

УДК 591.1



## Влияние исследователя на оценку мышечной силы у животных в эксперименте: сравнение автоматизированного теста «перевернутая сетка» и его классического варианта

П.Р. Лебедев<sup>1</sup>, Е.В. Кузубова<sup>1</sup>, В.М. Покровский<sup>1</sup>, А.И. Радченко<sup>1</sup>, С.И. Осипьян<sup>1</sup>,  
Ю.В. Степенко<sup>1</sup>, А.А. Апостол<sup>1</sup>, Л.М. Даниленко<sup>1</sup>, А.А. Должиков<sup>1</sup>, Т.Г. Покровская<sup>1</sup>,  
О.С. Гудырев<sup>1</sup>, Я.С. Кочергина<sup>2</sup>, О.В. Дудникова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

<sup>2</sup> Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Белгородское бюро судебно-медицинской экспертизы», 308017, Россия, г. Белгород, ул. Волчанская, д. 159

E-mail: kuzubova@bsu.edu.ru

Получена 10.12.2023

После рецензирования 27.03.2024

Принята к печати 11.04.2024

**Цель.** Изучить влияние исследователя на оценку мышечной силы у животных в эксперименте на примере сравнения результатов автоматизированного теста «перевернутая сетка» и его классического варианта.

**Материалы и методы.** Для исследования были выбраны самцы линий (Bla/J,  $n=20$ ; FUS(1-359),  $n=20$ ; Tau P301S<sup>+/+</sup>,  $n=20$ ) и их фоновый контроль (C57BL/6J,  $n=20$ ; CD1,  $n=20$ ). Динамику изменения мышечного дефицита животных оценивали в автоматизированном и классическом варианте теста «перевернутая сетка».

**Результаты.** По результатам оценки мышечной силы мышей с редактированным геномом линий: FUS(1-359)<sup>+/+</sup>, Tau P301S<sup>+/+</sup>, B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ при помощи теста «перевернутая сетка» в классическом варианте и автоматизированном было установлено, что статистически значимых различий в сравнении с результатами, полученными при проведении классического варианта теста, получено не было. Стандартная ошибка среднего возрастала в классическом тесте по сравнению с автоматизированным на 23–39%. Было показано, что стандартная ошибка среднего в классическом варианте теста на мышцах линии Tau P301S<sup>+/+</sup> составила 6,24; 5,94; 5,88; 7,38 в 4-х возрастных точках; на мышцах линии FUS(1-359)<sup>+/+</sup> – 4,49; 6,8; 6,98 и 4,1; B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ – 7,66; 7,58; 8,3 и 7,92 соответственно.

**Заключение.** Таким образом, значение стандартной ошибки среднего результатов исследования динамики изменения мышечной силы при использовании автоматизированного варианта теста «перевернутая сетка» было снижено в сравнении с результатами проведения классического варианта теста. Результаты исследования показывают, что автоматизация общепризнанных поведенческих тестов способна повысить точность получаемых данных снизив влияние человеческого фактора на проведение манипуляции.

**Ключевые слова:** «перевернутая сетка»; автоматизация; поведенческое тестирование; нейродегенерация; трансгенные животные

**Список сокращений:** БАС – боковой амиотрофический склероз; БГ – болезнь Хантингтона; БП – болезнь Паркинсона; БА – болезнь Альцгеймера; ДД – двигательный дефицит; ПС – перевернутая сетка; МС – мышечная сила.

**Для цитирования:** П.Р. Лебедев, Е.В. Кузубова, В.М. Покровский, А.И. Радченко, С.И. Осипьян, Ю.В. Степенко, А.А. Апостол, Л.М. Даниленко, А.А. Должиков, Т.Г. Покровская, О.С. Гудырев, Я.С. Кочергина, О.В. Дудникова. Влияние исследователя на оценку мышечной силы у животных в эксперименте: сравнение автоматизированного теста «перевернутая сетка» и его классического варианта. *Фармация и фармакология*. 2024;12(1):63-73. DOI: 10.19163/2307-9266-2024-12-1-63-73

© П.Р. Лебедев, Е.В. Кузубова, В.М. Покровский, А.И. Радченко, С.И. Осипьян, Ю.В. Степенко, А.А. Апостол, Л.М. Даниленко, А.А. Должиков, Т.Г. Покровская, О.С. Гудырев, Я.С. Кочергина, О.В. Дудникова, 2024

**For citation:** P.R. Lebedev, E.V. Kuzubova, V.M. Pokrovsky, A.I. Radchenko, S.I. Osipyanyan, Y.V. Stepenko, A.A. Apostol, L.M. Danilenko, A.A. Dolzhikov, T.G. Pokrovskaya, O.S. Gudyrev, Ya.S. Kochergina, O.V. Dudnikova. Investigator's influence on the muscle strength assessment in animals in experiment: Comparison of automated "inverted grid" test and its classical variant. *Pharmacy & Pharmacology*. 2024;12(1):63-73. DOI: 10.19163/2307-9266-2024-12-1-63-73

# Investigator's influence on the muscle strength assessment in animals in experiment: Comparison of automated "inverted grid" test and its classical variant

P.R. Lebedev<sup>1</sup>, E.V. Kuzubova<sup>1</sup>, V.M. Pokrovsky<sup>1</sup>, A.I. Radchenko<sup>1</sup>, S.I. Osipyan<sup>1</sup>,  
Y.V. Stepenko<sup>1</sup>, A.A. Apostol<sup>1</sup>, L.M. Danilenko<sup>1</sup>, A.A. Dolzhikov<sup>1</sup>, T.G. Pokrovskaya<sup>1</sup>,  
O.S. Gudyrev<sup>1</sup>, Ya.S. Kochergina<sup>2</sup>, O.V. Dudnikova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University (BSU),  
85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015

<sup>2</sup> Belgorod Office Chief Medical Examiners,  
159, Volchanskaya Str., Belgorod, Russia, 308017

E-mail: Kuzubova@bsu.edu.ru

Received 10 Dec 2023

After peer review 27 March 2024

Accepted 11 April 2024

**The aim** of the work was to study the influence of the researcher on the muscle strength assessment in animals in the experiment by comparing the results of the automated "inverted grid" test and its classical variant.

**Materials and methods.** Male lines (Bla/J,  $n=20$ ; FUS(1-359),  $n=20$ ; Tau P301S<sup>+/+</sup>,  $n=20$ ) and their background controls (C57BL/6J,  $n=20$ ; CD1,  $n=20$ ) were selected for the study. The dynamics of changes in the muscle deficit of the animals was evaluated in the automated and classical variant of the "inverted grid" test.

**Results.** According to the results of the muscle strength assessment of mice with an edited genome of lines FUS(1-359)<sup>+/+</sup>, Tau P301S<sup>+/+</sup>, B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ, using the "inverted grid" test in the classical variant and the automated one, it was found that statistically significant differences were not obtained in comparison with the results obtained by the classical variant of the test. The standard error of the mean increases by 23–39% in the classical test compared to the automated one. It was shown that the standard error of the mean in the classical variant of the test in Tau P301S<sup>+/+</sup> mice was 6.24; 5.94; 5.88; 7.38 at 4 age points; in FUS(1-359)<sup>+/+</sup> mice, 4.49; 6.8; 6.98 and 4.1; B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ mice, 7.66; 7.58; 8.3 and 7.92, respectively.

**Conclusion.** Thus, the value of the standard error of the results study mean of the changes dynamics in the muscle strength when using the automated variant of the "inverted grid" test was reduced in comparison with the results of the classical variant of the test. The results of the study show that the automation of generally recognized behavioral tests is able to increase the accuracy of the obtained data reducing the influence of a human factor on the manipulation.

**Keywords:** "inverted grid"; automation; behavioral testing; neurodegeneration; transgenic animals

**Abbreviations:** ALS – amyotrophic lateral sclerosis; HD – Huntington's disease; PD – Parkinson's disease; AD – Alzheimer's disease; MD – motor deficit; PS – inverted grid; MS – muscle strength.

## ВВЕДЕНИЕ

Воспроизводимость и повторяемость результатов экспериментальной работы в биомедицинских исследованиях является актуальной темой для дискуссии среди исследователей и вызывает интенсивные дебаты в течение последних 10 лет [1]. В работах других авторов было показано, что от 50 до 90% экспериментальных данных являются невозпроизводимыми и спорны в своих выводах [2]. Указывают сразу на несколько причин плохой повторяемости и воспроизводимости результатов эксперимента – предвзятость при интерпретации результатов [3], неправильный подход к статистической обработке результатов [4], отсутствие рандомизации [5], несоблюдение правил содержания животных (различная скученность животных в клетке) [6], пренебрежение валидированием оборудования и вспомогательных материалов [7]. Работа с животными требует особого подхода при разработке дизайна исследования, рандомизации группы и минимизации влияния экспериментатора на результаты фенотипических тестов [8].

Проведение поведенческого исследования является неотъемлемой частью для характеристики нейродегенеративных и нервно-психических заболеваний на животных моделях. За последние 30 лет поведенческое тестирование повсеместно стало использоваться в неврологических и генетических исследованиях на животных [9].

С 1940 по 1989 гг. поиск с помощью библиотеки PubMed по «мышам» и «поведению» обнаружил около 1800 статей, в основном относящихся к генетике поведения, тестированию на наркотики и нейробиологии, но только в одной статье сообщается об анализе поведения трансгенных мышей [10]. С 1990 по 2023 год количество статей, посвященных тестированию поведения только генетически модифицированных мышей, выросло до 28 000 [11].

В изучении динамики симптомов неврологических заболеваний на трансгенных животных используют различные поведенческие тесты, одними из которых являются тесты, направленные на выявление моторных нарушений,

обеспечивающие хорошую фенотипическую характеристику заболевания. Для интерпретации эффективности терапии модельного заболевания экспериментального животного на человека необходимо получить помимо молекулярного также и фенотипическое подтверждение идентичности заболевания [12]. Данный инструмент является неотъемлемым компонентом современных протоколов изучения механизмов развития заболеваний с использованием экспериментальных моделей и генетически модифицированных лабораторных животных [13]. Исследование поведения обеспечивает количественный и качественный маркер симптомов заболеваний человека и является доклиническим инструментом для оценки эффективности новых методов лечения [14].

Создание животного с редактированным геномом, имитирующего фенотип заболевания человека, имеет важное значение для исследования основных патофизиологических каскадов и разработки новых методов лечения патологии.

Существуют различные генетически модифицированные мышинные модели для изучения патофизиологических аспектов нейродегенерации и миодистрофий. Наиболее часто используемыми моделями данных заболеваний являются трансгенные мышинные модели бокового амиотрофического склероза (БАС), болезни Хантингтона (БГ) [15], болезни Паркинсона (БП) [16, 17] и болезни Альцгеймера (БА) [18]. Двигательная дисфункция, присутствующая у данных трансгенных мышей, может быть классифицирована как двигательный дефицит (ДД), нарушение равновесия, координации или мышечная слабость (МС) [19].

Тестами, способными показать фенотипические проявления ДД, являются: тест «CatWalk», «Сужающаяся дорожка», «Staircase test», «Лестница с перекладинами», «Открытое поле». Одним из наиболее используемых тестов для оценки моторных нарушений является «перевернутая сетка» (ПС), которая используется для оценки силы конечностей мышей, координации и выносливости. Тест заключается в вовлечении всех четырех конечностей животного для фиксации к проволочной сетке, что позволяет проводить неинвазивное измерение МС животного, показывать устойчивое напряжение конечностей, противодействуя воздействию гравитации. Стимулирующим фактором удержания животного на сетке является страх высоты. Оценка интересующих параметров проводится путем размещения животного на перевернутой сетке и определения срока его фиксации на ней. Тест оценивает МС, координацию движений и равновесие животного, измеряя то, как долго оно может держаться на перевернутом экране, прежде чем упасть [20].

В экспериментах, связанных с изучением терапии мышечных дистрофий, исследуют ряд симптомов

заболевания, таких как ДД, ассоциируемый с прогрессированием в проксимальных мышцах конечностей атрофии мышц [21]. Для изучения динамики заболевания ученые используют поведенческие тесты, способные интерпретировать клиническое улучшение состояния здоровья животного от терапии. Одним из таких тестов и является «перевернутая сетка».

Создание автоматизированных форм установок для проведения поведенческого исследования животных, способно объективизировать исследование, исключить неблагоприятный эффект взаимодействия «исследователь–животное» на проведение теста, оптимизировать продолжительность теста и снизить трудозатраты на его проведение. Автоматизация протокола позволяет получить больше данных для проведения статистического сравнения между группами, не проводя дополнительных манипуляций с животным [22, 23].

В данной статье описывается сравнительное исследование классического варианта теста ПС и его автоматизированной формы для использования его с целью определения ДД и динамики изменения МС у мышей с подтвержденным фенотипом нейродегенеративных и миодистрофийных заболеваний человека.

**ЦЕЛЬ.** Изучить влияние исследователя на оценку мышечной силы у животных в эксперименте на примере сравнения автоматизированного теста «перевернутая сетка» и его классического варианта.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные

Для исследования были выбраны самцы линий Bla/J ( $n=20$ ), FUS(1-359)<sup>+/-</sup> ( $n=20$ ), Tau P301S<sup>+/-</sup> ( $n=20$ ) и их фоновый контроль (C57BL/6J,  $n=20$ ; CD1,  $n=20$ ), которых содержали группами согласно их возрасту, генетическому фону и группе в эксперименте. Животные содержались в условиях SPF вивария ФГАОУ «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ БелГУ) в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) при температурном режиме от +22 до +26°C, относительной влажности в системе содержания от 50 до 65%, имели свободный доступ к корму и воде. В работе руководствовались этическими принципами обращения с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS No. 170). Все болезненные манипуляции с животными проводились в соответствии с регламентирующими стандартами: Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных

целях. Экспериментальные исследования были одобрены Биоэтической комиссией НИУ БелГУ (протокол № 15/10 от 29.10.2021 г.).

### Дизайн исследования

Для сравнительного исследования регистрации ДД и динамики изменения МС при помощи классического теста «перевернутая сетка» и его автоматизированной формы у трансгенных животных самцов и их фонового контроля линий B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ, FUS(1-359)<sup>+/-</sup>, Tau P301S<sup>+/-</sup> в 4-х возрастных точках (период проявления клинических признаков заболевания) для каждой когорты мышей (Рис. 1).

В 50-ю, 51-ю, 52-ю и 53-ю недели соответственно были созданы экспериментальные группы линии мышей B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ.

1) Группа изучения динамики ДД и МС у линии B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ<sup>-/-</sup> ( $n=10$ ) при помощи классического варианта теста ПС (Bla/J).

2) Группа изучения динамики ДД и МС у линии C57BL/6J ( $n=10$ ) при помощи автоматизированного варианта теста ПС (b/C57BL/6J). Группа является контрольной к линии Bla/J<sup>+/-</sup>.

3) Группа изучения динамики ДД и МС у линии B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ<sup>-/-</sup> ( $n=10$ ) при помощи автоматизированного варианта теста ПС (Bla/J).

4) Группа изучения динамики ДД и МС у линии C57BL/6J ( $n=10$ ) при помощи классического варианта теста ПС (b/C57BL/6J). Группа является контрольной к линии Bla/J.

В 11-ю, 12-ю, 13-ю и 14-ю недели соответственно были созданы экспериментальные группы линии мышей FUS(1-359).

1) Группа изучения динамики ДД и МС у линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup> ( $n=10$ ) при помощи классического варианта теста ПС(FUS(1-359)).

2) Группа изучения динамики ДД и МС у линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup> ( $n=10$ ) при помощи автоматизированного варианта теста ПС (FUS(1-359)).

3) Группа изучения динамики ДД и МС у линии CD-1 ( $n=10$ ) при помощи автоматизированного варианта теста ПС (CD-1). Группа является контрольной к линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup>.

4) Группа изучения динамики ДД и МС у линии CD-1 ( $n=10$ ) при помощи классического варианта теста ПС (CD-1). Группа является контрольной к линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup>.

В 16-ю, 17-ю, 18-ю и 19-ю недели соответственно были созданы экспериментальные группы линии мышей Tau P301S<sup>+/-</sup>.

1) Группа изучения динамики ДД и МС у линии Tau P301S<sup>+/-</sup> ( $n=10$ ) при помощи классического варианта теста ПС (Tau P301S<sup>+/-</sup>).

2) Группа изучения динамики ДД и МС у линии Tau P301S<sup>+/-</sup> ( $n=10$ ) при помощи автоматизированного варианта теста ПС (Tau P301S<sup>+/-</sup>).

3) Группа изучения динамики ДД и МС у линии C57BL/6J ( $n=10$ ) при помощи автоматизированного

варианта теста ПС (C57BL/6J). Группа является контрольной к линии Tau P301S<sup>+/-</sup>.

4) Группа изучения динамики ДД и МС у линии C57BL/6J ( $n=10$ ) при помощи классического варианта теста ПС (C57BL/6J). Группа является контрольной к линии Tau P301S<sup>+/-</sup>.

В работе использовали 3 линии мышей с проявлением симптомов заболевания, затрагивающих моторную функцию. Линия FUS(1-359)<sup>+/-</sup>, в нервной системе которых экспрессируется трансгенная последовательность, кодирующая aberrантную форму белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации под нейронспецифичным промотором Thy-1 [24]. Наиболее распространенные мутации гена FUS, связанные с заболеванием, влияют на сигнал ядерной локализации С-конца кодируемого белка, вызывая его накопление в цитоплазме и, по крайней мере, частичное истощение его ядерного пула [25]. Эта линия мышей моделирует боковой амиотрофический склероз. Данное нейродегенеративное заболевание характеризуется утратой нейронов в моторных областях головного и спинного мозга. Линия FUS(1-359)<sup>+/-</sup> характеризуется наличием манифестации симптомов нарушения двигательной активности и МС у моно-аллельного мутантного животного на 15-й неделе жизни [26].

В исследовании были использованы трансгенные мыши Tau P301S<sup>+/-</sup>, которые экспрессируют человеческий Tau (1N4R) с мутацией P301S [27]. Идентификация беззетворных мутаций в MAPT, гене Tau, в случаях лобно-височной деменции показала, что дисфункции белка Tau достаточно, чтобы вызвать нейродегенерацию и деменцию [28]. У данных мышей наблюдается прогрессирующая патология нейрофибриллярных клубков и нейродегенерация в головном и спинном мозге. В спинном мозге Tau-патология приводит к резкой потере двигательных нейронов (примерно 50%) и ранним, прогрессирующим и тяжелым двигательным нарушениям [29]. Проявление ДД нижних конечностей начинается примерно в возрасте 3-х мес [30].

Также в работе использована сублиния мышей B6.ADysf<sup>prmd</sup>/GeneJ (Bla/J), у которых была случайно обнаружена спонтанная инсерция в интроне 4. Данный вид патологии представляет из себя фенотипически гетерогенную прогрессирующую мышечную дистрофию, вызванную мутациями в гене DYSF, который кодирует трансмембранный белок дисферлин, участвующий в восстановлении сарколеммы. Также он участвует в процессе восстановления мембран, в системе внутриклеточных пузырьков и в развитии Т-каналцев в скелетных мышцах [31]. Заболевания характеризуются слабостью и атрофией мышц, которые медленно и симметрично прогрессируют в проксимальных мышцах поясов конечностей примерно на 50-й неделе жизни животного [32].

### Оценка мышечной силы и двигательного дефицита

Динамику изменения мышечного дефицита животных оценивали в автоматизированном и классическом варианте теста ПС [33]. В случае использования автоматизированного варианта, животное помещали на центр сетки 25×25 см с шириной отверстий 5×5 мм и толщиной сетки 0,5 мм. Переворачивание сетки с животным происходило с заданной скоростью при помощи автоматизированной платформы. Сетка установлена на опорах с регулируемой высотой (от 30 до 100 см с шагом 10 см), над клеткой с толстым слоем подстила. На сетку помещают животное, после того как оно стабильно хватается за сетку всеми четырьмя лапами, на управляющем контролере запускаем протокол. После чего сетка посредством сервопривода переворачивается вместе с животным на 180°. При этом вес сетки с лабораторным животным регистрируется соответствующим тензометрическим датчиком, а скачкообразное изменение веса сетки интерпретируется, как падение животного с сетки с регистрацией времени фактического нахождения на ней и отображением этого результата на дисплее. После завершения протокола животное извлекается из теста путем выдвижения клетки из установки.

Автоматизированный вариант теста был сделан на оборудовании согласно патенту на изобретение

№ 2815584 «Автоматизированное устройство для проведения поведенческого теста «перевернутая сетка».

В случае использования классического варианта установка перевернутая сетка представляет собой проволочную сетку 25×25 см с размером ячеек 5×5 мм с диаметром проволоки 0,5 мм, окруженная перегородкой размером 4 см, предотвращающей попытку мыши перелезть на другую сторону. Тест используется для оценки координации движений и МС обеих пар конечностей. Мышей помещали в центр проволочной сетки, которую переворачивали и устанавливали на высоте 50 см над мягкой поверхностью. Регистрировалось время падения животного или животное снималась с сетки, если время достигало 180 сек [31].

### Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью программы GraphPad Prism Software 8.0 («GraphPad Software Inc.», США). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (*U*-критерия Манна-Уитни). Для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## Дизайн исследования

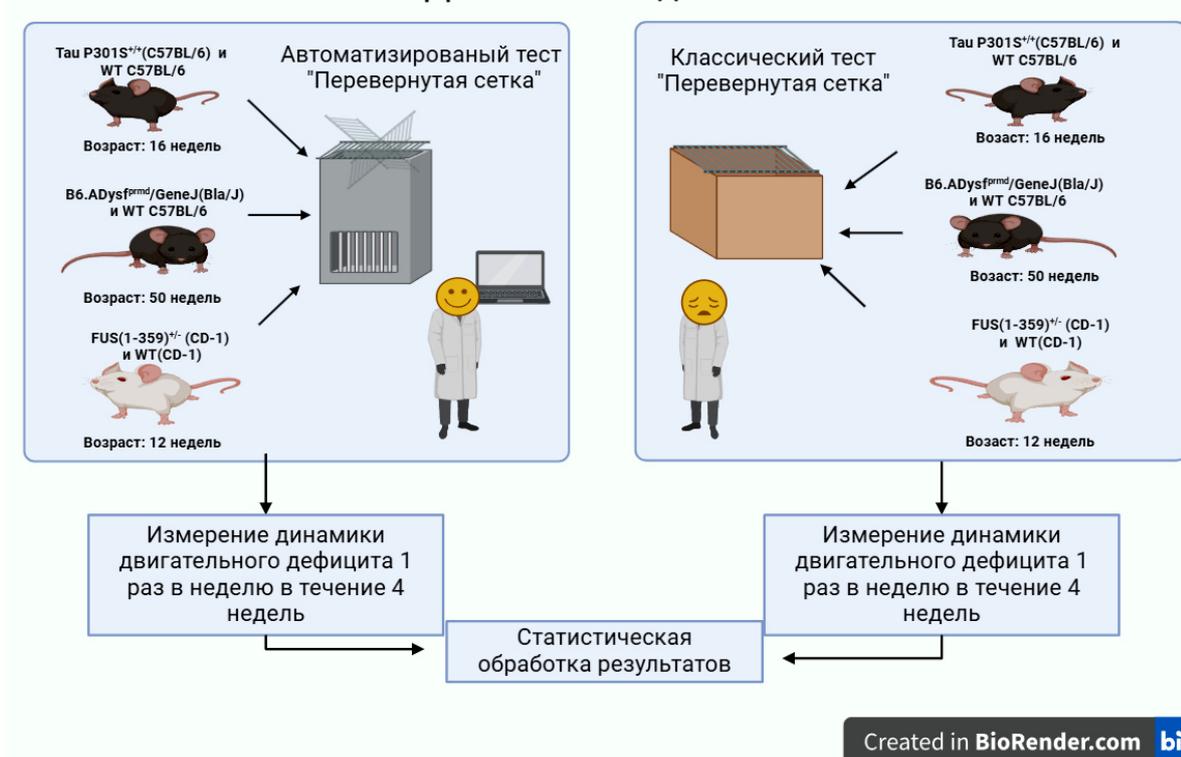


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Примечание: экспериментальные (Bla/J,  $n=20$ ; FUS(1-359)<sup>+/+</sup>,  $n=20$ ; *Tau* P301S<sup>+/+</sup>,  $n=20$ ) и контрольные (C57BL/6J,  $n=20$ ; CD1,  $n=20$ ). ДД – двигательный дефицит.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении сравнительного исследования классического варианта теста ПС и его автоматизированной формы для использования его с целью определения ДД и динамики изменения МС у мышей с подтвержденным фенотипом нейродегенеративных и миодистрофийных заболеваний человека ранее были получены следующие результаты [21, 34, 35].

В результате проведения теста ПС, степень повышения симптомов ДД и снижения МС у мышей линии Tau P301S<sup>+/-</sup> (Рис. 2) в сравнении с группой контроля (C57BL/6J) в случае использования автоматического варианта ПС (Tau P301S<sup>+/-</sup>) составила 32,17, 48,67, 67,67 и 82,17% ( $p < 0,001$ ) в возрасте 16, 17, 18, 19 недель соответственно. В случае проведения теста по классическому варианту у группы (Tau P301S<sup>+/-</sup>) составила 22,17, 39,34, 61,83 и 72,17% ( $p < 0,0001$ ) в возрасте 16, 17, 18, 19 недель соответственно в сравнении с контрольной группой (C57BL/6J). Таким образом, разница результатов, полученных при проведении двух вариантов теста ПС, составила 10, 9,33, 5,84 и 10% в возрасте 16, 17, 18 и 19 недель соответственно.

В результате проведения теста ПС, степень повышения симптомов ДД и снижения МС у мышей линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup> (Рис. 3) в сравнении с группой контроля (CD-1) в случае использования автоматического варианта теста (FUS(1-359)<sup>+/-</sup>) составила 21,83, 53,17, 72,67 и 90,5% ( $p < 0,0001$ ) в возрасте 11, 12, 13, 14 недель соответственно. В случае проведения теста по классическому варианту у группы FUS(1-359)<sup>+/-</sup> составила 16,17, 40,67, 61,67 и 73,33% ( $p < 0,0001$ ) в возрасте 11, 12, 13 и 14 недель соответственно в сравнении с контрольной группой (CD-1). Таким образом, разница результатов, полученных при проведении двух вариантов теста ПС, составила 5,67, 12,5, 11 и 17,17% в 1–4 недели исследования.

В результате проведения теста ПС, степень повышения симптомов ДД и снижения МС у мышей линии B1a/J (Рис. 4) в сравнении с группой контроля (C57BL/6J) в случае использования автоматического варианта ПС (B1a/J) составила 25,83, 33,51, 33 и 58,67% ( $p < 0,0001$ ) в возрасте 12, 13, 14 и 15 недель соответственно. В случае проведения теста по классическому варианту у группы (B1a/J) составила 41,17, 44,67, 51,83 и 59,33% ( $p < 0,0001$ ) в возрасте 50, 51, 52, 53 недели соответственно в сравнении с контрольной группой (C57BL/6J). Таким образом, разница результатов, полученных при проведении двух вариантов теста ПС, составила 15,34, 11,67, 0,5 и 0,67% в 1–4 недели исследования.

На примере автоматизации всеми известного теста «перевернутая сетка», мы хотели показать различия в полученных результатах, при использовании автоматизированного комплекса и классического теста на трех сублиниях трансгенных животных (Рис. 5). Было показано, что стандартная

ошибка среднего в классическом варианте теста на мышах линии Tau P301S<sup>+/-</sup> составила 6,24, 5,94, 5,88, и 7,38 в 4-х возрастных точках, на мышах линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup> – 4,49, 6,8, 6,98 и 4,1; B1a/J – 7,66, 7,58, 8,3 и 7,92 соответственно. Стандартная ошибка среднего при анализе данных, полученных при проведении автоматического варианта теста ПС, составила у линии Tau P301S<sup>+/-</sup> – 5,1, 4,93, 3,42 и 2,26 соответственно, на мышах линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup> – 4,24, 4,52, 5,19 и 2,9; B1a/J – 5,24, 4,52, 4,7 и 4,85 соответственно. Таким образом, автоматизация теста и уменьшение влияния экспериментатора снизило стандартную ошибку среднего на мышах линии Tau P301S<sup>+/-</sup> на 36,6%, FUS(1-359)<sup>+/-</sup> – на 23,1%; B6. ADysf<sup>frmd</sup>/GeneJ – 38,5%.

Общепризнанно, что экспериментатор влияет на результат эксперимента и его интерпретацию, поэтому важно автоматизировать данную переменную и минимизировать влияние экспериментатора как на сам эксперимент, так и на его интерпретацию [36, 37].

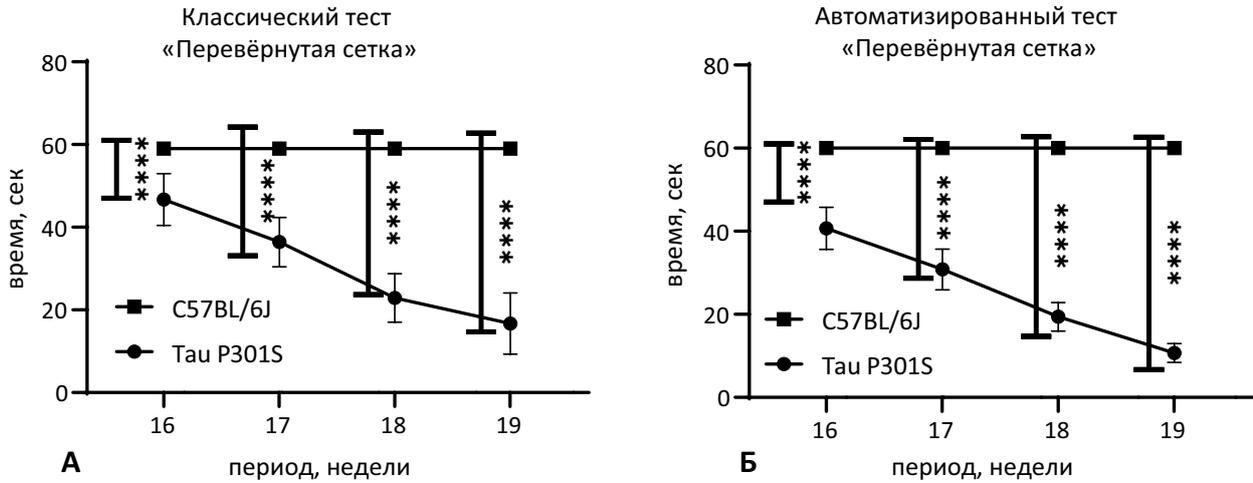
## ОБСУЖДЕНИЕ

Поведенческое тестирование животных в экспериментальных исследованиях с целью определения ДД и МС используется для оценки результативности фармакологической терапии при многих моделях заболеваний. Первая экспериментальная статья, в которой был упомянут тест ПС, датируется 1986 годом<sup>1</sup>.

Тесты известные под названием «открытое поле», «перевернутая сетка», и тест с «вращающимся стержнем» широко используются в экспериментальных работах, связанных с оценкой эффективности терапевтической коррекции заболеваний основным симптомом которых являются нарушения координации и двигательный дефицит. В настоящее время, существует возможность автоматизации классических для исследователей тестов, что минимизирует контакт человека с животным тем самым делая исследование более объективным и точным, также это способствует повышению пропускной способности установки. Строго говоря, данная работа показывает, что существует возможность автоматизировать большое количество поведенческих тестов широко известных научно-исследовательскому сообществу, что повысит интенсивность проведения экспериментов.

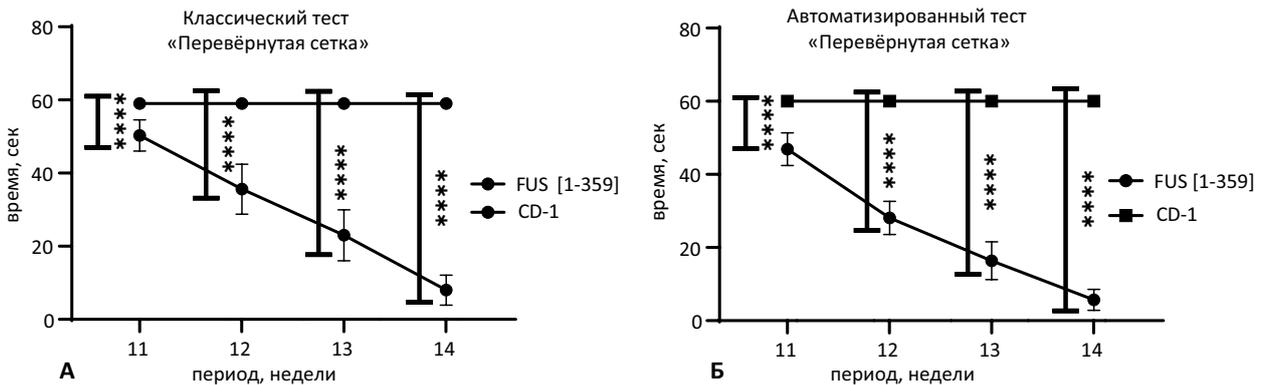
Примерами могут служить тест «Cat Walk», сущность которого заключается в автоматизации регистрации положения лап животного при походке посредством инфракрасного излучения, что ранее делалось путем нанесения туши на лапы испытуемого и помещением его на листы бумаги.

<sup>1</sup> Kordower J.H., Felten S.Y., Felten D.L., Gash D.M. Behavioral sequelae following MPTP administration in mice. A neurotoxin producing a parkinsonian syndrome. Orlando: Academic Press. – 1986. – P. 413–417.



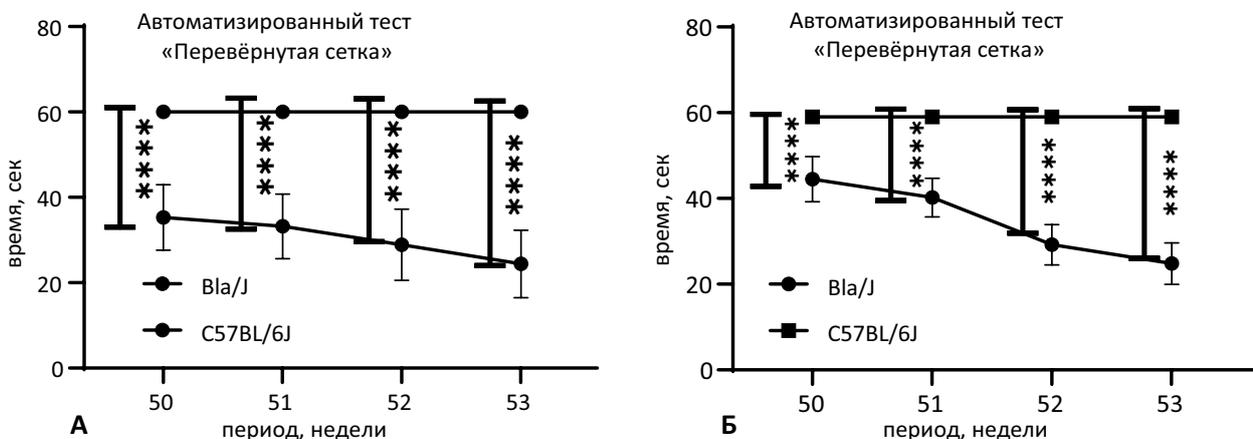
**Рисунок 2 – Исследование двигательного дефицита у линии Tau P301S<sup>+/+</sup> при помощи автоматизированного и классического варианта теста «перевернутая сетка»**

Примечание: представлены медианы и стандартная ошибка среднего. Выборки проверены на нормальность, а статистическая достоверность оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни (\*\*\*\**p* < 0,0001). А – классический тест ПС, Б – автоматизированный тест ПС.



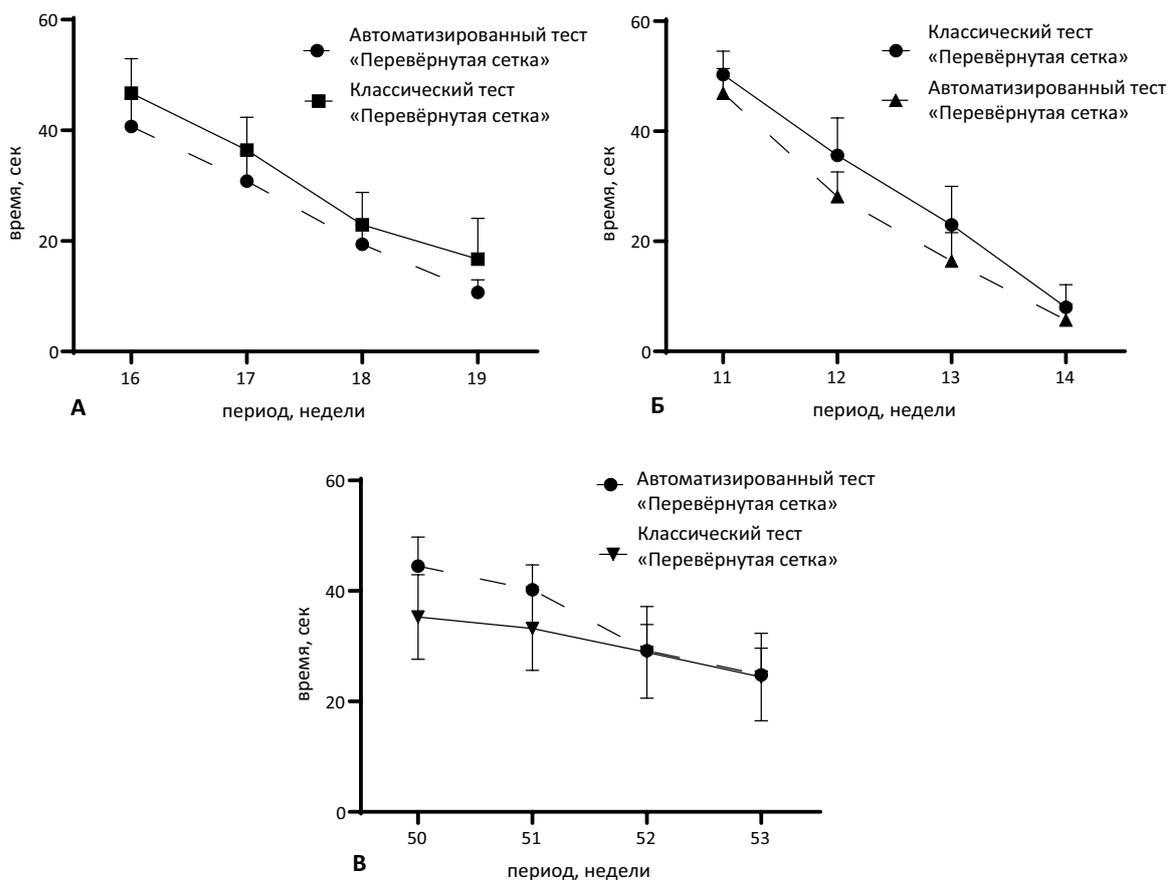
**Рисунок 3 – Исследование двигательного дефицита у линии FUS(1-359)<sup>+/-</sup> при помощи автоматизированного и классического варианта теста «перевернутая сетка»**

Примечание: представлены медианы и стандартная ошибка среднего. Выборки проверены на нормальность, а статистическая достоверность оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни (\*\*\*\**p* < 0,0001). А – классический тест ПС, Б – автоматизированный тест ПС.



**Рисунок 4 – Исследование двигательного дефицита у линии BlA/J при помощи автоматизированного и классического варианта теста перевернутая сетка**

Примечание: представлены медианы и стандартная ошибка среднего. Выборки проверены на нормальность, а статистическая достоверность оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни (\*\*\*\**p* < 0,0001). А – классический тест ПС, Б – автоматизированный тест ПС.



**Рисунок 5 – Сравнение результатов исследования двигательного дефицита у линии А – Tau P301S<sup>+/+</sup>, Б – FUS(1-359)<sup>+/+</sup>, В – Blc/J, при помощи автоматизированного и классического варианта теста «перевернутая сетка»**

Многие научные группы работают над разработкой полностью автоматизированной системы для поведенческого тестирования. Например, разработана система «IntelliCage» [11], которая кроме автоматизации работы позволяет избежать потенциально тревожных условия для животных и обладает широким спектром различных протоколов исследования, но кроме весомых достоинств, данная система не может до конца заменить всем известные классические поведенческие тесты. Еще одним ярким примером является полная автоматизация домашней клетки для непрерывного тестирования мышей [38]. Безусловно данная разработка является ценным инструментом для всестороннего фенотипирования, но большой массив данных для обработки и скорость проведения тестов подходит не для всех экспериментальных работ.

В некоторых случаях автоматизации и усовершенствованию подвергаются и тесты, которые на данный момент уже используют автоматическую трассировку перемещения животного (EthoVision и VideoMot). Так, например для теста «Водный лабиринт Морриса» был предложен новый инструмент «Minorontikos» [39], позволяющий объединить различные методы обсчета и интерпретации результатов.

Проведенная нами автоматизация «перевернутой сетки» показала, что кроме уменьшения стандартной ошибки среднего по сравнению с классическим тестом на 23–39%, также повышается коэффициент полезного действия за счет уменьшения затрачиваемого времени на проведение теста. Следовательно, тем самым повышается пропускная способность тестирования и увеличивается количество получаемых новых косвенных числовых значения (например, регистрация угла, при котором животное теряет фиксацию с сеткой). В среднем, на выполнение стандартного ручного фенотипического тестирования 30–40 мышей (включая регистрацию спонтанной активности и анализ данных) уходит 20 ч рабочего времени. Еще одним немаловажным достоинством установки является стандартизация скорости вращения сетки и высоты её установки относительно клетки с амортизирующим покрытием, что позволяет уменьшить разницу в испытываемом стрессе между мышами.

#### Ограничения исследования

На результаты исследования может повлиять: малочисленная выборка, проведение исследования на экспериментальных и контрольных

животных в разное время циркадного ритма, неудовлетворительное содержание животных, в том числе и высокая стрессовая нагрузка на экспериментальный объект, близкое нахождение экспериментатора возле прибора при проведении тестирования.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время неотъемлемой частью при проведении экспериментальной работы с животными является использование фенотипических тестов. Но в тоже время неточности оценки параметров поведения животных резко снижают ценность результатов всего эксперимента и приводят к значительным финансовым затратам. Поэтому во всем мире активно ведутся разработки систем

автоматической регистрации и оценки поведения. Нами была проделана работа по автоматизации теста «перевернутая сетка».

В ходе сравнительной характеристика классического теста с автоматизированным значение стандартной ошибки среднего результата исследования динамики изменения МС при использовании автоматизированного варианта теста «перевернутая сетка» было снижено в сравнении с результатами проведения классического варианта теста. Результаты исследования показывают, что автоматизация общепризнанных поведенческих тестов способна повысить точность получаемых данных, снизив влияние человеческого фактора на проведение манипуляции.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1346. Разработка автоматизированной системы проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № FZWG-2021-0016.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

П.Р. Лебедев – автоматизация теста «перевернутая сетка»; Е.В. Кузубова – написание статьи, разработка дизайна исследования; В.М. Покровский – анализ литературы, написание статьи; А.И. Радченко – оценка и проведение поведенческих тестов; С.И. Осипьян – подготовка когорт животных, генотипирование; А.В. Степенко – интерпретация результатов; А.А. Апостол – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных; Л.М. Даниленко – разработка дизайна исследования; А.А. Должиков – оформление графического материала; Т.Г. Покровская – консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ; О.С. Гудырев – статистическая обработка данных; Я.С. Кочергина – консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ; О.В. Дудникова – анализ данных. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Peirson S.N., Brown L.A., Potheary C.A., Benson L.A., Fisk A.S. Light and the laboratory mouse // *J Neurosci Methods*. – 2018. – Vol. 300. – P. 26–36. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2017.04.007
2. Fitzpatrick B.G., Koustova E., Wang Y. Getting personal with the “reproducibility crisis”: interviews in the animal research community // *Lab Anim (NY)*. – 2018. – Vol. 47, No. 7. – P. 175–177. DOI: 10.1038/s41684-018-0088-6
3. Munafò M.R., Nosek B.A., Bishop D.V.M., Button K.S., Chambers C.D., du Sert N.P., Simonsohn U., Wagenmakers E.J., Ware J.J., Ioannidis J.P.A. A manifesto for reproducible science // *Nat Hum Behav*. – 2017. – Vol. 1, No. 1. – P. 0021. DOI: 10.1038/s41562-016-0021
4. Voelkl B., Würbel H. A reaction norm perspective on reproducibility // *Theory Biosci*. – 2021. – Vol. 140, No. 2. – P. 169–176. DOI: 10.1007/s12064-021-00340-y
5. García-Berthou E., Alcaraz C. Incongruence between test statistics and P values in medical papers // *BMC Med Res Methodol*. – 2004. – Vol. 4. – P. 13. DOI: 10.1186/1471-2288-4-13
6. Manouze H., Ghestem A., Poillierat V., Bennis M., Ba-M’hamed S., Benoliel J.J., Becker C., Bernard C. Effects of Single Cage Housing on Stress, Cognitive, and Seizure Parameters in the Rat and Mouse Pilocarpine Models of Epilepsy // *eNeuro*. – 2019. – Vol. 6, No. 4. – P. ENEURO.0179-18.2019. DOI: 10.1523/ENEURO.0179-18.2019
7. Replicating scientific results is tough – but essential. *Nature*. – 2021. – Vol. 600, No. 7889. – P. 359–360. DOI: 10.1038/d41586-021-03736-4
8. Smith A.J. Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals // *Lab Anim Res*. – 2020. – Vol. 36. – P. 21. DOI: 10.1186/s42826-020-00054-0
9. Nigri M., Åhlgren J., Wolfer D.P., Voikar V. Role of Environment and Experimenter in Reproducibility of Behavioral Studies With Laboratory Mice // *Front Behav Neurosci*. – 2022. – Vol. 16. – P. 835444. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.835444
10. Finger S., Heavens R.P., Sirinathsinghi D.J., Kuehn M.R., Dunnett S.B. Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome //

- J Neurol Sci. – 1988. – Vol. 86, No. 2-3. – P. 203–213. DOI: 10.1016/0022-510x(88)90099-8
11. Lipp H.P., Krackow S., Turkes E., Benner S., Endo T., Russig H. IntelliCage: the development and perspectives of a mouse- and user-friendly automated behavioral test system // *Front Behav Neurosci.* – 2024. – Vol. 17. – P. 1270538. DOI: 10.3389/fnbeh.2023.1270538
  12. Rusmini P., Cortese K., Crippa V., Cristofani R., Cicardi M.E., Ferrari V., Vezzoli G., Tedesco B., Meroni M., Messi E., Piccolella M., Galbiati M., Garrè M., Morelli E., Vaccari T., Poletti A. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration // *Autophagy.* – 2019. – Vol. 15, No. 4. – P. 631–651. DOI: 10.1080/15548627.2018.1535292
  13. Wang C., Chen S., Guo H., Jiang H., Liu H., Fu H., Wang D. Forsythoside A Mitigates Alzheimer’s-like Pathology by Inhibiting Ferroptosis-mediated Neuroinflammation via Nrf2/GPX4 Axis Activation // *Int J Biol Sci.* – 2022. – Vol. 18, No. 5. – P. 2075–2090. DOI: 10.7150/ijbs.69714
  14. Салмина А.Б., Горина Я.В., Большакова А.В., Власова О.Л. Анализ основных мировых трендов в объективизации протоколов поведенческого тестирования лабораторных животных с патологией головного мозга // *Биомедицина.* – 2023. – Т. 19, № 1. – С. 34–46. DOI: 10.33647/2074-5982-19-1-34-46
  15. Yamin H.G., Menkes-Caspi N., Stern E.A., Cohen D. Age-Dependent Degradation of Locomotion Encoding in Huntington’s Disease R6/2 Model Mice // *J Huntingtons Dis.* – 2021. – Vol. 10, No. 3. – P. 391–404. DOI: 10.3233/JHD-210492
  16. Rai S.N., Singh P. Advancement in the modelling and therapeutics of Parkinson’s disease. *J Chem Neuroanat.* – 2020. – Vol. 104. – P. 101752. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2020.101752
  17. Mustapha M., Mat Taib C.N. MPTP-induced mouse model of Parkinson’s disease: A promising direction of therapeutic strategies // *Bosn J Basic Med Sci.* – 2021. – Vol. 21, No. 4. – P. 422–433. DOI: 10.17305/bjbms.2020.5181
  18. Zang C., Liu H., Shang J., Yang H., Wang L., Sheng C., Zhang Z., Bao X., Yu Y., Yao X., Zhang D. Gardenia jasminoides J.Ellis extract GJ-4 alleviated cognitive deficits of APP/PS1 transgenic mice // *Phytotherapy.* – 2021. – Vol. 93. – P. 153780. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153780
  19. Osmon K.J., Vyas M., Woodley E., Thompson P., Walia J.S. Battery of Behavioral Tests Assessing General Locomotion, Muscular Strength, and Coordination in Mice // *J Vis Exp.* – 2018. – No. 131. – P. 55491. DOI: 10.3791/55491
  20. Zolotarev Y.A., Shram S.I., Dadayan A.K., Dolotov O.V., Markov D.D., Nagaev I.Y., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Sokolov O.Y., Kost N.V. HLD-6 peptides exhibit neuroprotective effects in the experimental model of preclinical Parkinson’s disease // *Neuropeptides.* – 2022. – Vol. 96. – P. 102287. DOI: 10.1016/j.npep.2022.102287
  21. Bohlen M., Hayes E.R., Bohlen B., Bailoo J.D., Crabbe J.C., Wahlsten D. Experimenter effects on behavioral test scores of eight inbred mouse strains under the influence of ethanol // *Behav Brain Res.* – 2014. – Vol. 272. – P. 46–54. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.06.017
  22. Hänell A., Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research // *Front Behav Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 252. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00252
  23. de Munter J., Babaevskaya D., Wolters E.C., Pavlov D., Lysikova E., V Kalueff A., Gorlova A., Oplatchikova M., Pomytkin I.A., Proshin A., Umriukhin A., Lesch K.P., Strekalova T. Molecular and behavioural abnormalities in the FUS-tg mice mimic frontotemporal lobar degeneration: Effects of old and new anti-inflammatory therapies // *J Cell Mol Med.* – 2020. – Vol. 24, No. 17. – P. 10251–10257. DOI: 10.1111/jcmm.15628
  24. Korobeynikov V.A., Lyashchenko A.K., Blanco-Redondo B., Jafar-Nejad P., Shneider N.A. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis // *Nat Med.* – 2022. – Vol. 28, No. 1. – P. 104–116. DOI: 10.1038/s41591-021-01615-z
  25. Lysikova E.A., Kukharsky M.S., Chaprov K.D., Vasilieva N.A., Roman A.Y., Ovchinnikov R.K., Deykin A.V., Ninkina N., Buchman V.L. Behavioural impairments in mice of a novel FUS transgenic line recapitulate features of frontotemporal lobar degeneration // *Genes Brain Behav.* – 2019. – Vol. 18, No. 8. – P. e12607. DOI: 10.1111/gbb.12607
  26. Korde D.S., Humpel C. Spreading of P301S Aggregated Tau Investigated in Organotypic Mouse Brain Slice Cultures // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12, No. 9. – P. 1164. DOI: 10.3390/biom12091164
  27. Larson T., Khandelwal V., Weber M.A., Leidinger M.R., Meyerholz D.K., Narayanan N.S., Zhang Q. Mice expressing P301S mutant human tau have deficits in interval timing // *Behav Brain Res.* – 2022. – Vol. 432. – P. 113967. DOI: 10.1016/j.bbr.2022.113967
  28. Macdonald J.A., Bronner I.F., Drynan L., Fan J., Curry A., Fraser G., Lavenir I., Goedert M. Assembly of transgenic human P301S Tau is necessary for neurodegeneration in murine spinal cord // *Acta Neuropathol Commun.* – 2019. – Vol. 7, No. 1. – P. 44. DOI: 10.1186/s40478-019-0695-5
  29. Zarate N., Gundry K., Yu D., Casby J., Eberly L.E., Öz G., Gomez-Pastor R. Neurochemical correlates of synapse density in a Huntington’s disease mouse model // *J Neurochem.* – 2023. – Vol. 164, No. 2. – P. 226–241. DOI: 10.1111/jnc.15714
  30. Корокин М.В., Кузубова Е.В., Радченко А.И., Деев Р.В., Яковлев И.А., Дейкин А.В., Жунусов Н.С., Краюшкина А.М., Покровский В.М., Пученкова О.А., Чапров К.Д., Екимова Н.В., Бардаков С.Н., Чернова О.Н., Емелин А.М., Лимаев И.С. МЫШИ В6.A-DYSF<sup>PRMD</sup>/GeneJ как генетическая модель дисферлинопатии // *Фармация и фармакология.* – 2022. – Т. 10, № 5. – С. 483–496. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-483-496
  31. Seo K., Kim E.K., Choi J., Kim D.S., Shin J.H. Functional recovery of a novel knockin mouse model of dysferlinopathy by readthrough of nonsense mutation // *Mol Ther Methods Clin Dev.* – 2021. – Vol. 21. – P. 702–709. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.04.015
  32. Lysikova E.A., Funikov S., Rezvykh A.P., Chaprov K.D., Kukharsky M.S., Ustyugov A., Deykin A.V., Flyamer I.M., Boyle S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. Low Level of Expression of C-Terminally Truncated Human FUS Causes Extensive Changes in the Spinal Cord Transcriptome of Asymptomatic Transgenic Mice // *Neurochem Res.* – 2020. – Vol. 45, No. 5. – P. 1168–1179. DOI: 10.1007/s11064-020-02999-z
  33. Вихарева Е.А., Чичёва М.М., Евгеньев М.Б., Фуников С.Ю., Дейкин А.В., Бачурин С.О., Устюгов А.А. Влияние белков теплового шока на продолжительность жизни и поведенческие функции животных с

- FUS-протеинопатией // Нейрохимия. – 2021. – Т. 38, № 1. – С. 37–42. DOI: 10.31857/S1027813321010143
34. Begam M., Collier A.F., Mueller A.L., Roche R., Galen S.S., Roche J.A. Diltiazem improves contractile properties of skeletal muscle in dysferlin-deficient BLA mice, but does not reduce contraction-induced muscle damage // *Physiol Rep.* – 2018. – Vol. 6, No. 11. – P. e13727. DOI: 10.14814/phys2.13727
35. Gessesse G.W., Tamrat L., Damji K.F. Amsler grid test for detection of advanced glaucoma in Ethiopia // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, No. 3. – P. e0230017. DOI: 10.1371/journal.pone.0230017
36. Sturman O., Germain P.L., Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test // *Stress.* – 2018. – Vol. 21, No. 5. – P. 443–452. DOI: 10.1080/10253890.2018.1438405
37. Mathiasen J.R., Moser V.C. The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents // *Curr Protoc.* – 2023. – Vol. 3, No. 5. – P. e780. DOI: 10.1002/cpz1.780
38. Ho H., Kejzar N., Sasaguri H., Saito T., Saido T.C., De Strooper B., Bauza M., Krupic J. A fully automated home cage for long-term continuous phenotyping of mouse cognition and behavior // *Cell Rep Methods.* – 2023. – Vol. 3, No. 7. – P. 100532. DOI: 10.1016/j.crmeth.2023.100532
39. Чернюк Д.П., Зорин А.Г., Деревцова К.З., Ефимова Е.В., Приходько В.А., Сысоев Ю.И., Власова О.Л., Болсуновская М.В., Безпрозванный И.Б. Автоматический анализ данных поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса» // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* – 2021. – Т. 71, № 1. – С. 126–135. DOI: 10.31857/S0044467721010044

## АВТОРЫ

**Лебедев Петр Романович** – младший научный сотрудник лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-9102-3360. E-mail: Artkelt98@yandex.ru

**Кузубова Елена Валерьевна** – младший научный сотрудник лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-2425-5027. E-mail: 1015artek1015@mail.ru

**Покровский Владимир Михайлович** – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-1493-3376. E-mail: pokrovskiy@bsu.edu.ru

**Радченко Александра Игоревна** – младший научный сотрудник лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-4554-2116. E-mail: sandrinkaradchenko@gmail.com

**Осипьян Сергей Игоревич** – лаборант-исследователь лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0009-0008-4837-3507. E-mail: osipyansergey23@gmail.com

**Степенко Юлия Владимировна** – младший научный сотрудник лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0002-7414-7326. E-mail: julia.v.stepenko@gmail.com

**Апостол Алина Александровна** – лаборант-исследователь лаборатории генетических технологий и геномного редактирования для биомедицины и ветеринарии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» ORCID ID: 0000-0003-3290-2917. E-mail: alinakum835@gmail.com

**Даниленко Людмила Михайловна** – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-6101-8712. E-mail: danilenko\_l@bsu.edu.ru

**Должиков Александр Анатольевич** – доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-2798-513X. E-mail: dolzhikov@bsu.edu.ru

**Покровская Татьяна Григорьевна** – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0001-6802-5368. E-mail: pokrovskaja@bsu.edu.ru

**Гудырев Олег Сергеевич** – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID ID: 0000-0003-0097-000X. E-mail: gudyrev@mail.ru

**Кочергина Яна Сергеевна** – учебно-медицинский эксперт ОГБУЗ «Белгородское бюро судебно-медицинской экспертизы». ORCID ID: 0009-0003-8167-5666. E-mail: yana5568@mail.ru

**Дудникова Ольга Васильевна** – учебно-медицинский эксперт ОГБУЗ «Белгородское бюро судебно-медицинской экспертизы». ORCID ID: 0009-0005-8949-5058. E-mail: Olenka\_Normanskikh@mail.ru