

ОБОРУДОВАНИЕ И ПРОГРАММЫ ДЛЯ АВТОМАТИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ФИЗИОЛОГИИ

*Е.Ф. Певцов**, *А.О. Горелов**, *П.А. Горбоконенко**, *Е.И. Певцова***

*Московский государственный институт радиотехники, электроники
и автоматики (технический университет) (pevtsov@mirea.ru)

**Научно-исследовательский институт
нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, г. Москва

В рамках аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы) (проект №2411) выполнены оригинальные разработки аппаратно-программных комплексов оборудования, служащих для обеспечения выполняемых в НИИНФ им. П.К. Анохина РАМН медико-биологических исследований. В частности разработаны: 1) алгоритмы и комплекты программного обеспечения для управления работой стенда для экспериментальных исследований сложного целенаправленного поведения животных; 2) макет экспериментального стенда для экспериментальных исследований реакций мелких животных на стрессовые воздействия в виде мощных звуковых импульсов; 3) приставка и программы для автоматизированного управления работой стенда неинвазивного измерения артериального давления и пульса.

Разработки были апробированы и показали высокую эффективность при изучении действия новых фармакологических веществ, исследованиях наркотических эффектов, поведения под воздействием алкоголя, стрессов и в других актуальных экспериментах физиологии человека и животных.

Аппаратура и программное обеспечение для исследований сложного целенаправленного поведения животных

Комплекс оборудования для исследований сложного целенаправленного поведения предназначен для изучения действий подопытных обученных белых крыс в ходе удовлетворения ими одной их основных физиологических мотиваций – жажды. Установка (рис. 1) состоит из стартового бокса, тредбана и манипуляторного бокса [1]. Манипуляторный бокс оборудован вращающимся диском с фиксированной на нем поилкой, в которую при установке диска в соответствующее положение автоматически подается порция воды объемом 0,5 мл.

Задача, решению которой крыса предварительно обучается, заключается в том, что животное после помещения его в стартовый бокс установки должно выполнить пробежку в манипуляторный бокс и получить в нем порцию воды. Сигнальная лампочка и щелчок, сопровождающий подачу воды, служат ориентиром результативности поворота диска с поилкой. В случае если крыса сама в течение определенного времени не покидает манипуляторный бокс, передвижная шторка прекращает доступ животного к вращающемуся диску, включается тредбан, и крыса принуждается к возврату в стартовый бокс, чтобы иметь возможность затем вновь повторить попытку.

При выполнении данной разработки решены задачи автоматического управления работой установки и автоматической фиксации поведения под-

опытного животного. Для этого разработаны алгоритм работы и программы управления стендом, обеспечивающие автоматическую работу стенда и измерения временных показателей, необходимых для анализа поведения обученных животных.

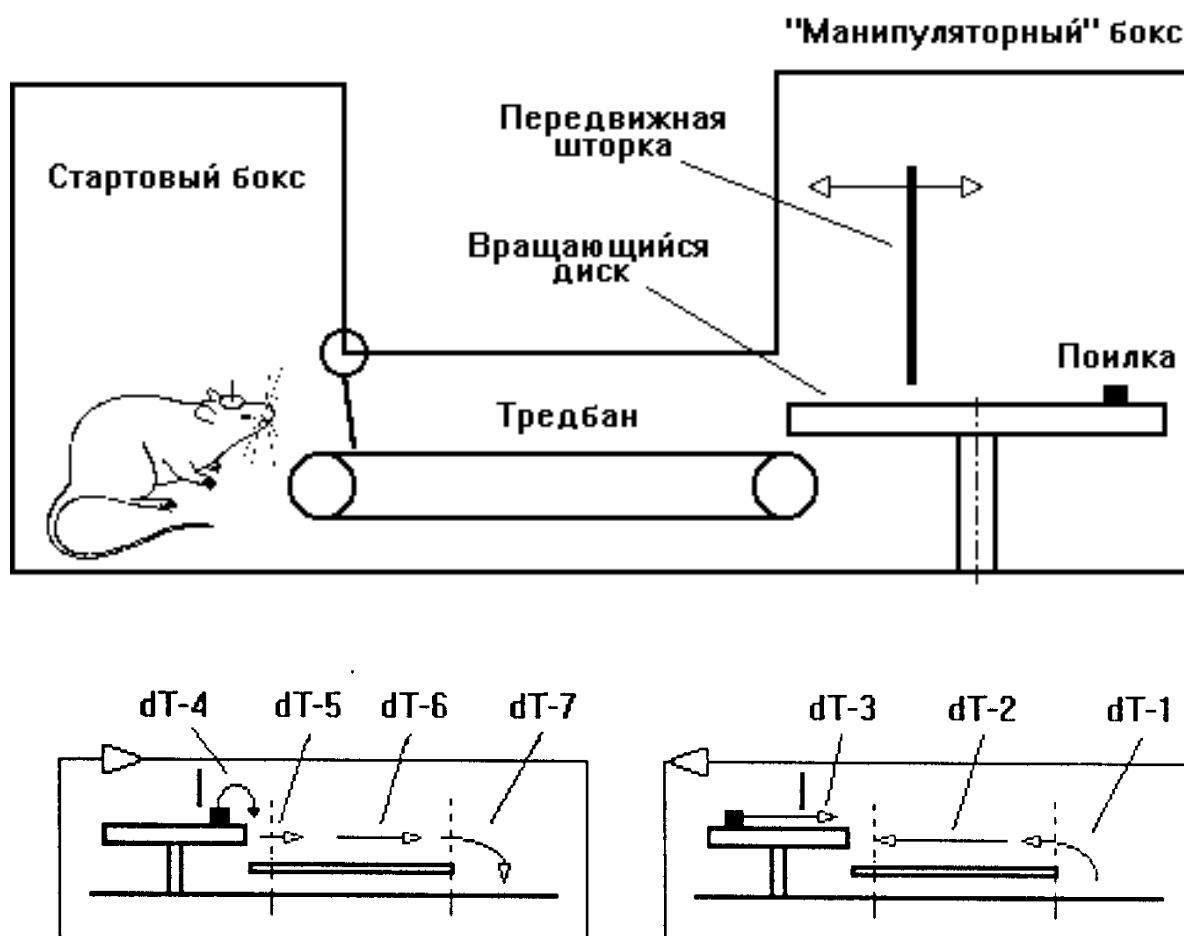


Рис. 1. Функциональная схема установки для исследований сложного целенаправленного поведения подопытных крыс. Измеряемые временные интервалы, служащие показателями сложного поведения: dT-1 – латентный период начала выхода из стартового бокса на тредбан; dT-2 – время от начала выхода на тредбан до принятия позы "манипуляции"; dT-3 – время от принятия позы "манипуляции" до начала потребления воды; dT-4 – время потребления воды; dT-5 – время от прекращения потребления воды до выхода из позы "манипуляции"; dT-6 – время возвращения по тредбану; dT-7 – время перехода с тредбана в стартовый бокс; dT-8 – общая длительность времени, затраченного животным на то, чтобы вернуться в стартовый бокс.

Управляющий компьютер подключается к установке с помощью специальной платы интерфейса, представляющей собой плату ввода-вывода данных, соединенную с шиной ISA. В контексте интерактивного режима обеспечивается задание условий опыта, автоматическое управление шторкой, задвижкой, движением тредбана, поворотами диска с поил-

кой, подача воды. Обеспечивается автоматическое удаление испытуемого животного в стартовый отсек при условии истечения одного из заданных временных интервалов: а) времени принятия решения о направлении вращения диска; б) времени манипуляции диском; г) времени нахождения возле поилки с водой.

Работа программы управления основана на фиксации изменений в состоянии установки, определяемых путем периодического опроса всех ее датчиков. В качестве входной информации рассматриваются сигналы, передаваемые от датчиков положения и от АЦП, а также данные инициализации работы программы, задаваемые оператором в диалоговом режиме. Оператором задаются следующие параметры: общее максимальное время опыта T_0 ; время на принятие решения о направлении вращения T_1 ; время достижения зоны доступа T_2 ; максимальное время нахождения животного рядом с поилкой T_3 ; скорости тредбана в двух направлениях; количество воды, подаваемой за один раз в поилку; количество предупреждений (световых импульсов) перед включением тредбана для принудительного удаления животного при неудачной попытке; показания АЦП для установления начального поворота диска; показания АЦП для установления значения зоны доступности воды; указатель кода сложности режима обучения животного. В ходе работы фиксируются изменения флага состояния, записываются также моменты времени, когда эти изменения произошли. Эти изменения состояния анализируются, и принимается решение о последующих действиях программы.

Информацией для анализа экспериментов служат данные об изменениях во времени показаний датчиков положения подопытной крысы, состояния поилки и АЦП, которые затем преобразуются в файлы, содержащие таблицы с обработанными данными. В каждой таблице отображаются состояния бита стартового отсека (S); битов датчиков положения на тредбане (0, 9, 8, 7, 6, 5); бита датчика положения зоны манипуляции (1); бита поилки (P); бита перемещения диска (M), причем установка его соответствует правильному направлению вращения; бита, показывающего, что диск повернут достаточно для получения воды (Z).

Разработанное оборудование и комплект программ апробированы в частности, в экспериментах по выявлению роли ренин-ангиотензиновой системы в механизмах алкоголизма. Методом сравнительного анализа изучена физиологическая активность (по показателям гемодинамики) свободного и связанного с функционально различными белками ангиотензина-II у животных, подвергнутых длительной принудительной алкоголизации. Показано, что у крыс после хронической алкоголизации существенно модифицировалась активность исследуемых веществ: гипертензивные и хронотропные эффекты свободного и связанного с белками А-II либо отсутство-

вали, либо извращались вплоть до проявления гипотензии и брадикардии [2,3].

Модуль для регистрации давления и пульса

Функциональная схема приставки для неинвазивной регистрации артериального давления и пульса при экспериментах с мелкими животными приведена на рис. 2.

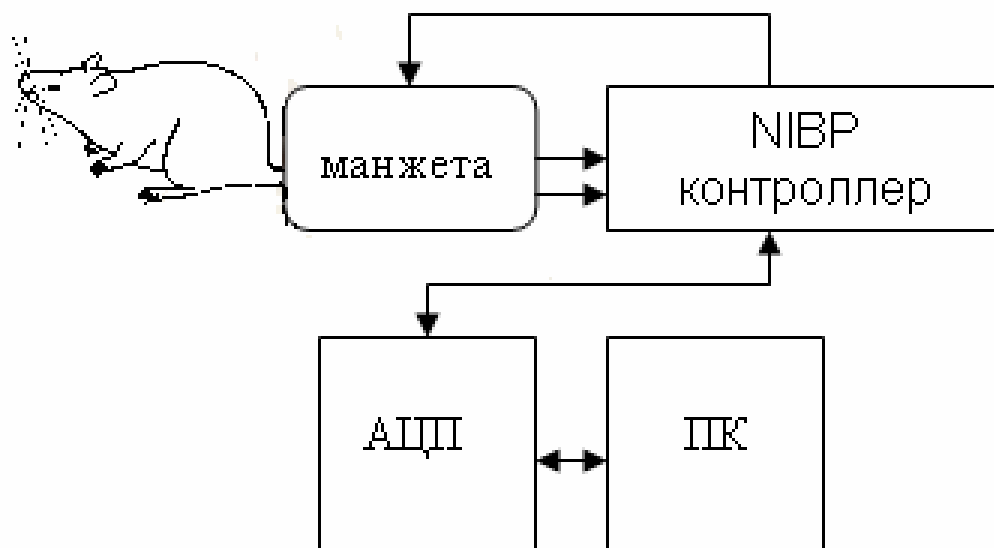


Рис. 2 Функциональная схема измерительного стенда для неинвазивной регистрации артериального давления и пульса.

Основные характеристики стенда приведены в табл.2.

Таблица 2.

Основные характеристики стенда для измерения давления и пульса

максимальное давление манжеты при измерениях	200 и 280 мм. рт. Ст.
время одного цикла измерения	22 и 41 с
диапазон измерений давления	до 300 мм.рт.ст
коэффициент усиления канала измерения пульса	регулируемый от 1 до 50
максимальная частота дискретизации измерений	1 кГц
тип интерфейса для связи с ПК	RS232

Основным узлом стенда служила специально разработанная двухканальная плата сбора данных, содержащая согласующие усилители, управляющий микроконтроллер (ATMega81150), мультиплексор каналов, быстродействующий АЦП (AD9220), буферное ОЗУ (TC551664В, 256кбайт) и интерфейс RS-232. Для управления работой стенда, включающего в себя также модули датчика и преобразователя «NIBP system» (фирма

ADInstruments Pty Ltd, Австралия), в рамках данного проекта разработана оригинальная программа, позволяющая регистрировать и обрабатывать результаты эксперимента в реальном времени.

Пример данных, иллюстрирующий работу станда для регистрации артериального давления и пульса, приведен на рис. 3 [4].

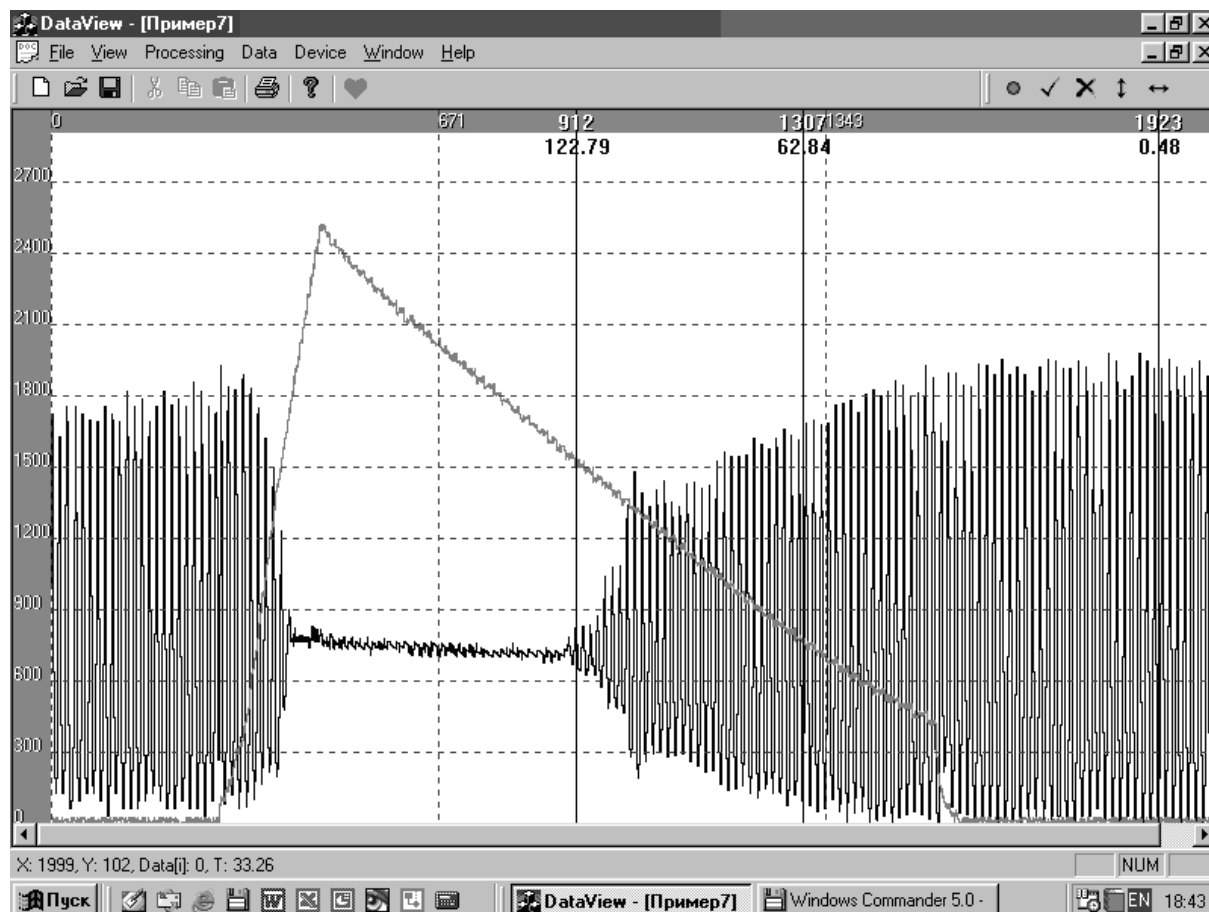


Рис. 3. Интерфейс и результаты работы программы регистрации пульса и давления.

Стенд для исследований реакций на звуковые стимулы

Изучение реакций на звуковые стимулы активно используется как инструмент в нейрофизиологических лабораториях в фундаментальных исследованиях причин различных патологических состояниях нервной системы, в частности, при болезни Паркинсона, эпилепсии, шизофрении, болезни детского застывания (стартл-болезнь), детской гиперактивности с дефицитом внимания, болезни Альцгеймера и др.

Макет экспериментального станда предназначен для исследования реакции вздрагивания мелких грызунов (крыс, мышей, хомячков) в ответ на интенсивное воздействие звуковых сигналов. Идея эксперимента заключается в том, чтобы регистрировать импульсы, переданные весовой платформе, при реакции находящегося на ней животного в ответ на мощные звуковые сигналы. Разработанное оборудование и программы позво-

ляют оценивать величину реакции и скорость ее возникновения. Функциональная схема стенда приведена на рис. 4, а его основные характеристики – в табл. 2.

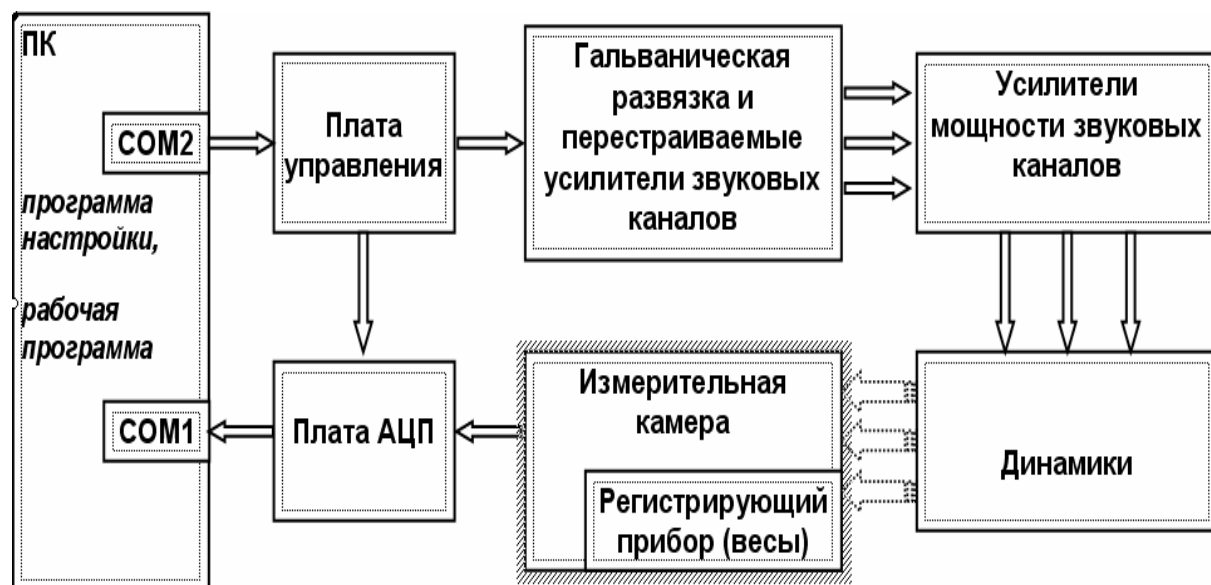


Рис. 4. Функциональная схема установки для исследований реакции мелких животных на стрессовые воздействия.

Таблица 1.

Основные технические характеристики стенда для исследований реакции на звуковые стимулы

Минимальный интервал дискретизации считывания сигнала	1 мс
Диапазон измерения реакции	от 0,1 до 30 Н
Чувствительность канала регистрации реакции на воздействие	0,1 Н
Количество предъявляемых воздействий (стимулов)	от 1 до 100
Длительность стимула	от 50 до 1000 мс с шагом 1 мс
Длительность промежутков между стимулами (задаются для каждого стимула)	от 2 до 60 с
Интенсивность стимула – («белый» шум)	от 110 до 125 dB с шагом 5 db;
Число точек записи амплитуды реакции	от 100 до 500 с шагом 50
Интенсивность предстимула	от 70 до 105 dB с шагом 5dB
Длительность предстимула	от 5 мс до 5 с с шагом 10 мс
Латентный период предстимула (интервал времени до стимула)	от 5 мс до 5 с с шагом 10 мс
Интенсивность фонового шума	0 и 60 dB

Интерфейсы для задания условий эксперимента и для управления работой станда представляют собой виртуальные приборы, реализованные средствами LabVIEW [5](язык G) (см. рис. 5).

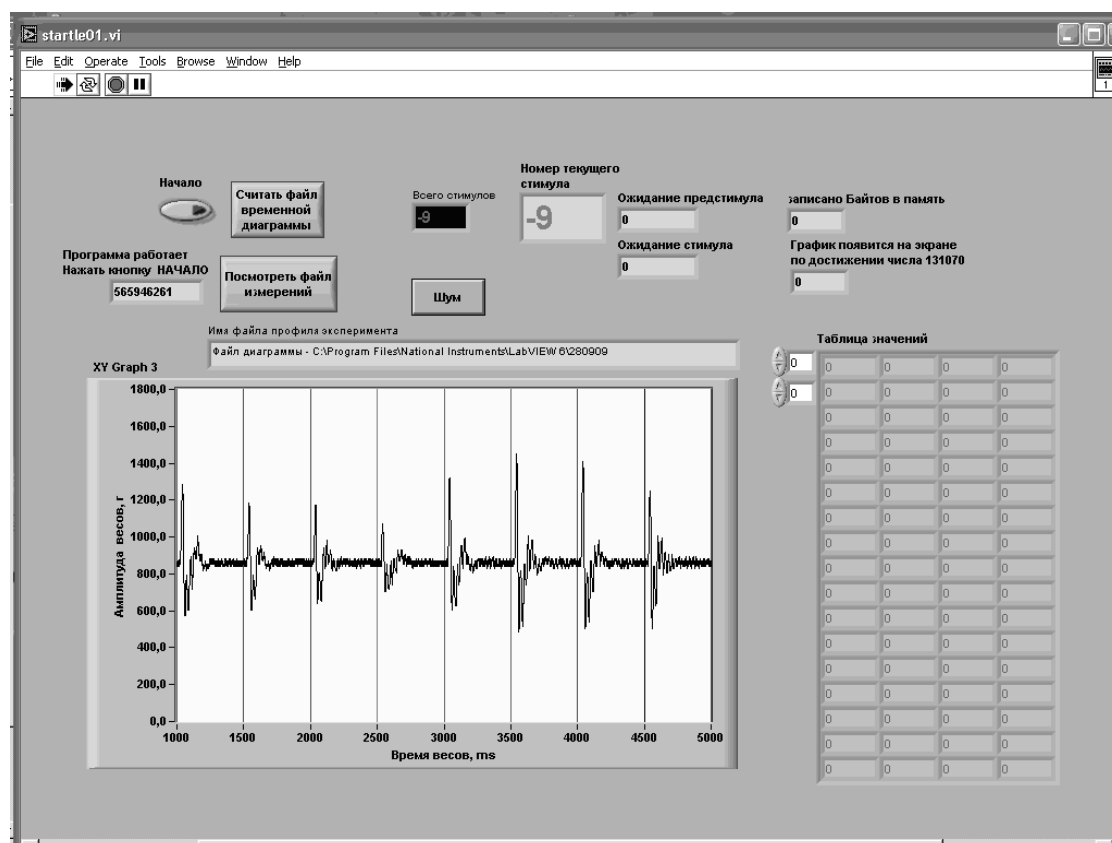
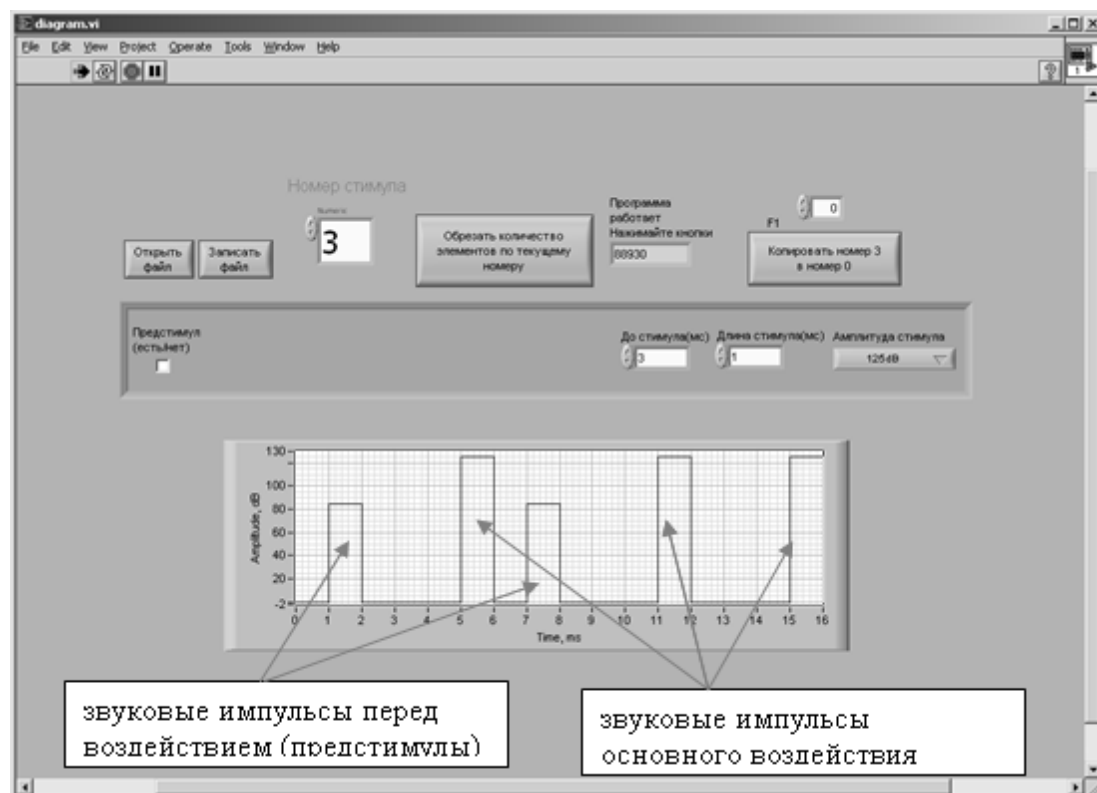


Рис. 5. Интерфейс программы задания режимов воздействия и интерфейс виртуального прибора регистрации реакции на мощные звуковые стимулы.

Виртуальные приборы макета позволяют программировать порядок следования звуковых импульсов, их амплитуды (80...125 дБ) и длительности (1...100 мс), а также регистрировать реакции животных по изменению показаний весовой платформы (0,01...2 Н). Работой стенда управляют микроконтроллеры, обеспечивающие синхронизацию включения звука и регистрацию реакции на него, и образующие вместе с АЦП и усилителями звукового сигнала систему сбора и обработки данных, соединенную с ПК по последовательным каналам.

Программное обеспечение и интерфейс ВП также позволяет оценивать неассоциативную форму обучения – привыкание, которое развивается при повторном предъявлении звуковых стимулов. Существенным отличием разработанного макета установки от дорогостоящих зарубежных аналогов – продукции фирм Coulburn, Columbus Instruments (США) [6] и TSE (Германия) [7] является возможность регистрировать показатели реакции у свободноподвижного животного. Кроме того, она дает возможность исследовать изменение параметров реакции вздрагивания на предъявление основного стимула в тех случаях, когда ему, с различными интервалами времени, предшествуют стимулы меньшей интенсивности. Данная методика позволяет исследовать процессы непроизвольного и произвольного внимания, а также уровень тревожности и страха.

Выводы

Таким образом, выполненные работы позволили повысить эффективность и достоверность экспериментальных исследований при изучении действия новых фармакологических веществ, исследованиях наркотических эффектов, поведения под воздействием алкоголя, стрессов и в других актуальных экспериментах физиологии человека и животных. В частности, с целью выявления роли ренин-ангиотензиновой системы в механизмах алкоголизма методом сравнительного анализа изучена физиологическая активность (по показателям гемодинамики) свободного и связанного с функционально различными белками ангиотензина-II у животных, подвергнутых длительной принудительной алкоголизации. Показано, что у крыс после хронической алкоголизации существенно модифицировалась активность исследуемых веществ: гипертензивные и хронотропные эффекты свободного и связанного с белками А-II либо отсутствовали, либо извращались вплоть до проявления гипотензии и брадикардии [1].

Разработанное оборудование активно используется как инструмент в нейрофизиологических лабораториях в фундаментальных исследованиях причин различных патологических состояниях нервной системы, в частности, при болезни Паркинсона, эпилепсии, шизофрении, болезни детского

застывания (стартл-болезнь), детской гиперактивности с дефицитом внимания, болезни Альцгеймера и др.

Библиографический список:

1. Варлаков В.С., Щербина А.П., Швадченко А.В. и др. Автоматизированная установка для изучения инструментального поведения животных. А.с. SU № 1813382 А1, 1992.
2. Певцова Е.И., Толпыго С.М., Обухова М.Ф., Котов А.В. Комплексы ангиотензина IV с функционально различными белками в регуляции питьевого поведения и гемодинамики у крыс // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2009. Т. 147. № 11. С. 491–495.
3. Толпыго С.М., Певцова Е.И., Котов А.В., Обухова М.Ф. Модификация физиологической активности Свободного и связанного с белками ангиотензина-II у крыс в условиях алкоголизации // Вопросы наркологии. 2008. № 2. С. 41–46.
4. Торшин В.И., Шевченко Л.В., Елфимов А.И., Серова О.Н., Певцова Е.И. Формирование и реализация алкогольной зависимости у крыс после каротидной гломэктомии // Технологии живых систем. 2009. Т. 6. № 6. С. 37–40.
5. Малето М.И., Певцов Е.Ф., Сигов А.С. Учебно-научный практикум по автоматизации экспериментов кафедры физики конденсированного состояния // Открытое образование. – 2009 г. – №5. С.58-66.
6. <http://www.colinst.com/brief.php?id=49>
7. <http://www.tse-systems.com/behavior/startle-response.htm>