

## Верификация теста «Приподнятый крестообразный лабиринт»

### Животные

Для данного эксперимента необходимо использовать только интактных животных (не использованных ранее в иных экспериментах). Самцы крыс или мышей - предпочтительнее, чем самки.

Контрольная и опытная группы должны быть составлены не менее, чем из 6 - 8 животных. Плюс к этому, необходимо иметь 1-2 животных для «нулевой» группы (см. ниже).

Животные всех групп должны находиться и содержаться в одинаковых условиях.

### Тестовый препарат

В качестве тестового препарата целесообразно использовать бензодиазепиновые транквилизаторы в неседативных дозах.

Для примера рассмотрим *Феназепам* — первый отечественный транквилизатор бензодиазепиновой группы. *Феназепам* в таблетках (готовую лекарственную форму\*, содержащую 0,5 мг (0,0005 г) действующего вещества) лучше всего приобрести в аптеке, поскольку у чистого вещества, например, фирмы Sigma, имеется существенный недостаток — практически полная нерастворимость в воде.

Доза препарата для внутривенного (в/в) введения — 0,25 мг/кг.

**Важно!** Самостоятельно делить таблетку 0,5 мг на две части допускается только в том случае, если на таблетке данного производителя есть четкая риска. Если риски нет, значит производитель не отвечает за равномерное распределение действующего вещества в таблеточной массе. В этом случае целесообразно использовать всю таблетку целиком и разводить в двукратном объеме физиологического раствора.

Разводить препарат требуется перед началом эксперимента, *ex tempore*.

Таблеточную массу *Феназепам* необходимо тщательно растолочь в ступке и необходимое ее количество (соответствующее 0,25 мг действующего вещества) развести в 2 мл физиологического раствора. Инъекции проводят из расчета 2 мл получившегося раствора — на 1 кг массы крыс<sup>\*\*</sup>. Для экспериментов на мышах целесообразно развести это же количество таблеточной массы *Феназепам* в 10 мл физиологического раствора - на 1 кг массы мышей. Исходя из данного разведения препарата на каждые 100 гр массы крысы необходимо ввести 0,2 мл раствора, а на каждые 10 гр мыши — 0,1 мл получившегося раствора *Феназепам*.

При растворении таблеточной массы допускается использование Твина-80.

### Процедура эксперимента

1. За 24 часа животных опытной и контрольной групп, находящихся в домашних клетках, необходимо перенести из вивария в помещение, где будет проходить эксперимент. Животных необходимо взвесить и пометить как минимум за 24 часа до эксперимента.
2. Непосредственно перед тестированием животных контрольной и опытной групп, в ПКЛ помещают животное «нулевой» группы и дают ему свободно исследовать установку в течение 5 минут. Это необходимо для уравнивания условий тестирования (по запаховым меткам) между первым и последующими животными, оказавшимися в условиях лабиринта. В «нулевой» группе может быть не одно, а два животных, которых помещают в лабиринт последовательно (каждого — на 5 минут). После «нулевого» животного лабиринт протирают или моют стандартным методом (тем, который будет использоваться во время эксперимента).
3. Тестирование животных в ПКЛ проводят через 30 мин после инъекции **Феназелама**. **Важно! Сразу после инъекции, животных необходимо отсаживать в индивидуальные камеры (клетки)**. Рассадка необходима для предотвращения стресса, вызванного влиянием транквилизатора на характер зоосоциальных взаимодействий и изменением вследствие этого ранговой структуры группы.

Целесообразно делать инъекции препарата или физиологического раствора с определенным интервалом между животными. В **Приложении** находится схема эксперимента, рассчитанная на одного исследователя, который проводит и инъекции, и поведенческое тестирование «ручным» способом. Для оптимизации эксперимента мы рекомендуем использовать программу PlanTimer, находящуюся в составе пакета программ RealTimer.

4. Животное помещают в центр ПКЛ, носом к открытому рукаву. Время тестирования животных в ПКЛ обычно составляет 3-5 минут. Основные параметры, которые необходимо зарегистрировать в процессе тестирования, приведены в таблице (ниже).  
Рекомендации в таблице ориентированы на ручную регистрацию поведения. При использовании видеотрекинга перечисленные в таблице параметры, за исключением стоек и груминга, при правильной настройке программы регистрируются автоматически. В любом случае для повышения точности результатов исследования мы рекомендуем сначала делать видеосъемку эксперимента, а затем анализировать видеозапись.

Название параметра		Поведение	Как регистрировать	Комментарии
Двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Стойки с опорой передними лапами на стенки закрытых рукавов (Climbing);  Стойки без опоры передними лапами на стенки закрытых рукавов (Rearing).	Отмечать каждую стойку  Отмечать каждую стойку	
	Горизонтальная двигательная активность	Передвижение животного горизонтально на всех четырех лапах	Отмечать число пересеченных квадратов <u>во всех рукавах, включая центральную зону</u>	Удобно отслеживать перемещение <u>задних лап</u> животного: с центра одного квадрата до центра следующего (чтобы не путать с поведением «вытягивания»)
Время пребывания в закрытых рукавах		Животное целиком находится в закрытом рукаве: перемещается по полу рукава, встает на задние лапы, обнюхивает пол и стенки рукава, умывается, сидит неподвижно, иногда выглядывает в центр арены (при этом задние лапы находятся в закрытом рукаве)	Отмечать время захода животного в закрытый рукав (по задним лапам) и время выхода из рукава (по задним лапам).	В процессе обработки данных можно вычленить дополнительный параметр: число посещенных закрытых рукавов
Время пребывания в открытых рукавах		Животное целиком находится в открытом рукаве: перемещается по полу рукава, встает на задние лапы, свешивается с рукава, обнюхивает пол и низкие бортики рукава, умывается, сидит неподвижно.	Отмечать время захода животного в открытый рукав (по задним лапам) и время выхода из рукава (по задним лапам).	В процессе обработки данных можно вычленить дополнительные параметры: число посещенных открытых рукавов, число «свешиваний», длительность и характер груминга и т.п.
Время пребывания в центральной зоне		Животное целиком находится в центральной зоне (все 4 лапы — внутри центрального квадрата)	Отмечать время захода животного в центральную зону (по задним лапам) и время выхода из центральной зоны (по задним лапам).	

5. Для анализа видеозаписи (а также для регистрации поведения непосредственно во время тестирования) мы рекомендуем использовать компьютерный видеотрекинг или, если это затруднительно, пакет программ RealTimer.

Обратите внимание, что при создании списка команд в RealTimer (программа «Регистрация поведения») в параметрах: «посещение закрытого рукава», «посещение открытого рукава» и «посещение центральной зоны» можно выставить опции «Измерять интервал между нажатиями (Toggle)» и «Завершать все другие интервалы». Тогда при перемещении животного между зонами лабиринта будет достаточно нажимать клавишу только один раз при входе в зону, а одновременный выход из другой зоны будет регистрироваться автоматически. При этом сохранится возможность нажимать любые другие клавиши (для регистрации двигательной активности) во время пребывания животного в рукаве.

6. После тестирования в ПКЛ животных возвращают обратно, каждого в свою камеру, вплоть до прекращения действия препарата (1,5 — 2 часа с момента инъекции).

### **Результаты эксперимента**

В стандартных условиях тестирования (закрытые рукава — затемнены, открытые — освещены) контрольные животные избегают выходить в открытые рукава, а в случае выхода — находятся на них короткое время.

Животные, получившие *Феназепам*, достоверно дольше находятся на открытых рукавах лабиринта.

**Важно!** Вывод о транквилизирующей активности *Феназепама* можно сделать только при условии ненарушенной моторики животных, иными словами, если нет достоверных отличий между группами по показателям вертикальной и горизонтальной двигательной активности. В случае, если животные, получившие *Феназепам*, имеют более низкую, чем контрольные, общую двигательную активность, в первую очередь стоит искать причину в превышении дозы препарата.

### **Дальнейшее использование животных, участвующих в эксперименте**

Животных, участвующих в данном эксперименте, не следует повторно тестировать в условиях ПКЛ ранее, чем через 28 суток. Для проведения повторного тестирования установка ПКЛ должна быть перенесена в другое помещение.

Через 7 дней после эксперимента возможно проведение иных тестов, например, тест «Открытое Поле», водные тесты.

## Примечания

\* Ампульную форму *Феназелама* использовать не рекомендуется, поскольку, помимо действующего вещества, в состав раствора входят вспомогательные вещества: *повидон (поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский)* — 9 мг; *глицерол (глицерин)* — 100 мг; *натрия дисульфит (пиросульфит натрия)* — 2 мг; *полисорбат 80 (твин 80)* — 50 мг; *раствор натрия гидроксида (натр едкий) 1 М* — до pH 6–7,5; *вода для инъекций* — до 1 мл). И именно такой раствор в этом случае будет необходимо ввести контрольным животным.

\*\* Поскольку в экспериментах участвуют как минимум 6 крыс массой от 250 грамм, общая масса животных будет превышать 1 кг. Имеет смысл сразу разводить не ½, а целую таблетку *Феназелама*. Это удобно еще и потому, что разведение препарата «с избытком» страхует от последствий «форс-мажорных» ситуаций, возникающих в ходе эксперимента.

## Приложение. Схема эксперимента

№ животного	Время инъекции, мин	Время тестирования в ПКЛ, мин	Уборка ПКЛ, мин	
1	00-01	31-35	35-36	=1 мин
2	06-07	36-40	40-42	=2 мин
3	12-13	42-46	46-48	=2 мин
4	18-19	48-52	52-54	=2 мин
5	24-25	54-60	60-62	=2 мин
6	30-31	60-64	64-66	=2 мин

Предложенная схема является простой и позволяет провести минимальный эксперимент (на 6 животных). Общее время эксперимента — 66 минут.

Для полноценного эксперимента с участием 12 животных необходимо провести два минимальных эксперимента.

**Важно!** Следует чередовать контрольных и опытных животных, например №1 - инъекция физиологического раствора, № 2 — инъекция препарата и т. д.