

DOI: 10.17516/1997-1389-0051

УДК 591.512.2.081.1

The New Method of Rhodamine Mark Detection and Its Application Possibilities in Zoological Studies

Oleg V. Tolkachev^{*a} and Elisey N. Bespamyatnykh^b

^a*Institute of Plant and Animal Ecology UB RAS
202 8 Marta Str., Yekaterinburg, 620144, Russia*

^b*Ural Scientific Research Veterinary Institute
112A Belinskogo Str., Yekaterinburg, 620142, Russia*

Received 20.02.2017, received in revised form 19.04.2017, accepted 19.06.2017, published online 21.05.2018

Rhodamine B is a perspective biomarker for unselective animal marking. Despite several successful attempts in practical use, the method is still under development. The critical problem is mark detection. We offer the new way of rhodamine mark detection which is simple, inexpensive and effective. White mouse were used as the model object. Instead of random hair sampling for fluorescent microscopy we suggest an inspection of animal's whole body surface. For this aim it is possible to employ a green laser (usual laser pointer) as an illuminator and an orange glass or plastic as a filter in front of observer's eyes. When testing the method it is revealed that in adult animals fluorescing areas soon after marking are usually less than half of the body surface, and being reduced over time. The maximum time interval in which the mark in the pelage was detectable during the examination of living mice ranged from 166 to 423 days. It was revealed that in suckling mice the mark can be formed by milk of females which received a dose of rhodamine B. In these cases the fluorescence manifests itself in whole or most part of the body surface. The mark remains in the fur of mouse cubs at least four months.

Keywords: marking, biomarker, rhodamine B.

Citation: Tolkachev O.V., Bespamyatnykh E.N. The new method of rhodamine mark detection and its application possibilities in zoological studies. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2019, 12(4), 352-365. DOI: 10.17516/1997-1389-0051

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: olt@mail.ru

ORCID: [0000-0002-5673-7816](https://orcid.org/0000-0002-5673-7816) (Tolkachev O.)

Новый метод детекции родаминовой метки и возможности его применения в зоологических исследованиях

О.В. Толкачев^а, Е.Н. Беспамятных^б

^а*Институт экологии растений и животных УрО РАН
Россия, 620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202*

^б*Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт
Россия, 620142, Екатеринбург, ул. Белинского, 112А*

Родамин В является перспективным маркером для массового неизбирательного мечения животных. Несмотря на успешные эксперименты по его практическому применению, метод все еще находится в стадии разработки. Основная проблема заключается в процессе выявления маркера в теле животных. В данной работе представлен новый способ детекции родамина В, отличающийся простотой, дешевизной и высокой эффективностью. В качестве объекта использовали лабораторных мышей. Вместо общепринятой процедуры взятия случайных проб из шкуры или вибрисс зверьков с последующим изучением с помощью специализированного микроскопа предлагается осматривать всю поверхность тела животного. Для этого можно использовать зеленый лазер (лазерную указку) в качестве осветителя и оранжевое стекло или прозрачный оранжевый пластик в качестве фильтра перед глазом наблюдателя. При апробации метода установлено, что у взрослых зверьков флуоресцирующие участки вскоре после мечения занимают, как правило, меньшие половины поверхности тела, сокращаясь со временем. Максимальные сроки, в которые удавалось обнаруживать метку на шкуре при осмотре живых мышей, составляли от 166 до 423 дней. Обнаружено, что у детенышей лабораторных мышей метка может формироваться за счет молока матерей, получивших дозу родамина В, при этом флуоресценция проявляется на всей или большей части поверхности тела. Метка сохраняется в шкуре детенышей не менее четырех месяцев.

Ключевые слова: мечение, биомаркер, родамин В.

Цитирование: Толкачев, О.В. Новый метод детекции родаминовой метки и возможности его применения в зоологических исследованиях / О.В. Толкачев, Е.Н. Беспамятных // Журн. Сиб. федер. ун-т. Биология, 2019. 12(4). С. 352-365. DOI: 10.17516/1997-1389-0051

Введение

Массовое неизбирательное самомечение животных является сравнительно редким, но хорошо зарекомендовавшим себя подходом. В фундаментальных исследованиях он используется в изучении миграционных процессов (Lavoie et al., 1971; Большаков, Ба-

женов, 1988; Рыльников, 2007; Григоркина, Оленев, 2013; Tolkachev, 2016 a, b). В прикладной сфере применяется для оценки полноты потребления дикими видами приманки с вакциной или ядом (Lindsey et al., 1971; Slate et al., 2009; Tripp et al., 2014). В самых общих чертах подход подразумевает экспонирование

приманки с веществом-биомаркером, после потребления которого особи целевого вида (одного или нескольких) получают метку, позволяющую отличать их от прочих. В качестве маркеров, формирующих системную (включенную в какие-либо ткани тела) метку, могут использоваться различные вещества: антибиотики тетрациклинового ряда (Crier, 1970; Клевезаль, Мина, 1980), иофеноксовая кислота (Massei et al., 2009), сульфадиметоксин (Matter et al., 1998), радионуклиды (Большаков, Баженов, 1988) и некоторые другие вещества (Карасева и др., 2008). Поиск новых маркеров продолжается как потому, что существующие методы имеют недостатки, так и потому, что для исследований миграционной активности животных целесообразно располагать несколькими типами меток.

Одним из многообещающих агентов для массового мечения животных является нетоксичный краситель родамин В. Системная метка в этом случае формируется за счет связывания маркера со структурами тела животного, содержащими кератин (Fisher, 1999). К настоящему времени принципиальная пригодность данного вещества для мечения и его безопасность показаны на лабораторных и диких видах животных: дикая кошка (Fisher et al., 1999), нутрия (Fichet-Calvet, 1999), горноста́й (Purdey et al., 2003), луговая собачка (Fernandez, Roche, 2011), домовая мышь (Jacob et al., 2002), лесная мышь и рыжая полевка (Papillon et al., 2002), землеройки-белозубки (Mohr et al., 2007) и др. Однако метод разработан пока не полностью и почти не применяется на практике. Основная проблема – процедура выявления родамина в теле животных.

Общепринятый протокол детекции родаминовой метки описан в статье Фишер с коллегами (Fisher et al., 1999). В соответствии с этой методикой до настоящего времени вы-

явление метки во всех случаях проводилось в волосяном покрове с помощью флуоресцентной/люминесцентной микроскопии (Fisher, 1999; Papillon et al., 2002; Southey et al., 2002; Spurr, 2002; Jacob et al., 2003; Johnston et al., 2007; Mohr et al., 2007; Weerakoon et al., 2013). Детекция родаминовой метки по общепринятой методике предусматривает довольно длительную, трудоемкую и дорогую процедуру подготовки образцов. В частности, используются предметные и покровные стекла, иммерсионное масло, изопропиловый спирт и специальный клей для подготовки препаратов к просмотру. Один препарат обычно включает несколько волосков животного. Вся процедура вместе с сушкой занимает не менее недели. Анализ всего волосяного покрова особи не практикуется из-за высокой трудоемкости и большого расхода материалов. Поэтому среди исследователей существуют разногласия по поводу процедуры пробоотбора, что вызывает вопросы относительно эффективности родаминового метода мечения в целом (Jacob et al., 2002; Spurr, 2002; Weerakoon et al., 2013; Tripp et al., 2014).

Цель данной работы заключалась в усовершенствовании процедуры детекции родаминовой метки.

Материалы и методы

Разработка и тестирование нового метода детекции родаминовой метки были организованы с прицелом на его дальнейшее применение в полевых исследованиях на мелких млекопитающих. Эксперименты проводили в 2015-2017 гг. Маркером служил родамин В или N-[6-(Диэтиламино)-9-(2-карбоксифенил)-3Н-ксантен-3-илиден]диэтиламмония хлорид, представляющий собой кристаллы зеленого цвета или порошок красновато-фиолетового цвета (Государственная фармакопея РФ, 2015). Торговое название “Родамин В (С) (чда)”.

В качестве модельного объекта использовали белых лабораторных беспородных мышей обоих полов, которым скармливали одновременно по 2-3 г приманки с родамином В. Кормовую основу приманки готовили на основе овсяных хлопьев. Необходимое количество порошка родамина В насыпали в сухие хлопья и тщательно перемешивали после заливки кипятком. Концентрация маркера в основной части опытов составляла 800 мг на 1 кг сухих хлопьев (0,08 %). Доза кра-

сителя в приманке подобрана в соответствии с существующими рекомендациями (Fisher, 1995) и в перерасчете на массу тела составляла ~80-120 мг/кг при LD₅₀ = 890 мг/кг (Fisher, 1999). В предварительных экспериментах использовали и более высокие концентрации родамина В (1000 и 1500 мг/кг корма; n=3). Полученную массу распределяли ровным слоем по металлическому поддону, нарезали шпателем на куски размером ~2x2x1,5 см и сушили не менее 8 ч при 80 °С. Высушенные

Таблица 1. Детали экспериментального плана и срок сохранения метки лабораторными белыми мышами

Table 1. Details of the experimental design and the time of the label retention by laboratory white mice

Идентификатор животного	Способ введения и концентрация маркера, мг/кг	Время экспонирования приманки, сут	Срок сохранения метки, дней*
1	2	3	4
предварительный опыт 1	приманка, 1500	1	7
предварительный опыт 2	приманка, 1000	1	7
предварительный опыт 3	приманка, 1000	1	7
1	приманка, 800	1	166/166
2	приманка, 800	1	171/171
3	приманка, 800	1	305/316
4 (первый опыт)	приманка, 800	1	423/нд
4 (второй опыт)	приманка, 800	1	17
5	приманка, 800	1	5
6	приманка, 800	7	147
7	приманка, 800	1	61
8	приманка, 800	1	61
10	приманка, 800	1	72
11	приманка, 800	1	111
12	приманка, 800	1	362/366
13	приманка, 800	1	190
детеныш 1 самки 13	с молоком, нд	1	54
детеныш 2 самки 13	с молоком, нд	1	187
детеныш 3 самки 13	с молоком, нд	1	190
17	приманка, 800	1	90
детеныш 1 самки 17	с молоком, нд	1	120
детеныш 2 самки 17	с молоком, нд	1	120
детеныш 3 самки 17	с молоком, нд	1	120

Продолжение табл. 1

Continuation Table 1

1	2	3	4
детеныш 4 самки 17	с молоком, нд	1	120
18	приманка, 800	1	7
19	приманка, 800	8	107
20	приманка, 800	1	30
21	приманка, 800	1	30
22	приманка, 800	1	180

*Жирным шрифтом выделены данные по тем особям, на примере которых авторам удалось дождаться исчезновения метки (в числителе – при наблюдении живого зверька без использования микроскопа; в знаменателе – результат посмертной диагностики с применением микроскопа). В остальных случаях опыт был прекращен до исчезновения метки. В двух случаях (№ 3, № 12) животных забивали спустя несколько дней после того, как метку не удавалось обнаружить на живом зверьке.

кусочки приманки опрыскивали нерафинированным подсолнечным маслом с помощью бытового пульверизатора. Спустя сутки после выдачи приманки с маркером зверьков отсаживали в чистые клетки и далее давали только обычный лабораторный корм. В двух случаях мыши содержались на пище с родамином в течение недели (№ 6 и № 19, табл. 1). Еще одна особь (№ 4) получила корм с маркером дважды, с интервалом в 572 дня (оба раза приманка экспонировалась сутки). Для проверки возможности передачи родамина в детенышам во время выкармливания был поставлен отдельный эксперимент. Две самки, содержащиеся в разных клетках, получили родамин В (800 мг/кг корма), когда их детеныши стали покрываться мехом. Спустя сутки обе самки были отсажены вместе с потомством (в одном помете было три, а в другом – четыре детеныша) в чистые клетки и переведены на обычный корм. Всего в опытах было задействовано 28 мышей – 21 взрослых и 7 детенышей (табл. 1).

Процедуру выявления метки проводили *in vivo* без обездвиживания животного (в первый день после отсадки и далее 2 раза в неделю) и *post mortem* после завершения опыта. Зверьков забивали либо для получения каче-

ственных фотографий экстерьера и осмотра интерьера особей на разных сроках после метки (n=23), либо после того, как метка становилась неразличимой при осмотре живой особи (n=5). В случаях, когда опыт не прерывался намеренно, день последней проверки, когда метка еще была видна, определял ее “срок сохранения” для данной особи.

Для выявления метки мы использовали зеленый лазер (общедоступную лазерную указку; $\lambda=532\pm 20$ нм) в качестве источника волны возбуждения флуоресценции. Лазер был доработан – установлен рассеиватель из тонкой белой пластмассы для получения широкого светового пятна. Спектр эмиссии родамина В выделяли с помощью оранжевого стекла ОС-14, размещенного перед глазами исследователя или на объективе микроскопа или фотоаппарата (рис. 1).

В качестве фильтра эмиссии были опробованы и другие материалы (неспециализированные образцы оранжевого стекла и пластика; стоматологические очки “Glacuboga monoart glasses cube orange” EURONDA, Тайвань). Детекцию метки и *in vivo*, и *post mortem* проводили в темной комнате. Для посмертной диагностики использовали микроскоп МБС-1 (ЛОМО, СССР). Полученные фотографии не

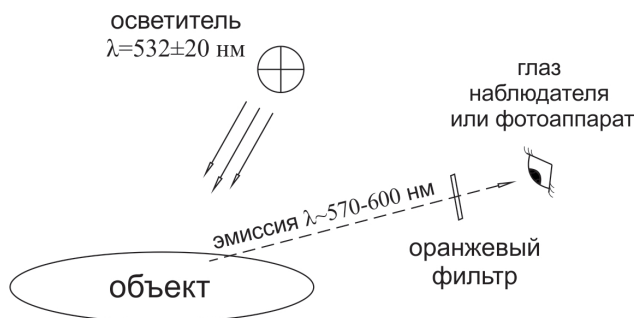


Рис. 1. Принципиальная схема предлагаемого способа детекции родамина В в биологических образцах
 Fig. 1. Schematic diagram of the proposed method for rhodamine B detection in biological specimens

подвергались никаким видам цветовой коррекции.

Результаты

Предложен новый способ детекции родамина В в теле животных. В ходе тестирования метода для проверки возможности его дальнейшего использования при массовом мечении были также получены сопутствующие результаты.

Мечение

В ходе непосредственных наблюдений выяснилось, что лабораторные мыши в большинстве случаев охотно поедают приманку с маркером, начиная кормиться в течение 1-2 мин после ее получения и обычно съедая всю за ночь. Лишь одна особь в первые сутки отказалась от приманки, но съела все на вторые сутки.

Изменений в поведении меченых зверьков отмечено не было. В ходе экспериментов зафиксировано три смертельных случая. Два самца (№ 4 и № 11, табл. 1) умерли на 589-й и 111-й день эксперимента соответственно (вероятно, от старости, так как каких-либо патологий при вскрытии не обнаружено). Умер один из детенышей в эксперименте по передаче маркера через молоко матери (детеныш 1 самки 13, табл. 1). Мы считаем, что этот

зверек также погиб по естественным причинам, поскольку при рождении он был самым маленьким и слабым в помете.

Тестирование нового способа детекции метки

Метка была обнаружена *in vivo* (без использования микроскопа) и *post mortem* (с применением микроскопа) у всех особей, съевших корм с родамином В ($n=21$), а также у детенышей, получивших маркер с молоком ($n=7$).

Мы выяснили, что эффективность распознавания метки зависит от свойств используемого фильтра. Без оранжевого фильтра метка не видна. Со слабым фильтром она выглядит оранжевой или не видна из-за “засветки” интенсивным излучением лазера. Наилучшие результаты дают фильтры, через которые родаминовая метка выглядит светло-желтой или золотистой (рис. 2, см. дополнительный материал). Необходимого эффекта можно добиться увеличением числа слоев материала, используемого в качестве фильтра. Установлено, что помимо стекла ОС-14 в качестве фильтра эмиссии можно применять любое оранжевое стекло или прозрачный оранжевый пластик. Например, эффект слабого фильтра дают очки EURONDA, а эффект сильного – стек из двух слоев тех же очков или стекло ОС-14.

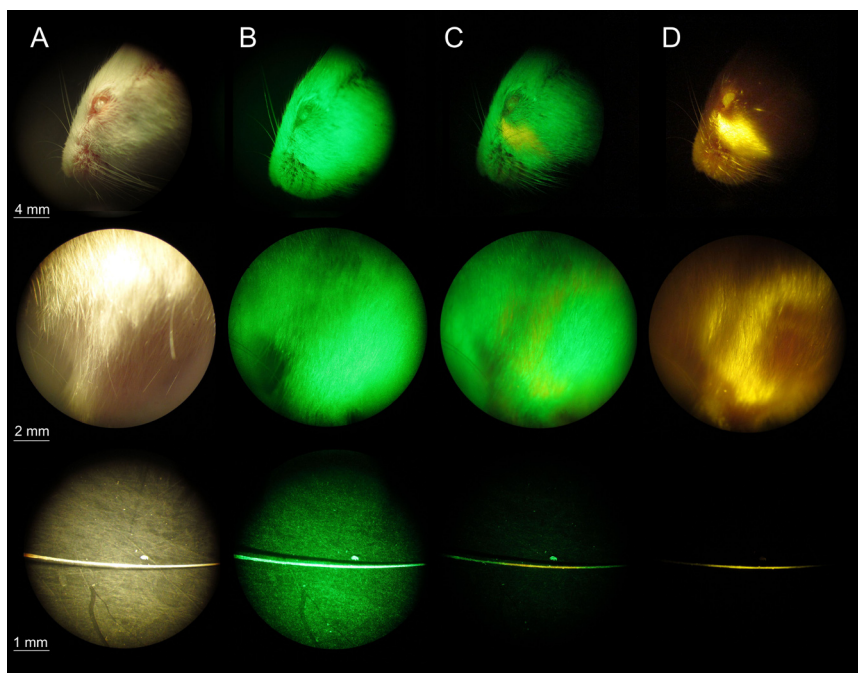


Рис. 2. Вид родаминовой метки на теле лабораторной мыши: А – при комнатном освещении (метка не видна); В – в свете зеленого лазера без фильтра на объективе микроскопа (метка не видна); С – в свете зеленого лазера со слабым фильтром (оранжевые участки – родаминовая метка); D – с сильным фильтром (желтые участки – родаминовая метка)

Fig. 2. View of rhodamine mark on the body of the laboratory mouse: A – under ambient light (label not visible); B – under light of a green laser without a filter on the microscope lens (the label is not visible); C – under light of a green laser with a weak filter (orange areas – a rhodamine label); D – with a strong filter (yellow areas – a rhodamine label)

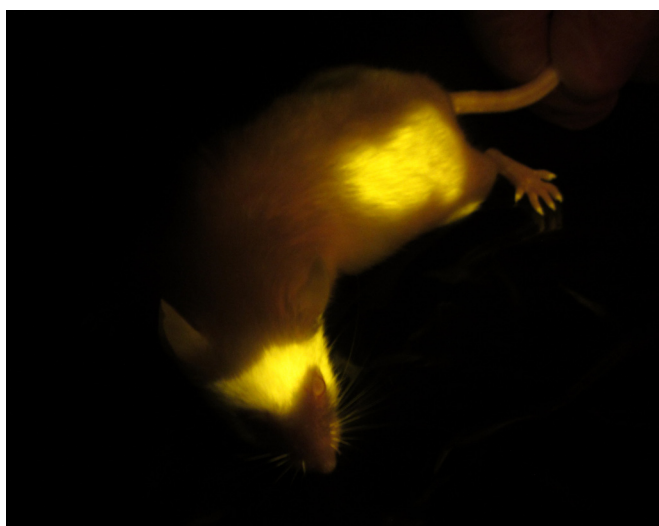


Рис. 3. Флуоресцирующая родаминовая метка (желтые участки) на шкуре, вибриссах и когтях живой лабораторной мыши, содержащейся на корме с родамином в течение недели (№ 6; 7 дней после окончания мечения)

Fig. 3. A fluorescent rhodamine label (yellow patches) on the fur, vibrissae and claws of a live laboratory mouse fed with rhodamine B bait for a week (No. 6; 7 days after the end of the marking)

Обнаружено, что флуоресценция родаминовой метки видна не только в полной темноте, но и при сумеречном освещении.

Локализация и динамика метки

У всех лабораторных животных родаминовая метка была обнаружена на шкуре, вибриссах и когтях (рис. 3). В первую неделю яркая флуоресценция наблюдалась в местах непосредственного контакта с красителем (в области рта и на передних лапах), на частях тела, которые активно чистятся мышами (уши, хвост), а также в области уретры из-за выхода маркера с мочой. В это же время хорошо заметно свечение в желудочно-кишечном тракте и фекалиях. Через три дня после мечения системная метка четко видна на вибриссах мышей. Обнаружено, что скорость продвижения метки не одинакова для разных вибрисс одной особи. В некоторых вибриссах метка отсутствовала.

При осмотре шкуры живых зверьков нам обычно не удавалось точно определить момент появления системной метки, так как

первая фаза процесса скрыта от наблюдения верхними слоями волос и завуалирована сохраняющимися следами непосредственного контакта с маркером, а также с мочой и фекалиями в первые дни после поедания приманки. Поверхностные следы родамина В исчезают и заменяются системной меткой постепенно, что заметно по смене локализации флуоресцирующих участков. Мы обнаружили, что площадь, на которой проявлялась метка, всегда составляла значительно меньше 50 % поверхности тела, а расположение флуоресцирующих участков было индивидуальным для каждой особи. С течением времени число и площадь светящихся участков шерсти сокращается и к концу срока наблюдения сводится к отдельным волоскам (рис. 4). Результаты опытов по сроку сохранения метки представлены в табл. 1. Выяснилось, что после того, как метку становится невозможным рассмотреть невооруженным глазом (без увеличения), ее еще можно уверенно обнаружить с помощью микроскопа спустя несколько дней после этого (рис. 4).

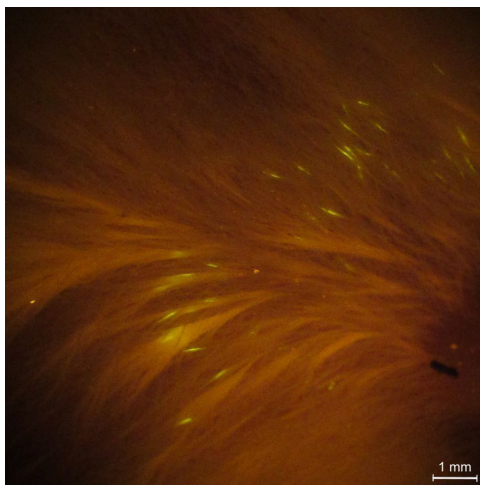


Рис. 4. Участок шкуры лабораторной мыши на вентральной стороне тела с родаминовой меткой в виде отдельных светящихся волосков (№ 12; 366 дней после мечения)

Fig. 4. A part of the laboratory mouse' skin on the ventral side of the body with the rhodamine label as separate luminous hairs (No. 12; 366 days after marking)

Максимальное значение показателя – 423 дня. Эта же особь (лаб. № 4) спустя еще 149 дней после исчезновения первой метки была успешно помечена повторно.

В опытах по опосредованному мечению через материнское молоко после отрастания шерсти у детенышей выяснилось, что все они имеют метку в волосах по всей поверхности тела ($n=7$). По мере роста молодых особей флуоресцирующие участки фрагментировались и метка исчезала заметно быстрее, чем это происходит у взрослых животных. Срок удержания метки детенышами составляет не менее четырех месяцев (опыт был прекращен).

Обсуждение

Разработка нового способа детекции родамина В проводилась нами, главным образом, для применения в массовом неизбирательном самомечении животных, поэтому лабораторным мышам маркер давали с пищей, в виде готовой приманки, которая потенциально может использоваться и в полевых исследованиях. В ходе опытов мы не обнаружили у животных явных признаков отвращения к нашей приманке. За два года исследований мы наблюдали только три случая самопроизвольной смерти подопытных мышей, и у нас нет оснований считать, что они погибли из-за биомаркера. Особи, получавшие пищу с более высокой концентрацией красителя (1000 и 1500 мг/кг однократно), как и те, которые содержались только на корме с родамином В в течение недели, не погибли. Зверек, помеченный дважды (лаб. № 4), благополучно достиг возраста более 589 дней (дата рождения не известна). Следует отметить, что к настоящему времени безопасность родамина В для животных уже достаточно хорошо обоснована и ее проверка не являлась целью нашего исследования. Более подробную информацию по дан-

ному вопросу можно найти в других работах (Fisher, 1999 и ссылки там).

Мы обнаружили, что эффективность выявления родаминовой метки очень зависит от применяемого фильтра. Наиболее яркое и контрастное изображение удается получить с фильтром, через который метка выглядит светло-желтой или золотистой. С более слабыми фильтрами метка имеет оранжевый цвет и видна намного хуже (рис. 2). Примечательно, что во всех известных нам работах, где родамин В выявляли с помощью люминесцентных микроскопов, авторы описывают метку именно как оранжевую, что вызывает вопросы относительно правильности подбора фильтров в некоторых приборах.

В ходе исследования установлено, что новый способ детекции родамина В значительно надежнее общепринятого. Распространенный до настоящего времени протокол предполагает взятие нескольких проб (волосков) из шкуры и/или вибрисс животного с последующим просмотром под люминесцентным микроскопом. Процедура пробоотбора является “ахиллесовой пятой” общепринятого метода детекции данного маркера. Известно, что родамин В в качестве системной метки включается только в растущие структуры, а рост волос идет неравномерно на различных участках тела (Fisher, 1999; Spurr, 2002; Weerakoon et al., 2013). Фактически распределение флуоресценции по телу меченого зверька отмечает участки шкуры, где происходил рост волос в тот период, когда был съеден корм с маркером. В ходе апробации нового способа детекции мы обнаружили, что у всех животных, съевших приманку, площадь флуоресцирующих частей шкуры составляет явно менее 50 %. Это верно даже в отношении двух мышей, которые получали родамин В в течение недели (рис. 3). Поэтому при “слепом” взятии

проб, как это делается в случае использования люминесцентной микроскопии, велика вероятность попасть на участок без метки. Вибриссы считаются более надежным индикатором, чем шерсть (Fisher, 1999; Weerakoon et al., 2013), однако нами были установлены случаи, когда метка проявлялась на шкуре зверька, но отсутствовала в вибриссах, что также подтверждается литературными данными (Purdey et al., 2003). Кроме того, длительность сохранения маркера в вибриссах не превышает двух месяцев (Jacob et al., 2002; Fernandez, Rocke, 2011). Таким образом, при использовании общепринятой процедуры детекции метки существует вероятность получения ложноотрицательных результатов, что ранее отмечалось исследователями (Jacob et al., 2002; Weerakoon et al., 2013), тогда как предлагаемый вариант метода позволяет просматривать всю поверхность тела животного, включая шерсть, вибриссы и когти (рис. 3). Поэтому в наших опытах метка была обнаружена у всех меченых животных.

Важнейшим преимуществом неизбежного мечения является возможность быстро и с минимальными трудозатратами пометить множество животных на определенной территории для получения как можно большего объема данных. Учитывая массовость получаемого материала, такие параметры метода, как степень сложности и стоимость, приобретают повышенное значение. Разработанный нами способ детекции родамина В делает методику мечения этим маркером значительно проще и дешевле. Очевидно, что стоимость комплекта оборудования для использования нового метода на несколько порядков меньше, чем у люминесцентных микроскопов. Кроме того, разработанный нами способ детекции метки в отличие от общепринятого не предполагает использования каких-либо расходных материалов. Процеду-

ра выявления родамина в теле животных по новой схеме не требует много времени. Полный осмотр одной мыши, например, занимает 1-2 мин (без учета фотографирования). Кроме того, детекцию метки новым способом можно проводить в полевых условиях, что часто бывает важным для зоологов и по понятным причинам затруднено в случае со специализированным микроскопом. Полевое применение облегчается еще и тем, что метка хорошо видна не только в полной темноте, но и при сумеречном освещении.

Одним из существенных преимуществ мечения родамином считается возможность выявлять метку *in vivo*, что может иметь значение как при изучении редких видов, так и по общим соображениям гуманизма. В таких случаях предлагаемый метод делает процедуру детекции метки еще менее инвазивной, поскольку позволяет осматривать все животное целиком без выдергивания волосков или вибрисс. Обобщающее сравнение основных параметров двух методов детекции родамина В дано в табл. 2.

Возможность наблюдать эволюцию метки на живых животных в ходе апробации метода позволила нам установить новые максимальные сроки удержания маркера для млекопитающих вообще и лабораторных мышей в частности. Наибольшая ранее известная продолжительность сохранения родаминовой метки млекопитающими достигала 225 дней (Fichet-Calvet, 1999), а для лабораторных мышей – 84 (Jacob et al., 2002), что значительно меньше установленного нами (423). В наших опытах минимальный срок сохранения метки составлял 165 дней (табл. 1), что позволяет использовать метод, например, для изучения пространственной структуры популяций мышевидных грызунов в зимний период (мечение осенью, отлов весной). При использовании флуоресцентной микроскопии решение

Таблица 2. Сравнение методов детекции родаминовой метки

Table 2. Comparison of methods for rhodamine mark detection

Общепринятый метод	Новый метод
Сложный. Используется люминесцентный микроскоп. Есть спорная процедура пробоотбора и пробоподготовка	Простой. Использование микроскопа не является обязательным. При необходимости можно применять самые простые модели. Пробоотбора и пробоподготовки нет
Дорогой. Помимо высокой цены специализированного микроскопа (высокий “порог вхождения”) метод предполагает использование расходных материалов	Дешевый. Стоимость инструментария ничтожно мала (низкий “порог вхождения”). Нет расходных материалов
Медленный. Длительность процедуры вместе с пробоподготовкой занимает до двух недель	Быстрый. Осмотр одной мыши занимает 1-2 мин
Ограничен по максимальному размеру образцов. Конструкция современных люминесцентных микроскопов дает возможность работать только с очень мелкими объектами	Не ограничен по максимальному размеру образцов
Ненадежный. Осмотреть зверька целиком нельзя, поэтому вероятность обнаружения метки очень зависит от нюансов пробоотбора. Распространены ложноотрицательные результаты	Надежный. Любых животных можно осматривать целиком. Не выявлено ложноотрицательных результатов
Не может использоваться в полевых условиях	Может использоваться в полевых условиях
Умеренная инвазивность. При работе с живыми особями нужно брать образцы шерсти и/или вибрисс	Крайне низкая инвазивность. Необходимо только ограничить подвижность животного

вопроса с установлением продолжительности сохранения метки было бы гораздо более затратным и трудоемким, поскольку, как выяснилось в опытах на горностае (Spurr, 2002), для надежной детекции маркера у одного животного нужно выдернуть 9 вибрисс, после чего продолжение опыта на той же особи становится проблематичным. В шерсти родамин В остается дольше, но обнаруживается ранее принятым методом менее надежно. При этом остается проблема с повторным взятием проб у одной и той же особи. Данное ограничение затрудняет совместное применение родаминового метода и индивидуального мечения с многократными повторными отловами, если используется общепринятый способ детекции метки с выдергиванием волосков.

Важным фактом кинетики родамина В является его способность передаваться де-

тенышам с молоком матери. Такое предположение было высказано ранее на основании косвенных признаков (Fichet-Calvet, 1999) и доказано в наших опытах на лабораторных мышах. Возможность мечения мелких млекопитающих еще до их выхода из гнезда дает более широкие возможности, например, для изучения процесса первичного расселения зверьков.

Одним из возможных применений разработанного нами способа детекции родаминовой метки может быть изучение закономерностей роста волос у животных (скорость роста и частота смены фаз роста/покоя на различных участках тела, особенности процесса линьки у различных видов, соотношение общих закономерностей и индивидуальных особенностей роста волос и т.п.).

Заключение

Итогом работы стала разработка нового способа детекции родаминовой метки в теле животных, который обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с общепринятым методом: предельная простота, дешевизна, более высокая вероятность обнаружения метки.

В ходе исследования был установлен новый предельный срок удержания мар-

кера для млекопитающих, превышающий год. Обнаружено, что родамин В способен передаваться детенышам мышей с молоком матери. У зверьков, получивших маркер с приманкой, площадь светящихся участков шерсти не превышала половины поверхности тела, тогда как у детенышей, помеченных опосредованно, через молоко их матерей, метка проявлялась на всей поверхности шкуры.

Благодарности / Acknowledgements

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН. Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.А. Байтимировой за ценные советы при обсуждении рукописи, а также И.Ю. Толкачевой за помощь в проведении опытов.

The study was performed in accordance with State Program for the Institute of Plant and Animal Ecology of the UB RAS. The authors are grateful to E.A. Baitimirova, Ph.D., for her valuable advice about preparing the manuscript and to I.Yu. Tolkacheva for her assistance in conducting experiments.

Список литературы / References

Большаков В.Н., Баженов А.В. (1988) *Радионуклидные методы мечения в популяционной экологии млекопитающих*. М., Наука, 158 с. [Bol'shakov V.N., Bazhenov A.V. (1988) *Radionuclide labeling in population ecology of mammals*. Moscow, Nauka, 158 p. (in Russian)]

Государственная фармакопея РФ (издание XIII). Том 1. (2015) М., Министерство здравоохранения РФ, 1312 с. [State Pharmacopoeia of Russian Federation (Edition XIII). Volume 1. (2015) Moscow, Ministry of Health of Russian Federation, 1312 p. (in Russian)]

Григоркина Е.Б., Оленев Г.В. (2013) Миграции грызунов в зоне влияния Восточно-Уральского радиоактивного следа (радиобиологический аспект). *Радиационная биология. Радиоэкология*, 53(9): 76-83 [Grigorkina E.B., Olenev G.V. (2013) Migration of rodents in the zone affected by East Ural radioactive trace: radiobiological aspect. *Radiation Biology. Radioecology* [Radiacionnaya biologiya. Radioehkologiya], 53(9): 76-83 (in Russian)]

Карасева Е.В., Телицына А.Ю., Жигальский О.А. (2008) *Методы изучения грызунов в полевых условиях*. М., ЛКИ, 416 с. [Karaseva E.V., Telitsina A.Yu., Zhigalsky O.A. (2008) *The methods of studying rodents in the wild nature*. Moscow, LKI, 416 p. (in Russian)]

Клевезаль Г.А., Мина М.В. (1980) Методика группового мечения грызунов с помощью тетрациклина и возможности ее использования в экологических исследованиях. *Зоологический журнал*, 59(6): 936-941 [Klevezal G.A., Mina M.V. (1980) Tetracycline method of group marking for rodents and prospect of its utilization in ecological studies. *Zoological Journal* [Zoologicheskij zhurnal], 59(6): 936-941 (in Russian)]

Рыльников В.А. (2007) Зональные особенности сезонных миграций серых крыс (*Rattus norvegicus* Berk.) России в аспекте управления ее численностью. *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*, 112(3): 13-19 [Rylnikov V.A. (2007)

Zonal peculiarities of seasonal migrations of the norwegian rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in Russia in view of species population management. *Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological series* [Byulleten Moskovskogo obshchestva ispytatelej prirody. Otdel biologicheskij], 112(3): 13–19 (in Russian)]

Crier J.K. (1970) Tetracyclines as a fluorescent marker in bones and teeth of rodents. *The Journal of Wildlife Management*, 34(4): 829-834

Fernandez J. R-R., Roche T.E. (2011) Use of rhodamine B as a biomarker for oral plague vaccination of prairie dogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3): 765-768

Fichet-Calvet E. (1999) Persistence of a systemic labelling in fur and guard hairs by ingestion of rhodamine B in *Myocastor coypus* (Rodentia). *Mammalia*, 63(2): 241-244

Fisher P. (1995) Techniques for using Rhodamine B as a systemic biomarker for the assessment of non-target risk. *Proceedings of the 10th Australian Vertebrate Pest Control Conference, 29 May-2 June 1995, Hobart, Tasmania*. Tasmania, Department of Primary Industries and Fisheries, p. 91-95

Fisher P. (1999) Review of using Rhodamine B as a marker for wildlife studies. *Wildlife Society Bulletin*, 27(2): 318-329

Fisher P., Algar D., Sinagra J. (1999) Use of Rhodamine B as a systemic bait marker for feral cats (*Felis catus*). *Wildlife Research*, 26: 281-285

Jacob T., Jones D.A., Singleton G.R. (2002) Retention of the bait marker Rhodamine B in wild house mice. *Wildlife Research*, 29: 159-164

Jacob T., Ylonen H., Runcie M.J., Jones D.A., Singleton G.R. (2003) What affects bait uptake by house mice in Australian grain fields? *The Journal of Wildlife Management*, 67(2): 341-351

Johnston M.J., Shaw M.J., Robley A., Schedvin N.K. (2007) Bait uptake by feral cats on French island, Victoria. *Australian Mammalogy*, 29(1): 77-84

Lavoie G.K., Atwell G.C., Swink F.N., Sumangil J.P., Libay J. (1971) Movement of the ricefield rat, *Rattus rattus mindanensis*, in response to flooding and plowing as shown by fluorescent bone labeling. *Philippine Agriculturist*, 54: 325-330

Lindsey G.D., Nass R.D., Hood G.A. (1971) An evaluation of bait stations for controlling rats in sugarcane. *The Journal of Wildlife Management*, 35(3): 440-444

Massei G., Jones A., Platt T., Cowan D.P. (2009) Iophenoxic acid as a long-term marker for wild boar. *The Journal of Wildlife Management*, 73(3): 458-461

Matter H.C., Schumacher C.L., Kharmachi H., Hammami S., Tlatli A., Jemli J., Mrabet L., Meslin F.X., Aubert M.F., Neuenschwander B.E., Hicheri K.E. (1998) Field evaluation of two bait delivery systems for the oral immunization of dogs against rabies in Tunisia. *Vaccine*, 16(7): 657-665

Mohr K., Leirs H., Katakweba A., Machang'u R. (2007) Monitoring rodents movements with a biomarker around introduction and feeding foci in an urban environment in Tanzania. *African Zoology*, 42(2): 294-298

Papillon Y., Buffiere L., Butet A. (2002) Rhodamine B as a collective marker for studying movements of small mammals. *Acta Theriologica*, 47(4): 491-497

Purdey D.C., Petcu M., King C.M. (2003) A simplified protocol for detecting two systemic bait markers (Rhodamine B and iophenoxic acid) in small mammals. *New Zealand Journal of Zoology*, 30: 174-184

Slate D., Algeo T.P., Nelson K.M., Chipman R.B., Donovan D., Blanton J.D., Niezgoda M., Rupprecht C.E. (2009) Oral rabies vaccination in North America: opportunities, complexities, and challenges. *PLoS Neglected Trop Diseases*, 3(12): 1-9

Southey A.K., Sleeman D.P., Gormley E. (2002) Sulfadimethoxine and Rhodamine B as oral biomarkers for European badgers (*Meles meles*). *Journal of Wildlife Diseases*, 38(2): 378-384

Spurr E.B. (2002) Rhodamine B as a systemic hair marker for assessment of bait acceptance by stoats (*Mustela erminea*). *New Zealand Journal of Zoology*, 29(3): 187-194

Tripp D.W., Rocke T.E., Streich S.P., Brown N.L., Fernandez J. R-R., Miller M.W. (2014) Season and application rates affect vaccine bait consumption by prairie dogs in Colorado and Utah, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(2): 224-234

Tolkachev O.V. (2016a) A study on the migrations of murine rodents in urban environments. *Russian Journal of Ecology*, 47(4): 399-404

Tolkachev O.V. (2016b) The dispersal of the pygmy wood mouse (*Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) in fragmented landscapes. *Contemporary Problems of Ecology*, 9(1): 116-124

Weerakoon M.K., Price C.J., Banks P.B. (2013) Hair type, intake, and detection method influence Rhodamine B detectability. *The Journal of Wildlife Management*, 77(2): 306-312