

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**ТЕХНОЛОГИЯ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ
ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ДОМАШНЕЙ КЛЕТКИ ДЛЯ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ МЕДИЦИНСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентов 2 курса 243 группы
направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Крупновой Валерии Васильевны
Манжаевой Марии Баходыровны

Научный руководитель

д.б.н., доцент _____ О. В. Семячкина -Глушковская
(подпись, дата)

Зав. кафедрой человека и животных,

д.б.н., доцент _____ О. В. Семячкина -Глушковская
(подпись, дата)

Саратов 2025

Введение. Автоматизированные системы фенотипирования для лабораторных животных широко востребованы в исследованиях функций головного мозга по всему миру. С помощью метода можно выявить изменения в поведении, метаболической и двигательной активности, эмоциональное состояние, когнитивные функции, нейрофизиологические параметры (оценка уровня гормона стресса), оценка слуховой и зрительной чувствительности, изменения этих параметров могут быть напрямую и косвенно связаны с рядом заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, аутизм и т.д. Например, первыми симптомами болезни Альцгеймер является ухудшение кратковременной памяти, с развитием болезни у больного выявляются потеря долговременной памяти, способность к связной речи и нарушения других когнитивных функций. Поэтому, для постановки диагноза, в первую очередь, проводят анализ поведения пациента, оценку способности его памяти и динамику когнитивных способностей.

В экспериментальных моделях на грызунах такую возможность дают ряд коммерческих установок: TSE PhenoMaster, HomeCageScan, SmartCube. Они имеют общий принцип, все они это – автоматизированные модульные платформы для фенотипирования лабораторных животных. Такие системы позволяют осуществлять комплексное *in vivo* фенотипирование: полностью автоматическая регистрация потребления корма и жидкости, изменений веса тела, регистрация активности в домашней клетке, тестирование памяти и обучаемости по принципу Скиннера, активность на беговом колесе, непрямая калориметрия и газообмен. Такие системы являются необходимыми инструментами для проведения доклинических и фармакологических исследований на животных, а также большинства экспериментов, связанных с разработкой новых технологий лечения нейродегенеративных заболеваний головного мозга.

Но несмотря на широкую востребованность таких систем, они имеют свои ограничения, в первую очередь это долгосрочная поставка данного

оборудования, сложность с инженерным обслуживанием и высокая стоимость, которая увеличивается за счет транспортировки из-за рубежа.

Для решения этой проблемы была разработана технология поведенческого фенотипирования мелких грызунов. Она представляет собой домашнюю клетку с встроенной оперантной стенкой, оснащенной инфракрасными датчиками приближения, для детектирования поведения животных, а также устройством для дозированной подачи корма, предназначенным для обучения мелких грызунов и выработки у них условных рефлексов. Благодаря технологическому решению, возможно объединение неограниченного числа таких клеток. Это позволяет автоматически, без присутствия сотрудника лаборатории, проводить поведенческие тесты, собирать и оценивать данные о нейрокогнитивных способностях, включая память и способность к обучению. Такие системы являются необходимыми инструментами для проведения доклинических и фармакологических исследований на животных, а также большинства экспериментов, связанных с разработкой новых технологий лечения нейродегенеративных заболеваний головного мозга.

Таким образом, целью работы является: разработка автоматизированной системы для поведенческого фенотипирования мелких грызунов, включающую в себя оперантную стенку и применение разработанной системы для выявления возрастных когнитивных изменений у мышей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать автоматизированную систему поведенческого фенотипирования лабораторных животных, включающую в себя оперантную стенку с детекторами движения животных, системой «поощрения» и визуальных сигналов, а также программное обеспечение для автоматизации процесса ведения эксперимента;

2. Изучить эффект фототерапии во сне и бодрствовании на физиологические и когнитивные процессы у мышей 24-месячного возраста с

применением иммуногистохимического анализа тканей и оболочек головного мозга;

3. Исследовать на практике эффективность применения оперантного обучения для выявления когнитивных улучшений после фотобиомодуляции у мышей 24-месячного возраста;

4. Разработать практические видео-протоколы оперантного обучения грызунов при помощи разработанного устройства - оперантной стенки.

Исследование проводилось на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского Государственного университета им. Н.Г. Чернышевского. Эксперименты проводились на самцах мышей линии C57B1/6 (возраст 24 месяца, 35 г.). Выбор возраста мышей связан с оценкой эффективности фотобиомодуляции у старых (24 месяца) мышей, что соответствует возрасту ~ 70 лет у людей. Все процедуры выполняли в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протоколы эксперимента были одобрены Комиссией по биоэтике ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского». (Приказ 35-В от 11.03.2022 г. Протокол № 7).

Группы животных

Исследования проводились на следующих группах животных:

- 1) группа мышей в возрасте 24 месяца – контроль;
- 2) группа мышей в возрасте 24 месяца – получавшие 10-дневный курс фотобиомодуляции во сне;
- 3) группа мышей в возрасте 24 месяца – получавшие 10-дневный курс фотобиомодуляции в бодрствовании;

n = 8 в каждой группе во всех сериях экспериментов.

Было проведено вживление электродов для электроэнцефалографии, фотобиомодуляцию, тест на установку условного рефлекса, иммуногистохимический анализ и конфокальная визуализация для изучения

отложения бета-амилоида в мозге и мозговых оболочках у мышей 24-месячного возраста, статистический анализ.

Магистерская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований), заключение и список использованных источников, включающий источники на русском и английском языках. Работа изложена на 51 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована рисунками и таблицами.

Процессы памяти и обучаемости находятся в тесной взаимосвязи. Согласно существующим исследованиям, память может объяснять от одной трети до половины коэффициента интеллекта человека, определяя объем информации, с которым индивид способен одновременно работать. Существует несколько классификаций типов памяти, среди которых одной из наиболее распространенных и валидных является деление на две основные категории: эксплицитную (декларативную, связанную с памятью на события) и имплицитную (процедурную, связанную с памятью на действия). Эти типы памяти отражают анатомически различные нейронные сети, а также механизмы кодирования, хранения, консолидации и воспроизведения информации.

Декларативная память человека демонстрирует параллели с пространственной памятью грызунов, что позволяет проводить ее моделирование на животных. Данная память представлена в гиппокампе и ассоциирована с нейронным процессом, известным как долговременная потенция. Болезнь Альцгеймера, которая затрагивает людей в пожилом возрасте, связана с нарушениями данного типа памяти. У грызунов гиппокамп играет ключевую роль в кодировании пространственной информации, что исследуется в различных лабиринтах.

Фенотипирование лабораторных животных — это процесс оценки клинических, физиологических или клеточных черт и отклонений с помощью наблюдения, измерений параметров организма и разнообразных тестов. Оно

позволяет оценить состояние здоровья, физиологические и поведенческие характеристики животных, а также выявить возможные генетические и фенотипические аномалии.

Многие клинические расстройства, будь то неврологические (например, болезнь Альцгеймера, Паркинсона и другие виды деменции) или нейropsychиатрические (например, шизофрения и депрессия), проявляются когнитивными симптомами, которые требуют фармакологического лечения. Эти заболевания затрагивают большой объем поведенческих изменений, которые включают в себя процессы восприятия, внимания, рабочей памяти, долговременной памяти, исполнительных функций, речи и т.д. Поэтому, очень важно проводить корреляцию между поведенческими симптомами заболевания у людей и изменениями поведения у животных моделей. Для достоверности трансляционных исследований рассматриваются отдельные нарушения у пациентов и применяются аналогичные или идентичные оценки когнитивных изменений у животных. С помощью такой аналогии рассматриваются реакции на экспериментальные манипуляции как в клинической медицине для диагностики заболеваний, так и для оценки реакции на лечение у пациентов.

Основное содержание работы. Обзор литературы включает в себя разделы: Применение современных методов фенотипирования в научных исследованиях на животных, Автоматизация и инновации в фенотипировании лабораторных животных, Применение оперантной стенки для поведенческого фенотипирования на животных моделях с болезнью Альцгеймера.

Камера оперантного обусловливания широко применяется в лабораториях по всему миру, став ключевым инструментом для исследования поведения в различных областях, включая ассоциативное обучение, нейробиологию, сравнительную психологию и поведенческую фармакологию.

Изобретение относится к сфере биомедицинских и ветеринарных технологий, а именно к методам оперантного обусловливания и изучения влияния последствий поведения на его динамику.

Основной технической задачей данного изобретения является разработка устройства для взаимодействия с лабораторными животными, которое обеспечивает возможность создания, модификации и проведения экспериментов, а также мониторинг поведенческих и физиологических параметров животных благодаря многофункциональным модулям.

Данное устройство содержит кормушку с вертикальным ротором и сбрасывателем, соединенную с емкостью для сброса корма. Ротор соединен с шаговым двигателем, посредством которого осуществляется точная выдача гранул корма. Драйвер для шагового двигателя закреплен на платформе. В емкость для корма встроен инфракрасный датчик, позволяющий подтвердить выдачу гранул корма. Датчики для детектирования носа мыши находятся внутри специальных отсеков, оснащенных LED-светодиодами. С помощью светодиодов осуществляется обучение мыши определенным сценариям. Все датчики соединены с микроконтроллером, закрепленному с помощью винтов на платформе.

Для автоматизации и анализа данных создано специализированное программное обеспечение. Основная программа состоит из трех функциональных блоков управления. Первый блок отвечает за инициализацию интерфейса пользователя, обработку событий передней панели графического интерфейса и запись результатов измерений на жесткий диск персонального компьютера. Второй блок регистрирует и обрабатывает сигнал оперантной стенки в реальном режиме времени. Также данный блок отображает полученные результаты. Третий блок отвечает за формирование и обмен информационными пакетами с микроконтроллером.

Программа управления поддерживает два режима работы. В режиме обучения лабораторного животного светодиоды выключены, а выдача корма активируется при срабатывании любого из двух инфракрасных датчиков. В

режиме эксперимента животное должно выбрать отсек с инфракрасным датчиком, над которым загорается светодиод, чтобы получить корм.

Для проведения исследования устройство помещается в лабораторную клетку и подключается к компьютеру. На компьютере выставляются время и условия эксперимента. В конце результаты предоставляются в виде txt-файла.

На первом этапе исследования была проверена гипотеза о том, что сон повышает эффективность ФБМ у возрастных животных. Для проверки гипотезы была создана функциональная модель эксперимента, где 24-месячные мыши были разделены на 3 группы: контрольные животные (без фотовоздействия), ФБМ в бодрствовании, ФБМ во сне.

При проведении ИГХ анализа с последующей конфокальной визуализацией выявили высокое содержание β -амилоида ($A\beta$) в мозговых оболочках и мозге мышей не проходивших курс ФБМ, при этом животные после терапии во сне показали снижение уровня $A\beta$ в 1,5 раза ($p < 0,01$) и в 1,3 раза ($p < 0,05$) как в мозге, так и в мозговых оболочках у 24-месячных мышей. А также группа ФБМ-бодрствование не показала статистически значимого изменение уровня $A\beta$ по сравнению с контрольной группой.

Для изучения когнитивных функций у 24-месячных мышей был применен тест на установку условного рефлекса (Павловское обусловливание). Результаты были получены при изучении эффектов ФБМ на улучшение нейрокогнитивных способностей старых мышей.

Результаты испытаний на выработку павловского условного рефлекса показали, что в группе ФБМ+сон по сравнению с контрольной группой количество тренировочных сессий уменьшилось в 1,2 раза ($p < 0,001$), а количество вознаграждений (выраженное в количестве заходов головы в кормушку) увеличилось в 1,7 раза ($p < 0,01$), что указывает на положительное влияние ФБМ во время сна на улучшение когнитивных функций у старых мышей (количество тренировочных сессий: $22,03 \pm 0,71$ против $26,38 \pm 0,63$, $p < 0,001$; количество заходов головы: $11,63 \pm 1,64$ против $6,88 \pm 0,55$, $n=8$ в

каждой группе, тест ANOVA с апостериорным тестом Дункана). Однако ФБМ+бодрствование не повлияло на обучение старых мышей (количество сеансов обучения: $26,25 \pm 0,53$ против $26,38 \pm 0,63$, количество входов головы: $7,00 \pm 0,82$ против $6,88 \pm 0,55$, $n=8$ в каждой группе, тест ANOVA с апостериорным тестом Дункана).

Таким образом, результаты этой серии экспериментов подтвердили гипотезу о том, что сон улучшает стимулирующее действие ФБМ на клиренс Аβ и когнитивные функции у старых мышей.

Заключение. ФБМ во сне по сравнению с двумя группа- контроль и ФБМ-бодрствование оказывает выраженные эффекты на очищение мозга и мозговых оболочек мышей 24-месячного возраста, что сочетается с более благоприятными прогнозами в терапии возрастных изменений ассоциированными с отложением токсичного Аβ. Восстановление когнитивных функций, а именно улучшения долговременной памяти у старых мышей под воздействием ФБМ во сне подтверждает благоприятные эффекты терапии, что может стать перспективным методом при лечении болезни Альцгеймера.

1. В результате выполнения первой задачи была разработана автоматизированная платформа для фенотипирования лабораторных животных, включающая оперантную стенку с многофункциональными модулями, позволяющими проводить эксперименты с высоким уровнем комфорта для животных и минимальной нагрузкой на исследователя. Созданное программное обеспечение обеспечивает автоматизацию процесса ведения эксперимента, включая регистрацию и обработку данных в реальном времени, что значительно упрощает исследовательский процесс и позволяет масштабировать эксперименты на большие группы животных;

2. Результаты экспериментов, проведенных с использованием оперантного обучения, продемонстрировали, что фотобиомодуляция в сочетании со сном значительно улучшает когнитивные функции у старых мышей. В частности, наблюдалось снижение уровня Аβ в мозге и мозговых

оболочках, что указывает на положительное влияние ФБМ на клиренс Аβ. Данные результаты подтверждают гипотезу о том, что ФБМ во время сна способствует улучшению когнитивных функций у старых мышей, в отличие от ФБМ во время бодрствования, которая не оказала значительного влияния на обучение;

3. Практическое применение разработанного устройства подтвердило его эффективность в мониторинге когнитивных изменений у мышей старого возраста. Результаты экспериментов показали, что использование автоматизированной системы позволяет точно и надежно отслеживать поведенческие реакции животных, что является важным аспектом в исследовании возрастных когнитивных изменений

4. В рамках выполнения последней задачи были разработаны практические видео-протоколы, которые демонстрируют процесс оперантного обучения грызунов с использованием созданного устройства. Эти протоколы могут служить полезным инструментом для исследователей, желающих воспроизвести и адаптировать методику оперантного обучения в своих экспериментах, что способствует стандартизации подходов в области поведенческой нейробиологии.

Таким образом, выполненные задачи подтвердили высокую эффективность разработанной автоматизированной системы и ее значимость для дальнейших исследований в области когнитивной нейробиологии и поведенческой фармакологии.