



Rus-LASA
НП «ОБЪЕДИНЕНИЕ
СПЕЦИАЛИСТОВ
ПО РАБОТЕ С
ЛАБОРАТОРНЫМИ
ЖИВОТНЫМИ»



МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени
М.В.ЛОМОНОСОВА

Подходы к планированию поведенческого эксперимента

Ловать Максим Львович

Руководитель испытательного центра
«Виварно-экспериментальный комплекс
ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»»,
ст. преп. каф. физиологии человека и животных
биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова

*Конференция «GLP-planet»,
30 июня – 1 июля 2020.*

Входит ли поведение в исследования по НЛП?

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. М., ЗАО «Гриф и К», 2012:

Доклинические исследования эффективности лекарственных средств (**не безопасность**)

НО: с 2021 года регистрация лекарственных средств по национальным требованиям будет заменена на требования Евразийский экономического союза (ЕАЭС, Решение ЕЭК № 78 и Решение № 81).

Рекомендация Коллегии ЕЭК №10 от 21 мая 2020г. П.29, для хронической токсичности: «контролировать потребление корма, общее поведение, массу тела» **Значит, нужно?**



Поведение вручную?...
Компьютеризированные системы!



КС



Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 81:

111. Для физических и химических систем инспектор должен проверить:

...б) регистрацию в автоматических системах **первичных данных, полученных в виде графиков**, кривых самописца или компьютерных распечаток;

118. Инспектор должен проверить:

з) надежность, точность и валидацию **компьютеризированных систем**, использованных в исследовании;

ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики

3.4.2 Должно быть предусмотрено периодическое техническое обслуживание **оборудования**, используемого в исследовании, включая регулярный периодический осмотр, уход, калибровку и **поверку** в соответствии со стандартными операционными процедурами. Эти работы должны сопровождаться соответствующими **записями**.

Может ли быть ретроспективной?

2. Ретроспективная оценка

Если для уже использованной системы необходимость соблюдения требований Правил не была предусмотрена или указана, должно быть в наличии документальное обоснование возможности использования такой системы, которое должно включать в себя ретроспективную оценку, используемую для валидации (определения пригодности) системы.



ГОСТ 31884-2012 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Соответствие поставщиков испытательного центра Принципам GLP

- 2.5.1 Все компьютерное программное обеспечение, в том числе полученное от иностранных поставщиков, как правило, должно пройти **приемочное испытание перед началом его эксплуатации** в испытательном центре. Это требование означает необходимость официальной валидации программного обеспечения ...

Валидация, значит, должна быть проведена до эксперимента

Валидация [validation] —

проверка соответствия данных, получаемых в процессе имитации, реальному ходу явлений



валидация подтверждает, что «вы **создали правильный** продукт»,

верификация подтверждает, что «вы создали продукт так, как и **намеревались** это сделать».

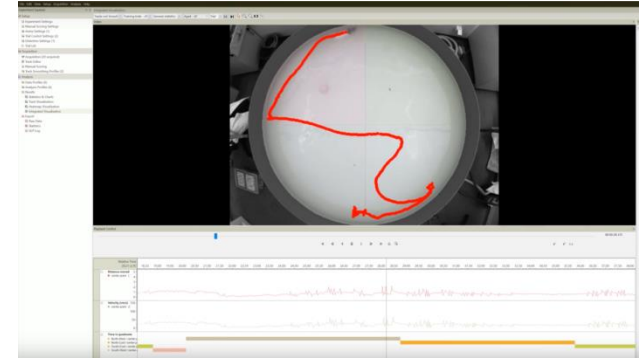
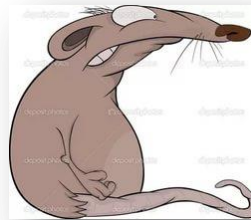
квалификация - действия, которые подтверждают, что конкретное оборудование **работает** правильно и действительно приводит к ожидаемым результатам.

Решение №081 «Под валидацией системы понимают проверку и документальное подтверждение **пригодности** систем своему назначению.»

ГОСТ Р ИСО 9000-2001,

3.8.5 **валидация** - подтверждение на основе представления объективных свидетельств (3.8.1) того, что требования (3.1.2), предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены, декларируемые свойства и **характеристики подтверждаются**, а **поставленная цель** (предназначение системы, комплекса, устройства и т. д.) **достигнута**.

Что именно подлежит проверке при тестировании поведения?



1. Диагностический тест

2. Модельный организм (тест-система)

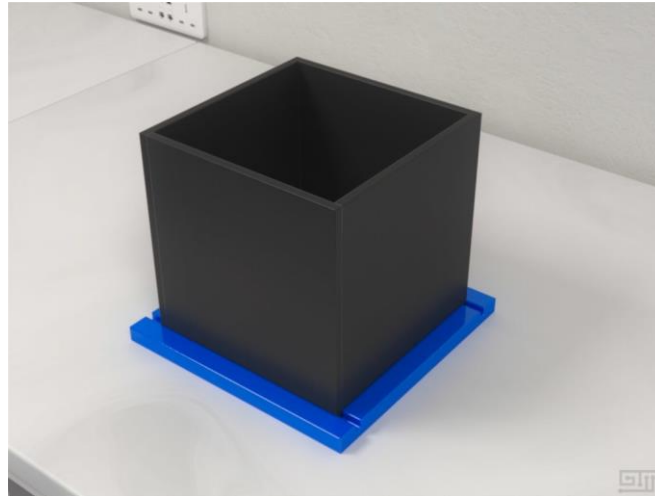
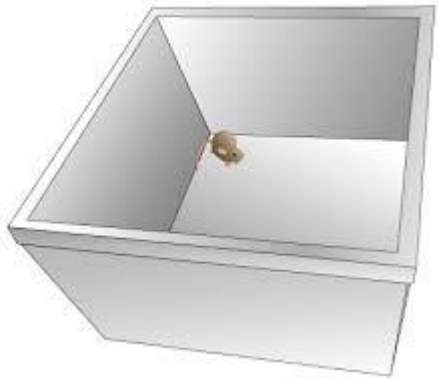
3. Эксперимент

- (от лат. experimentum — проба, опыт) - метод исследования некоторого явления в управляемых наблюдателем условиях

= надежное получение первичных данных (для КС это электронные данные)!

1. Диагностический тест например, “Открытое поле”

Выбираем вид теста



Фиксируем условия валидации (при изменении - новая валидация)



согласно СОП № 34И:

- тест ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ, серый, с норками, (НПО «Открытая наука», TS0501-RG, TS0501-MG)
- арена стоит на полу в центре комнаты 12 м² с серыми стенами
- освещенность с потолка, равномерный верхний свет 800-850 Лк, теплый спектр
- **Уровень шума 50-60 Дб, в диапазоне 10 гц – 100 кгц, без пиков в спектре.**
- Камера в 2 м над центром арены
- запись с частотой 15 кадров в секунду, в течение 5 минут программой «Noldus Ethovision XT 14»

Уровни инфразвука, дБ, в октавных полосах частот (2, 4, 8, 16) Гц и максимальный уровень инфразвука										Эквив. уровень звука Leq, дБА
2	4	8	16	R _{max}	L _{max}	L _{max}	L _{pk}			
Чистая зона, экспериментальная комната.										
72	64	63	57	82		56	51	72	50	
Уровни звукового давления, дБ, в октавных полосах частот со среднегеометрическими частотами, Гц										Уровень звука, дБА
31,5	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000		
Чистая зона, экспериментальная комната. Тон 100 Гц.										
52	45	53	51	51	43	35	28	20	50	
Уровни ультразвука, дБ, в третьоктавных полосах частот со среднегеометрическими частотами, кГц										100 кГц
12,5	16	20	25	31,5	40	50	63	80		
Чистая зона, экспериментальная комната.										
49	49	49	50	50	52	52	53	55	55	

Валидируем процедуру

ПЛАН:

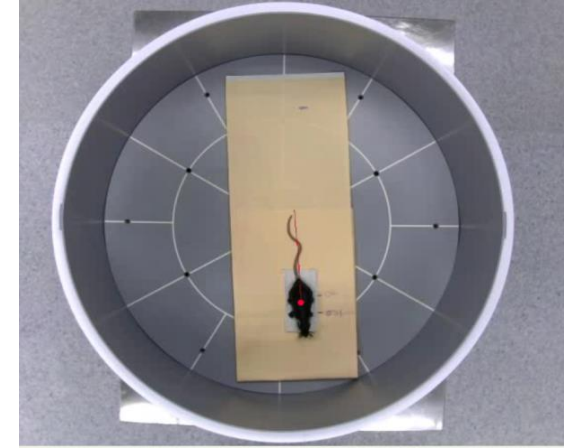
пошагово описываем процедуру

Оборудование:

1. установка «Открытое поле для мышей» TS 0501 MG: ООО «НПК Открытая Наука», Россия, (квалифицирована)
2. видеочамера ELP Sony jmx291 USB 3.0 50fps, Китай (аттестована),
3. система видеотрекинга Noldus Ethovision XT14 – Noldus Information Technology (валидирована)

Технические средства для проведения валидации (поверены):

секундомер электронный «Интеграл С-01»,
Люксметр, марка Testo 540
миллиметровая бумага, лента 20*60 см



*Тянем муляж черной мыши (10*3,5 см) на нити длиной 2м, в течение 1 мин.
Нажимаем кнопки «норки», «стойки», «груминг».
Анализируем, сохраняем, извлекаем, печатаем.*

ПРОТОКОЛ:

сравниваем данные, полученные вручную и КС

Номер измерения	Velocity	Distance moved	Rearing	Grooming	Nork	показания секундомера, с
Среднее значение						

Trial	Velocity center-point		Distance moved center-point		nork	Grooming	Rearing
	Mean	Total	Frequency	Frequency	Frequency	Frequency	Frequency
Trial 2	0.1283	0.8000	0	0	0	0	0
Trial 3	31.4339	1905.1564	3	3	3	3	3
Trial 4	1.2641	75.0753	3	3	3	3	3
Trial 5	1.1009	66.1420	3	3	3	3	3
Trial 6	1.1813	70.9964	3	3	3	3	3
Trial 7	25.4003	381.0041	0	0	0	0	0
Trial 8	0.5945	35.7119	3	3	3	3	3
Trial 9	0.6382	38.3576	3	3	3	3	3
Trial 10	0.8030	48.2578	3	3	3	3	3
Trial 11	0.6153	36.8816	3	3	3	3	3

ОТЧЕТ:

заключение по результатам валидации тестовой системы «Открытое поле».

Валидация пройдена успешно, оборудование признано пригодным к работе
Комиссия _____ (3 чел)

2. Тест-системы

(проверка сходимости результатов внутри лаборатории и с литературой)

Мыши: линии BALB/c (тревожные), C57BL/6 (слабая антиоксидантная защита)

Крысы: сток Sprague Dawley (спокойные)

Источники получения: питомник лабораторных животных «Пушино»; питомник «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН
статус SPF по списку FELASA, 2014

масса тела к началу теста – 20-25г у мышей, 200-250 г у крыс

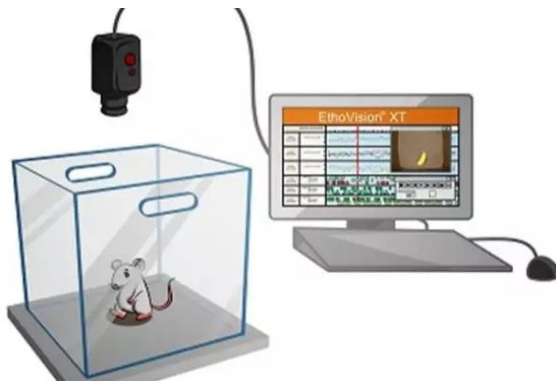
Условия содержания (стандартизированы)

- виварий барьерного типа с мокрым шлюзом
- все материалы, поступающие к животным, стерилизованы.
- открытые полупрозрачные красные клетки T2 и T4 (Techniplast)
- рассадка по 5-6 голов (мыши) 3 (крысы) при поступлении
- световой режим 12/12, (включение света в 09:00),
- кратность воздухообмена 15-18 об/ч,
- температура воздуха 20-24°C (перепад не более чем на 2°C в сутки),
- влажность 40-70%.
- подстил деревянная щепка Lignocel (производство JRS, Германия).
- неограниченный доступ к гранулированному автоклавируемому комбикорму и обратноосмотической стерильной воде



3. Эксперимент: эксплуатационная квалификация (Performance qualification)

- документальное подтверждение того, что помещения, системы и оборудование в комплексе **работают эффективно** и с воспроизводимыми показателями.



RESULTS BY YEAR

45,029 results



Для испытательного центра важно **выбрать ключевые воспроизводимые параметры:**

длина перемещений каждого животного
+ специфические паттерны поведения (стойки, норки, груминг)

Стандартизируем процедуру эксперимента

Подготовка опыта:

- маркировка ушных раковин,
- опыт через 7 дней после получения (период адаптации)
- хендлинг прозрачным цилиндром (мыши), ладонями (крысы)
- начало эксперимента с 14-00,
- препараты вводят внутривентрально, за 1 час до проведения теста.

Протокол опыта:

- перенос животных в домашних клетках в пред-тестовую комнату за 1 час до опыта
- первая мышь (сентинела) не включается в массив данных
- мышь переносят за **основание хвоста, положив на ладонь, опускают** в центр поля
- исследователь уходит в смежную комнату,
- запись 5 мин, старт автоматически через 2 сек
- контроль и опыт чередуются
- после теста мышь помещают в отсадку
- пол рукавов протирают салфеткой с р-ром «Клиндезин спрей» (изопропиловый спирт 40%) для размывания меток, затем чистой салфеткой

Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1–12.

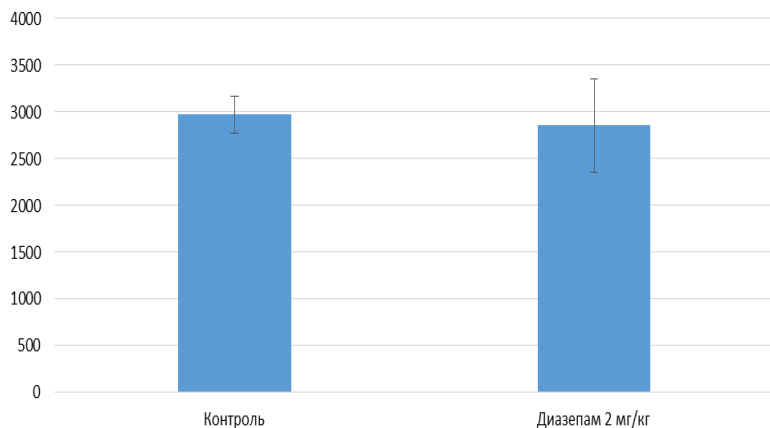
Crusio, WE; Sluyter, Frans; Gerlai, RT (2013). "Ethogram of the mouse". In Crusio, WE; Sluyter, Frans; Gerlai, RT; Pietropaolo, S (eds.). Behavioral Genetics of the Mouse. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. pp. 17–22. ISBN 978-1-107-03481-5.

Sturman, O; Germain, P-L; Bohacek, J (2018-02-16). "Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test". *Stress*. 21 (5): 443–452. doi:10.1080/10253890.2018.1438405. PMID 29451062.

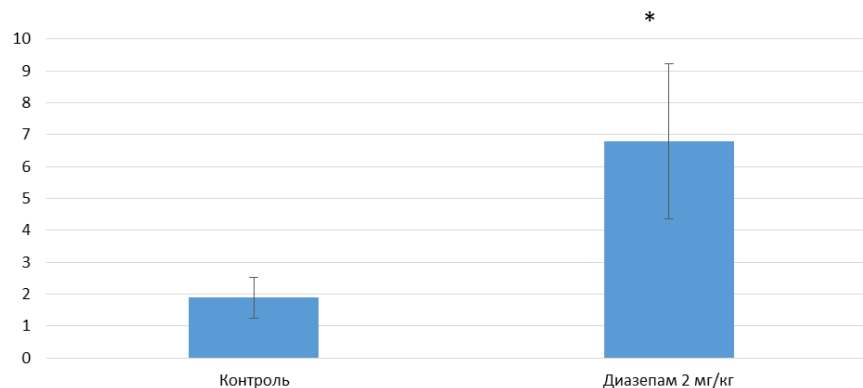
Накапливаем данные

Влияние транквилизатора (агонист ГАМК-а рецепторов) на поведение, самцы крыс Sprague Dawley

Общая дистанция, см



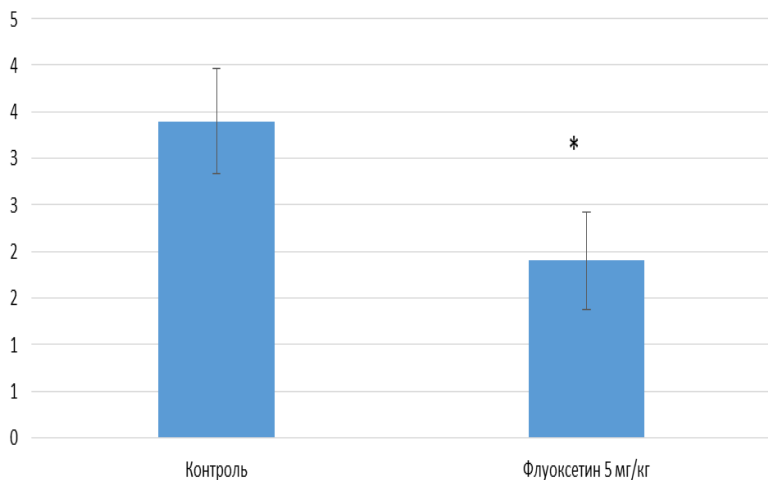
Число выходов в центр



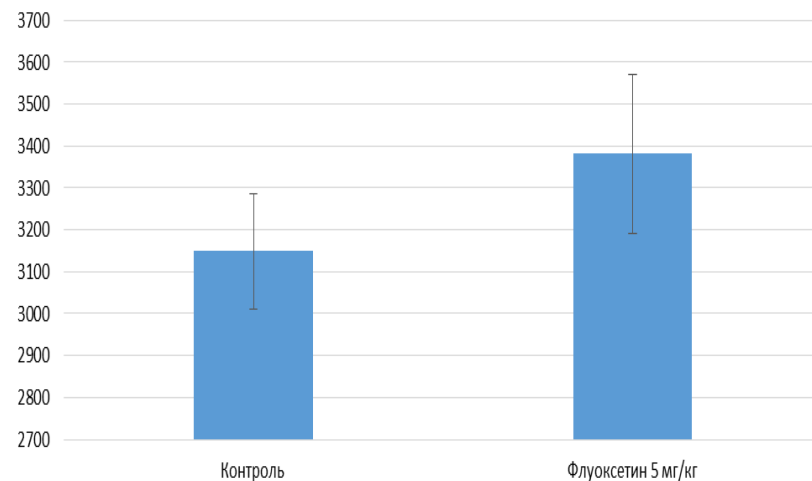
- - $p < 0,01$ однофакторного дисперсионного анализа (one - way ANOVA) с последующим апостериорным анализом (post hoc) по критерию Фишера LSD

Влияние антидепрессанта (селективный ингибитор обратного захвата серотонина) на поведение, самцы крыс Sprague Dawley

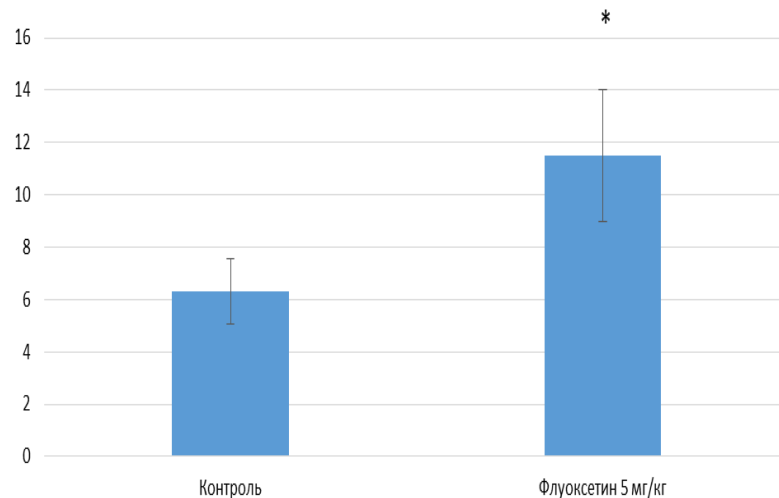
Груминг



Общая дистанция, см

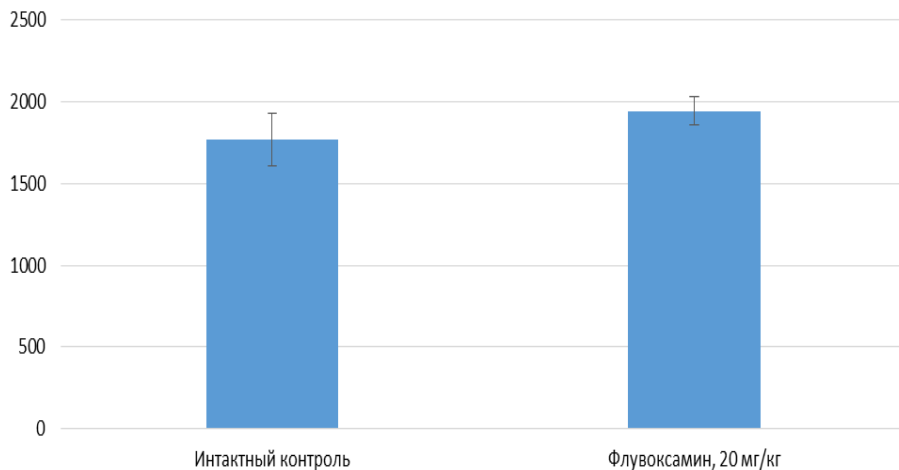


Число выходов в центр

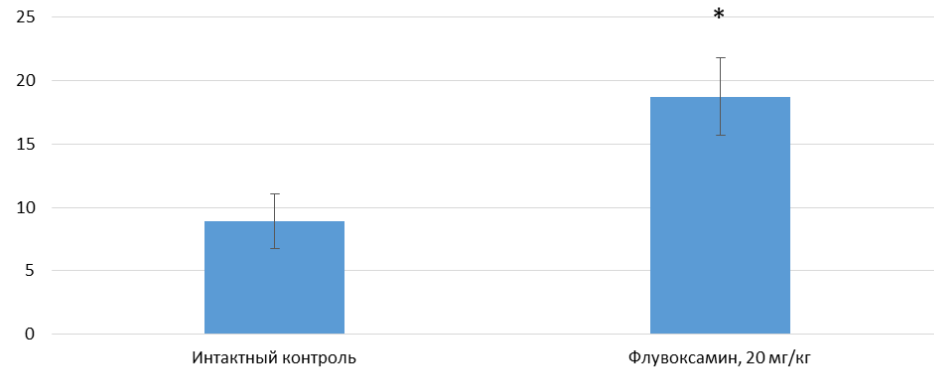


Влияние антидепрессанта (селективный ингибитор обратного захвата серотонина) на поведение, самцы **мышей** линии BALB/c

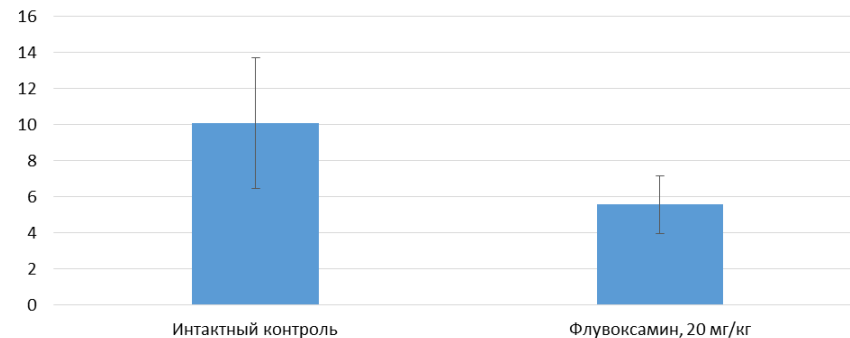
Общая дистанция, см



Число выходов в центр

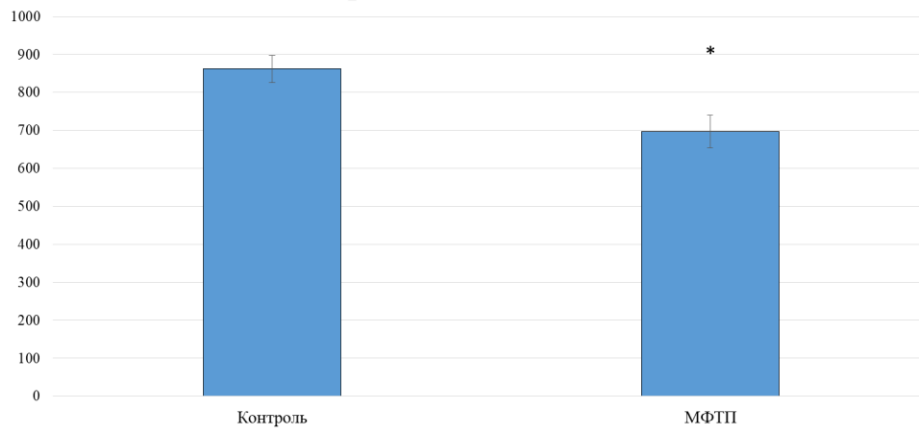


Стойки

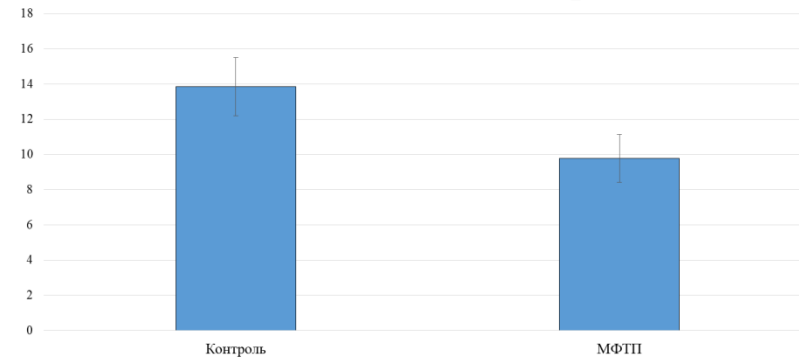


Влияние токсина (угнетение дофаминовых нейронов) на поведение, самцы мышей линии C57BL/6

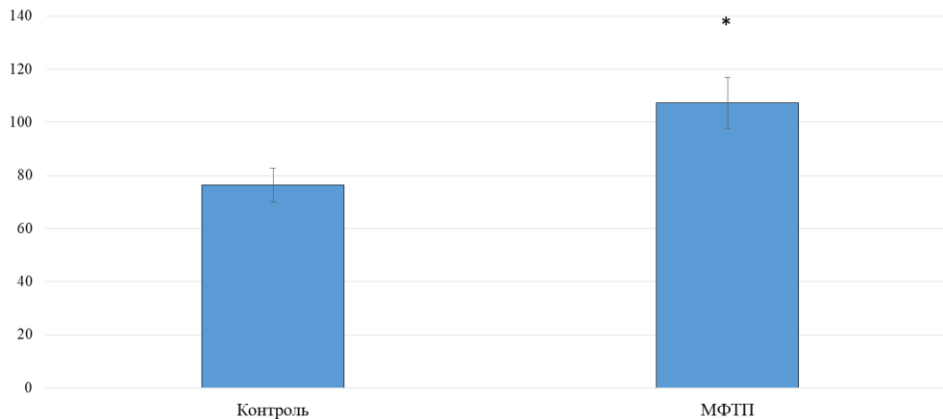
Общая пройденная дистанция, см



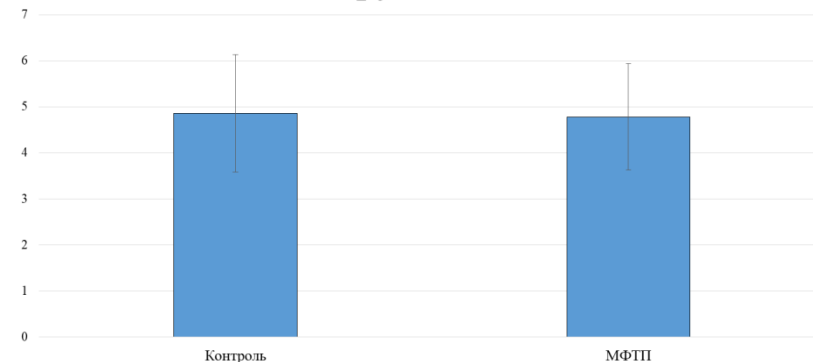
Число выходов в центр, n



Время замирания, с



Грумминг, n



ИТОГ



Составление «GLP+» досье лаборатории:

- о дате валидации
- о сходимости контроля в разных сериях
- о действии препаратов с известными механизмами действия
- о выборе разных видов и линий животных для тестирования препаратов разных групп

Установка

Тест

Модельный
организм

Спасибо за внимание!

Благодарности:

*Н.А. Бондаренко, сотрудникам НПК «Открытая наука»
за интеллектуальную поддержку*