

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии им. И.П. Павлова (ИФ РАН)

ЦКП Биоколлекция ИФ РАН

СОП № 15

№ версии: 1

Начало действия: 1/10/17

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

Подготовка макак к процедурам паспортизации

Составлено: н.с. лаб. регуляции функций нейронов мозга Беляков А.В.

Утверждено: зам.директора ИФ РАН Рыбникова Е.А.



1. ЦЕЛЬ:

1.1. СОП описывает порядок выполнения процедур для подготовки макак к паспортизации по показателям когнитивных функций в зависимости от функционального состояния.

2. ОПОРНЫЕ СОП:

2.1. Подготовка макак к процедурам паспортизации состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих Стандартных операционных процедур:

2.1.1. СОП «Поение обезьян».

2.1.2. СОП «Кормление обезьян».

2.1.3. СОП «Пересадка обезьяны из клетки в клетку».

2.1.4. СОП «Использование ультрафиолетового бактерицидного облучения для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещении».

3. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

3.1. СОП предназначен для лаборантов и рабочих по уходу за лабораторными обезьянами.

3.2. СОП предназначен для научных сотрудников, осуществляющих процедуры по приучению обезьян к условиям лабораторного содержания и оперативной деятельности.

4. ОБЪЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ СОП:

4.1. В процедурах используются клинически здоровые макаки-резусы обоего пола с массой тела от 3кг. Масса тела подопытных животных определяется с погрешностью

взвешивания не более $\pm 1\%$. Для этого используются напольные весы ВЛР/20 или аналогичные.

5. ПОДГОТОВКА ОБЕЗЬЯН К ПРОЦЕДУРАМ ПАСПОРТИЗАЦИИ.

5.1. На базе данных о предтестировании, имеющихся данных биологического паспорта, текущего статуса обезьяны (беременность, выкармливание, менструальный цикл, состояние здоровья, возраст) выбрать обезьяну для осуществления процедур подготовки к паспортизации.

5.2. Переместить обезьяну из клетки вивария в лабораторную клетку путем выполнения следующих процедур:

5.2.1. В соответствии с СОП «Пересадка обезьяны из клетки в клетку» способа №3. пересадить обезьяну из клетки вивария в клетку-переноску (60х60х60см³), оснащенную двумя ручками для удобства транспортировки.

5.2.2. Транспортировать обезьяну в помещение лаборатории. Для этого перенести клетку-переноску из здания вивария до автомобиля, на автомобиле перевезти клетку-переноску с обезьяной к зданию лаборатории, где будет осуществляться содержание обезьяны во время выполнения СОП по подготовке к паспортизации и СОП по паспортизации и перенести клетку-переноску от автомобиля в помещение лаборатории.

5.2.3. Пересадить обезьяну из клетки-переноски в лабораторную клетку. Для этого расположить рядом с лабораторной клеткой подставку, на нее поставить клетку переноску таким образом, чтобы проемы дверей (открываются вверх) двух клеток совпали без больших щелей и просветов. После чего открыть дверь лабораторной клетки и клетки переноски, после перехода животного аккуратно, но достаточно быстро закрыть двери в том же порядке и повесить замок на лабораторную клетку.

5.2.4. Далее процедуры пересадки осуществлять аналогичным образом.

5.3. Обеспечить обезьяне условия содержания и предоставить адаптационный период для привыкания к новой обстановке содержания в лабораторной приматологической клетке, режиму ежедневных стандартных процедур и лабораторному персоналу. Время адаптационного периода варьируется от одного дня до нескольких недель в зависимости от текущего биологического и когнитивного статуса обезьяны и приученности к содержанию в лабораторной приматологической клетке.

5.3.1. Требования к помещению.

5.3.1.1. В помещении поддерживается средняя комфортная температура воздуха 21-24 градусов (для контроля температуры используется бытовой термометр для помещений).

5.3.1.2. В помещении поддерживается влажность 40-70% (для контроля влажности используется гигрометр психрометрический ВИТ-2).

5.3.1.3. Принудительная вентиляция через центральную вытяжку (вытяжной шкаф) и кварцевание осуществляется в течение 30 минут перед экспериментальными процедурами. Для кварцевания используется УФ облучатель-рециркулятор Армед СН211-115 или аналогичный. Кроме этого в течение дня с 11:00 до 20:00 производится периодическое проветривание помещения (раз в час в течение 10 минут) посредством вытяжки, подключенной к реле времени. Выполнение данной процедуры опирается на соответствующий СОП «Использование ультрафиолетового бактерицидного облучения для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещении».

5.3.1.4. Обезьяне обеспечивается суточный цикл искусственного освещения, при котором день и ночь длятся по 12 часов (с 8:00 до 20:00 и с 20:00 до 8:00, соответственно).

5.3.1.5. Для удобства обслуживания/мытья клетки нижняя часть стен помещения покрыты водонепроницаемым и легко моющимся материалом, присутствуют раковина, ванна, душевые лейки.

5.3.1.6. Уровень шума. В помещении обеспечивается шумоподавление со стороны входной двери и окна для того чтобы снизить отвлекаемость обезьяны во время процедур паспортизации. При этом обезьяна не полностью изолирована от окружающих звуков, а в процессе адаптации к новой обстановке и установке приучается не реагировать на привычные звуки.

5.3.1.7. Обезьяне помещенной в клетку создается сенсорно-обогащенная среда: предлагаются молодые веточки деревьев, некоторые лакомства предлагается достать не из кормушки.

5.3.1.8. В помещении ведется суточный и периодический видеомониторинг для определения суточной двигательной активности, оценки функционального состояния, протоколированию этапов приучения животного к элементам обстановки.

Для этого используются несколько цифровых видеокамер: Logitech 720p или аналогичная, фотокамера Canon или аналогичная, ИК камера суточного мониторинга Proline PR-DV103H или аналогичная.

5.3.2. Размещение обезьяны в клетке и устройство лабораторной клетки.

5.3.2.1 Лабораторная приматологическая клетка имеет базовый объем 0,63м³. В клетке предусмотрена деревянная скамейка для удобства размещения животного.

5.3.2.2. Внутри клетки находится дополнительная подвижная стенка (прижимка), позволяющая ограничивать рабочий объем клетки или стимулировать обезьяну к переходу в смежное пространство (клетку-переноску) для последующей транспортировки или уборки клетки.

5.3.2.3. Задняя стенка является легко съёмной, что позволяет производить удобный уход за клеткой, когда там нет обезьяны или производить уход за большей частью клетки, когда животное ограничено за счет подвижной стенки.

5.3.2.4. Входной лаз оснащен навесным замком.

5.3.2.5. В фасадной решетчатой стенке предусмотрена система для легкой смены модулей имеющих окно для работы или для добывания еды из навесной кормушки. С фасадной части к клетке может быть закреплена установка, оснащенная системой предъявления изображений, регистрации двигательной реакции животного, и системой питьевого подкрепления, необходимых для реализации СОП по подготовки к паспортизации и СОП по паспортизации.

5.3.2.6. Для сбора анализов суточной мочи используется наклонный поддон, который устанавливается под клеткой. Поддон накрыт сеткой, задерживающей упавшие куски пищи и экскременты. Моча, попадающая в поддон, стекает в один угол и собирается в герметичный мерный сосуд.

5.3.3. Кормление обезьяны.

5.3.3.1. Весь суточный рацион предлагается обезьяне единовременно в навесной кормушке, прикрепляемой к клетке. Перечень продуктов является стандартным и соответствует СОП «Кормление обезьян».

5.3.3.2. Время кормления выбирается в соответствии с последующим временем окончания процедур приучения к работе в установке и процедур проведения паспортизации.

5.3.4. Уборка клетки.

5.3.4.1. Ежедневно осуществляется частичная уборка клетки: мытье поддонов, мытье кормушки, протирание прутьев решетки, протирание прозрачных элементов клетки, выполненных из оргстекла.

5.3.4.2. Поддон для сбора мочи, располагаемый под клеткой, моется отдельно теплой водой с погружением его в специально оборудованную ванну с использованием душевого излива. Сетка пластиковая/или сетка нержавеющая, трубка, сосуд для сбора мочи моются ежедневно, в качестве подготовки для нового суточного цикла сбора анализов.

5.3.4.3. Два раза в неделю производится плановое мытье всей клетки. Для этого на время обслуживания лабораторной клетки осуществляется перемещение обезьяны в клетку-переноску и обратно в соответствии с СОП «Пересадка обезьяны из клетки в клетку» способа №3. Мытье клетки, и доски, на которой часто сидит обезьяна, производится теплой водой с использованием моющих средств (Биолан, Comet или аналогичные). После мытья клетка протирается сухой тряпкой.

5.3.5. Забор пробы для анализов суточной мочи осуществляется ежедневно перед уборкой клетки в 9:30. Для этого измеряется полное количество накопившейся за сутки мочи, из нее автоматическим микродозатором Лайт (Ленпипет, 1-100мкл.) отбирается 1мл. мочи помещается в эппендорф 1,5мл. и замораживается в морозилке (-20°C) с консервантом Кислота борная (3мг. на 1мл. пробы). На эппендорфе проставляется кличка обезьяны и текущая дата, в протокол заносится общий объем собранной мочи. В последствие пробы подготавливаются с использованием центрифуги СМ-50 и анализируются по стандартному протоколу при помощи иммуноферментного фотоэлектрического анализатора АИФ-Ц-01С или аналогичного.

5.3.6. Приучение обезьяны к лабораторному персоналу

5.3.6.1. Перечень персонала. Персонал, прошедший инструктаж по работе с обезьянами и непосредственно работающий с паспортизируемым животным: старший лаборант, осуществляющий техническое сопровождение выполнения СОП, старший лаборант, осуществляющий уборку клетки, помещения, кормление обезьяны, научные сотрудники, осуществляющие научное сопровождение СОП.

5.3.6.2. Время и порядок взаимодействия с обезьяной. Для того чтобы обезьяна привыкла к указанным сотрудникам им необходимо в количестве не более двух человек периодически заходить в помещение в котором содержится обезьяна выполняя свои стандартные обязанности. Период посещений обусловлен часами, в которые и в дальнейшем будут проводиться процедуры по подготовке к паспортизации и самой паспортизации животного (с 9:00 до 14:00 часов).

5.3.7. Приучение обезьяны к суточной поилке.

5.3.7.1. Устройство суточной поилки. В клетке присоединен мерный открытый сверху сосуд, к которому снизу присоединена силиконовая трубка, проходящая в электромагнитный клапан и заканчивающаяся в металлическом мундштуке внутри лабораторной клетки. Поилка оснащена емкостным датчиком: в ответ на прикосновение обезьяны к трубке-мундштуку, срабатывает электромагнитный клапан, открывающий ток воды на 2 секунды, из поилки выделяется 200-250 мл. жидкости. Устанавливается ограничение на одновременное открытие клапана, чтобы во время поения часть воды не проливалось, и можно было определить суточное потребление жидкости обезьяной.

5.3.7.2. Для приучения обезьяны к поилке выполняются следующие процедуры:

Продемонстрировать обезьяне, что из трубки течет вода, установив электромагнитный клапан в открытое состояние (при необходимости повторять процедуру несколько раз/несколько дней). На время приучения (1-2 дня) увеличить период открывания электромагнитного клапана для облегчения получения питья. Контролировать число ложных срабатываний электромагнитного клапана для введения поправок в определение суточного потребления жидкости обезьяной.

5.3.7.3. В период приучения поилка работает круглосуточно, но через несколько дней суточная поилка подключается через реле времени и обеспечивает доступ к воде в период

с 11:00 до 20:00. В остальное время электромагнитный клапан не срабатывает и вода из мундштука не выливается. Это обеспечивает в дальнейшем достаточный уровень жажды у обезьяны во время процедур паспортизации и мотивацию активно участвовать в этих процедурах за питьевое подкрепление.

5.4. Приучение обезьяны к периодическому пребыванию в условиях ограниченного пространства в пределах лабораторной клетки.

5.4.1. Обоснование. Для повышения концентрации внимания обезьяны во время проведения процедур паспортизации обезьяна приучается к ежедневному непродолжительному (не более 1,5 часов) сокращению полезного объема клетки.

5.4.2. Процедуры приучения обезьяны к периодическому пребыванию в условиях ограниченного пространства внутри лабораторной клетки. Процедуры проводятся в те же часы, в которые в дальнейшем будет осуществляться выполнение СОП по паспортизации.

5.4.2.1. После прохождения обезьяной этапа адаптации к новой обстановке на следующий день 1 раз ограничить животное в полуобъеме клетки сроком на пол часа путем перемещения подвижной стенки.

5.4.2.2. На следующий день 1 раз ограничить животное в полуобъеме клетки сроком один час путем перемещения подвижной стенки.

5.4.2.3. В течение двух последующих дней ограничивать животное в одной четвертой объема клетки сроком на один час путем перемещения подвижной стенки и установкой дополнительной стенки, опускающейся в клетку через крышу.

5.4.2.4. На каждом этапе приучения после пребывания в условиях ограниченного пространства обезьяне выдавать полбанана, как часть суточного рациона и пищевого подкрепления за хорошую работу.

5.4.2.5. После четырех дней приучения к периодическому пребыванию в условиях ограниченного пространства считается завершенной, и описанная процедура продолжается в качестве стандартной в остальные дни.

5.5. Приучение обезьяны к приматологической установке, с использованием которой будет производиться реализация СОП по подготовке к паспортизации и СОП по паспортизации.

5.5.1. Состав приматологической установки. Два рода приматологических установок.

5.5.1.1. Приматологическая установка первого рода состоит из двух подвешенных в одной плоскости сенсорных экранов (планшеты ASUS 7" ME 173X). За подвесными экранами находятся две кормушки с пищевым подкреплением (семечками или другим предпочитаемым обезьяной кормом). Эта установка отличается тем, что процедура приучения к ней проходит значительно легче в виду ее экологичности: принцип выбора одного из двух экранов рефлекторно сопрягается у животного с актом обыскивания кормушек за экраном.

5.5.1.2. Приматологическая установка второго рода представляет собой зафиксированный сенсорный ИК монитор с кормушками пищевого подкрепления располагаемыми перед ним.

5.5.1.3. Обе установки оснащены подвижной заслонкой, регулирующей интервалы доступности экранов для обезьяны.

5.5.1.4. Одна или вторая установка прикрепляется со стороны фронтальной части ограниченного пространства клетки (см. п.5.4), и становятся доступными для исследования обезьяной, в случае если подвижная заслонка опущена.

5.5.1.5. Обе установки оснащены системой подачи питьевого подкрепления, закрепляемой на фронтальной части клетки, таким образом, чтобы мундштук питьевой трубки находился напротив рта обезьяны, находящейся напротив. Питьевое подкрепление дозируется перистальтическим насосом BT100-2J (Longerpump) или аналогичным. Объем

и тип жидкости выбирается индивидуально с учетом этапа работы, типа тестовой задачи, предпочтений обезьяны.

5.5.1.6. Обе установки оснащены системой подачи и регистрации звуковых сигналов для дистанционной связи с обезьяной и подачи сигналов звукового положительного или отрицательного подкрепления за правильный и неправильный ответы соответственно.

5.5.1.7. Управление подвижной заслонкой, системой питьевого подкрепления, аудиоканалами осуществляется через плату ввода/вывода Arduino и специализированное программное обеспечение Геллер v.3.1. дистанционным способом. Операторский пульт с компьютером и двумя мониторами находится в соседнем помещении откуда ведется видеонаблюдение за обезьяной и управление реализацией СОП.

5.5.2. В течение последующего дня (или нескольких дней, в зависимости от физиологического состояния животного) приучать обезьяну к периодическому присутствию рядом с клеткой приматологической установки. Для этого в период пребывания обезьяны в ограниченной части клетки в течение часа к клетке присоединять приматологическую установку с опущенной заслонкой и доступными выключенными экранами. В этот период обезьяна активно исследует кормушки, трогает планшеты.

5.5.3. В течение последующего дня (или нескольких дней, в зависимости от физиологического состояния животного) приучать обезьяну к получению питьевого и звукового подкрепления в момент обыскивания кормушки за подсвеченным экраном (или в случае использования сенсорного монитора в момент касания области экрана, в которой демонстрируется базовая яркая картинка). При этом из мундштука системы питьевого подкрепления выделяется увеличенная норма питьевого подкрепления и звучит условный звуковой сигнал положительного подкрепления. В базовом варианте используется разведенный в воде сироп шиповника и звук голоса сотрудника, к которому обезьяна привыкла и которому доверяет.

5.5.4. В течение последующего дня (или нескольких дней, в зависимости от физиологического состояния животного) повторять процедуру, но сокращать количество пищевого подкрепления в кормушках за планшетами. Таким образом, обезьяна приучается к взаимодействию с приматологической установкой за питьевого подкрепления.

5.5.5. В течение последующего дня (или нескольких дней, в зависимости от физиологического состояния животного) повторять процедуру, исключив пищевое подкрепление. Вместо подсвеченного экрана использовать значимую картинку (изображение банана), периодически возникающую на одном из двух планшетов или на одной из двух частей сенсорного ИК экрана.

5.5.6. В течение последующего дня (или нескольких дней, в зависимости от физиологического состояния животного) повторять процедуру, но с использованием подвижной заслонки. Периодически блокировать доступ обезьяны к экрану, затем подавать звуковой сигнал привлекающий внимание, опускать заслонку и повторять уже известные обезьяне процедуры. Постепенно поднятие и опускание заслонки становится одним из составляющих в сложном акте предъявления одной задачи. Целью этого этапа является приучение обезьяны к подвижной заслонке и условному звуковому сигналу начала работы.

5.5.7. На каждом этапе приучения после пребывания в условиях ограниченного пространства обезьяне выдавать полбанана, как часть суточного рациона и пищевого подкрепления за хорошую работу.

5.6. Приучение обезьяны к периодическому ношению жилетки. Этот этап является технологически сложным и требует учета индивидуальных особенностей животного. Он может быть исключен, если обезьяна первый раз находится в условиях лабораторного пребывания и демонстрирует тревожное или агрессивное поведение по отношению к обстановке или персоналу.

5.6.1. Наркотизировать животное и надеть приматологическую жилетку.

5.6.1.1. Посредством использования прижимки лабораторной клетки сделать обезьяне укол смеси препаратов Золетил 100мг и Рометар 2%. Концентрация и соотношение выбираются индивидуально исходя из длительности последующей процедуры сроком 30 минут, возраста и веса животного и базируется на ветеринарных рекомендациях использования этих препаратов (0,1-0,2мл Золетила и 0,1-0,2мл Рометара). Укол делается внутримышечно в область ягодичных мышц.

5.6.1.2. Забрав наркотизированную обезьяну из клетки, надеть на нее предварительно приготовленную приматологическую жилетку, расположив под ней пластиковый имитатор аппарата суточного мониторинга. Имитация прибора используется для контроля поведения животного при первом использовании приматологической жилетки для сохранности настоящего дорогостоящего оборудования. Приматологическая жилетка разрабатывается на заказ по индивидуальным размерам конкретной обезьяны, но предусматривает тонкую подтяжку с использованием шнуровки и молнии, располагаемых на спине животного.

5.6.1.3. При первых респираторных и кардиологических признаках пробуждения поместить обезьяну в клетку, контролируя ее состояние.

5.6.2. В течение дня контролировать поведение обезьяны и ее попытки снять или повредить жилетку, попытки вытащить имитатор прибора.

5.6.3. В следующие 2-3 дня (в зависимости от поведения животного) провести стандартные процедуры ограничения обезьяны в пространстве клетки и процедуры взаимодействия с приматологической установкой.

5.6.4. На четвертый день снять жилетку, предварительно повторив процедуру наркотизации из п. 5.6.1.

5.6.5. В течение последующего дня контролировать состояние и поведение обезьяны.

5.7. Завершить процедуры подготовки к паспортизации и либо перейти к реализации СОП по паспортизации макаки по показателям когнитивных функций в зависимости от функционального состояния, либо вернуть животное в виварий, выполнив соответствующие операции согласно СОП «Пересадка обезьяны из клетки в клетку» и п. 5.2. настоящего СОП

6. Ведение протокола. В течение пребывания обезьяны в лабораторном корпусе (в клетке или в приматологическом кресле) за животным ведется ежедневное наблюдение, формируется протокол, отражающий общее состояние, доверие/агрессивность по отношению к обслуживающему персоналу, аппетит, количество выпитой жидкости и собранной мочи, фиксируется работоспособность и результаты экспериментов. Ведется электронный протокол с последующей распечаткой материалов в случае необходимости и видеопротокол состояния обезьяны для последующего анализа общей двигательной активности и когнитивной деятельности.