать не рекомендуется. Ингредиентами диеты для лабораторных млекопитающих являются зерна злаковых и бобовых растений, листва и трава, молоко и молочные продукты, семена масличных растений, мясо, кости, дрожжи, различные экстракты, витамины, минеральные соли и вода. При содержании крыс в виварии большое значение имеет обеспеченность пищи витаминами. При витаминном голодании развиваются различные нарушения жизнедеятельности организма, делающие крыс непригодными для

использования в экспериментах. Дача витаминных кормов особенно необходима самкам в период размножения, что обеспечивает нормальный рост и развитие потомства. Нельзя использовать недоброкачественные продукты при кормлении крыс. Также необходимо помнить, что в клетке всегда должна быть свежая вода. Корм нужно давать в достаточном количестве, т.к. крысы плохо переносят голодание, что может послужить причиной каннибализма.

Учреждения могут проводить работу на животных при соблюдении следующих условий:

1. Наличие вивария (экспериментально-биологической клиники), оборудованного в соответствии с санитарными требованиями;

2. Наличие экспериментальной операционной (лаборатории) с соответствующим оборудованием;

3. Наличие штата сотрудников, обеспечивающих уход за животными.

При планировании учебных занятий или научных экспериментов должны быть обоснованы вид используемых животных и необходимое для получения достоверных результатов количество.

4. Кормление лабораторных крыс

Лишение крыс возможности свободного передвижения снижает их обмен веществ и делает их более восприимчивыми к различным инфекциям. Поэтому одним из главных условий успешного содержания и разведения крыс является правильная организация кормления. Основным вопросом рационального питания лабораторных крыс является точное выяснение качественного и количественного состава пищи, в которой нуждаются лабораторные животные.

Потребности в питании различны в каждый период жизни животного. Быстрый рост, беременность, период грудного кормления, снижение температуры окружающей среды связаны с усиленным питанием животных.

Размножение столь плодовитых животных как крысы, связано с очень высокими требованиями к питанию. Например, рацион, удовлетворительный для поддержания здоровья, нормального роста и среднего уровня плодовитости, может оказаться неэффективным в условиях интенсивного размножения.

Ингредиентами диеты для лабораторных млекопитающих являются зерна злаковых и бобовых растений, листва и трава, молоко и молочные продукты, семена масличных растений, мясо, кости, дрожжи, различные экстракты, витамины, минеральные соли и вода.

Пшеница – лучший зерновой корм для крыс. Содержит белки, углеводы, витамины и небольшое количество кальция. Также полезны овес, ячмень, рожь, просо, а также семена подсолнечника (не жареные).

Крысы охотно поедают траву хорошего качества, салат, шпинат, листья капусты, зимой – зелень проросшего овса. Из овощей крысам можно давать измельченную свеклу, морковь и репу. Особенно полезна морковь.

Молоко для крыс является продуктом, содержащим полноценный белок, кальций, фосфор, витамины. В рацион крыс

можно вводить немного яичного порошка. Нельзя давать животным скисшее молоко.

Белый хлеб является не основным, а добавочным пищевым продуктом. Полезен хлеб, смоченный в молоке.

Мясо является источником белков и витаминов, поэтому также для крыс является полезным продуктом. Только давать его необходимо в вареном виде. Также можно кормить животных печенью, почками.

В небольшом количестве можно давать рыбий жир, т.к. он является источником витаминов А и D. Вместо рыбьего жира крыс можно поить томатным соком (0,3-0,5 мл на крысу).

Чтобы компенсировать недостаток минеральных веществ крысам дают поваренную соль, хлористый кальций, мел, древесный уголь и костную муку.

При содержании крыс в виварии большое значение имеет обеспеченность пищи витаминами. При витаминном голодании развиваются различные нарушения жизнедеятельности организма, делающие крыс непригодными для использования в экспериментах. Дача витаминных кормов особенно необходима самкам в период размножения, что обеспечивает нормальный рост и развитие потомства. Данные о составе суточного рациона крыс различного возраста и физиологического состояния приведены в табл. 2.

Таблица 2. Суточные кормовые нормы для крыс в граммах*

Наименование кормов	Взрослые крысы	Молодняк (40-130 г.)	Молодняк (130-240 г.)	Молодняк (240-350 г.)
Зерновая смесь	35	10	15	15
Хлеб пшеничный	12	2	4	6
Крупа овсяная	9	1,5	3	4,5
Комбикорм	10	-	-	-
Молоко	25	5	8	10
Мясо 2-ой категории	10	3	5	7
Сочные корма	20	5	10	10
Зелень	15	5	10	10

Рыбий жир	0,5	0,1	0,1	0,2
Рыбная мука	1	0,3	0,5	0,7
Дрожжи кормовые	0,5	0,1	0,2	0,3
Мука костная	0,5	0,1	0,2	0,3
Соль поваренная	0,3	0,1	0,2	0,2

* – нормативы, действующие по Приказу № 163 Минздрава СССР от 10.03. 1966 г. «О нормах кормления лабораторных животных» и принятые за основу при организации кормления лабораторных крыс, содержащихся в виварии кафедры физиологии человека и животных Самарского университета.

Нельзя использовать недоброкачественные продукты при кормлении крыс. Также необходимо помнить, что в клетке всегда должна быть свежая вода. Лучше использовать nipple-поилки, их нельзя разлить, они более гигиеничны. Когда вы убедитесь, что животное научилось ей пользоваться, миску с водой можно убрать. Вода должна быть чистой и свежей, рекомендуется пользоваться кипяченой водой. Количество потребляемой крысами воды зависит от количества влаги, которая содержится в кормах. Питание сухими кормами резко повышает потребность в воде.

Корм нужно давать в достаточном количестве, т.к. крысы плохо переносят голодание, что может послужить причиной каннибализма. Кормят крыс обычно два раза в сутки. Ввиду того, что крысы – ночные животные, основную часть корма нужно давать вечером, примерно к 20-ти часам. В период разведения крысы должны получать пищу 3-4 раза в день. Молодым животным пищу можно давать до 5-ти раз за сутки. Не рекомендуется резко менять пищевой режим, к новой пище нужно переходить постепенно. Количество пищи, поедаемое крысой, зависит от веса тела и от калорийности корма. При клеточном содержании крысы весом от 150 до 400 граммов съедают в сутки от 25 до 75 граммов пшеничного хлеба; в единичных случаях крупные экземпляры съедают в сутки до 100 грамм хлеба.

Некоторые продукты крысы очень любят, но кормить ими животных можно иногда, т.к. большинство обожаемых крысами продуктов содержат жиры или приводят к заболеваниям желудочно-кишечного тракта. Это колбаса (содержит вредные для крыс соль и жир), тыквенные семечки (содержат жир; можно давать не больше 15 штук в неделю одному животному), подсолнечные семечки (содержат жир; можно давать не больше 15 штук в неделю), сыр (содержит жир и соль; чрезмерное потребление способствует ожирению; можно давать раз в 2-3 дня), сметана (содержит жир; можно давать 1-2 раза в неделю), ветчина, яйца (раз в неделю).

Расстройство здоровья вследствие неправильного питания может быть вызвано общей количественной недостаточностью корма, а также с недостаточностью или избытком в нем определенных ингредиентов. Количественная недостаточность питания влечет задержку роста молодых животных, потерю веса взрослыми и понижение сопротивляемости к заболеваниям. Недостаточное питание приводит к нарушению равновесия между основными его ингредиентами (белками, углеводами, жирами, клетчаткой) с недостаточным или избыточным содержанием витаминов и минеральных веществ. Однако следствием неполноценного кормления не обязательно является смерть или серьезное заболевание. Необязательно также и раннее проявление указанных последствий. Например, недостаточность в диете витамина Е может не обнаружиться в течение двух-трех поколений и лишь впоследствии неблагоприятно отразится на плодовитости животных. Избыток углеводов при относительной недостаточности белков приводит животных к ожирению, которое может также понизить их плодовитость. Следовательно, необходимо применять более точные методы оценки рациона питания крыс.

Места для хранения пищи для животных необходимо оборудовать определенным образом, для того, чтобы пища не контактировала с землей, к ней не проникали другие животные и мухи, которые являются переносчиками кишечных инфекций. Перед раздачей животным пищи необходимо промывать кормушки горячей водой. Корм, не съеденный животными и убранный из клеток, вновь скармливать не следует.

5. Разведение лабораторных крыс

Половое созревание крыс

Половые отличия у крыс внешне хорошо выражены. Самцы крупнее самок и туловище их развито своеобразно: передняя часть сильнее задней (особенно заметно сверху). У самок более грациозное телосложение: голова легкая, костяк тонкий, задняя часть туловища шире передней. У самок расстояние между половым органом и заднепроходным отверстием значительно короче, чем у самцов. У самок, особенно кормящих, хорошо заметны соски.

Половая охота (течка) у самок выражается в покраснении и опухании наружных половых органов. В таком состоянии самки очень подвижны и быстро идут на контакт с самцами.

Половой цикл зрелой самки белой крысы периодически совершается каждые 5 дней. Он состоит из 4-х стадий, которые хорошо различаются по влагалищным мазкам:

1. *Стадия покоя (dioestrus)* продолжается около 57 часов и характеризуется содержанием во влагалище слизи с лейкоцитами и незначительным количеством эпителиальных клеток.

2. *Переходная стадия (prooestrus)* продолжается в среднем 12 часов, во влагалищных мазках имеется множество эпителиальных клеток; лейкоцитов и слизи нет.

3. *Стадия течки (oestrus)*, длящаяся около 27 часов, характеризуется содержанием во влагалище чешуек.

4. *Стадия восстановления (metaoestrus)* продолжается около 6 часов. В мазках отмечается исчезновение чешуек и появление зернистых клеток и лейкоцитов.

Покрытие самки самцом возможно только в стадии prooestrus и первой половины стадии oestrus, когда самка находится в возбужденном состоянии. Во время других стадий полового цикла самка не допускает самцов.

Оплодотворение самки можно установить или при помощи микроскопического метода по присутствию сперматозоидов во влагалищном мазке, или путем осмотра по наличию во влагалище

пробки из секрета половых желез самца. В этом случае половой цикл у самки нарушается до конца беременности.

Половая охота у крыс отмечается уже в двухмесячном возрасте. В этом возрасте они уже способны к оплодотворению, но пускать их в случку еще не рекомендуется, т.к. преждевременная беременность отрицательно сказывается на дальнейшем развитии организма самок, количестве и качестве потомства. Самцы, пускаемые в случку в раннем возрасте, плохо оплодотворяют самок, при этом молодняк рождается довольно слабым.

При проведении работ по разведению лабораторных крыс следует самое пристальное внимание обращать на состояние здоровья. Внешним, весьма информативным показателем самочувствия животных является их экстерьер.

При формировании нового племенного стада или при пополнении уже имеющегося путем оставления отборного молодняка необходимо учитывать, что только животные крепкого телосложения могут обладать должной сопротивляемостью к различным заболеваниям. На племя следует выбирать крыс из летних выводков, являющихся наиболее сильными и здоровыми производителями. Крысы должны быть с крепким костяком, хорошим телосложением, относительно длинной грудной клеткой, большими открытыми глазами. Самки должны иметь длинные, ясно выраженные соски и среднюю упитанность (тело с округленными линиями; кости глубоко скрыты под мышцами и эластичной тугой подвижной кожей; блестящий шерстный покров, плотно прилегающий к телу). Хвост – толстый, недлинный, с хорошо заметными кровеносными сосудами. Животные подвижные, энергичные, быстро реагирующие на внешние раздражители.

При отборе животных на разведение нужно обращать внимание на определенные кондиции, которые обусловлены особенностями кормления, содержания и ухода. Выделяют 2 кондиции грызунов:

1) *племенная кондиция* характеризуется наилучшим развитием костяка и мускулатуры при отсутствии ожирения. Крысы достаточно упитаны, хорошо развиты, энергичны и подвижны;

2) *порочная кондиция* подразделяется на голодную и ожиревшую. Голодная кондиция является результатом временного или хронического недоедания. Недостаточность питания вызывает

недоразвитость организма, что проявляется в замедленном росте, отсутствии пропорциональности между отдельными частями тела (большеголовость, узкогрудость, отвислый и раздутый живот и т.д.). Способность к размножению у таких животных заметно понижена или вовсе утрачена. Наоборот, избыточность питания грызунов приводит к их ожирению. Такие животные флегматичны, характеризуются пониженной способностью к размножению.

Способы разведения лабораторных крыс

Выделяют несколько способов разведения лабораторных животных.

1. *Чистое разведение* – наиболее распространенный способ разведения в племенных питомниках. Правильное применение данного способа повышает плодовитость крыс, скорость взросления и другие полезные для экспериментаторов признаки. Однако при длительном применении такого способа разведения плодовитость животных может резко снизиться. Во избежание этого применяют освежение крови, т.е. подсаживают к крысам неродственных для данного маточного стада самцов из другого питомника. Новые крысы-самцы обязательно должны подвергаться карантину. Рекомендуется приобретать их в раннем возрасте, до наступления половой зрелости. Как правило, потомство, полученное в течение ряда поколений от такого спаривания, оказывается значительно более крепким и плодовитым. При последующем ухудшении племенных качеств вновь прибегают к методу освежения крови.

2. *Родственное разведение* применяют осторожно, т.к. наряду с закреплением наследственно-полезных признаков оно часто приводит к вырождению потомства (уменьшаются ростовые и половые качества, понижается иммунная реактивность и т.д.).

Родственное разведение рекомендуется применять только на ограниченной группе животных при тщательном ведении племенных записей.

Нередко в практике разведения крыс бывают случаи, когда молодняк полностью не отсаживается от родителей. В дальнейшем это ведет к крайне нежелательным последствиям в результате близкородственного скрещивания. При этом снижается плодовитость и увеличивается процент рождаемости слабого молодняка, легко подвергающегося различного рода заболеваниям.

3. *Линейное разведение* – наиболее действенный метод получения высококачественных животных. При его проведении в стаде выделяются ценные производители (самцы и самки), которые становятся основателями своей линии крыс. Для закрепления в потомстве их качеств применяют внутрисемейное скрещивание. Каждая линия – это достаточно многочисленная группа животных, происходящая от одних и тех же родителей и обладающая признаками, ради которых животные данной линии были выделены и размножены. При понижении плодовитости и появлении признаков вырождения применяют межлинейное скрещивание. В этом случае спаривают животных из двух тождественных, но не родственных линий.

Линейное разведение должно сопровождаться тщательным индивидуальным отбором животных и ведением племенных записей.

Отбор животных на племя

Для улучшения племенных качеств у крыс необходимо их оценивать по совокупности признаков (конституции, здоровью, развитию организма, производительности). Степень развития (класс) животных определяется по их живому весу (табл. 3). Животные, не соответствующие первому и второму классу, бракуются.

Таблица 3. Распределение крыс по классам в зависимости от их живого веса, г

Класс животных	Зимний окот		Летний окот	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
<i>Молодняк в возрасте 1 месяца</i>				
Первый	50,6	49,2	57,0	55,5
Второй	46,3	45,6	47,7	44,3
Третий	40,9	36,1	45,8	41,9
<i>Взрослые крысы в возрасте 4 месяцев</i>				
Первый	264,3	212,8	284,0	218,4
Второй	236,5	182,6	262,3	213,2
Третий	171,6	143,5	231,0	170,6

Оценка производительности крыс-самок делается по первому и второму окотам. При наличии в двух окотах высокого уровня плодовитости молодняк пригоден на племя. Рекомендуется отбирать на племя молодняк из второго и четвертого окотов.

К первому классу относятся самки, приносящие в каждом помете 8-10 крысят и воспитавшие их до отсадки в состоянии нормальной упитанности и с соответствующим живым весом. Ко второму классу принадлежат самки, приносящие в каждом помете 5-7 крысят и воспитавшие их до отсадки нормально упитанными.

Воспроизводительная способность самцов является их главным качеством и характеризуется плодовитостью самок данного семейства. Выбраковываются самцы, плохо оплодотворяющие самок и вызывающие большой процент их прохолостания. Кроме того, бракуются самки и самцы, у которых понижается работоспособность вследствие старости. Подлежат выбраковке самки, регулярно приносящие мертворожденных детенышей или поедающие свое потомство, а также маломолочные.

С увеличением возраста плодовитость самок понижается (табл. 4).

Таблица 4. Влияние возраста самок-крыс на их плодовитость

	Окоты							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Число крысят в помете	4-6	5-7	6-8	6-9	5-7	4-6	3-5	2-3

При отсутствии племенных записей возраст крыс можно определить по внешним признакам. Старые животные имеют желтоватый налет на зубах, характеризуются низкой упитанностью, мутными глазами, редким шерстным покровом желтого цвета, безволосым брюхом и др. Крысы прекращают размножаться в возрасте 15-17 месяцев при продолжительности жизни около 2,5 лет.

Племенное стадо желательно сортировать по возрасту: в одних клетках содержать племенной молодняк, в других – животных в порядке очередности окота.

Подготовка к случной кампании

Перед случкой производится тщательный осмотр животных. Истощенные и ожиревшие, а также животные с различными заболеваниями (в частности, с заболеванием половых органов) к случке не допускаются. Предназначенные к случке животные должны иметь среднюю упитанность и получать особый пищевой рацион. Рекомендуется в этот период в рацион крыс вводить витамин Е, который содержится в зеленых растениях и особенно в пророщенных зернах пшеницы, ячменя и овса. Увеличивается количество животного и растительного белка в пище. Для проведения случки необходимо подготовить чистые продезинфицированные клетки.

В случку допускаются здоровые животные и в первую очередь достигшие четырехмесячного возраста. В этот период вес самцов составляет 230-280 г, а самок – 180-220 г.

Способы и техника случки

Для широкомасштабного разведения крысы пускаются в произвольную случку: четырех самок и одного самца помещают в одну общую клетку и оставляют на весь период размножения. При племенном способе разведения в одну клетку сажают одну самку и одного самца. Самки и самцы должны быть одного возраста и одного класса. Если самца подсаживают в клетку, в которой до этого в течение некоторого времени находились самки, то они нападают на самца. Ту же картину можно наблюдать, если к самцу в клетку подсаживаются самки. С целью избегания проявлений агрессивности крыс рекомендуется сажать в клетку одновременно.

Если необходимо удалить из клетки самца (например, при его заболевании), а у некоторых самок в этот момент имеются детеныши в подсосном возрасте, то с посадкой в клетку нового самца следует повременить (до подрастания крысят). При необходимой выбраковке самок после очередного осмотра не следует подсаживать в клетку молодых самок к старым, а лучше соединить животных одинакового возраста из соседних клеток.

Рекомендуется тщательно осматривать клетки, т.к. в период случки крысы часто прогрызают клетки и убегают. С целью предоставления отдыха самкам самцы отсаживаются на 10-15 дней в индивидуальные клетки. После восстановления здоровья и под-

растания молодняка самцы могут быть опять пущены в общую клетку.

Не рекомендуется увеличивать число самок в случной клетке, т.к. самец слишком быстро расходует силы и оказывается неспособным оплодотворить всех самок. Нельзя одновременно допускать в клетку двух самцов, т.к. между ними могут происходить агрессивные столкновения, приводящие к гибели более слабого самца.

Нужно помнить, что крысы более интенсивно размножаются в летний период.

Беременность и подготовка к окоту

Беременность у крыс продолжается 16-22 дня. При содержании в клетке четырех самок и одного самца оплодотворение происходит у разных самок с разницей 1-3 дня. Беременность можно определить только за несколько дней до окота по увеличению живота, набуханию сосков и прекращению очередной течки.

К этому времени животных необходимо поместить в чистые продезинфицированные клетки с подстилкой из сена или мелких стружек. Беременные самки за 2-3 дня до окота сооружают гнездо. Необходимо, чтобы в этот период в клетке всегда было пойло: лучше молоко или, в крайнем случае, кипяченая вода. При селекционно-племенном разведении каждую беременную самку пересаживают в отдельную маленькую клетку. Это делается для того, чтобы точно знать происхождение потомства. При широкомасштабном разведении самки постоянно содержатся в одних и тех же клетках (четыре самки и один самец).

Причины поедания новорожденных и способы их устранения

Наиболее сложным этапом разведения крыс является период лактации до того времени, когда крысята переходят на самостоятельное питание. У крыс, как и у некоторых других животных, нередко наблюдаются случаи поедания самками своих детенышей. Чаще всего это бывает у первородящих самок, значительно реже – у старых животных. Нередки случаи поедания новорожденных чужими особями. В большинстве случаев самки поедают детенышей сразу же после окота, а иногда спустя несколько дней.

Поедание молодыми самками новорожденных сразу после окота вероятно связано с тем, что они по причине недостаточно развитого материнского инстинкта принимают детенышей за послед. Другая причина может заключаться в стремлении утолить сильное чувство жажды, которое толкает самок на усиленное облизывание детенышей, а иногда и на их съедание.

Причиной поедания детенышей самками через несколько дней после родов является та боль, которую причиняют острые зубы детенышей при сосании молока. При повторном поедании своего потомства самок следует выбраковывать из племенного стада.

Самец, находящийся в одной клетке с родившими самками, также может поедать новорожденных крысят. Обычно самки не допускают самца в гнездо с крысятами. Когда же самки выходят из гнезда, самец может напасть на крысят.

Имеется мнение, согласно которому причиной поедания потомства может являться белковое голодание самок. Другой причиной может выступать низкая молочность у первородящих и стареющих самок.

В первые дни после рождения крысы кормят детенышей через 40-50 минут. Поэтому огромное значение приобретает правильное кормление лактирующих самок. Во-первых, необходимо, чтобы в период лактации у крыс была организована ночная дача корма. Во-вторых, важно включать в рацион богатые белком корма. С этой целью в пищевой рацион вводится зерновой корм, а также коровье или козье молоко с куриными яйцами (3 яйца на 1 л молока с добавлением 100 г сахара). Полезно давать самкам в период вскармливания потомства мягкий корм (каши, белый хлеб и т.д.). Летом необходимо включать в рацион витаминные корма в виде трав, а в остальное время года – рыбий жир, пророщенный овес, натертую морковь с подсолнечным маслом и т.д.

Содержание многоплодных пометов

Окот у крыс чаще всего происходит в ночное время суток, реже утром и днем. В норме окот продолжается около 20-35 минут. Крысята рождаются голыми, слепыми, со слипшимися ушками; сразу после рождения они малоподвижны. Температура их зависит от степени согревания самкой. Уши у крыс открываются

через 2-3 дня; через 8-10 дней прорезаются резцы, и крысята начинают обрастать шерстью; глаза открываются на 14-17 день.

При первом осмотре гнезда в день окота следует установить число новорожденных крысят, удалить мертвых и имеющих пороки развития. В случае отсутствия гнезда построить его. Осмотр следует проводить очень осторожно, особенно у первородящих самок. В этом случае лучше повременить с осмотром 2-3 дня, т.к. очень часто после него самка поедает новорожденных. Пересчитывая крысят, не следует прикасаться к ним рукой. Перед осмотром необходимо тщательно вымыть руки. После каждой осмотренной клетки руки необходимо дезинфицировать.

После каждого осмотра следует сделать соответствующие записи в племенной журнал, указав дату окота и число родившихся крысят. Если в клетке находится несколько самок, то мать определяют по набухшим и оголенным соскам.

Часто рождаются многоплодные пометы, в которых число крысят превышает количество сосков у самки. Для сохранения молодняка в этих случаях необходимо уравнивать пометы. Если, например, в одном гнезде у 4 самок оказывается только 10 детенышей, а в другом при том же количестве самок – 34, то часть новорожденных нужно осторожно переложить из второго гнезда в первое. При перекладывании самок следует удалить из клетки. Перекладываемых крысят тщательно очистить от старой подстилки, а в новом гнезде подстилку заменить на новую. Перекладывание молодняка следует проводить до пятидневного возраста, т.к. в более поздние сроки самки обычно уничтожают новых крысят.

Способность самки к вскармливанию зависит от ее молочности, которая определяется по внешнему виду ее детенышей. Если они получают достаточное питание, то выглядят упитанными, имеют округлую форму тела и блестящую кожу; желудки, просвечивающие через покровы тела, наполнены. Крысята спокойно лежат в гнезде. К таким самкам, если у них небольшое число детенышей, можно подсадить других. Если крысята расползаются по клетке, имеют сморщенную, матовую без блеска кожу и пустые желудки, то это говорит о малой молочности самки. В таких случаях следует переложить ее детенышей в гнездо более молочных самок.

По способности вскармливать молодняк самки крыс подразделяются на три группы (табл. 5).

Таблица 5. Распределение самок крыс по степени молочности

Группа	Число вскармливаемых крысят
Первая - <i>высокомолочная</i>	8-10 и более
Вторая - <i>среднемолочная</i>	5-7
Третья - <i>низкомолочная</i>	3-4

Выращивание отсаженного молодняка

От матери крысят отсаживают в возрасте 30 дней при весе 45-48 г. Пересаживать молодняк желательно в утренние часы. В одну клетку помещают 8-10 крысят, сортированных по полу и классу.

Молодняк требует к себе самого пристального внимания. Успех выращивания будет зависеть от качества ухода и питания. В первый месяц после отсадки необходимо обеспечить молодняк полноценным кормом с обязательным включением в рацион концентрированных кормов в дробленном виде, мягкого корма (разнообразные каши, хлеб) с добавлением витаминов и минеральной подкормки (кусковый мел, костная мука). Кормление производится не менее 4-х раз в сутки. Летом полезно давать крысятам зеленый корм в виде листьев одуванчиков, салата и шпината. Рекомендуются также зеленая трава.

Животных, у которых заподозрено заболевание, удаляют на карантин; больных – в изолятор.

6. Биометрические показатели крыс

Биометрия (*греч. bios – жизнь и metreo – измеряю*) – раздел биологии, включающий совокупность методов и приемов математической статистики, предназначенных для планирования и обработки биологических экспериментов и наблюдений. Использование биометрии в планировании экспериментов позволяет резко сократить их объем для получения того же количества информации. При проведении биологических экспериментов и наблюдений исследователь всегда имеет дело с количественными вариациями частоты встречаемости или степени проявления различных признаков и свойств.

Таблица 6. Биологические характеристики некоторых линий мышей и крыс

Параметр	Мыши		Крысы			
	Balb/c	C57Bl/6	Wistar	Wistar-Kyoto	Sprague Dawley	SHR
Возраст первого ссаживания (самцы), недели	8-10	8-10	10-12	10	10-12	10
Возраст первого ссаживания (самки), недели	8-10	8-10	8-10	8	8-10	8
Соотношение полов при ссаживании	1:1/1: 2	1:1/1: 2	1:1	1:1	1:1	1:1
Продолжительность эстрального цикла, дни	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5
Продолжительность беременности, дни	19-21	19-21	21-23	19-21	21-24	21-23

Средний размер помета (1-ый), голов	5	6	11	6	11	4
Средний размер помета (2-ой), голов	6	7	12	10	12	8
Вес при рождении (г)	1-2	1-2	5-7	6-8	5-7	6-8
Вес при отъеме (самцы), г	8-12	9-13	40-50	40-60	40-60	35-45
Вес при отъеме (самки), г	7-11	9-13	35-50	35-55	35-60	30-40
Возраст при отъеме, дни	21	28	21	21	21	21
Среднее ежедневное потребление пищи (8 недель возраст), г	5		5		5 на 100 г массы тела	
Среднее ежедневное потребление воды (8 недель возраст), мл	6-7	6-7	8-11	6-7	8-11	8-11
Возраст выведения из разведения (самцы), мес.	8-12	7-9	9-12	8-12	9-12	9-12
Возраст выведения из разведения (самки), мес.	8-12	7-9	9-12	8-12	9-12	9-12

Следует отметить, что в настоящее время увеличиваются объемы экспериментальных исследований на животных, при этом возрастают требования к подобным научным работам. Не указывать в научных работах возраст животных означает сознательно ставить под сомнение достоверность выводов проведенной работы и лишать возможности сопоставлять факты, полученные в разных лабораториях. Весьма часто одни и те же воздействия (физиологические, фармакологические, патологические) у животных различных возрастных групп вызывают не только количественно, но и качественно разные реакции.

Разработка возрастной периодизации лабораторных животных весьма сложна из-за отсутствия четких критериев для оценки возраста. Например, масса животных и длина их туловища

лишь приближенно могут служить показателями возраста, поскольку они зависят от особенностей содержания и кормления. В связи с этим вынужденным и неизбежным является допущение ряда условных характеристик, сроков и признаков.

В основу наиболее распространенной периодизации взяты анатомо-физиологические особенности животных, интенсивность их роста, поведенческие реакции, изменения в половой сфере и др.

Примерные характеристики каждого периода и возраста:

1. Период молочного кормления. Животные находятся в гнезде и кормятся молоком матери. Дистантные рецепторы не функционируют или функционируют недостаточным образом. Появляется шерстный покров. Прорезываются молочные зубы. Интенсивный рост. Средний ежедневный прирост: массы тела – 5-15 %; длины тела – 2-8 %.

а) Возраст новорожденный (новорожденные животные). Шерстный покров отсутствует. Кормятся животные молозивом. У крыс, мышей зубы отсутствуют. Морские свинки рождаются с шерстным покровом, имеют все зубы, хорошо передвигаются, дистантные рецепторы функционируют.

б) Возраст подсосный (сосуны). Появляются пигментация кожи и шерстный покров. Отлипают уши, открываются глаза. Начинают функционировать дистантные рецепторы. Реализуется поза стояния. Животные передвигаются по гнезду. У самок появляются грудные соски.

2. Период полового созревания. Самостоятельное кормление. Животные оставляют гнездо, их отсаживают от матери. Хорошо развиты двигательные акты. Хорошо выражены вторичные половые признаки. Молочные зубы сменяются постоянными. Интенсивный линейный рост. Шерстный покров густой, глянцевого цвета. Глаза блестят.

Средний ежедневный прирост: массы тела – 1-10 %, длины тела – 0,5-2 %.

а) Возраст не половозрелый (инфантильные животные). Животные не требуют ухода матери. Совершенствуются двигательные акты. Намечается дифференциация вторичных половых признаков (самцы крупнее самок). У части самок открывается вагина, а у самцов происходит опускание семенников в мошонку.

б) Возраст предслучный (ювенильные животные). Хорошо выражены вторичные половые признаки: у самок открыто влагалище, у самцов завершено опускание семенников в мошонку. Появляется половая охота.

3. Период репродуктивный. Завершено развитие половых органов, дифференцированы вторичные половые признаки. У самок установились половые циклы. Интенсивное размножение. Значительно снижен линейный рост. Животные физически крепки. Шерстный покров густой, глянцевого цвета. Средний ежедневный прирост: массы тела 0,15-1,5 %, длины тела – 0,01-0,15 %.

а) Возраст молодой (молодые животные). Животные допускаются в случку. Размножение интенсивное. Приплод многочислен. Зубы белые без признаков стирания.

б) Возраст зрелый (взрослые животные). Интенсивность размножения снижается. Зубы белые без налета, на них отмечаются первые признаки стирания.

4. Период выраженных старческих изменений. Резкое снижение или прекращение половой охоты и репродуктивной функции. Наступление менопаузы. Рост тела значительно замедлен или прекращен. Двигательная активность снижена. Поверхность зубов стертая. Шерстный покров редкий, без глянца, неплотно прилегает к телу. Выражена атрофия мышц и кожи. Возникают спонтанные опухоли. Отмечаются значительная гипофункция внутренних органов, ослабление адаптации и процессов метаболизма.

Средний ежедневный прирост массы тела 0,01-0,2 %, длины тела 0,001-0,005 %.

а) Возраст предстарческий (предстарые животные). Значительно снижается размножение. Приплод малый и часто нежизнеспособный. У самок нарушается регулярность течки.

б) Возраст старческий (старые животные). Размножение резко снижено или полностью прекращается. У большинства самок наступает менопауза. Шерстный покров редкий, облыселый. На зубах коричневый налет, их режущие поверхности стертые. Когти длинные, искривленные.

в) Возраст предельно старческий (предельно старые животные). Половая функция прекращена. Значительное

облысение. Вес тела снижается. Отмечается общее одряхление организма.

Ниже представлен вес различных лабораторных животных по отдельным возрастным группам. Эти показатели составлены на основе многолетнего их изучения различных лабораторий и на основании данных ведущих мировых питомников.

Таблица 7. Крысы беспородные (г, М±m)

Возраст, недели	Самцы	Самки
1-2	24±0,7	22±1
2-3	56±4	54±3
3-4	73±2	70±2
4-5	130±3	113±3
5-6	163±2	158±3
6-7	178±4	164±3
7-8	213±3	181±3
8-9	256±6	206±2
9-10	292±4	249±3
10-11	326±7	254±4
11-12	367±6	258±4
12-13	391±5	267±6
14-15	417±4	269±5
16-17	433±8	274±4
18-19	437±9	281±9
20-21	443±9	284±8
22-23	446±10	288±7
24-25	453±11	294±6
26-27	458±12	302±11
28-29	464±18	304±9
30-31	468±14	311±12
32-33	472±15	314±8

Окончание табл. 7

34-35	478±16	320±17
36-37	484±11	324±11
38-39	488±12	330±10
40-41	494±20	334±9
42-46	498±19	343±14
47-48	503±18	344±16
49-50	505±25	349±11
51-52	508±23	353±17

Таблица 8. Крысы линии Wistar (г)

Возраст, недели	Самцы	Самки
3	55,3	58,1
4	95,5	97,4
5	138,0	139,0
6	184,9	174,6
7	240,3	196,7
8	268,9	217,8
9	301,5	241,2
10	336,1	255,7
11	370,7	269,6
12	389,0	282,4
13	418,9	295,8
14	432,9	305,0

7. Характеристика некоторых показателей гомеостаза

Основным компонентом внутренней среды организма является кровь. Поддержание ее показателей на относительно стабильном уровне (явление гомеостаза) является непременным условием должного количества и качества здоровья лабораторных животных. Отметим некоторые аспекты, связанные с физиологией системы крови крыс.

Забор цельной крови и ее исследование

Клеточный состав периферической крови зависит от особенностей содержания и кормления животных, их видовой и половой принадлежности, времени суток, сезонности, температурного и светового режима, других составляющих и может различаться в разных экспериментах. Снижение до минимума разбросов результатов из-за вероятных ошибок возможно лишь при строгой стандартизации всех этапов отбора материала и пробоподготовки с соблюдением стандартных операционных процедур. Для корректного проведения гематологических и биохимических исследований важна техника забора биологического материала. Определяющими особенностями взятия биопроб у таких лабораторных животных как крысы являются ограниченный объем пробы, возможность загрязнения биоматериала элементами шерсти и необходимость ограничения подвижности животных за счет их жесткой фиксации. Из-за стрессовых воздействий и компенсаторных реакций, связанных с отбором крови, возможны искажения лейкоцитарной формулы и биохимических параметров крови. В случае периодического отбора проб объем крови следует корректировать в меньшую сторону. В ходе эвтаназии возможен отбор около 50 % общего объема крови животного, что используется только в случаях, когда нетерминальные методы отбора не позволяют собрать необходимое для клинико-лабораторного метода исследования количество биоматериала. Следует учитывать, что объем полученной плазмы или сыворотки будет составлять при-

мерно половину от взятого объема цельной крови. Отбор крови у грызунов из орбитального венозного синуса для опытных исследователей не составляет труда. Одним из его существенных недостатков является тот факт, что процедура приводит к небольшому повреждению ткани и, как следствие, к высвобождению тканевого тромбопластина, результатом чего является искажение результатов коагуляционного исследования.

Забор крови из яремной вены у крыс может выполняться с или без анестезии. Его преимуществом по сравнению с методикой отбора из орбитального синуса является отсутствие физического повреждения тканей. Однако само применение анестезии далеко не всегда желательно и/или требует постановки дополнительных контрольных экспериментов. Образцы крови можно также получить из хвостовой вены грызунов путем ампутации кончика хвоста или венепункции. Первая процедура с очевидными последствиями может привести к несколько разбавленным образцам крови, загрязненным тканевыми жидкостями. Для предотвращения загрязнения первые две-три капли удаляются из пробы. Недостаток венепункции – травмирование эндотелия сосудов иглой и, как следствие, ускоренное тромбообразование и склеивание стенок вен. Пункция сердца успешно используется некоторыми исследователями для сбора образцов крови, однако связанные с этим риски, включающие утечку крови в перикардиальный мешок, как правило, перевешивают любое потенциальное преимущество этого метода перед другими, более приемлемыми процедурами. Эмоциональный и болевой стресс во время манипуляций с лабораторными животными может также послужить причиной искажения результатов, поэтому для минимизации беспокойства животных к работе должен быть допущен персонал, прошедший специальную подготовку по надлежащему обращению с ними. В некоторых случаях хорошим решением может стать относительно безопасная ингаляционная анестезия смесью, состоящей из диоксида углерода (70 %) и кислорода (30 %). В случае особой необходимости допускается использование неингаляционных анестезирующих средств (кетамин, ксилазин, смесь ксилазала с золетилом и др.). Однако большинство из них являются индукторами микросомальных ферментов, что может повлиять на биофармацию изучаемого вещества с непредсказуемыми последствиями. При должном навыке

для сведения к минимуму дискомфорта животных часто используют различные способы фиксации с помощью подобранных по размеру рестрейнеров. Популярность приобретает использование для забора крови вакуумных пробирок с антикоагулянтами, соответствующими последующим задачам. Это хорошо стандартизует процедуру, но практически неприменимо у мелких грызунов. При использовании современного оборудования объем сыворотки/плазмы, необходимый при рутинных анализах крови, составляет не менее 5-30 мкл на один показатель, а для измерения 10 основных биохимических параметров обычно требуется около 400-500 мкл сыворотки/плазмы. Кроме того, для дифференциальной оценки лейкоцитов и количества ретикулоцитов требуется дополнительно около 50 мкл для приготовления и анализа мазков крови, окрашенных соответствующим образом. Для этого, в свою очередь, суммарно требуется 1,0-1,2 мл цельной крови, но с учетом возможного повторного анализа, плохого выхода сыворотки и т. д. обычно отбирают 1,5-1,8 мл крови для проведения типичного набора гематологических и биохимических тестов, исключая коагулологические исследования и анализ на метгемоглобин. Цельная кровь имеет высокую вязкость и потому трудно перемешивается. Перед началом гематологического измерения пробирку с кровью необходимо осторожно вращать и переворачивать не менее 10 раз для равномерного распределения элементов крови, предотвращения адгезии и повреждения клеток. Анализ пробы желательно проводить в ближайшие 5-10 мин после взятия пробы. Позднее наблюдается снижение большинства показателей, что может привести к искажению результатов эксперимента. При работе на автоматических гематоанализаторах предпочтительно использовать программу «Разбавление пробы», что позволяет избежать сбоев в работе из-за повышенной свертываемости крови, например, у крыс, или в результате фармакологического эффекта. Дополнительные гематологические анализы, которые могут потребоваться для доклинических токсикологических исследований специфических лекарственных кандидатов, включают определение метгемоглобина, карбоксигемоглобина, фибриногена, протромбинового времени (PT) и активированного частичного тромбопластинового времени (APTT). Первые два показателя могут быть измерены с помощью оксиметра. Поскольку метгемоглобин, окисленная фор-

ма гемоглобина, нестабилен, так как фермент метгемоглобинредуктаза крови восстанавливает его обратно до гемоглобина, эти образцы следует собирать на льду и анализировать в течение 1 ч. РТ и АРТТ следует определять из образцов крови, взятых с цитратом в качестве антикоагулянта. Поскольку отношение объема цитратного антикоагулянта к объему отобранной крови критично, для проведения коагуляционных испытаний необходимо получить 1 мл цитратной крови с использованием туберкулинового шприца, предварительно заполненного 0,1 мл раствора цитрата. Стоит отметить, что получение максимально точных результатов возможно только при строгом соблюдении методик калибровки приборов. Приготовление тонкопленочного мазка крови на предметном стекле Правильная оценка и дифференциация разных форм клеток находятся в прямой зависимости от технического выполнения предварительных процедур: взятия крови, техники микроскопирования и метода окраски. Для дифференцированного подсчета лейкоцитов и ретикулоцитов делаются мазки цельной крови непосредственно в момент отбора проб без добавления антикоагулянтов. Для получения мазков высокого оптического качества необходимо использовать готовые чистые обезжиренные стекла толщиной 1 мм. Каплю исследуемой крови наносят на середину стекла на расстоянии 2 см от края. Шпатель или шлифованное стекло помещают в 1-2 мм от капли под углом 35-45°, двигают его немного назад, чтобы захватить кровь, которая растекается по ребру стекла (шпателя), и затем легким движением продвигают вперед для получения монослойного ряда клеток. Мазок должен получиться достаточно длинным (3-4 см), желтоватого цвета, располагаться на 0,5-1 см от краев и оканчиваться «метелочкой». При приготовлении мазка не следует сильно надавливать на стекло (шпатель), так как при этом травмируются форменные элементы крови. В первую очередь страдают клетки эритроцитарного ряда, деформация которых приводит к ложным результатам, затрудняя диагностику. Для предотвращения подобных случаев и стандартизации процесса приготовления препаратов крови в современных лабораториях используют автоматические приборы для производства равномерных мазков. В этом случае данное действие контролируется автоматически, что обеспечивает возможность получения стандартных мазков с обширной «рабочей поверхно-

стью», оптимальным распределением крови и минимальным повреждением клеток. Длина и толщина мазка зависят от гематокрита и количества крови, а также определяются скоростью движения распределяющей пластины, которая выставляется при калибровке. Автоматические анализаторы практически полностью заменили мануальное осуществление фиксации, окраски (по Романовскому) и сушки препаратов крови. Лейкограмма и морфометрические параметры эритроцитов и тромбоцитов также анализируются с помощью автоматической гематологической системы анализа мазка крови. Количество ретикулоцитов (суправитальная окраска во влажной камере, краситель бриллиантовый крезоловый синий) подсчитывают автоматизировано при помощи специальных программ или визуально под микроскопом (увеличение 1000).

Общий анализ крови

Влияние потенциальных лекарственных средств на систему крови в токсикологических исследованиях оценивается по следующим гематологическим показателям: количеству гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокриту, тромбокриту, среднему объему эритроцитов, среднему содержанию гемоглобина в эритроцитах, средней концентрации гемоглобина в эритроците. Обязательно проводится дифференциальный подсчет лейкоцитов (соотношение различных видов лейкоцитов), так как изменения («сдвиги») в лейкоцитарной формуле при референтном значении общего содержания лейкоцитов могут свидетельствовать о длительных хронических процессах в организме лабораторных животных, снижении активности иммунной системы и т. д. Немаловажное значение имеет изучение морфологии эритроцитов. Так, характерные изменения, касающиеся величины, формы, степени насыщения эритроцитов гемоглобином, подсчет и оценка ретикулоцитов (незрелых эритроцитов) дают представление о влиянии токсических факторов на активность эритропоэза и способствуют выявлению различных патологий. При выявлении гематологических изменений в ходе эксперимента целесообразно провести дополнительное специализированное цитологическое (цитохимическое или иммуноцитохимическое) исследование костного мозга, которое позволит оценить повреждение клеток на начальном этапе

крововетворения, когда происходит образование и дифференциация стволовых клеток.

У крыс активность щелочной фосфатазы повышена в 1,2 раза, по сравнению с нормальными значениями для человека. Снижен уровень калия, а уровень мочевины – повышен. Уровень альбуминов несколько снижен, а уровень глобулинов незначительно повышен, в результате чего альбумин-глобулиновый коэффициент снижен.

Все показатели липидного обмена в крови крыс ниже, чем у человека. У этих животных вырабатывается особая желчная кислота, которая у людей отсутствует. Это α и β -мурихолевая кислота. Считают, что именно благодаря ей крысы обладают способностью к быстрому выведению холестерина из организма. Данные различия проявляются в том, что крысы очень устойчивы к изменениям уровня сывороточного холестерина, а люди нет. Кроме того, эти животные почти не подвержены образованию бляшек в артериях в результате потребления пищи богатой холестерином. 7α -гидроксилаза имеет высокую активность у крыс, поэтому в их желчи холевой кислоты почти нет, а с желчью выводится дезоксихолевая кислота.

Биохимические показатели у крыс-самцов в большинстве своем относительно стабильны в различных возрастных группах. Наблюдается некоторая тенденция увеличения АСТ. Повышается общий белок за счет увеличения фракции альбуминов. Однако с 6-ти месяцев эти показатели стабилизируются. Если сравнить показатели белкового обмена в одной возрастной группе (от 3 до 5 месяцев) у самцов и самок, то можно отметить более высокий уровень общего белка и глобулинов у самок, что может быть подтверждено данными других исследователей. У молодых животных наблюдается низкий уровень альбуминов – как у самцов, так и у самок. Остаются практически без изменений в ходе онтогенеза.

8. Биоэтические аспекты использования лабораторных животных в медико-биологических исследованиях

Руководящими этическими правилами при работе с лабораторными животными следует считать принципы Russel и Birch (1959) (правила трех R):

- Уменьшение (reduction) – максимально возможное уменьшение числа животных, используемых для осуществления необходимых учебных или научных целей. Если нет возможности заменить животных в болезненных экспериментах иными моделями, то необходимо попытаться так построить эксперимент, чтобы использовать минимальное количество животных. Этого можно достигнуть путем правильного планирования эксперимента (Remfry, 1985 и др.), использования здоровых животных нужного стандарта по экологическому и генетическому статусам;

- Повышение качества (refinement) – улучшение, совершенствование экспериментальных методик для снижения (исключения) отрицательных (болевых, стрессирующих и др.) влияний на животное. Страданий животных будет меньше, если в работе применяется высококачественная хирургическая техника и, если операции выполняются опытными специалистами с использованием нужной анестезии, анальгезии и обеспечением хорошего ухода за животными в период до и после хирургических вмешательств. Даже простые инъекции могут быть источником страданий, если их делают непрофессионально. Усыплять животных после экспериментов следует специальными безболезненными методами, чтобы минимизировать страдания. В опытах по изучению поведения необходимо использовать специально обученных животных;

- Замена (replacement) – устранение животных из экспериментальной или учебной работы, если есть возможность получить аналогичные результаты альтернативными методами.

В нашей стране существуют нормативные документы, разработанные и утвержденные Министерством здравоохранения

в 1977 г. Это «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Правила содержат следующие основные положения:

1. Работу с экспериментальными животными имеют право вести только лица, имеющие высшее образование (биологическое, ветеринарное, медицинское, зоотехническое, фармацевтическое), допущенные к этой работе с разрешения руководства учреждения с возложением на них ответственности за соблюдение Правил.

2. Учебно-вспомогательный персонал и студенты, принимающие участие в проведении научных исследований, обязаны знать настоящие Правила и допускаются к работе с экспериментальными животными контролем преподавателя и научного сотрудника, ответственного за работу.

3. За подготовку экспериментатора к работе с животными и за соблюдение настоящих Правил по использованию животных ответственность в целом несет руководитель подразделения (отдела, лаборатории кафедры), в котором работает лицо, допущенное к работе с животными.

4. Контроль за соблюдением норм гуманного обращения с животными, условиями их содержания и проведения с ними работы осуществляют специальные комиссии при учреждениях, а общий контроль за выполнением Правил осуществляют специальные комиссии при соответствующем ведомстве (министерстве). Учреждения и экспериментаторы обязаны предоставлять таким комиссиям по их требованию необходимые сведения для контроля за работой с использованием животных.

5. При представлении в печать результатов научных исследований на экспериментальных животных и защите диссертационных работ учреждения и отдельные лица обязаны указывать сведения об использованных животных (вид, количество, тип применявшегося обезболивания, способ эвтаназии и т.п.).

6. Все процедуры на животных, которые могут вызвать у него боль и иного рода мучительные состояния, проводятся при достаточном обезболивании под местной анестезией или наркозом.

7. Опыты с применением обездвиживающих средств (миорелаксантов) во всех случаях проводятся при полном обезболивании.

8. Запрещается использование животного в болезненном эксперименте более одного раза. Повторное использование разрешается только в необходимых случаях при разрешении комиссии.

9. При проведении экспериментов и других процедур в условиях повышенного риска нанесения животному болезненных раздражений строго обязательно присутствие лица, ответственного за использование животного, и контроль с его стороны за сохранением адекватного обезбоживания.

10. В послеоперационный период животное должно получать квалифицированный уход и адекватное обездвиживание. Животное, оставшееся после эксперимента искалеченным и нежизнеспособным, должно быть своевременно умерщвлено с соблюдением всех мер гуманности.

Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) проводится ответственным лицом или под его наблюдением разрешенным способом.

11. Ответственность за нарушение Правил несут лица, допущенные к такого рода исследованиям, и руководители учреждений, где проводятся такие эксперименты.

12. Нарушение правил гуманного обращения с животными и проведение экспериментов в условиях, ставящих научную достоверность полученных данных под сомнение, может повлечь за собой в установленном порядке применение к виновным лицам мер дисциплинарного воздействия, а также запрещения научных публикаций, защиты диссертационных работ и запрещения дальнейшего использования экспериментальных животных.

Кроме того, во многих ВУЗах существуют собственные нормативные документы, регулирующие работу на лабораторных животных.

9. Рекомендации по организации поведенческих исследований

При организации и проведении исследований в области поведения животных необходимо соблюдать ряд правил, которые позволят повысить надёжность и достоверность полученных результатов.

1. Все исследования с применением поведенческих методик должны записываться на видео.

2. Проводить исследования рекомендуется в одно и то же время суток, в одном и том же помещении.

3. Лаборатория, в которой проводятся поведенческие исследования, должна быть изолирована от действия посторонних раздражителей (большое количество людей, лишний шум, перепады освещения, посторонние запахи и т.д.)

4. Брать животных в руки, помещать в условия тестовых площадок рекомендуется одному и тому же человеку на протяжении всего периода исследования.

5. От момента формирования выборки животных для эксперимента и рассаживания их в клетки до момента начала исследования должно пройти не менее 5-7 дней.

6. На протяжении всего эксперимента необходимо обеспечить животным один и тот же рацион кормления (если иного не требует ход исследования) и свободный доступ к воде (если не требуется иного).

10. Методы изучения поведения грызунов в биомедицинских исследованиях

Вопросы, связанные с исследованием целостного поведения и отдельных его компонентов, приобретают всю большую актуальность. Поведенческие тесты используются в космической, спортивной, адаптивной физиологии, в патофизиологии и клинической физиологии, для решения многих задач в области нейропсихологии, зоопсихологии, психиатрии, при различных генетических исследованиях.

Поведенческие тесты используют при:

- моделировании различных патологий (в том числе, нейродегенеративных и наследственных);
- исследовании физиологических аспектов адаптации к различным условиям среды;
- изучении механизмов реализации высших психических функций;
- выяснении особенностей организма на различных этапах онтогенеза;
- тестировании медицинского оборудования;
- изучении свойств лекарственных препаратов.

Испытание новых фармакологических препаратов невозможно без исследований их действия на высшие психические процессы. Вот почему, очень важно правильно подобрать методику, которая бы полностью отвечала целям и задачам, поставленным в каждом конкретном эксперименте, и позволяла получать объективные результаты.

Считается, что всё целостное поведение животных состоит из нескольких паттернов, которые представляют собой пересекающиеся множества.

Разделение поведения на моторные и сенсорные, эмоциональные, социальные и «интеллектуальные» компоненты является во многом условным, но необходимым для дифференцировки их друг от друга. Зачастую, для того, чтобы сформировать чёткую картину поведенческого статуса животного в эксперименте, необ-

ходимо изучить по отдельности каждый компонент поведения, а иногда и отдельные его функции.



Рис. 1. Паттерны поведения (по А.В. Амикишиевой, 2009)

Так, при оценке сенсорных функций в поведенческих тестах обычно изучается болевая чувствительность. В то время как для исследования зрительной функции чаще используются неведенческие тесты. Оценка обонятельной чувствительности не требует специального оборудования и практически все тесты основаны на поиске или обнюхивании приманки, помещаемой в домашнюю клетку.

Исследования эмоционального поведения и его нарушений фокусируются на изучении феноменов повышенной тревожности, депрессии и маниакально-депрессивного психоза, шизофрении (является суперпозицией эмоциональных и когнитивных нарушений). Под тревожностью этологи понимают защитный ответ организма на потенциальное присутствие угрозы (в отличие от страха, вызванного реальным угрожающим стимулом). Нейрональные субстраты страха и тревожности во многом разные. Страх является

адаптивной реакцией, в то время как повышенная тревожность дезадаптирует организм. Тревожность традиционно разделяют на конститутивную, во многом генетически закреплённую, и ситуативную, спровоцированную условиями тестов. Депрессия – это психическое состояние с пониженным настроением, сниженной жизнеспособностью, отсутствием стремления к удовольствию (ангедония). Депрессивноподобное состояние животных в эксперименте провоцируется длительными стрессорными воздействиями или селекцией.

При изучении памяти большое внимание отводится пространственной памяти грызунов, т.к. она имеет параллели с декларативной памятью человека. Они имеют представительство в гиппокампе и ассоциированы с таким нейтральным процессом, как долговременная потенциация. У грызунов гиппокамп участвует в кодировании пространственной информации, которую изучают в различных лабиринтах.

В данном пособии речь пойдёт о некоторых поведенческих методиках, позволяющих в лабораторных условиях изучить те или иные компоненты целостного поведения. Однако, при выборе методов исследования, стоит понимать, что для получения достоверных результатов некоторые тесты не рекомендуется использовать изолированно, не сочетая их с изучением других поведенческих компонентов.

11. Основные тесты для исследования поведения грызунов

Тест принудительного плавания

Принудительное плавание (поведенческое «отчаяние», тест Порсолта) является общепризнанным тестом для оценки депрессивного поведения грызунов. В качестве экспериментальных животных используют мышей или крыс. Каждое животное по одному помещают в цилиндр с водой, диаметром от 18 до 38 см, высотой 40 см, т.е. достаточного размера для того, чтобы крысы или мыши в нем могли свободно плавать (рисунок 2). Температура воды поддерживается в пределах 22-23 °С. Регистрируется время, в течение которого животное неподвижно зависает в воде, т.е., проявляет симптомы депрессии, длительность первого эпизода активного плавания, общее время плавания, число ныряний. Чем больше время иммобильности, меньше общее время плавания и меньше длительность первого эпизода активного плавания, тем выше уровень депрессивности, и наоборот. Время тестирования 5 минут.

Иногда, при изучении влияния некоторых веществ на организм, можно провести повторное исследование через 2 часа.

В некоторых случаях можно использовать в тесте принудительного плавания дополнительный стрессорный фактор. В таком случае, плавание осуществляется с грузом, прикрепляемым к корню хвоста, равным 10 % от веса тела. Животные плавают с грузом до утомления, о котором свидетельствует погружение животного на дно цилиндра.

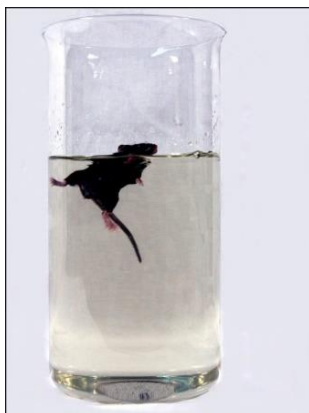


Рис. 2. Крыса в тесте «Принудительное плавание»

Тест «экстраполяционное избавление»

Установка «Экстраполяционное избавление» 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.



Рис. 3. Установка для теста «экстраполяционное избавление»

Установка представляет собой 2 цилиндра: внешний непрозрачный с диаметром примерно 35 см и внутренний прозрачный (диаметр 8 см, высота 23 см). Внешняя ёмкость заполняется водой (22-23 °С) и в неё на 2,5-3 см погружается внутренний цилиндр (рисунок 3).

Крысу аккуратно помещают в воду, опуская её во внутренний прозрачный цилиндр хвостом вниз, не допуская того, чтобы она цеплялась задними лапами за края цилиндра.

Регистрируют: латентный период начала аверсивных реакций после посадки в установку; число прыжков за тестовый период; латентный период подныривания. Вынимать животное из воды (внешней ёмкости) следует сразу после подныривания, но не допускается пребывание животного в тестовых условиях более 2 минут.

Водный тест Морриса

Водный тест Морриса является классической методикой для изучения функции памяти у мелких животных. Этот тест используется также при исследовании таких заболеваний, как аутизм, болезнь Альцгеймера, различных мозговых травм. Тестовое задание

представляет собой круглый бассейн диаметром 200 сантиметров и высотой 67 сантиметров, наполненный водой с температурой около 23 °С. В определенном месте бассейна помещается платформа, скрытая под водой. С целью полного скрытия платформы воду подкрашивают в белый цвет. Каждую крысу помещают в воду и засекают время нахождения ею «спасительной» платформы (рисунок 4). Через час проводят повторное тестирование.



Рис. 4. Крыса в водном тесте Морриса

Подобное задание для крыс является сильным стрессом, происходит мобилизация всех функций организма, в том числе и памяти, для скорейшего нахождения скрытой под водой платформы.

Тест потребления сахарозы

Тест используется для оценки уровня депрессивности мелких грызунов. Крысу помещают на 15 мин в экспериментальную камеру и после стабилизации уровня потребления регистрируют количество выпитой жидкости (20 %-ный раствор сахарозы) и число подходов к поилке (косвенный показатель двигательной активности). Потребление сахарозы определяют как разницу в массе бутылки до и после теста. Животные не подвергаются специальной процедуре пищевой или питьевой депривации, но предварительно адаптируются к камере. Количество выпитой сахарозы является показателем, широко используемым для оценки чувствительности животных к подкреплению, вызывающему чувство удовольствия. Пониженное потребление (предпочтение) раствора сахарозы считается надёжным показателем депрессивного состояния животных.

Тест светло-темнового выбора

Тест предназначен для оценки тревожного поведения грызунов.

Установка представляет собой закрытую камеру, разделённую на два отсека: освещённого (100 Лк) тёмного (менее 5 Лк) размером 48×55×40 см, которые сообщаются между собой через отверстие в перегородке.



Рис. 5. Крыса в тёмно-белой камере

Крысу помещают в светлую часть камеры хвостом к входу в тёмный отсек (рисунок 5). Затем в течение 5 минут регистрируют латентный период захода в тёмный отсек, время нахождения в тёмном и светлом отсеке, число переходов между отсеками, число стоек в светлом отсеке и число оценок «риска» (крыса вы-

глядывает из тёмного отсека или частично выходит из него в светлый отсек, принохивается, после чего быстро скрывается в тёмном отсеке). Чем меньше время пребывания в светлом отсеке, чем меньше число переходов из одного отсека в другой и чем больше число оценок «риска», тем выше уровень тревожности, и наоборот.

Данная методика входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г.

Одним из аналогов установки для проведения теста светло-темнового выбора является «Темная камера с отверстиями» (рисунок 6). Однако в отличие от тёмно-светлой камеры она имитирует укрытие с выходом в окружающее пространство, характерное для построек грызунов.

Поскольку боковое отверстие камеры расположено на некотором расстоянии от пола, выход животного сопряжен с невозможностью быстрого возврата в камеру. Регистрируемые показатели за 4-х минутный период наблюдения:

- латентный период первого заглядывания в верхнее отверстие и общее число заглядываний в верхние отверстия за тестовый период;
- латентный период первого выглядывания из бокового отверстия и общее число выглядываний из бокового отверстия за тестовый период;
- латентный период первого «полувыхода» и общее число «полувыходов» через боковое отверстие за тестовый период;
- латентный период первого выхода и общее число выходов/заходов через боковое отверстие за тестовый период.



Рис. 6. Тёмная камера с отверстиями

Оценка индивидуального тревожно-фобического уровня животных

В данной группе тестов оценивается интегральный показатель тревожности (ИПТ).

Латентный период спуска с высоты. Данный тест используется для оценки интенсивного оборонительного поведения у крыс. Крысу помещают на пенал из непрозрачного материала размером 20х14х14 см и отмечают время спуска с пенала, когда крыса коснется всеми 4 лапами поля. Расчёт ИПТ: $0 < t < 30$ сек – 0 баллов; $30 < t < 60$ сек – 1 балл; $60 < t < 180$ сек – 2 балла; более 180 сек – 3 балла.

Латентный период прохождения через отверстие. Крысу помещают в прозрачный пенал, разделенный поперек на 2 отсека с

отверстием 7x10 см в перегородке. Действие считается выполненным, когда крыса перелезает во 2 отсек двумя лапами. Расчёт ИПТ тот же, что и в предыдущем тесте.

Время выхода из домика. Животное помещают в домик из прозрачного плексигласа 16x15x12 см и выход на 15 мин закрывают заслонкой. Отчет времени начинают с момента открытия выхода. Расчёт ИПТ: $0 < t < 15$ сек – 0 баллов; $15 < t < 30$ сек – 1 балл; $30 < t < 180$ сек – 2 балла; более 180 сек – 3 балла.

Тест закапывания шариков. В клетку размером 20×25×17 см насыпают опилки слоем 5 см, сверху равноудаленно раскладывают 20 стеклянных шариков диаметром 1 см. Крысу помещают в клетку на 30 минут. По истечении этого времени подсчитывают число шариков, закрытых опилками более чем на 2/3. Тест «закапывание шариков» применяется для исследования выраженности обсессивно-компульсивного поведения грызунов и для скрининга антикомпульсивных препаратов. Считается, что животные используют доступный материал подстилки, чтобы закопать нежелательные источники дискомфорта, находящиеся в домашнем окружении. Число закопанных шариков отражает выраженность стереотипного поведения животного.

Изучение реакции пассивного избегания

Оценка реакции пассивного избегания является стандартным способом изучения кратковременной и долговременной памяти



Рис. 7. Камера для изучения реакций пассивного избегания

грызунов в тестах, использующих мотивацию страхом. Экспериментальная камера состоит из 2-х отделений, большего, освещенного размером 125x135x190 мм, и меньшего, затемненного, размером 90x100x180 мм с электропроводным полом (рисунок 7).

Животное помещают в центр освещенного отделения

хвостом к перегородке с отверстием, которая разделяет большее отделение от меньшего. Найдя отверстие в электроболевое раздражение силой 0,45 мА до тех пор, пока животное не выбегает в освещенное отделение. Если в течение 10 секунд грызун не возвращается в затемненное отделение, его удаляют из камеры и возвращают в клетку, если же заходит, повторно наносят электроболевое раздражение. Сохранность условного рефлекса пассивного избегания тестируют через 24 часа после его выработки, помещая животное в освещенное отделение. При оценке сохранности условного рефлекса пассивного избегания учитывают число животных в процентах, зашедших в затемненный «опасный» отсек камеры за 3 минуты наблюдения, время первого захода в него, общее время пребывания в нем при тестировании, разницу во времени пребывания животного в затемненном отделении до выработки рефлекса и при его тестировании.

Тесты с применением лабиринтов

Метод «лабиринта» позволяет изучать как вопросы, связанные непосредственно со способностью животных к научению (к выработке двигательных навыков), так и вопросы пространственной ориентации, в частности роль кожно-мышечной и других форм чувствительности, памяти, способности к переносу двигательных навыков в новые условия, к формированию чувственных обобщений и др.

Приподнятый крестообразный лабиринт

Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить уровень тревожности животного (по предпочтению темноты/света, боязни высоты, выраженности и динамике поведения «выглядывания»). Данная методика входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г.



Рис. 8. Установка
«Приподнятый
крестообразный лабиринт»

Крестообразная установка состоит из двух открытых рукавов 50x10 см и двух закрытых рукавов 50x10 см, расположенных перпендикулярно относительно друг друга. Высота лабиринта над полом 1 метр (рисунок 8). Животное помещают в центр лабиринта. Продолжительность теста для каждой отдельной крысы составляет 3 минуты. Фиксируют время пребывания в закрытых и открытых «рукавах», количество заходов в за-

крытые и открытые «рукава», длительность нахождения в центре.

Чем меньше время нахождения в открытых рукавах лабиринта и на центральной площадке, тем выше уровень тревожности. Общее число выходов в открытые и закрытые рукава лабиринта является показателем двигательной активности животных в тесте.

Радиальный лабиринт

Восьмилучевой радиальный лабиринт широко используется для изучения пространственной и непространственной памяти, ассоциированной с различными типами мотивации (обычно, пищевым стимулом). Данная методика входит в перечень установок



Рис. 9. Установка
«Восьмилучевой
радиальный лабиринт»

для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г.

Обычно радиальный лабиринт состоит из центральной камеры и 8 лучей, открытых или закрытых (называемых в этом случае отсеками, или коридорами) (рисунок 9). Перед началом опыта в конец каждого коридора

помещают пищу. После процедуры приучения к обстановке опыта голодное животное сажают в центральный отсек, и оно начинает заходить в лучи в поисках пищи. При повторном заходе в тот же отсек животное пищи больше не получает, а такой выбор классифицируется экспериментатором как ошибочный. По ходу опыта у животного формируется мысленное представление о пространственной структуре лабиринта. Животные помнят о том, какие отсеки они уже посетили, а в ходе повторных тренировок «мысленная карта» данной среды постепенно совершенствуется.

Лабиринт Барнс

Методика позволяет исследовать процессы памяти и обучения на основе пространственной навигации. С помощью данного метода можно также исследовать различные болезни, например, болезнь Альцгеймера. Лабиринт Барнс входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г.

Установка состоит из платформы диаметром 92 см с двадцатью отверстиями (диаметр каждого – 5 см), расположенными по её краю. Только в одном из отверстий можно спрятаться, остальные являются ложными. Установка приподнята над полом на 105 см (рисунок 10). Регистрируют время нахождения животным убежища.

Здоровое животное быстро находит спасательный ящик, не пытаясь сбежать через ложные отверстия. Животное с дефектами пространственной памяти будет каждый раз спонтанно исследовать все отверстия. Допускается в качестве мотивации использовать приманку, которую кладут в спасательный ящик. Преимуществом метода является то, что он гораздо менее всех остальных лабиринтов стрессует животное.



Рис. 10. Установка «Лабиринт Барнс»

Выработка условного пищедобывательного рефлекса на место в сложном лабиринте

Методика позволяет оценивать функции памяти, способность к обучению и скорость формирования условного рефлекса. Лабиринт представляет собой квадратную камеру, разделённую пятью перегородками на шесть коридоров. В каждой перегородке имеется прямоугольное отверстие, смещённое относительно отверстий в соседних перегородках. В один из отсеков помещают пищевую приманку (рисунок 11).



Рис. 11. Крыса в сложном лабиринте

число ошибок (любых отклонений от правильной траектории движения).

Перед экспериментом животных подвергают 24-часовой пищевой депривации. В первый раз животное помещается в лабиринт на 30 минут в целях адаптации и угощения ориентировочно-исследовательской реакции. Далее животное помещают в лабиринт по 5 раз ежедневно не более чем на 3 минуты. Регистрируют число выполненных реакций (число случаев, когда животное находит подкрепление в течение 3 минут) и

Тесты для оценки болевой чувствительности

Тест «горячая пластина» используется для определения особенностей регуляции болевой чувствительности на уровне центральных структур мозга.

Животное помещают на металлическую поверхность, разогретую до 53 °С. Регистрируют латентный период поведенческой

реакции на болевой раздражитель – время от момента посадки до первого облизывания задней лапы. Измерения проводят трижды с интервалом 15 минут.

«Формалиновый» тест – модель тонической боли – является классическим методом определения эффективности анальгетического действия фармакологических препаратов, физиотерапевтических и других факторов.

«Формалиновый» тест проводят путем подкожной инъекции 5 %-ного раствора формалина (0,08 мл на 100 граммов веса) в дорсальную поверхность стопы задней конечности крыс. После инъекции формалина каждую крысу возвращают в свою клетку и регистрируют продолжительность поведенческих проявлений в пределах заданных последовательных интервалов (минимальный интервал – 1 минута) и в пределах всего периода наблюдения – 60 минут после инъекции формалина. Показателями интенсивности болевой реакции у крыс при экспериментально вызванной тонической боли служит продолжительность (в секундах) и частота (количество циклов) лизания пораженной конечности.

Тест «Открытое поле»

Методика позволяет регистрировать целый комплекс поведенческих компонентов: двигательную активность грызунов, их уровень тревожности, степень выраженности ориентировочно-исследовательского поведения. Данная методика входит в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России № 281 от 30.04.2013 г.

«Открытое поле» представляет собой площадку, ограниченную непрозрачными бортами высотой 20 см и разделённую на девять одинаковых квадратов с круглыми отверстиями в центре каждого. В некоторых случаях площадка может быть в виде круглой арены (диаметр 131 см, высота стенок 37 см), пол которой разделён на сегменты (рисунок 12). Крысу помещают в центр площадки на заданное количество времени (3, 5, 10 минут) и регистрируют горизонтальную двигательную активность (число пересечений линии, число прыжков), исследовательскую активность (число заглядываний в центральные

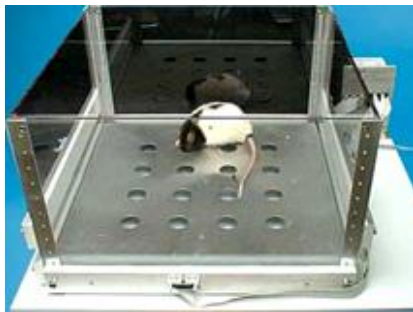


Рис. 12. Установка «Открытое поле»

квадратах), характер пассивно-оборонительного поведения (время замирания в одном квадрате поля) и т.д. В некоторых случаях рекомендуется также регистрировать уровень агрессии, отмечая количество сильных ударов задними лапами о пол камеры (особенно, если объект изучения кролик).

Если в условиях тестовой площадки необходимо только оценить уровень тревожно-фобического состояния животных, можно применять тест «**Пячение**». Через 180 с после момента помещения животного в «Открытое поле» резко меняют освещённость: выключают яркий свет и включают простую лампу на 60 с, затем восстанавливают освещенность. За 300 с наблюдения определяют измеренное расстояние в квадратах, на которое пятилось животное. Отсутствие изменений 0 баллов, на полквadrата – 1 балл, до 2 квадрата – 2 балла, более 2 квадратов – 3 балла.

Тест для оценки исследовательской активности

Тест представляет собой упрощённый вариант теста «Открытое поле» и в отличие от предыдущей методики позволяет изучать только один компонент целостного поведения – ориентировочно-исследовательское. Установка представляет собой ящик из непрозрачного материала (40x40x20 см) с 16 отверстиями в крышке, диаметр каждого из

отверстия и обнюхивания их), вертикальную двигательную активность (количество вертикальных стоек), число груминговых реакций. Наблюдают также за общим характером поведения животного в условиях тестовой площадки: отмечают степень эмоционального напряжения (время нахождения в центральных и пристеночных

которых не превышает 2 см. В тесте оценивается общее количество обследований отверстий за 5 минут.

Тест для определения межполушарной асимметрии

Тест позволяет определить степень двигательной асимметрии в момент добывания пищи. Животное должно доставать семечко подсолнечника из горизонтальной трубки диаметром 12 мм, расположенной на высоте 5 см. Глубина нахождения семечки составляет 17 мм. По 10 взятиям определяют предпочитаемую лапу в соответствии с коэффициентом асимметрии K_{ac} .

$$K_{ac} = (П-Л) / (П+Л).$$

$$\text{для «правшей»}: 0,4 \leq K_{ac} \leq 1$$

$$\text{для «левшей»}: -1 \leq K_{ac} \leq -0,4$$

$$\text{для «амбидекстров»}: -0,4 \leq K_{ac} \leq 0,4$$

Тест «Сужающаяся дорожка»

Тест направлен на исследование двигательного компонента поведения. Используется для оценки равновесия, в тестах на обучение или возрастные изменения.

Установка представляет собой перекладину, приподнятую от пола на расстоянии 1 метра, которая с одной стороны постепенно сужается. Длина доски 165 см. Животное помещается на широкую сторону перекладки, которая ярко освещается, мотивируя крысу бежать к концу доски, где установлена тёмная камера. Регистрируются время ходьбы, соскальзывание лап, падения. При нарушенном равновесии животное цепко держится за перекладину, боясь падения, что удлиняет латентный период перехода.

Тест «Вращающийся стержень»

Тест используется для оценки двигательной функции грызунов, позволяет оценивать моторный дефицит и степень нарушения

координации движений. В настоящее время широко используется при изучении синдрома Паркинсона, нарушений пирамидной и экстрапирамидной систем, моторных отделов мозга, а также для оценки повреждающего действия некоторых химических факторов при неврологическом тестировании.

Животное помещают на горизонтальный стержень диаметром 4 см, который вращают с постоянной скоростью 3 оборота в минуту или с нарастающей скоростью – каждые 7 секунд за оборот, где: начальная скорость – 5, конечная – 30 оборотов в минуту. Регистрируют время удерживания животного на вращающемся стержне. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2-х минут оценивается как проявление нарушения координации движений.

Тест подтягивания на горизонтальной перекладине

Тест является одним из методов регистрации мышечного тонуса и применяется для изучения двигательного компонента поведения.

Крыс подвешивают передними лапами на проволоку, натянутую на высоте 20-30 см от поверхности стола. Крысы с ненарушенным мышечным тонусом быстро подтягиваются и удерживаются на перекладине всеми четырьмя лапами. Невыполнение этого рефлекса животными свидетельствует о нарушении мышечного тонуса и неврологическом дефиците.

Тест «Постановка конечности на опору»

Тест используется для оценки неврологического дефицита у животных в возрасте 42 и 90 суток. Тест состоит из семи испытаний, оценивающих сенсомоторную интеграцию передних и задних конечностей в ответ на тактильную, проприоцептивную и зрительную стимуляцию.

1. Крысу передними конечностями размещают на край стола, придерживая туловище. Каждую переднюю лапу поочередно

аккуратно сталкивают с края стола, контролируя её возвращение и размещение. В норме крыса сразу же возвращает конечность на место.

2. Крысу передними конечностями размещают на край стола, придерживая туловище. Голову крысы отводят вверх под углом 45 градусов, не давая ей возможность видеть поверхность стола и контактировать с ней вибриссами. Каждую переднюю лапу поочередно аккуратно сталкивают с края стола, контролируя её возвращение и размещение.

3. Крысу размещают параллельно краю стола и переднюю лапу отводят в сторону.

4. Крысу размещают параллельно краю стола и заднюю лапу отводят в сторону.

5. Крысу задними лапами ставят на край стола и каждую лапу поочередно отводят вниз.

6. Крысу размещают передними лапами у края стола и аккуратно подталкивают за туловище по направлению к краю стола. В норме крыса сопротивляется толканию, перебирая и упираясь передними лапами.

7. Крысу держат за корень хвоста и медленно опускают на поверхность стола. В норме крыса вытягивает вперёд передние конечности за 10 см до поверхности стола.

Тест оценивают следующим образом: крыса выполняет все испытания нормально – 2 балла, крыса выполняет испытания с промедлением и/или не полностью – 1 балл, крыса не выполнила испытание – 0 баллов.

Угловой тест

Тест используется для оценки координации движений в пространстве, позволяет выявлять неврологический дефицит, такой как неглект (игнорирование половины пространства), используется для изучения ишемических расстройств в модельных экспериментах.

Животное помещают между двумя досками, соединёнными под прямым углом. Здоровые крысы поворачивают как влево, так

и вправо случайно. У животных с патологиями наблюдается преимущественно поворачивание в здоровую сторону.

Тесты на суб-интеллектуальное поведение

Тесты на проверку суб-интеллектуального поведения не требуют большого числа проб, оценка их проводится по скорости решения задачи. Решение находится всегда или случайно, за счёт рекомбинации многих возможных вариантов, или путём инсайта – внезапного «озарения».

Тест со шприцем (syringe task). Используют одноразовый одномиллилитровый шприц (диаметр трубки 0,5 см) с обрезанным свободным концом (длина 7 см). В окончание поршня имплантируют иглу, выступающую наружу на 3 мм. На неё насаживают маленький кусочек пищи, который может свободно перемещаться вдоль трубки при движении поршня. Трубку шприца фиксируют на платформе и помещают внутрь камеры с животным. В первый день эксперимента приманку располагают в окончании трубки, чтобы она была легко доступной (рисунок 13). В последующие дни её помещают в середину трубки. Чтобы завладеть лакомством животное должно либо толкать поршень вперёд, либо тянуть его в обратную сторону. В день предъявляют две пробы, продолжительностью 5 минут. Оценивают время, за которое животным удаётся вынуть лакомство из трубки и характер выполняемых реакций.

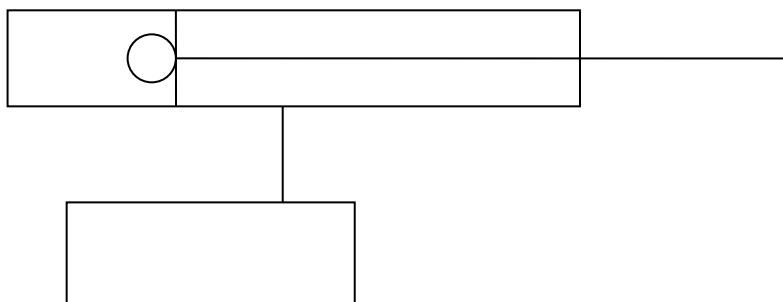


Рис. 13. Схема установки для проведения теста со шприцем

Тест на самоосвобождение (self-release task). Животных помещают в небольшую замкнутую камеру (13x10x10 см), передняя стенка которой может вдвигаться внутрь камеры, сокращая её размер. Размеры камеры выбираются в зависимости от размера животного. На передней стенке камеры располагается небольшая вертикально скользящая дверца (5x6x0,1 см), нижней край которой не касается пола камеры (0,5 см). На первом этапе эксперимента животные должны приподнять дверку, подсунув мордочку и лапу в щель, и выйти из камеры. На втором этапе задача усложняется: поднятие дверцы блокируется штырём, продетым в отверстие, проходящее через дверцу и переднюю стенку камеры. Теперь чтобы выйти из камеры животные должны выдернуть штырь и только после этого открыть дверцу, как в первом случае. Максимальное время пробы составляет 5 минут. Реакцию самоосвобождения оценивают по времени выхода из запертого ограниченного пространства.

Тест на построение подставок. Опыты состоят из трёх этапов и обычно проводятся на мышах. На первом этапе животных обучают доставать лакомство, помещённое на верхнее пластмассовое основание гладкого металлического или стеклянного цилиндра, установленного вертикально (диаметр 4,5 см) при длине 9 см (для крыс высота может быть больше). Животное легко достаёт лакомство и съедает его. Затем задачу усложняют, увеличивая высоту цилиндра до 15 см (в случае с крысами – больше). Теперь грызун не может добраться до лакомства, однако к цилиндру приставляют картонные коробки разных размеров и животное, легко взбираясь по ним достигают приманки. На третьем этапе коробки отодвигают от цилиндра на большое расстояние и теперь даже взобравшись на них, животные не могут достать верхушки цилиндра. Чтобы сделать это, они должны вначале подтащить коробки к цилиндру.

Трёхкамерный социальный тест

Эта методика является общепринятым способом оценки социального поведения грызунов. Грызуны, как правило, предпочи-



Рис. 14. Трёхкамерный социальный тест

тают проводить больше времени с другими особями (общительность) и исследовать новый объект, а не уже знакомый (социальная новизна). Данный тест позволяет выявить грызунов с дефицитом в общительности и социальной новизны. Установка используется для изучения аутизма, родительского поведения, коммуникабельности и социальной памяти.

Установка представляет собой бокс (60х40 см) с тремя отсеками. Размер центрального отсека составляет 20х60 см, боковые отсеки – 19,5х40 см. Боковые отсеки содержат два сетчатых ограждения для новых объектов (рисунок 14).

Исследование состоит из трёх 10-минутных этапов: на первом этапе тестируемое животное помещают в центральный отсек для адаптации к установке; на втором этапе в левый отсек помещают «стимул» (новое незнакомое животное), на третьем этапе – в правый боковой отсек помещают новый «стимул».

В тесте оценивается время, проведённое животным в каждой камере; время, затраченное на контакт с «животным-стимулом». Чем выше тревожность, тем меньше будут параметры социального поведения.

Тест «перегородка»

Эта методика очень проста и позволяет исследовать социальное или половое поведение. Клетка разделяется прозрачной мелко-перфорированной перегородкой. С одной стороны перегородки помещается экспериментальное животное, а с другой сторо-

ны другая особь этого же (для изучения социальных контактов) или противоположного (для изучения репродуктивного поведения) пола. Регистрируют общее поведение животного, а также время, проведённое у перегородки, которое описывает степень мотивации и социального интереса.

Тест «Резидент-интродер»

Тест используется для исследования социального межсамцового поведения. Самцу, предварительно сидящему в изоляции и вследствие этого агрессивному, подсаживают партнера, после чего регистрируют весь спектр межсамцовых взаимодействий, таких как:

- социальный интерес – следование, приношение к партнеру, генитальный груминг;
- защитное поведение – побежки (как активное избегание партнера), замирание (пассивная реакция затаивания, страха);
- агрессивное поведение – угрозы, биение хвостом, нападения, толчки-отпихивания, погоня, агрессивный груминг, ходьба «шариком» и пр.;
- сопровождающее взаимодействие несоциальное поведение – автогруминг, исследование клетки, рытье подстилки.

Данный тест можно использовать при исследовании анксиолитических препаратов.

Тесты для оценки родительского поведения

Тесты с использованием лабиринтов. Помещая в один из рукавов Т-образного или Y-образного лабиринта запаховую метку детеныша, оценивают аттрактивность (привлекательность) детского запаха для матери.

Тест на «место предпочтения». Установка состоит из двух или трех камер. Автоматически регистрируются моменты перехода между частями, общее время нахождения в каждом отсеке, дви-

гательная активность и пройденный путь. Вариант протокола для исследования родительского поведения: предварительное содержание в четные дни матери с детенышем в левом отсеке, в нечетные дни – одной матери в правом отсеке прибора. Далее оценивается предпочтительное место нахождения самки в отсутствие детеныша.

12. Практические работы по изучению поведения животных с использованием тестовых установок

Работа № 1. Изучение общего уровня двигательной активности в тесте «Открытое поле».

Цель работы: определить уровень общей моторной (неспецифической) и исследовательской активности.

Материалы и оборудование: установка «открытое поле», спирт, вата, бумажные полотенца, крысы, секундомер.

Ход работы: перед началом тестирования установку тщательно протирают спиртом и высушивают бумажным полотенцем. Крысу помещают в центр «открытого поля» и запускают отсчет времени. Наблюдение за поведением животного длится в течение 5 мин. Горизонтальная (локомоторная) активность определяется по числу пересеченных квадратиков (квадратик считается пересеченным, если морда и 2 передние лапы животного пересекают одну из его сторон). Отдельно считается посещение квадратиков в центре и на периферии лабиринта. Подсчитывается количество вертикальных стоек (вставание на задние лапы в опорном и безопорном положении). Подсчитывается количество заглядываний в норки, расположенные на дне лабиринта, а также количество и время замираний. После этого определяется суммарная двигательная активность. Исследуемые показатели фиксируются каждую минуту и заносятся в табл. 9. После прекращения тестирования лабиринт протирается спиртом, и насухо вытирается бумажным полотенцем. После чего тестируется следующее животное. Эксперименты рекомендуется проводить в вечернее время суток, в промежутке между 16 и 18 часами.

Таблица 9. Показатели активности животных в лабиринте
«Открытое поле»

Время, мин	Параметры активности					
	Активность в центре	Активность на периферии	Вертикальные стойки	Заглядывания	Замирания	Суммарная активность
1						
2						
3						
4						
5						

На основе полученных результатов необходимо сделать заключение об изменении двигательной активности с течением времени в новой для животного обстановке.

Работа № 2. Влияние психостимуляторов на изменение общего уровня двигательной активности.

Цель работы: изучить влияние кофеина на уровень общей (неспецифической) моторной и исследовательской активности в тесте «Открытое поле».

Материалы и оборудование: установка «открытое поле», спирт, вага, бумажные полотенца, крысы, секундомер, 2 шприца, раствор кофеина, физиологический раствор.

Ход работы: исследование состоит из 2 экспериментальных серий. Поскольку введение фармакологических препаратов связано с проведением болезненных процедур, являющихся для животных значительным стрессом, первая экспериментальная серия является контрольной. В тесте «открытое поле» исследуется уровень двигательной и исследовательской активности крыс после

инъекции физиологического раствора. Инъекция производится внутривентриально, в объеме 0,1 мл. Методика регистрации активности полностью аналогична предыдущей работе. Вторая экспериментальная серия является опытной. Животным внутривентриально вводят раствор кофеина в количестве 10 мг/кг веса, после чего так же исследуют двигательную активность. Полученные результаты заносят в табл. 10.

Таблица 10. Показатели активности животных в лабиринте до и после инъекции кофеина

Время, мин	Параметры активности					
	Активность в центре	Активность на периферии	Вертикальные стойки	Заглядывания	Замирания	Суммарная активность
До инъекции кофеина						
После инъекции кофеина						

Работа № 3. Изучение уровня тревожности с использованием методики «крестообразный приподнятый лабиринт».

Цель работы: определить уровень тревожности и временную динамику тревожности у экспериментальных животных.

Материалы и оборудование: крестообразный приподнятый лабиринт, спирт, вата, бумажные полотенца, крысы, секундомер.

Ход работы: тестирование проводится в стандартных условиях в вечернее время в промежутке между 18 и 20 часами. Перед началом тестирования лабиринт тщательно протирают спиртом и высушивают бумажным полотенцем. Крысу помещают в центр

«лабиринта» располагая мордой в центр открытого рукава лабиринта и запускают отсчет времени. Наблюдение за поведением животного длится в течение 5 мин. В ходе эксперимента регистрируются следующие поведенческие показатели: исследовательская активность (число выходов в открытые рукава лабиринта, число вертикальных стоек); оценка риска (заглядывания вниз из открытых рукавов лабиринта, возврат в открытые рукава лабиринта, вытягивание на задних лапах без опоры); показатели тревожности (число выходов в открытые рукава лабиринта, длительность пребывания в открытых рукавах лабиринта, соотношение времени пребывания в открытых и закрытых рукавах, число пересечений центральной платформы, уринация, дефекация, груминг); двигательная активность (общее количество выходов в рукава лабиринта). Под выходом в открытый рукав лабиринта подразумевается любое передвижение по рукаву лабиринта, если при этом морда и 2 передние лапы животного пересекли условную линию между центральной платформой и рукавом. Стойкой считается приподнимание животного на задних лапах над уровнем пола с опорой о стенку закрытого рукава лабиринта. Заглядывания вниз регистрируются, если наблюдается пересечение всей мордой животного или какой-либо ее частью горизонтальной границы между краем рукава и его условным продолжением. Все показатели заносятся в табл. 11.

Таблица 11. Поведенческие показатели тревожности

Показатели тревожности				
Число выходов в открытые рукава лабиринта	Длительность пребывания в открытых рукавах	Соотношение времени пребывания в открытых и закрытых рукавах	Число пересечения центра платформы	Уринация, дефекация, груминг

Также описывают другие формы поведения в условиях тестовой площадки. Данные заносят в табл. 12.

Таблица 12. Поведенческие показатели других форм поведения

Показатели оценки риска			Показатели исследовательского поведения		Показатели двигательной активности
Возврат в открытые рукава лабиринта	Заглядывания вниз открытых рукавов лабиринта	Вытягивание на задних лапах без опоры на передние	Число выходов в открытые рукава	Число вертикальных стоек	Общее количество выходов в рукава

Работа № 4. Изучение процессов латентного научения в водном лабиринте Морриса.

Цель работы: определить скорость формирования пространственной памяти, и способность использовать полученный опыт для решения аналогичных задач в изменившейся обстановке.

Материалы и оборудование: крысы (или мыши) 5-6 шт, секундомер, емкость для водного лабиринта, термометр, теплая вода.

Ход работы: водный лабиринт Морриса на 0,4 м. бассейн заполнен замутненной водой, температура воды 24-26 °С. На дне бассейна на глубине 1,5 м от поверхности воды располагается невидимая для животного платформа диаметром 0,1 м. В помещении, где располагается лабиринт, должны находиться стационарные ключевые стимулы (шкаф, стеллаж, экспериментатор) для ориентации животного в бассейне относительно внешних зрительных сигналов. Животное отпускают в воду и включают секундомер. При первой попытке оно начинает хаотично плавать по бассейну, пока случайным образом не наткнется на платформу. После

того как животное выбралось на платформу секундомер останавливают, время заносят в таблицу. Далее животному дают 10-15 сек., чтобы осмотреться и сориентироваться в пространстве (определить место расположения платформы по внешним ориентирам). После этого животное снимают с платформы и повторно погружают в воду из того же места, что и в первой попытке, засекают время нахождения платформы во второй попытке. С увеличением количества попыток время прохождения лабиринта сокращается, что указывает на формирование пространственной памяти. Для оценки способности использовать полученный навык для решения аналогичных задач проводят следующий эксперимент. Изменяют место расположения платформы в лабиринте и определяют время, которое тратит животное на поиск платформы. Полученные результаты заносят в табл. 13.

Таблица 13. **Время формирования пространственного навыка в водном лабиринте Морриса**

Номер животного	Время поиска платформы до перестановки			Время поиска платформы после перестановки		
	Попытка 1	Попытка 2	Попытка 3	Попытка 1	Попытка 2	Попытка 3
1						
2						
3						
4						

Работа № 5. Многопараметрический метод определения тревожно-фобического статуса крыс или мышей.

Цель работы: оценить комплексную характеристику индивидуального тревожно-фобического уровня животного.

Материалы и оборудование: тест «Открытое поле», спирт, вата, бумажные полотенца, секундомер, крысы или мыши.

Ход работы: исследование проводят в открытом поле при электрическом освещении 3000 люкс в фиксированное время суток.

Тест 1. Латентный период спуска с высоты. Данный тест используется для оценки интенсивного оборонительного поведения у крыс. Крысы помещаются на пенал из непрозрачного материала размером 20x14x14 см и отмечается время спуска с пенала, когда крыса коснется всеми 4 лапами поля.

Тест 2. Латентный период прохождения через отверстие. Крыса помещается в прозрачный пенал, разделенный поперек на 2 отсека с отверстием 7x10 см в перегородке. Действие считается выполненным, когда крыса перелезает во 2 отсек двумя лапами. При наличии колебаний при выполнении действия, заглядывания в отверстие или начатый, но не заверченный перенос оценки на 0,5 балле.

Тест 3. Время выхода из домика. Животное помещается в домик из прозрачного плексигласа 16x15x12 см и выход на 15 мин закрывается заслонкой. Отчет 50 времени начинается с момента открытия выхода. В тестах 1-3 крысу из экспериментальной обстановки возвращали не ранее, чем через 20 мин после выполнения соответствующего действия или по истечению времени тестирования (180 с) в случае невыполнения действия. Интервалы между тестами не менее 15 мин.

Тест 4. Выход из центра открытого поля. Этот тест позволяет выявить реакции страха, связанные со снижением двигательной активности. Тестирование начинают с помещения крысы в центр поля и с этого момента фиксируют время, за которое животное посещало все центральные сектора.

По тестам 1-4 оценки выставлялись в соответствии со шкалой

№ теста	Время выполнения, сек	Оценки
1	0-30	0
	30-60	1
	60-180	2
	не спуск за 180	3

Окончание таблицы

2	0-30	0
	30-60	1
	60-180	2
	не выход за 180	3
3	0-15	0
	15-30	1
	30-180	2
	свыше	3
4	0-15	0
	15-30	1
	30-60	2
	свыше	3

Тест 5. Пячение. Оценка функционирования реакции пячения спонтанно и при резкой смене освещенности в обстановке открытого поля. Через 180 с после момента помещения животного в поле, освещенность резко меняют: выключают яркий свет и простую лампу на 60 с, затем восстанавливают освещенность. За 300 с наблюдения определяют измеренное расстояние в секторах, на которое пятилось животное. Пячение отсутствует – 0 баллов, на полсектора – 1 б., до 2 сектора – 2 б., более 2 секторов – 3 б.

Тест 6. Пячение-2. Попытка экспериментатора взять животное на руки. Оценивается также.

Тест 7. Реакция вокализации.

Тест 8. Реакция затаивания. Животное замирает в напряженной позе на выпрямленных лапах или, прижимаясь к полу, иногда с прижатыми ушами и закрытыми глазами.

Тест 9. Прижатие ушей. Тесты 6-9 осуществляют путем постепенного приближения руки экспериментатора со стороны морды так, чтобы крыса видела руку. Приближение руки к животному осуществляется 2-3 раза подряд. Оценка: 0 б. – реакция отсутствует; 1 б. – реакция при поглаживании; 2 б. – реакция при приближении руки; 3 б. – реакция сохраняется после удаления руки. При наличии спонтанных реакций по тестам 7-9 за каждый добавляют по 3 балла дополнительно. Далее высчитывают суммарную оценку по всем тестам, по которой судят об общем уровне тревожности (интегральный показатель тревожности ИПТ)

Работа № 6. Экстраполяционное избавление.

Цель работы: оценка когнитивных способностей крыс в острой эвристической ситуации.

Материалы и оборудование: установка «экстраполяционное избавление», секундомер.

Ход работы: процедура тестирования делится на три основных этапа: 1. посадка животного в цилиндр; 2. регистрация поведения; 3. вынимание животного из установки. Посадка животного в установку – очень важный этап эксперимента. Стресс, вызванный неправильной посадкой (сильным захватом животного, попытками фиксировать задние лапы и т.д.), может повлиять на поведение животных не меньше, чем любое психотропное вещество! Поэтому перед началом эксперимента внимательно посмотрите видеозапись, желательно при замедленном воспроизведении, обращая внимание на момент посадки животного. Крысу необходимо аккуратно поместить в воду, опустив ее внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Для этого спокойно возьмите животное правой рукой полным хватом за плечевой пояс и шею. Второй рукой можно взять хвост и направить его внутрь цилиндра (или вложить в правую руку и прижать мизинцем – тогда задние лапки немного поднимутся вверх и животное будет посажено в цилиндр чуть спиной, не цепляясь задними лапами за край цилиндра). Вынимать животное из воды (внешней емкости) следует сразу после подныривания (если, конечно, не стоит иных задач). Основные формы поведения в тесте:

- начальное замирание (а);
- аверсивные реакции:
 - прыжки внутри цилиндра (b);
 - подныривание под край цилиндра (с);
- иммобильность

Регистрируемые параметры:

- латентный период начала аверсивных реакций после посадки в установку;
- число прыжков за тестовый период;
- латентный период подныривания.

Время тестирования: вплоть до подныривания (но не более 2-х минут). По результатам исследования разделите исходную

группу животных на 2 подгруппы по способности решить экстраполяционную задачу.

Работа № 7. Изучение исследовательского поведения крыс разного возраста.

Цель работы: оценить уровень исследовательского поведения у крыс на разных стадиях онтогенеза.

Материалы и оборудование: установка «открытое поле» со сменным полом (размеры квадратов должны быть пропорциональны длине тела опытных животных), секундомер, крысы разного возраста, содержащиеся в обычных условиях.

Ход работы: крыс разного возраста поочерёдно помещают в один из углов установки «открытое поле» и дают им возможность свободно передвигаться в ней в течение 5 мин. Регистрируют такие формы исследовательского поведения как горизонтальная двигательная активность (ГДА), путем подсчета количества квадратов на которые вступает животное обеими передними лапами, а так же вертикальная двигательная активность (ВДА), представленная двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (Climbing) или остаются на весу (Rearing). Результаты тестирования заносят в табл. 14.

Таблица 14. **Исследовательская активность крыс разного возраста**

Возраст и номер животного		Регистрируемые показатели		
		ГДА	ВДА	
			Climbing	Rearing
	1			
	2			
	3			
Среднее по группе				
	1			
	2			
	3			
Среднее по группе				

Проанализируйте полученные результаты и сделайте заключение о выраженности исследовательской активности у крыс разного возраста.

Работа № 8. Определение формирования поведенческих стратегий у крыс.

Цель работы: изучить стратегии поведения животных в процессе реализации поведенческой задачи.

Материалы и оборудование: установка «двенадцатилучевой радиальный лабиринт», секундомер.

Ход работы: провести тестирование крыс в двенадцатилучевом радиальном лабиринте и определить, какую поведенческую стратегию из трёх возможных реализует каждое животное при поиске пищи. Первая – использование когнитивных карт местности, вторая – поиск опорных внешних ориентиров, третья – поиск на основе последовательности собственных двигательных реакций. Сравнить поведенческие стратегии самок и самцов.

13. Способы моделирования некоторых физиологических и патологических состояний у животных

1. Моделирование депрессии, тревоги и эмоционального стресса на животных

Модель выученной беспомощности. Стимулируют разрядом электрического тока лапы грызунов до тех пор, пока они не прекращают попыток вырваться из неприятной ситуации.

Водно-иммерсионная модель. Крыс помещают в узкие пеналы, зафиксированные на общей платформе, которую ставят в ванну с водой так, чтобы крыса была погружена в неё до головы в положении на спине. В таком положении крысы остаются в прохладной воде (+16 °С) на протяжении 1 часа, после чего их тщательно высушивают и переносят в клетки.

Острый иммобилизационный стресс. Животных подвергают полному обездвиживанию в специальных пеналах на срок от 1 до 4 часов однократно или до 30 суток.

Острый гипоксический стресс. Животных помещают в герметичную камеру объёмом 0,5 л на 30 минут.

Фармакологическая модель. Животным однократно, внутрибрюшинно вводят раствор резерпина в дозе 5 мг/кг.

Модель стресса социального поражения. Некрупного самца подсаживают в клетку к более крупному и агрессивному самцу, провоцируя схватку между ними.

Модель пренатального стресса. Беременную самку с 15 по 19 день беременности подвергают ежедневной 60-минутной иммобилизации в пластиковых пеналах

Модель стресса раннего периода жизни. Детёныша отделяют от матери на 1-24 ч в сутки в течение первых двух недель жизни.

Модель хронического лёгкого стресса. Воздействие на животное в течение не менее 2 недель серией лёгких и непредска-

зуемых стрессорных факторов: периоды лишения пищи или воды, небольшое повторяющееся снижение температуры окружающей среды и т.д.

Модель эмоционального стресса «дефицита времени». Крыса помещается в спиралевидно расположенный тоннель (пластиковая ёмкость объемом 65 литров: высота 55 см, диаметр 40 см, широкий прозрачный гофрированный полиуретановый шланг диаметром 10 см, который располагается по спирали и крепится вокруг емкости. Нижнее отверстие шланга плотно закрывается пробкой. Внутри широкого шланга на всем протяжении располагают узкую полиуретановую трубку диаметром 1 см для подачи холодной воды), после чего его отверстие закрывают и начинают подавать холодную воду. Стрессовая ситуация формируется за счет того, что животное, стремясь избежать контакта с водой, вынуждено перемещаться вверх по установке и, находясь в закрытом пространстве, не может избежать ситуации, в которой оказалось.

Модель экспериментального аналога посттравматического стрессового расстройства. Крыс подвергают тяжелому комбинированному стрессу, состоящему из следующих друг за другом 2-х часовой иммобилизации в пеналах, 20-ти минутного вынужденного плавания в воде при $t = 24-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ и, после 15-ти минутного перерыва и обсыхания, эфирного стресса до потери сознания. Триггером для развития реактивного патологического состояния является рестресс, который представляет собой 30-ти минутную иммобилизацию через 7 дней после комбинированного стресса.

2. Моделирование алкогольной зависимости

Модель добровольного потребления алкоголя. Животным предоставляется свободный доступ к двум поилкам, одна из которых содержит воду, а другая – 9-10 % раствор этанола.

Модель вынужденного потребления алкоголя. Животным вместо воды в поилки заливается раствор этанола (12-15 %), который они потребляют на протяжении 7-28 дней.

Модель алкогольной депривации. Период свободного доступа к алкоголю у животных чередуют с периодами его лишения.

3. Моделирование нарушения биоритмов

Хроническая световая экспозиция. Животных помещают в условия круглосуточного освещения (300 Лк) на срок от 7 дней.

Хроническая световая депривация. Животных помещают в условия полной темноты на срок от 7 дней.

Депривация сна. Животное помещают на платформу, диаметр которой мал по сравнению с размером животного (примерно, 7 см для взрослых крыс). Платформу располагают в воде, так чтобы край воды не доходил до края платформы на 1 см

14. Примерный перечень научно-исследовательских работ с использованием основных поведенческих методик

1. Изучение влияния на поведение животных ноотропных препаратов («Семакс», «Тенотен», «Пирацетам», «Глицин» и т.д.).
2. Изучение влияния на поведение средств, использующихся при наркозе.
3. Изучение влияния на поведение различных препаратов на основе растительного сырья (гинко билоба, эхиноцея, Melissa).
4. Изучение некоторых компонентов целостного поведения животных после различных операций (кастрация, овариоэктомия, адреналэктомия, тимэктомия и т.д.).
5. Изучение влияния некоторых препаратов, имеющих гормональную активность, на особенности поведения грызунов (тестостерон, эстроген, окситоцин, тироксин, адреналин, прогестерон).
6. Изучение особенностей поведения самок крыс в зависимости от фазы эстрального цикла.
7. Изучение особенностей поведенческих реакций животных, подвергавшихся разным формам стресса (иммобилизационный стресс, температурный стресс, болевой стресс, эмоциональный стресс, социальная депривация и т.д.)
8. Особенности поведенческого статуса крыс при введении алкоголя.
9. Особенности поведения животных при разных типах пищевых рационов.
10. Особенности влияния вновь синтезированных химических веществ на поведенческий статус животных.
11. Изменение некоторых компонентов поведения в онтогенезе.

Список литературы

1. Батуев, А.С. Высшая нервная деятельность: учебник для вузов / А.С. Батуев. – Москва: Высшая школа, 1991. – 256 с.
2. Гамбарян, П.П. Крыса / П.П. Гамбарян, Н.М. Дукельская. – Москва: Современная наука, 1955. – 254 с.
3. Григорьян, Г.А. Общая когнитивная способность. Некоторые новые подходы к её исследованию у мышей / Г.А. Григорьян // Журнал высшей нервной деятельности, 2004. – № 6. – С. 842-850.
4. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. – Киев: «Вища школа», 1974. – 304 с.
5. И.П. Павлов об опытах на животных / Р.А. Копаладзе // Успехи физиологических наук, 1999. – № 3. – С. 103-107.
6. Исследование гематологических показателей крыс в норме и в условиях термического воздействия / А.К. Ажикова, Г.Ф. Журавлёва // Современные проблемы науки и образования. 2016. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24350> (дата обращения: 17.09.2020).
7. Ковалевский, К.Л. Лабораторное животноводство / К.Л. Ковалевский, А.И. Метелкин. – Москва: Медгиз, 1958. – 324 с.
8. Кожевников, С.П. Физиология высшей нервной деятельности и поведения: Руководство к лабораторным занятиям / С.П. Кожевников, Н.А. Худякова. – Ижевск: Удмуртский университет, 2012. – 120 с.
9. Лейн-Петтер, У. Обеспечение научных исследований лабораторными животными / У. Лейн-Петтер. – Москва: Медгиз, 1964. – 194 с.
10. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований / З.К. Бландова [и др.]. – Москва, 1983. – 192 с.
11. Модель эмоционального стресса «дефицита времени» / Е.А. Гусакова, И.В. Городецкая // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2019. – С. 8-13.

12. Ноздрачев, А.Д. Анатомия крысы / А.Д. Ноздрачев, Е.Л. Полякова. – СПб.: Лань, 2001. – 464 с.

13. Образование и обучение в науке о лабораторных животных (Европейские инициативы) / Р. Фоссе // Лабораторные животные. 1991. – № 1. – С. 39-45.

14. Особенности формирования тревожно-депрессивного состояния в экспериментальной модели посттравматического стрессового расстройства у пренатально стрессированных самцов крыс / Н.Э. Ордян, И.В. Смоленский, С.Г. Пивина [и др.]. // Журнал высшей нервной деятельности, 2013. – № 2. – С. 280-289.

15. О крысах и мышах / Е.В. Котенкова [и др.]. – Москва: Наука, 1989. – 176 с.

16. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А.В. Амикишиева // Вестник ВОГиС. 2009. – №3. – С. 529-542.

17. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Приказ № 755 Министерства Здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г.

18. Применение теста «Принудительное плавание» при проведении доклинических исследований / М.А. Ковалёва, М.Н. Макарова // Международный вестник ветеринарии. 2015. – № 4. – С. 90-95.

19. Проблемы биоэтики в современной физиологии / К.П. Иванов // Успехи физиологических наук. 2002. – ISSN 0301-1798. – №3. – С. 97-110.

20. Работа с лабораторными животными в контексте биоэтики – история, современность, перспективы / Р.А. Копаладзе // Успехи физиологических наук. 2004. – № 2. – С. 92-109.

21. Регламентация экспериментов на животных – этика, законодательство, альтернативы / Р.А. Копаладзе // Успехи физиологических наук. – 1998. – № 4. – С. 74-89.

22. Сепп, Е.К. История развития нервной системы позвоночных / Е.К. Сепп. – Москва: Медгиз, 1959. – 427 с.

23. Современные методы и оборудование для оценки поведения лабораторных животных (обзор) / С.В. Нотова, Т.В. Казакова, О.В. Маршинская // Животноводство и кормопроизводство. 2018. – №1. – С. 106-113.

24. Современные экспериментальные модели депрессии / Н.А. Язуина, Ю.К. Комлева, А.Б. Салмина [и др.] // Биомедицина. – 2013. – №1. – С. 61-77.
25. Суева, Л.И. Крыса – наш многоликий сосед и враг / Л.И. Суева [и др.]. – Минск: Наука и техника, 1991. – 59 с.
26. Тревожное поведение крыс и его зависимость от режимов освещённости / С.К. Касимова // Современные проблемы науки и образования. 2006. – № 2. – С. 45-47.
27. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: справочник / Т.В. Абрашова, Я.А. Гушин, М.А. Ковалева [и др.]. – Санкт-Петербург: Издательство «ЛЕМА», 2013. – 116 с.
28. Филимонов, И.Н. Сравнительная анатомия коры большого мозга млекопитающих / И.Н. Филимонов. – Москва: АМН СССР, 1949. – 263 с.
29. Хамилтон, Л.У. Основы анатомии лимбической системы крысы / Л.У. Хамилтон. – Москва: Издательство МГУ, 1984. – 183 с.
30. Циркин, В.И. Физиологические основы психической деятельности и поведения человека / В.И. Циркин, С.И. Трухина. – Москва: Медицинская книга, 2001. – 524 с.
31. Animals (Scientific procedures). Act 1986: Training course for applicants for licences / Training School University Biomedical Support Services Greemwich House Madingley Rise Cambridge, CB3 0HA. 1986. – Module 1. – 46 p.
32. Animals (Scientific procedures). Act 1986: Training course for applicants for licences / Training School University Biomedical Support Services Greemwich House Madingley Rise Cambridge, CB3 0HA. 1986. – Module 2. – 29 p.
33. Animals (Scientific procedures). Act 1986: Training course for applicants for licences / Training School University Biomedical Support Services Greemwich House Madingley Rise Cambridge, CB3 0HA. 1986. – Module 3. – 46 p.
34. Animals (Scientific procedures). Act 1986: Training course for applicants for licences / Training School University Biomedical Support Services Greemwich House Madingley Rise Cambridge, CB3 0HA. 1986. – Module 4. – 54 p.

35. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes / K. Diehl, B. Morton [et al.] // *Journal Appl Tox.* 2001. – №1. – P. 15-23.
36. A parametric analysis of the growing CFHB (Wistar) rat / A.H. Pullen // *Journal Anat.* 1976. – 121(Pt 2). – P. 371-383.
37. An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis / A. Garthe, G. Kempermann // *Frontiers Neuroscience.* 2013. – V. 7. – doi.org/10.3389/fnins.2013.00063.
38. Alternatives to animal testing / S. K. Doke, S.C. Dhawale // *Saudi Pharm Journal.* 2015. – № 3. – P. 223-229.
39. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice / Matthew W. Pitts // *Bio Protoc.* 2018. – 8 (5). – doi.org/10.21769/bioprotoc.2744.
40. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques / M.W. McGill, A.N. Rowan // *ILAR Journal.* 1989. – 31 (4). – P. 5-20.
41. Clinical and anatomic pathology effects of serial blood sampling in rat toxicology studies, using conventional or microsampling methods / A. Caron, T. Bartels [et al.] // *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015. – 72 (3). – P. 429-439.
42. Dorothy Hegarty and founding of FRAME: a personal recollection / T. Hegarty // *ATLA.* 1995. – V. 23. – P. 15-17.
43. Education and training a basis for the introduction of the Three Rs alternatives into animal research / Van Zutphen B.F.M., Van der Valk J.B.F. // *ATLA.* 1995. – V. 23. – P. 123-128.
44. First European Commission report on statistic of animal use / D.W. Straughan // *ATLA.* 1994. – V.22. – P. 289-292.
45. Introducing INVITTOX: the ERGATT/FRAME in vitro toxicology data bank / M. Warren, K. Atkinson, S. Steer // *ATLA.* 1989. – V. 16. – P. 332-343.
46. Repeated blood collection from tail vein of non-anesthetized rats with a vacuum blood collection system / W. Zou, Y. Yang [et al.] // *Journal Vis Exp.* 2017. – <https://doi.org/10.3791/55852>.
47. Reducing blood volume requirements for clinical pathology testing in toxicologic studies-points to consider / F. Poitout-Belissent, A. Aulbach [et al.] // *Vet Clin Pathol.* 2016. – 45 (4). – P. 534-551.

48. Recent developments in laboratory animal science // Animal experimentation: improvements and alternatives / J. Remfry // Suppl. to ATLA. 1985. – P. 25-30.

49. The EU target for a 50 % reduction in use of experimental animals by the year 2000 - what does it mean? / D.W. Straughan // ATLA. 1995. – V. 23. – P.262-263.

50. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior / R.Yankelevitch-Yahav, M. Franko [et al.] // Journal of Visualized Experiments. 2015. – doi.org/10.3791/52587.

51. The fund for the replacement of animal in medical experiments (FRAME): the first 25 years / B. Annett // ATLA. 1995. – V.23. – P. 19-32.

52. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior / Ann-Katrin Kraeuter, Paul C. Guest, Zoltán Sarnyai // Methods Mol Biol. 2019. – doi.org /10.1007/978-1-4939-8994-2_9.

53. ZEBET's data bank and information service on alternatives to the use of experimental animals in Germany / H. Spielmann, B. Grune-Wolff. [et al.] // ATLA. 1992. – V.20. – P. 362-367.

54. Todd D. Gould. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice / Todd D. Gould, David T. Dao, Colleen E. Kovacsics. – LLC, 2009. – 327.

55. Animals (Scientific procedures). Act 1986: Training course for applicants for licences / Training School University Biomedical Support Services Greenwich House Madingley Rise Cambridge, CB3 OHA. 1986. – Module 1. – 46 p.

Учебное издание

*Беляков Владимир Иванович,
Инюшкина Елена Михайловна,
Громова Дарья Сергеевна,
Инюшкин Алексей Николаевич*

**ЛАБОРАТОРНЫЕ КРЫСЫ:
СОДЕРЖАНИЕ, РАЗВЕДЕНИЕ
И БИОЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ
ПО ФИЗИОЛОГИИ ПОВЕДЕНИЯ**

Учебное пособие

Редактор И.П. Ведмидская
Компьютерная верстка И.П. Ведмидской

Подписано в печать 19.05.2021. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Печ. л. 6,0.
Тираж 25 экз. Заказ . Арт. – 5(Р2У)/2021.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.П. КОРОЛЕВА»
(САМАРСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)
443086, Самара, Московское шоссе, 34.

Издательство Самарского университета.
443086, Самара, Московское шоссе, 34.

