

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**М.О. Гомзикова, А.Г. Маланьева, З.Ю. Сираева**

**ОСНОВЫ ПРОВЕДЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Учебное пособие**

**КАЗАНЬ  
2021**

**УДК 57.084+59.084**

**ББК 28.0+28с**

**О75**

*Рекомендовано к изданию  
учебно-методической комиссией  
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ  
(протокол № от октября 20 г.)*

**Рецензенты:**

Заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, профессор, член-корреспондент Академии наук РТ, доктор медицинских наук

**Бойчук С.В.**

Директор НКЦ ПРМ, заведующий отделом поисковых исследований НОЦ фармации ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», профессор, член-корреспондент Академии наук РТ, доктор биологических наук

**Ризванов А.А.**

О75 Основы проведения биомедицинских исследований на лабораторных животных: учеб. пособие / М.О. Гомзикова, А.Г. Маланьева, З.Ю. Сираева – Казань: ИД «МеДДоК», 2021. – 124 с.

Данное учебное пособие – часть методического обеспечения аудиторной и внеаудиторной работы по дисциплинам «Методы клинической лабораторной диагностики», «Организация клинических и доклинических исследований лекарственных средств», «Патоморфология и хирургия лабораторных животных с основами биоэтики по стандартам GLP» по направлениям подготовки 06.03.01 «Биология», 33.05.01 «Фармация». В учебном пособии изложены основные понятия и принципы работы с лабораторными животными согласно правилам GLP, требования к условиям содержания животных, основные болезни и методы диагностики, стандартные манипуляции с животными.

Учебное пособие предназначено для студентов, магистрантов и аспирантов биологических и медицинских факультетов университетов.

© Гомзикова М.О., Маланьева А.Г., Сираева З.Ю., 2021

© ООО «Издательский дом «МеДДоК», 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Основные этические принципы проведения исследований на лабораторных животных.....	6
Концепция 3R и законы о защите животных.....	6
Понятие процедуры и цель этических принципов.....	9
Характеристика лабораторных крыс и мышей.....	10
Анатомо-физиологическая характеристика.....	10
Генетическая характеристика.....	21
Содержание лабораторных животных.....	23
Условия содержания лабораторных животных.....	23
Корм и режим кормления.....	30
Санитарные требования к условиям содержания животных.....	32
Мониторинг состояния здоровья животных.....	33
Основные болезни лабораторных крыс и мышей.....	37
Вирусные болезни.....	39
Бактериальные болезни.....	40
Микозы.....	46
Паразитарные болезни.....	48
Профилактика инфицирования.....	49
Незаразные болезни.....	50
Основы распознавания и облегчения боли у лабораторных животных...	52
Признаки боли, классификация степени тяжести боли.....	53
Понятие об анестезии и анальгезии, основные препараты.....	60
Понятие об эвтаназии, способы эвтаназии.....	70
Стандартные манипуляции с лабораторными животными.....	72
Техника удержания животных.....	72
Техника забора крови.....	76

Способы введения исследуемых лекарственных средств.....	81
Основные правила проведения доклинических исследований на лабораторных животных.....	90
Роль моделей на животных в разработке новых лекарственных средств.....	90
Цикл разработки новых лекарственных средств.....	92
Применение животных моделей для прогнозирования ответа организма человека.....	93
Экстраполяция данных с модели на животных на организм человека.....	96
Определение дозы фазы I клинических испытаний.....	97
Фармакокинетическое моделирование.....	101
Модели <i>in vitro</i> – альтернатива исследованиям на животных.....	101
Фармакогенетика и фармакогеномика.....	102
Принципы проектирования доклинического исследования.....	103
Требования к оборудованию для доклинических исследований..	108
Стандартные операционные процедуры.....	110
Контроль качества <i>in vivo</i> исследований.....	111
Валидация и проверка методов испытаний.....	113
Документирование и отчетность.....	114
Заключение.....	116
Список используемых сокращений.....	117
Рекомендуемая литература.....	119
Рекомендуемые Интернет-ресурсы.....	124

## **ВВЕДЕНИЕ**

В аспекте современных тенденций развития медицины и биологии знание теоретических положений проведения медико-биологических исследований и овладение практическими навыками работы с лабораторными животными необходимы каждому исследователю. Ознакомление с изложенным в учебном пособии материалом позволит расширить и углубить знания об основных этических принципах проведения медико-биологических, в том числе доклинических, исследований на животных моделях и овладеть основными навыками манипуляции с лабораторными животными. Вы сможете расширить и углубить знания о лабораторных животных с позиций анатомо-физиологических различий с организмом человека, что позволит вам адекватно экстраполировать полученные на животной модели данные на организм человека.

Изучение учебного пособия будет способствовать формированию научных представлений о правилах проведения медико-биологических исследований на лабораторных животных согласно стандартам GLP, расширяющих фундаментальный и практический базис для изучения других дисциплин, в том числе клинических, и способствующих формированию у Вас исследовательского мышления.

# ОСНОВНЫЕ ЭТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

## Концепция 3R и законы о защите животных

Британский зоолог Уильям Рассел (*William Russell*, 1925-2006), известный как Билл Рассел, совместно с Рексом Леонардом Берчем (*Rex Leonard Burch*, 1926-1996) (рис. 1) создали концепцию гуманного использования животных в исследованиях, обучении и тестировании, которую опубликовали в своей книге «Принципы гуманной экспериментальной техники» (*The Principles of Humane Experimental Technique*) (Russell & Burch, 1959; Balls, 2014). Концепция получила название «3R» (от англ. **R**eplacement – замена, **R**eduction – сокращение, **R**efinement – усовершенствование).

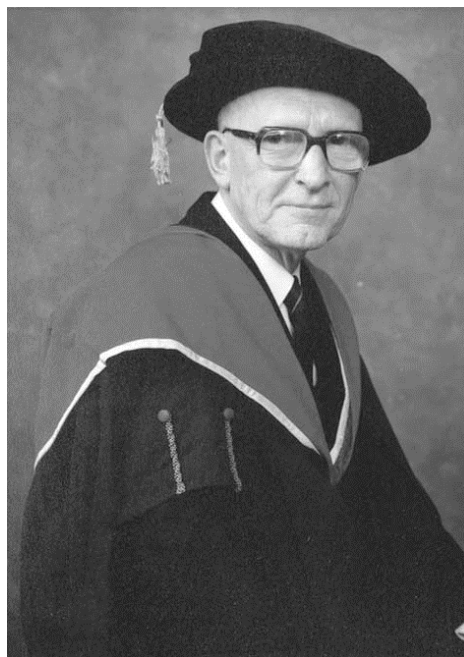


Рисунок 1. Создатели концепции «3R», авторы книги «Принципы гуманной экспериментальной техники» Уильям Рассел (*William Russell*, 2006; адаптировано из: Balls, 2014) и Рекс Леонард Берч (*Rex Leonard Burch*, 1991; адаптировано из: Stephens, 2009) (слева направо).

Суть концепции заключается в поддержке методов исследования, альтернативных испытаниям на животных, в улучшении обращения с подопытными животными или сокращении числа в случаях, когда невозможно избежать использования животных объектов, с одновременным повышением качества научных и прикладных медицинских исследований.

*Replacement* – замена: означает замену животной модели на методы, позволяющие достичь цели без проведения экспериментов на животных. Данное понятие включает замену животной модели на клеточные, математические, компьютерные модели. Частичная замена предполагает использование видов животных, которые, согласно современным научным представлениям, не способны испытывать страдания. К ним относят беспозвоночных животных: дрозофила, нематодные черви, амёбы.

*Reduction* – сокращение: означает использование минимально необходимого количества животных в исследовании, использование методов, позволяющих получать информацию от меньшего количества животных или получать больше информации от того же количества животных.

*Refinement* – усовершенствование: означает использование методов, исключающих или вызывающих минимальную боль, страдания и стресс у животных, а также повышающих качество жизни животных (Гильдеева, 2015; Russell & Burch, 1959; Stephens, 2009; Balls, 2014).

В настоящее время концепция «3R» прописана в законодательных актах и стандартах, регулирующих использование животных во всем мире. Разработана «Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18.03.1986). В соответствии с Директивой Европейского Союза о защите животных, используемых в научных целях (Directive 2010/63/EU) запрещено проводить процедуры для оценки переносимости боли и страданий животными и

процедуры, сопровождаемые сильной болью, страданием, которые могут длиться долго и не могут быть купированы.

Европейскими странами в 1978 году была создана Федерация европейских научных ассоциаций по лабораторным животным – FELASA (от англ. The **F**ederation of **L**aboratory **A**nimal **S**cience **A**ssociation). FELASA разработана система специализированного обучения для получения разрешения на работы с экспериментальными животными. Сертификаты, выданные FELASA, признаны во всем мире и являются доказательством квалификации ученого-исследователя по работе с животными объектами.

В России положения Федерального закона «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 27.12.2018 N 498-ФЗ не применяются к «области содержания и использования лабораторных животных», что привело к правовому пробелу в области регулирования общественных отношений по содержанию, использованию и охране лабораторных животных (Галушин и Марфенин, 2010; Горохов, 2020). На базе ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (КФУ) утвержден локальный этический комитет (ЛЭК) – независимый экспертно-аналитический коллегиальный орган, призванный обеспечивать независимую экспертизу, консультирование и принятие решений по вопросам этики биомедицинских исследований. Основными целями деятельности ЛЭК КФУ являются защита прав, достоинства, интересов и здоровья вовлеченных в исследование испытуемых (человека, животных), беспристрастная этическая оценка биомедицинских исследований, обеспечение качества биомедицинских исследований в соответствии с международными нормами в интересах развития фундаментальной и прикладной биологической и медицинской науки (<https://kpfu.ru/>).



Эксперименты на животных должны быть тщательно спланированы, эффективно выполнены, правильно проанализированы, четко представлены и правильно интерпретированы, чтобы считаться этически приемлемыми.

### **Понятие процедуры и цель этических принципов**

Любая *процедура* с использованием животного может быть реализована исключительно согласно протоколу проекта, утвержденному локальным этическим комитетом (ЛЭК).

*Процедура* – любое инвазивное или неинвазивное использование животного в экспериментальных или других научных целях с известным и неизвестным результатом, или в образовательных целях, которое может причинить животному такой же уровень стресса, боли, страданий, который *эквивалентен или выше, чем введение иглы для подкожных инъекций*. Таким образом, на любой эксперимент, подразумевающий введение иглы и равнозначных процедур (рана, ожог, ограничение еды, длительный стресс и др.) с использованием животного, необходимо получить разрешение в ЛЭК КФУ.

Основными целями этических принципов экспериментов на лабораторных животных являются:

- 1) максимально возможное повышение качества жизни животного;
- 2) достижение гарантии сведения к минимуму или купирование любых страданий экспериментальных животных при проведении процедур.

# ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС И МЫШЕЙ

## Анатомо-физиологическая характеристика

Крысы – любопытные, умные, социальные животные. В лабораторной практике чаще всего используют серых крыс (от лат. *Rattus norvegicus* – норвежская крыса; наименование дано английским натуралистом Джоном Беркенхаутом (*John Berkenhout*, 1769 год)); лабораторных аутбредных крыс линии Wistar, выведенных в 1906 году (Wistar Institute, USA) и Sprague-Dawley – линии беспородных крыс-альбиносов вида *Rattus norvegicus*, выведенных в 1925 году (University of Wisconsin-Madison, USA).

Мыши – территориальные животные, характеризующиеся агрессией при защите территории. Одним из наиболее распространенных видов лабораторных животных является домовая мышь – *Mus musculus* L. Первоначально в исследованиях применяли исключительно белых мышей, традиционно называемых альбиносами, или, согласно современной терминологии, аутбредными (нелинейными) животными. Первые линейные мыши выведены методом скрещивания группой американских онкологов в 1909 году. В последующем путем близкородственного скрещивания и селекции потомства на выживаемость и наличие опухолей молочных желез была выведена первая линия мышей, обозначаемая с 1950 года как DBA.

В настоящее время основными линиями мышей, используемых в лабораторной практике, являются C57BL/6 (с использованием данной линии проведено до 43,25% исследований) и BALB/c (с использованием данной линии проведено до 19,93% исследований).

Основные параметры и характеристики крыс и мышей приведены в табл.1.

Таблица 1. Основные характеристики лабораторных крыс и мышей

Параметр	Крыса	Мышь
Вес взрослого самца, г	450-520	25-40
Вес взрослой самки, г	250-300	20-40
Вес при рождении, г	5-6	0,5-1,5
Потребление пищи, г/100 г веса	5-6	15
Потребление воды, мл/100 г веса	10-12	15
Частота дыхания, мин	70-115	100-200
Частота сердцебиения, мин	250-450	300-800
Температура тела, °С	35,9-37,5	36,5-38,0
Систолическое давление, мм рт.ст.	88-184	133-160
Диастолическое давление, мм рт.ст.	58-145	102-110
Объем крови, мл/кг	58	75
Срок жизни, лет	2,5-3,0	1,0-3,0

**Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта.** Большинство лекарственных препаратов представляют собой лекарственные формы, предназначенные для приема *per os*. Это обуславливает необходимость сопоставления пищеварительной системы у лабораторного животного и человека при моделировании исследований.

**Ротовая полость.** Зубная формула у грызунов и человека существенно отличается (табл. 2). Основным отличием зубов у грызунов является пара крупных резцов на верхней и нижней челюстях. Передняя поверхность резцов покрыта эмалью, задняя – дентином, что обуславливает стачивание резцов при соприкосновении со стороны дентина. Участок, лишенный клыков (диастема), заполнен подщечными подушками. Резцы у грызунов растут на протяжении

жизни; при ограничении твердой пищи возникает первичный дефект в виде неправильного прикуса, приводящий к повреждениям челюсти (вывиху) ил неспособности к приему пищи.

Таблица 2. Сравнительная характеристика зубной формулы

Зубы	Человек	Крысы, мыши
Резцы I ( <i>dentes incisivi</i> )	8	4
Клыки ( <i>dentes canini</i> )	4	0
Премоляры Р ( <i>dentes premolars</i> )	8	0
Моляры М ( <i>dentes molares</i> )	12	12
Всего	32	16

(адаптировано из: Чумаков, 2013).

*Пищевод.* Пищевод человека имеет три анатомических (фарингеальное, бронхиальное, диафрагмальное) и два физиологических (аортальное, кардиальное) сужения. Грызуны (и зайцеобразные) имеют аналогичные анатомо-морфологические особенности строения пищевода. Это важно при выполнении манипуляций внутрижелудочного введения лекарственных форм. При введении лекарственных форм *per os* с помощью зонда параметры зонда должны быть выбраны согласно размерам пищевода (табл. 3).

При необходимости введения животному капсулы или таблетированной формы необходимо тщательно определить параметры выбора животного, пищевод которого позволяет ввести таблетку или капсулу определенного размера. Сравнение типоразмерного ряда таблеток, нормированных ОСТ 64-072-89, таблетки и капсулы в нативной форме с некоторыми исключениями могут быть введены исключительно кроликам. В связи с этим, исследователю целесообразно рассмотреть модельный объект, пищевод которого позволяет вводить крупные лекарственные формы без нарушения целостности, в частности, мини-пиги.

Таблица 3. Сравнительные размеры пищевода человека и лабораторных животных

Показатель	Человек	Крыса	Мышь	Кролик	Морская свинка	Хомяк
Длина пищевода, см	25-30	7-10	3,0-5,0	14-20	8-15	7-9
Средний диаметр пищевода, мм	25-30	1,7-2,5	0,9-2,25	8,5-11	1,7-2,5	0,5-1,5
Фаренгиальное сужение, см	18	2,3	1,0	8,9	2,0	0,5
Наиболее широкая часть, мм	22	3,5	1,5	10	2,4	1,4
Диафрагмальное сужение, мм	21	1,5	1,0	9,0	1,7	0,6
Размер зонда, G	-	13-18	16-22	13	13	13
Диаметр оливы, мм	-	2,3-3,0	1,2-1,6	3,5	3,5	3,5
Длина зонда, см	-	3,0-8,8	2,5-3,8	90-150	90-150	90-150

(адаптировано из: Макарова и др., 2016)

*Желудок.* Объём опустошенного желудка человека составляет 0,5 л, после принятия пищи – от 1 до 4 л. Различают: кардиальный отдел, дно желудка (свод), тело желудка, пилорический отдел (рис. 2 В). Выделяют переднюю стенку желудка, заднюю стенку, малую кривизну и большую кривизну желудка. За счёт мышечной оболочки стенки желудка происходит перемешивание пищи и желудочного сока с образованием химуса, постепенно перемещающегося отдельными порциями в 12-перстную кишку. Слизистая желудка человека выстлана железистым эпителием.

Желудок грызунов имеет принципиально иное строение. Желудок крысы имеет форму крючка, реже – подковообразной формы (рис. 2 А). Желудок крысы бóльшей частью размещен левее срединной линии, вентрально прикрыт печенью. Анатомически разделен на четыре отдела: пищеводный, или преджелудок (выстлан многослойным неороговевающим эпителием; функционально служит для хранения и бактериального переваривания пищи); кардиальный с трубчатыми слизистыми железами (безжелезистая часть, бактериальное пищеварение); дно желудка (занимает бóльшую часть желудка; ферментативное пищеварение); пилорическая часть (слизистые железы) (рис. 2А) (Чумаков, 2013; Макарова и др., 2016).



Рисунок 2. Строение желудка человека (А) и грызунов (В) (адаптировано из: Макарова и др., 2016).

Анатомически части ограничены гребнем, закрывающим выход из пищевода и предотвращающий возможность рвоты. Это обуславливает невозможность самостоятельного вывода животным тестируемого объекта с рвотными массами. Пища при попадании в желудок осажается в безжелезистой части желудка, переваривается в железистой части.

Таким образом, желудок человека отличается от желудка крысы железистым эпителием на всем протяжении слизистой оболочки, отсутствием безжелезистой части и ограничивающего гребня.

Желудок взрослой мыши характеризуется аналогичными особенностями, однако вместимость не превышает 1,5 мл, при принудительном заполнении – 3,5 мл (Макарова и др., 2016).

Морфологические и структурные показатели имеют свои видовые особенности (табл. 4).

Таблица 4. Объемные и морфологические показатели желудка крыс и мышей

Вид	Морфологические показатели желудка			
	Объем, мл	Длина, см	Ширина, см	Толщина, см
Крыса белая лабораторная линии Wistar	$7,12 \pm 0,12$	$4,01 \pm 0,36$	$2,03 \pm 0,13$	$0,79 \pm 0,08$
Мышь лабораторная линии Агути	$0,21 \pm 0,004$	$1,76 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,06$	$0,84 \pm 0,08$
Мышь лабораторная белая	$0,51 \pm 0,12$	$1,80 \pm 0,20$	$0,73 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,06$

*Кишечник.* Растительный рацион питания грызунов обуславливает преобладание в кишечнике целлюлозолитической микрофлоры,

осуществляющей кишечное брожение (*hindgut fermentation*). Вследствие этого, пищеварительный тракт грызунов длиннее, чем у человека. Основное бактериальное расщепление компонентов потребленной пищи происходит в слепой кишке. Тонкая кишка у крыс является основным местом переваривания и всасывания питательных веществ, воды и электролитов. Разделена по длине на три неравные части: двенадцатиперстную, тощую и подвздошную кишку. Наиболее активно всасывание происходит в двенадцатиперстной кишке и проксимальной части тощей кишки; основные механизмы всасывания: пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт путем пиноцитоза. Поглощение воды и электролитов также продолжается в толстой кишке (DeSesso & Jacobson, 2001).

В организме человека в составе толстого кишечника выделяют слепую кишку, ободочную (восходящую, поперечную, нисходящую), сигмовидную кишку, прямую кишку, анальный канал. Крысы имеют схожие отделы толстого кишечника, кроме сигмовидной кишки (у крыс отсутствует) (DeSesso & Jacobson, 2001).

Длина кишечника человека лишь в 5,5 раза больше длины кишечного тракта крыс, несмотря на бóльшую массу тела человека (~ 70 кг) по сравнению с массой тела крысы (~ 0,25 кг).

Тонкий кишечник человека занимает 81% общей длины ЖКТ, но лишь 38% от тонкого кишечника представлено тощей кишкой. Тонкий кишечник крыс составляет 83% от общей длины ЖКТ, при этом 90% тонкого кишечника составляет тощая кишка.

Вторым существенным различием кишечных трактов человека и крысы являются относительные размеры слепой кишки. Аппендикс человека составляет ~ 5% от длины толстого кишечника, слепая кишка крыс ~ 26% от длины толстого кишечника (DeSesso & Jacobson, 2001).



Несмотря на превышение линейных размеров тонкого кишечника человека, площадь всасывания в 200 раз больше, чем у крыс. Это связано с тем, что слизистая кишечника у человека формирует: 1) многочисленные, выраженные складки слизистой оболочки (увеличивают площадь поверхности с коэффициентом 3), ориентированные перпендикулярно к продольной оси, которые отсутствуют у крыс; 2) многочисленные ворсинки (увеличивают площадь поверхности у крысы с коэффициентом 5, у человека – с коэффициентом 10). Как у крыс, так и у человека каемчатые энтероциты формируют микроворсинки, увеличивающие площадь поверхности тонкого кишечника с коэффициентом 20 (Макарова и др., 2016).

Особенностью ЖКТ крыс и мышей, равно как и кроликов, морских свинок и хомяков, является формирование 2 типов испражнений – волокнистый материал выделяется в виде фекалия, а обогащенный питательными компонентами материал в слепой кишке упаковывается в поедаемые впоследствии цекотрофы (каловые шарики, или первичный кал). Цекотрофы содержат бактерии, простейших, дрожжи и продукты их ферментации с аминокислотами, летучими жирными кислотами, витаминами и ферментами. Повторное использование пищи путем поедания фекалий позволяет животным получать витамины группы В, витамин К и белки микробного происхождения.

**Терморегуляция.** У крыс и мышей не наблюдается одышки, отсутствуют потовые кожные железы. Способы осуществления терморегуляции:

- 1) поведенческая реакция – тактика избегания высоких и низких температур;
- 2) изменение положение тела – увеличение или уменьшение открытой поверхности кожи;
- 3) пилоmotorный рефлекс – сокращение волосковых мышц кожи (*m. arrector pili* – мышца, поднимающая волос) под влиянием местного или

рефлекторного раздражения, обеспечивающее задержку прогретого телом воздуха у поверхности кожи;

4) расширение находящихся близко к поверхности тела кровеносных сосудов для усиления теплоотдачи (рис. 3) (например, поверхность хвоста крысы составляет 5% площади тела, на который приходится 17% терморегуляторного эффекта);

5) повышенное выделение слюны (у крыс), вылизывание шерсти для увеличения испарения и снижения температуры тела.

Температура окружающей среды влияет на все физиологические параметры и метаболизм животного. Это необходимо учитывать, например, при исследовании метаболизма лекарственных средств; следует строго поддерживать температуру на стабильном рекомендуемом уровне ( $21 \pm 3^\circ\text{C}$ , влажность 40-60%). Необходимо учитывать, что температура внутри клетки может быть выше комнатной, так как зависит от плотности животных в клетке.

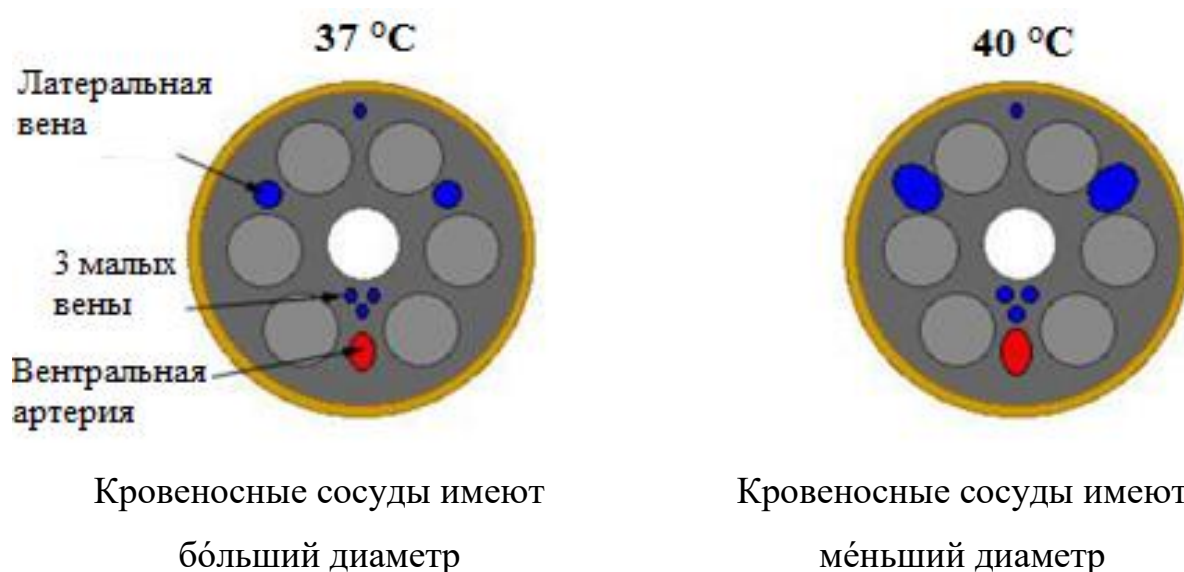


Рисунок 3. Схематическое изображение хвоста крысы в поперечном сечении. Представлен диаметр кровеносных сосудов при разной температуре окружающей среды (адаптировано из: Ratbehavior.org).

**Биологические ритмы.** Крысы и мыши, как и большинство грызунов, ведут ночной образ жизни, предпочитая полумрак. Скорость метаболизма у ночных животных наиболее высока в темное время суток. Рекомендуемое соотношение дня/ночи составляет 12/12 ч, для репродуктивных особей – 14/10 ч.

**Зрение грызунов.** Специфическими характеристиками ночных грызунов является слабое зрение и отсутствие колбочек в структуре сетчатки, необходимых для восприятия цветовой гаммы. В то же время в сетчатке глаза грызунов выявлены колбочки, чувствительные к ультрафиолету (УФ). Функциональная роль УФ зрения у грызунов недостаточно изучена и в настоящее время является актуальной областью исследований. Вероятно, возможность видеть объекты в УФ-спектре необходима для обнаружения мочевых меток, видимых в ультрафиолетовом диапазоне.

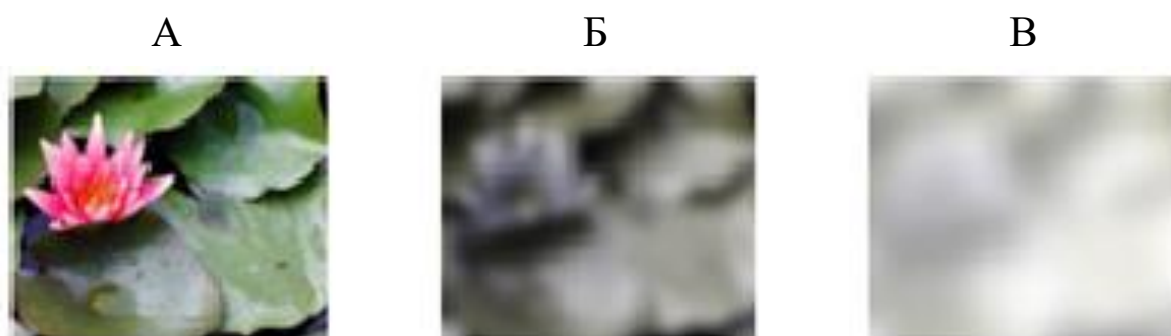


Рисунок 4. Сравнение восприятия объектов органами зрения человека и грызунов. А – восприятие объекта глазом человека, Б – восприятие объекта глазом крысы дикого типа (размытое черно-белое изображение), В – зрительное восприятие объекта крысами-альбиносами (сильно размытое изображение) (адаптировано из: Ratbehavior.org).

Наиболее распространенный фенотип лабораторных грызунов – альбиносы. У грызунов-альбиносов отсутствует тирозиназа – фермент, катализирующий синтез меланина из тирозина. Это приводит к цитологическим изменениям меланоцитов и нервных клеток, а также к ослаблению зрения (рис. 4), слуха, обоняния и координации движений.

**Обоняние.** Вследствие ограничения возможностей зрительного восприятия грызунами объектов, наибольшее компенсаторное значение приобретает обоняние. С помощью обоняния происходит распознавание вида, индивидуума, пола, статуса в иерархии, фаз полового цикла, социальной группы. Низкомолекулярные соединения, выделяемые в окружающую среду с мочой или особыми железами, предупреждают об опасности и информируют об источниках пищи. Феромоны – химические сигналы между представителями одного вида, кайромоны – между представителями разных видов.

**Пол.** Определение пола осуществляют по расстоянию между анусом и половым органом – у самцов это расстояние больше (рис. 5).

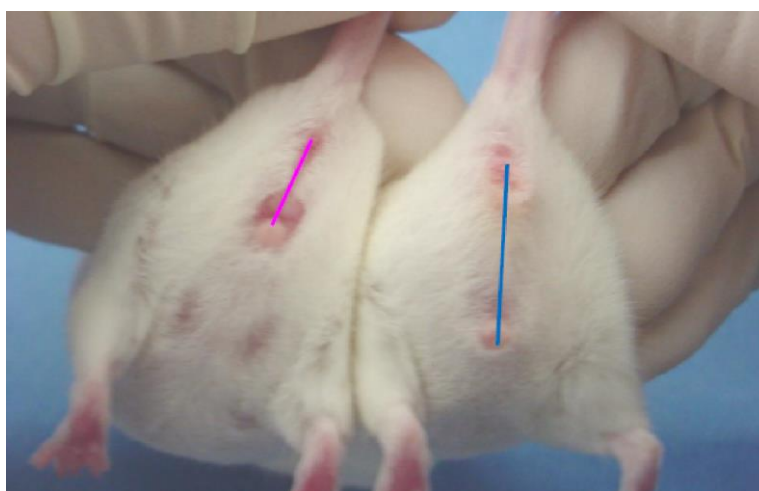
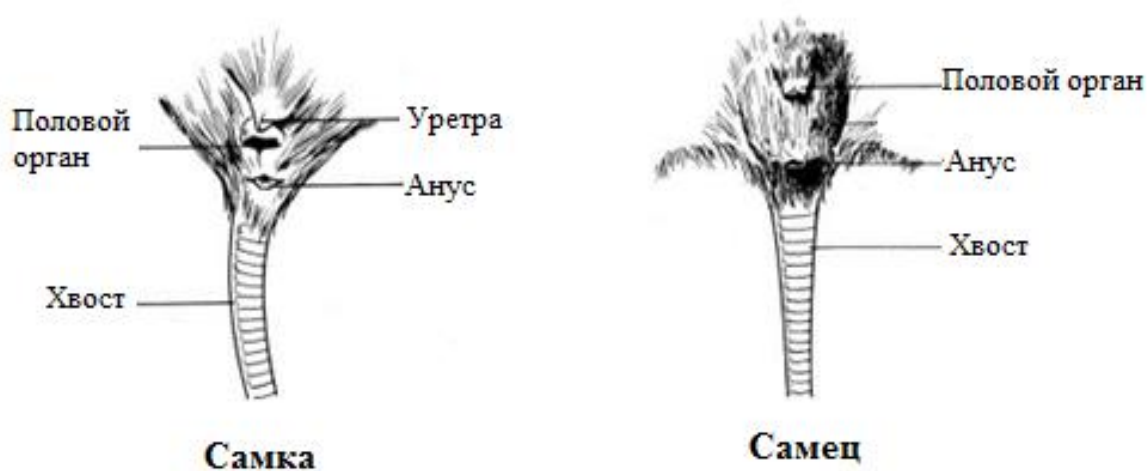


Рисунок 5. Определение пола у грызунов (адаптировано из: Animalia-life.club).

## Генетическая характеристика

В зависимости от генетического статуса лабораторных животных подразделяют на:

- беспородных (рандомбредных);
- аутбредных (гетерозиготных);
- линейных (инбредных, гомозиготных);
- трансгенных.

*Аутбредные животные* – генетически не охарактеризованные животные с широкой генетической вариацией между индивидами; большинство генов в гетерозиготном состоянии. Аутбридинг – это метод разведения животных посредством скрещивания неродственных организмов, в том числе и принадлежащих к разным линиям/породам (Гайдай и др., 2019). Характеризуются высокой плодовитостью, устойчивостью к внешней среде, широким отклонением в реакции на стимул, что приводит к низкой воспроизводимости результатов эксперимента.

При разведении аутбредных животных необходимо избегать инбридинга и случайно выбирать пары для разведения из существенной выборки животных. Опасения исследователей, связанные с широкой генетической вариативностью и низкой воспроизводимостью результатов при использовании аутбредных животных, препятствовали их широкому использованию в исследовательском сообществе. Однако аутбредные животные более полно отражают генетическое разнообразие человеческой популяции, то есть являются лучшим модельным объектом, тогда как использование инбредных линии отражает лишь небольшую часть общей картины (Tuttle *et al.*, 2018).

*Инбредные животные* наиболее широко используются в биомедицинских исследованиях; это линия, которая поддерживается вязками между братьями и сестрами (также разрешено спаривание потомства с родителем) на протяжении как минимум 20 или более последовательных поколений.

Преимущества использования в исследованиях инбредной породы:

- фенотипическая и генетическая однородность;
- сведение к минимуму отклонений;
- повышение воспроизводимости экспериментов.

Указанные преимущественные характеристики обуславливают приоритетное использование инбредных животных в доклинических исследованиях по всему миру. Для достижения статистической значимости эксперимента требуется меньшее количество животных. Использование в эксперименте инбредных животных позволяет сопоставлять полученные результаты с международными исследованиями (Tuttle *et al.*, 2018).

Факторы, способствующие снижению вариативности и повышению воспроизводимости экспериментов на животных:

- использование генетически охарактеризованной линии;
- использование инбредных животных;
- использование животных одного пола и возраста;
- контроль условий окружающей среды (режим освещенности, температура, влажность);
- стандартизация процедур (использование корма и подстила одного вида, производителя, партии).

## **СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Микросреда – это среда, непосредственно окружающая животное, например, клетка для лабораторных животных. Микросреда характеризуется физико-химическими и микроклиматическими константами: определённым освещением, температурой, влажностью, составом воздуха и т.п.

Макросреда – это комната или внешняя среда обитания (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2015). Рекомендации к условиям среды, которые будут приведены ниже, относятся к макросреде внутри вивария, так как оценить условия микросреды каждой клетки весьма затруднительно. Следует иметь в виду, что температура, влажность и концентрация газов в воздухе в микросреде выше, чем в макросреде, в то время как уровень освещённости обычно ниже.

### **Условия содержания лабораторных животных**

Условия содержания оказывают влияние на метаболизм и поведение лабораторных животных. Несоответствие условий содержания рекомендованным оказывает влияние на качество жизни животных и результативность эксперимента. Например, если мышей и крыс (стайных животных) изолировать – это вызовет стресс, что окажет влияние на метаболизм и может привести к различиям в ферментативной активности и фармакокинезе между особями одиночного и группового содержания. Недостаточно частая смена подстила приводит к возбуждению животных и агрессии у самцов (Van Loo *et al.*, 2000). Тип подстила также оказывает влияние на состояние животных, например, древесина кедра содержит канцерогены, а мелко измельченные опилки попадают в дыхательную систему животных. Учитывая сказанное, необходимо контролировать качество подстила и корма, стандартизировать условия макросреды, а также микросреды путем содержания определённого количества животных и соблюдения режима уборки (Kaliste, 2007).

*Пространство.* Плотность содержания животных в одной клетке выражается в суммарной массе животных на единицу площади (г/см<sup>2</sup>). Более крупные особи часто являются более взрослыми и менее активными, в то время как животные мёньшего размера – более молодые и активные (Kaliste, 2007). Ниже приведены значения рекомендуемой площади клетки для содержания мышей и крыс в зависимости от их массы (табл. 5).

Таблица 5. Рекомендуемая площадь для содержания мышей и крыс

Животные	Вес, г	Площадь на 1 животное, см <sup>2</sup>	Высота, см	Примечание
Мыши в группе	< 10	38,7	12,7	крупные особи требуют больше пространства
	до 15	51,6	12,7	
	до 25	77,4	12,7	
	> 25	≥ 96,7	12,7	
Самка мыши с новорожденными	-	330	12,7	зависит от числа зрелых самок и новорожденных, возраста потомства
Крысы в группе	< 100	109,6	17,8	крупные крысы требуют больше пространства
	до 200	148,35	17,8	
	до 300	187,05	17,8	
	до 400	258	17,8	
	до 500	387	17,8	
	> 500	≥ 451,5	17,8	
Самка крысы с новорожденными	-	800	17,8	зависит от числа зрелых самок и новорожденных, возраста потомства



*Температура и влажность.* Термонеutralная зона (ТНЗ) – это диапазон температуры окружающей среды, комфортный для животного.

Для поддержания определённой оптимальной температуры тела, животные приспосабливаются физиологически (посредством активации метаболизма) и поведенчески (путем изменения уровня активности). В ТНЗ животным не требуется активировать выработку метаболического тепла или испарения для охлаждения тела.

ТНЗ у мышей колеблется от 26 до 34°C, у крыс – от 26 до 30°C. Температура в комнате для содержания грызунов устанавливается диапазон от 20 до 26°C, чтобы избежать температурного стресса. Данная температура должна поддерживаться в помещении постоянно и суточные колебания температуры должны быть сведены к минимуму. Для защиты от холодового стресса животные должны быть обеспечены соответствующими материалами, такими как солома для гнезд, материал для укрытия.

В определённых условиях животным требуется более высокая температура окружающей среды, чем обычно, например, после операции, новорожденным, грызунам, лишенным шерстного покрова. В данном случае используют локальное повышение температуры в клетке с помощью грелок.

Относительную влажность также следует контролировать, но не так строго, как температуру. Для большинства видов млекопитающих приемлемый диапазон относительной влажности от 30 до 70%.

*Вентиляция.* Основная цель вентиляции – обеспечение надлежащего качества воздуха в виварии. Вентиляция обеспечивает снабжение кислородом; понижает температуру воздуха, постоянно нагреваемого животными, персоналом, освещением и оборудованием; разбавляет газообразные и твердые (пыль, аллергены, патогены) загрязнители; регулирует влажность воздуха в помещении. В макроокружающей среде (виварии) рекомендуется от 10 до 15

смен воздуха в час, что гарантирует достаточное качество воздуха в микроокружающей среде (клетке).

Для рециркуляции воздуха допускается использование НЕРА-фильтров, однако при условии, что рециркулируемый воздух смешивается как минимум с 50% свежего воздуха, то есть приточного воздуха. Рециркулированный воздух должен поступать только в ту комнату или зону, из которой он поступает. Совместно с рециркуляцией воздуха, частая смена подстила и мытье клеток минимизируют воздействие на животных токсичных газов и запахов.

*Освещение.* Основным документом, регламентирующим требования к освещенности, является СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Особенности лабораторных животных в отношении освещенности описываются нормативными документами и рассматриваются в научных публикациях. В российской нормативной базе приняты несколько стандартов, описывающих, в том числе организацию освещенности в клетках и помещениях содержания животных, а именно:

- ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»;
- ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»;
- ГОСТ 33217-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными хищными млекопитающими».

Из зарубежных руководств наиболее полно аспекты освещенности описаны в:

- Code of practice for the housing and care of laboratory mice, rats, guinea pigs and rabbits (2004);
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (2006);
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2010).

Биологический эффект освещения зависит от интенсивности, продолжительности, периодичности и спектрального состава.

Самыми чувствительными к свету процессами в организме млекопитающих являются: зрительная ориентация, фотопериодическая регуляция и метаболическая регуляция.

Зрительная ориентация характерна большинству дневных животных и выполняет роль источника сложной информации о внешних условиях. Ослабление интенсивности света индуцирует адаптивные перестройки органов зрения (у ночных форм, подземных и глубоководных организмов): редукцию глаз, развитие гипертрофированных глаз и др.

Под фотопериодическим контролем находятся практически все метаболические процессы, связанные с ростом, развитием, жизнедеятельностью и размножением животных.

Примерами метаболической регуляции являются метаболизм зрительных пигментов родопсина и йодопсина, усиление неспецифического иммунитета, изменение прироста массы тела, увеличение лактации, синтез витамина D и других соединений. Режим освещения является важным регулятором репродуктивного поведения и оказывает влияние на прирост массы тела и потребление корма.

Таким образом, освещенность играет чрезвычайно важную роль в доклинических исследованиях, поскольку ведущей задачей исследователя

является сохранение в эксперименте максимально стандартизованных животных.

Тип освещения должен обеспечивать адекватное видение и нейроэндокринную регуляцию суточных и циркадиальных циклов. Как правило, естественное освещение для лабораторных животных не подходит, во-первых, вследствие изменчивости длительности дня и интенсивности освещения в зависимости от географического расположения лаборатории, что неизбежно повлечет за собой отсутствие сходимости данных между разными лабораториями (нарушается принцип воспроизводимости); во-вторых, может наблюдаться отсутствие сходимости результатов экспериментов, выполненных в разные сезоны.

Для освещения помещений с животными более целесообразным представляется выбор люминесцентных или светодиодных ламп. Их выбор обоснован с точки зрения спектрального диапазона, безопасного для отдельных видов животных.

Рекомендуемый уровень освещенности составляет 325-400 лк (люкс) на высоте порядка 1 м над уровнем пола (Макарова и др., 2017). Этот диапазон не вызывает клинических признаков ретинопатотии у крыс при использовании средств обогащения среды (например, материала для туннелирования), позволяющих животным самостоятельно контролировать освещенность.

Интенсивность света уменьшается пропорционально квадрату расстояния от источника (закон обратных квадратов). Следовательно, высота расположения клетки на стеллаже влияет на интенсивность света в микропространстве клетки. Интенсивность света в прозрачных клетках наверху и внизу стойки может отличаться в 80 раз, даже внутри клетки интенсивность света может отличаться в 20 раз (Schlingmann *et al.*, 1993). Учитывая это, рекомендуется периодически менять местами клетки относительно источника света и предоставлять животным средства обогащения среды.

Обобщенные рекомендации по освещенности для отдельных видов животных представлены в табл. 6.

Таблица 6. Обобщенные рекомендации по освещенности для отдельных видов животных

Вид	Интенсивность освещения в световой период, лк	Примечания
Мыши	$E_{V \min} - 25-40$ ; $E_{V \max} - 325-400$ ; для отдельных видов/линий 130-270. Молодые нуждаются в более низкой $E_V$	Необходим четкий фотопериод, световой период не более 16 ч. Адаптация к фотопериоду 10-14 сут. Обязательны элементы обогащения среды
Крысы		
Хомяки		
Песчанки		
Морские свинки		
Кролики	$E_{V \max} - 350$	Световой период не менее 8 ч, не более 16 ч. Слабый уровень ночного освещения. Обязательны элементы обогащения среды
Хорьки	$E_{V \max} - 100$	
Карликовые свиньи	$E_{V \max} - 50-250$	Световой период не менее 8 ч. $E_V$ в период сна, отдыха, темного периода – 2,4-4,0 лк

$E_{V \min}$  – минимальная интенсивность освещения;  $E_{V \max}$  – максимальная интенсивность освещения

*Обогащение пространства.* Основная цель обогащения пространства заключается в повышении качества жизни животных путем предоставления им сенсорной и двигательной стимуляции с помощью материалов, которые

способствуют выражению типичного для них поведения. Обогащение окружающей среды материалом для гнездования или туннелирования способствуют психологическому благополучию благодаря задействованию физических упражнений и когнитивных функций. Дополнительные объекты и материалы позволяют крысам/мышам прятаться, а также избегать переохлаждения или излишнего света.

*Подстил.* Подстил используется для поглощения влаги, минимизации роста микроорганизмов, ограничения контакта животных с экскрементами (Smith *et al.*, 2004). Подстил следует использовать в количествах, достаточных для того, чтобы животные оставались сухими между чистками клеток.

Подстил может быть загрязнен токсинами, бактериями, грибами и паразитами. Для стерилизации подстила используют автоклавирование, что, однако приводит к существенному снижению впитывающей способности. Поэтому после стерилизации подстил либо подвергают сушке, либо используют альтернативную стерилизацию гамма-облучением.

Качество подстила определяется также его материалом. Например, кедровые опилки в качестве подстила не рекомендуется использовать, так как они выделяют ароматические углеводороды, оказывающие влияние на состояние печени и являющиеся канцерогенными (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

### **Корм и режим кормления**

*Корм.* Для сохранения здоровья экспериментальных животных и получения воспроизводимых, достоверных результатов доклинических исследований повышенное внимание необходимо уделять питанию животных. В пищевом рационе лабораторных животных обычно используются два вида корма:

- 1) на основе натуральных ингредиентов;
- 2) на основе очищенных ингредиентов.

*Корм на основе натуральных ингредиентов.* В состав такого корма часто входят кукурузный глютен, пшеница, сало/жир, кукурузное масло и соевый шрот. Форма – гранулированная. Натуральный корм намного дешевле корма с очищенными ингредиентами. Однако в зависимости от происхождения натуральных ингредиентов, используемых в рационе питания (состав почвы, использование пестицидов), и погодных условий, которым они подвергались, состав корма с натуральными ингредиентами заметно варьирует, что может быть причиной расхождения в экспериментальных результатах. Также существуют различия в составе корма разных производителей (вариация между брендами) и между партиями одной и той же фирмы (вариация между партиями) (Beunen *et al.*, 2001). В доклинических исследованиях, проводимых в соответствии со стандартами GLP (от англ. *good laboratory practice* – надлежащая лабораторная практика), используют исключительно коммерчески доступные, сертифицированные корма (проверенные на наличие загрязняющих веществ).

*Корм на основе очищенных ингредиентов* представляет собой комбинацию очищенных ингредиентов в нормированной концентрации. Данный корм стандартизирован и может быть воспроизведен в любой лаборатории. Так, в частности, требования по содержанию белка выполняют за счет внесения молочного белка казеина с добавлением метионина; углеводы вносят в виде кукурузного крахмала и сахарозы; кукурузное масло обеспечивает потребность в жирах, а целлюлоза является источником пищевых волокон; витамины и минеральные компоненты добавляют в определенных пропорциях с учетом физиологических норм (Лещенко и др., 2015). Использование стандартизированного корма на основе очищенных ингредиентов приводит к более воспроизводимым результатам внутри и между институтами и/или лабораториями (Ritskes-Hoitinga *et al.*, 2003).

Одним из существенных недостатков корма на основе очищенных ингредиентов является то, что его не рекомендуют гранулировать. Кормление

грызунов пищей в виде порошка не позволяет стачивать постоянно растущие резцы. В связи с этим, при использовании данного корма требуется регулярное укорочение резцов и/или ввести элементы обогащения среды посредством внесения деревянных брусков/палочек для стачивания зубов.

Другим недостатком использования очищенных ингредиентов является дефицит неизвестных ингредиентов, что в долгосрочной перспективе может приводить к развитию дегенеративных процессов и снижению репродуктивности особей (Ritskes-Hoitinga *et al.*, 2003).

Исследователь должен учитывать дату производства и условия хранения корма, непосредственно влияющие на качество продукта, так как в просроченных или хранящихся ненадлежащим образом кормах возникает недостаток питательных веществ.

Общими для хранения требованиями являются: чистота помещения и защита от проникновения вредителей; хранение открытой индивидуальной тары (пакетов/мешков) в защищенных от паразитов контейнерах с целью минимизации риска заражения возбудителями болезней.

*Питье.* Животные должны иметь доступ к питьевой незагрязненной воде. Для обеспечения приемлемого качества воды рекомендовано проводить периодический мониторинг pH, жесткости, микробного и химического загрязнения, в случае использования иммунодефицитных мышей – регламентирована стерилизация.

### **Санитарные требования к условиям содержания животных**

Регулярная уборка и чистка необходима для поддержания благоприятных для здоровья животных и персонала условий и включает смену подстила, мытье клеток и принадлежностей, уборку и дезинфекцию вивария.

Смена подстила и санитарная уборка удаляет чрезмерное количество грязи и мусора, дезинфекция устраняет потенциально патогенные микроорганизмы.



Клетки, решетки и приспособления (кормушки, поилки, бутылки) следует мыть и дезинфицировать не реже одного раза в неделю, клеточные стеллажи – не реже одного раза в 2 недели.

Мытье предполагает использование моющих средств, горячей воды и, при необходимости, антисептиков. Для приспособлений небольшого размера допускается чистка с помощью ультразвука.

Помещения, используемые для содержания животных, и вспомогательные помещения (например, складские помещения, помещения для мытья клеток, коридоры и процедурные помещения), должны быть убраны и продезинфицированы. Частота уборки зависит от частоты эксплуатации помещения и характере вероятного загрязнения. Для стерилизации помещения (стеновых и потолочных перекрытий) и предметов проводят распыление перекиси водорода или диоксида хлора, особенно в случае заражения животного инфекционными агентами (Krause *et al.*, 2001).

### **Мониторинг состояния здоровья животных**

Животных следует ежедневно проверять на наличие признаков болезни, травмы или боли. Более частые проверки необходимы в период послеоперационного восстановления или в ходе эксперимента.

Во время ежедневного мониторинга, ветеринары или квалифицированный научный персонал используют критерии для оценки состояния здоровья и благополучия лабораторных животных:

- внешний вид;
- динамика массы тела;
- поведенческие реакции.

Наиболее информативные индикаторы ухудшения здоровья животного:

- снижение реакции на внешние раздражители;
- тусклая взъерошенная шерсть;
- выделения из носа или глаз;

- подавленный аппетит с сопутствующим обезвоживанием и потерей веса;
- сгорбленная поза.

С целью стандартизации оценки состояния здоровья и уменьшения доли субъективности исследователя была разработана шкала оценки состояния тела животного (от англ. BCS – body condition score). Оценка состояния тела грызунов – это неинвазивный метод оценки здоровья, выполняющийся путем осмотра и пальпации тела животного по костным выступам крестцово-подвздошной области. Показатель состояния тела (BCS) варьирует от 1 (исхудание) до 5 (ожирение). Если в ходе эксперимента ожидается достижение значения BCS равное 2 или ниже, требуется обоснование научной значимости эксперимента и предложение методов устранения боли и страдания животных в протоколе, который представляется на рассмотрение ЛЭК.

Описание результата осмотра и сопоставление с баллами BCS представлено на рис 6.

В случае выявления летальных исходов следует незамедлительно провести экспертизу по выявлению причины смерти животных, осмотреть животных с признаками болезней, изолировать больных животных от здоровых. Признаки болезни, дистресса или других отклонений от нормы следует незамедлительно фиксировать и при необходимости провести клинические анализы для обеспечения оказания надлежащей своевременной ветеринарной помощи (Convenor *et al.*, 2014).

Большинство инфекций не вызывают явных клинических признаков, однако оказывают решающее влияние на результаты экспериментов на животных. Некоторые инфекционные агенты, выявляемые у лабораторных животных, способны инфицировать человека (зоонозы).





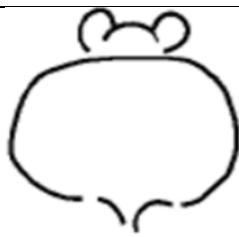
BC 1		<p>Животное истощено:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ скелет прощупывается;</li> <li>➤ минимальная прослойка мышечной ткани;</li> <li>➤ жировая прослойка отсутствует;</li> <li>➤ позвонки отчетливо видны.</li> </ul>
BC 2		<p>Животное недокормлено:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ видна сегментация позвоночника;</li> <li>➤ тазовые кости легко прощупываются.</li> </ul>
BC 3		<p>Животное в хорошем состоянии:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ позвонки и тазовые кости не выдаются;</li> <li>➤ кости прощупываются при пальпации</li> </ul>
BC 4		<p>Животное перекормлено:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ позвоночник выглядит сплошным столбом;</li> <li>➤ позвонки прощупываются при значительном нажатии</li> </ul>
BC 5		<p>Животного с ожирением:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ выглядит круглым и размером больше среднего;</li> <li>➤ позвоночник и кости не различимы;</li> <li>➤ кости не прощупываются под слоем мышечной ткани и жировой прослойки</li> </ul>

Рисунок 6. Схематичное изображение грызуна и соответствующие оценки состояния тела (BC – body-condition) (адаптировано из: Ullman-Culleré *et al.*, 1999).

Факторы, увеличивающие риск заражения животных бактериями и вирусами:

- 1) высокая плотность размещения животных;
- 2) недостаточное по объему или неполноценное по составу кормление;
- 3) поступление новых партий животных;
- 4) расположение комнаты для содержания животных в непосредственной близости от «грязных» помещений (комнаты с верхней одеждой, помещения для складирования мусора);
- 5) поступление животных из разных питомников;
- 6) перемещение животных в другую комнату/здание (для манипуляций) с последующим возвратом в виварий;
- 7) проникновение насекомых или диких животных в помещение вивария или помещения для хранения подстила и корма;
- 8) превышение числа исследователей, имеющих доступ в виварий для проведения манипуляций (помимо работника вивария);
- 9) смена работников вивария;
- 10) наличие в помещении вивария оборудования, которое не может быть эффективно стерилизовано (например, микроскопа) (Convenor *et al.*, 2014).

## ОСНОВНЫЕ БОЛЕЗНИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС И МЫШЕЙ

Достижение современного уровня биомедицинских исследований возможно при строгой унификации всех факторов, воздействующих на организм лабораторных животных, путем стандартизации как условий содержания, так и самих животных. Введение в мировую практику стандартов GLP для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ предъявило еще более жесткие требования к проблеме стандартизации животных, состоянию их здоровья.

В соответствии с международным опытом стандартность лабораторных животных обеспечивается, с одной стороны, современной технологией их разведения и содержания в барьерной системе, с другой – едиными критериями оценки состояния здоровья. Основой этих критериев является принцип недопустимости носительства ряда патогенных и условно-патогенных агентов инфекционной и инвазионной природы: вирусов, бактерий, паразитов, или, другими словами, стандартизация животных основана на исключении возможности возникновения инфекционной и инвазионной патологии.

В последние годы отмечается явная тенденция к унификации критериев качества животных и создания единых стандартов. Примером могут служить разработки группы исследователей европейских стран GV-SOLAS, FELASA.

Классификация лабораторных животных в зависимости от микробиологического статуса:

- безмикробные (не содержат микрофлоры);
- гнотобиоты (состав микрофлоры известен);
- гнотиферы (не содержат определенных микроорганизмов; SPF-животные);
- конвенциональные (состав микрофлоры неизвестен).

*Конвенциональные* – это обычные животные, содержащиеся в открытых вивариях, которые обладают естественной микрофлорой, а также врожденным и приобретенным иммунитетом. Животных данной группы используют в рутинных исследованиях и кратковременных экспериментах.

*SPF-животные* (от англ. specific pathogen free) – это животные, свободные от специфицированного международными ветеринарными ассоциациями спектра патогенов. У SPF-животных практически отсутствует приобретенный иммунитет, что детерминирует специфические условия их содержания (виварий с санпропускником, фильтрация воздуха, ограничение доступа, технологическое зонирование). Согласно требованиям FDA, SPF-животные являются основным типом экспериментальных животных, используемых в доклинических *in vivo* исследованиях для оценки безопасности лекарственных средств. Животных данной группы используют в получении культур клеток для производства вакцин GMP.

*Гнотобиотические животные* – это безмикробные животные, которые обладают исключительно врожденным иммунитетом (с рождения содержатся в изоляторах). Животных данной группы используют в испытаниях новых лекарственных средств и поддержании перевиваемых опухолей.

Для своевременной реакции и предотвращения распространения заболевания исследователю необходимо знать причины развития и симптоматику наиболее распространенных болезней лабораторных животных.

В подавляющем большинстве случаев возбудитель инфекции попадает в организм животного из окружающей среды и вызывает инфекционную болезнь, которую определяют как экзогенную инфекцию. Носительство здоровыми животными факультативных микробов-паразитов (или микробов-комменсалов, относящихся к условно патогенной микрофлоре) при ослаблении защитных свойств организма нередко приводит к их вирулентности и более тяжелому протеканию инфекционной болезни. Это явление называют эндогенной

инфекцией, или аутоинфекцией (сальмонеллез, пастереллез, колибактериоз др.). Если не удастся установить путь проникновения микроба в организм, инфекцию называют криптогенной.

### **Вирусные инфекции**

**Инфекционный ринит.** Возбудитель – вирус парагриппа 2 из рода *Paramyxovirus* семейства *Paramyxoviridae*.

**Характеристика.** Вирион сложноорганизованный, 80-120 нм; геном – РНК одонитевой фрагментированной; спиральный тип симметрии. Заражение происходит аэрогенным путем. Заболевание характеризуется беспокойством, серозным, в дальнейшем слизисто-катаральным истечением, иногда носовые отверстия закупориваются засохшими корочками экссудата, слизистая носовых путей покрасневшая и припухшая. Возникновению и распространению болезни предрасполагают сквозняки, резкие колебания температуры, сырость, повышенное содержание пыли и аммиака в вивариях.

**Устойчивость** к физико-химическим воздействиям: при температуре 65°C погибает через 5-10 мин, прямой солнечный свет инактивирует вирус за 40 ч. Вирус стабилен при pH 7,0-8,0, неблагоприятна кислая среда. Дезинфицирующие вещества: раствор 0,1% йода; 3% хлорная известь; 2% КОН; эфир, детергенты.

**Инфекционный стоматит** («мокрая мордочка»). Заболевание характеризуется воспалением слизистой оболочки рта. Возникновению и распространению способствуют антисанитарные условия, перепады температуры, повышенная влажность, скученное содержание.

**Миксоматоз.** Заболевание характеризуется серозно-гнойным конъюнктивитом и образованием опухолей в области головы, ануса и наружных половых органов кроликов. Основные переносчики болезни – насекомые (комары, москиты), эктопаразиты (вши, блохи, клещи), а также птицы,

животные, человек. Возникновению и распространению способствуют инфицированность кормов, подстила, ослабленность организма животного.

### **Бактериальные болезни**

**Пастереллез** (от лат., англ. *Pasteurellosis*; геморрагическая септицемия) – контагиозная зоонозная инфекционная болезнь. При остром течении характеризуется септическими явлениями, отеками в различных областях тела, плевритом, крупозным воспалением легких, при подостром и хроническом течении – гнойно-некротизирующей пневмонией, поражением суставов, глаз, молочной железы и геморрагическим энтеритом.

**Этиология.** Возбудитель пастереллеза – *Pasteurella multocida* – представляет собой полиморфные, чаще короткие грамотрицательные, неподвижные эллипсовидные палочки.

**Морфология.** *P. multocida* в мазках, отпечатках органов и крови, окрашенных метиленовой синью, имеют вид биполярно окрашенных бактерий. В препаратах из культур пастереллы имеют вид овоидных палочек размером длиной  $0,3-0,4 \times 0,4-1,2$  мкм, располагаются одиночно, реже в виде коротких цепочек, неподвижные, спор не образуют.

**Культуральные свойства.** *P. multocida* – факультативный анаэроб. Оптимум температуры 37-38°C, pH среды 7,2–7,4. На МПА образуют мелкие, круглые S-формы прозрачные колонии. В жидком МПБ – слабое равномерное помутнение среды и образование на дне пробирки осадка, поднимающегося при встряхивании в виде слизистой косички.

**Источником инфекции** являются в основном больные животные, загрязненные корма и подстил. Распространителем болезни могут быть и люди (через одежду, обувь), птицы и грызуны.

**Диагностика.** Диагноз устанавливают на основании комплекса эпизоотологических, клинических, патологических и лабораторных исследований. Для выделения возбудителя и подтверждения диагноза



используют свежий патологический материал. В качестве исследуемого материала от больных животных отбирают из поверхностных сосудов кровь и носовую слизь, а после падежа – кровь из сердца, лимфатические узлы (брыжеечные, заглочные, средостенные и др.), фрагменты легких, печени, селезенки, сердца, почки, трубчатой кости.

Для первичного выделения и культивирования применяют обогащенные питательные среды, в том числе МПА с 5-10% крови барана или сывороточный МПБ. Посевы из внутренних органов инкубируют в термостате при 37°C в течение 24-48 ч. Из патологического материала готовят мазки и окрашивают по Грамму, Романовскому-Гимза или метиленовой синью по Леффлеру.

*Лечение.* Больным животным вводят гипериммунную сыворотку против пастереллеза в лечебной дозе и антибиотик (Госманов и др., 2017).

**Сальмонеллез.** Возбудитель – штаммы из рода *Salmonella* семейства *Enterobacteriaceae*. Заболевание характеризуется при остром течении лихорадкой, явлениями септицемии, токсикоза и поражением кишечника, а при хроническом – воспалением легких. Источником заражения служат больные животные, загрязненные корма, инвентарь, вода, подстил. Возникновению и распространению способствуют нарушение условий содержания, ухода, кормления, антисанитарное состояние помещений.

*Лабораторная диагностика.* Лабораторная диагностика сальмонеллеза заключается в обнаружении возбудителя в исследуемом материале методами световой и люминесцентной микроскопии; выделении чистой культуры; идентификации возбудителя по морфологическим, культуральным, ферментативным, серологическим и патогенным свойствам.

Материалом для исследования служат паренхиматозные органы, сердце, трубчатая кость, абортированный эмбрион/плод, трупы животных. В первые дни болезни для прижизненной диагностики исследуют фекалии больных животных, для получения гемокультуры – кровь.

Микроскопическое исследование: из материала готовят мазки, отпечатки, окрашивают по Грамму и изучают микроскопически морфологические свойства сальмонелл. Полученный материал также засевают в МПБ, на МПА, дифференциальные и элективные среды – Эндо, Плоскирева или висмут-сульфитный агар. При подозрении на хроническое течение болезни дополнительно высевает материал на одну из сред накопления (селенитовую, Мюллера).

*Морфология.* Палочки с закругленными концами размером 0,5-0,8×2,0-4,0 мкм; в мазках располагаются одиночно, беспорядочно; подвижны; спор и капсул не образуют; по Грамму окрашиваются отрицательно (Госманов и др., 2017).

**Стафилококкоз** – возбудитель старифилококк (гноеродный), является возбудителем гнойных воспалительных процессов (фурункулов, карбункулов, абсцессов, флегмон, панариций, пневмонии, остеомиелита, сепсиса), может вызывать пищевую интоксикацию. Заболевание характеризуется появлением дерматитов, конъюнктивитов, отитов, абсцессов. Основным источником распространения – больные животные. Возникновению и распространению способствуют антисанитарные условия содержания, скученность, травмы, покусы, минеральная недостаточность. По характеру проявления признаков различают септикопиемию (пиодермия), блуждающую пиемию, мастит и общую септицемию.

Одним из первичных симптомов стафилококковой инфекции является бактериальный фолликулит, при котором наблюдается формирование дермальных пустул. Для оперативной диагностики и подтверждения инфицирования используют методы экспресс-окрашивания. Для окрашивания мазков крови и биопрепаратов можно использовать набор реагентов «Лейкодиф 200» (Erba Lachema, Чехия) или набор реагентов «Диахим-Дифф-Квик» («НПФ АБРИС+», Россия). В состав наборов входят фиксаторы и дифференциальные красители. Для приготовления препарата необходимо сделать соскоб

содержимого пустулы на очищенное обезжиренное предметное стекло и окрасить согласно протоколу производителя. Типичными признаками бактериального инфицирования являются выявляемые при анализе препаратов методом светопольной микроскопии грамположительно окрашенные кокки и выраженный фагоцитоз бактериальных клеток макрофагами и нейтрофилами (рис. 7).

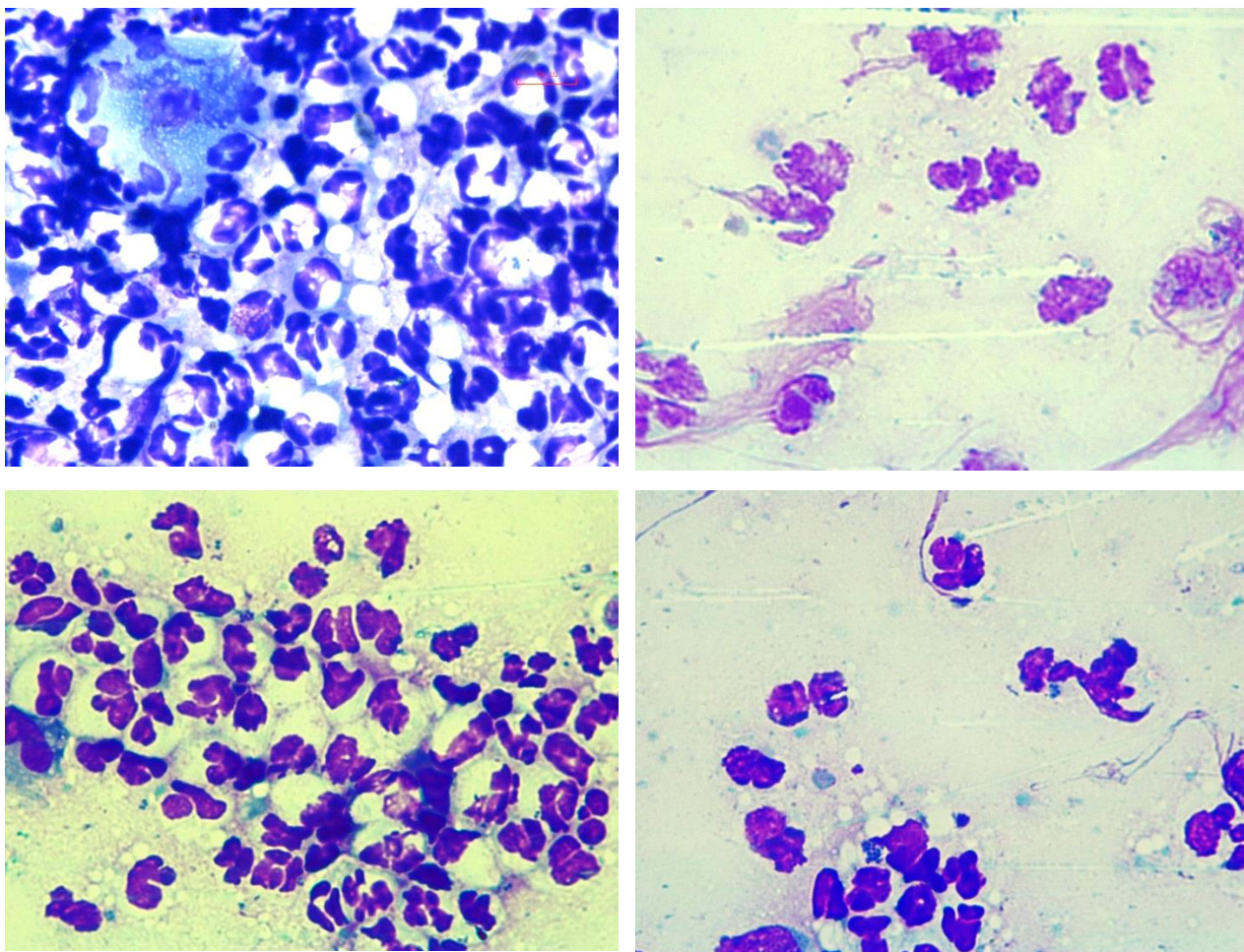


Рисунок 7. Микрофотографии препаратов содержимого дермальных пустул при стафилококковой инфекции. Окраска: «Лейкодиф 200». Микроскоп: AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). Ув.  $\times 900$ .

*Микроскопическое исследование:* из исследуемого материала готовят препараты, окрашивают метиленовой синью, по Грамму, микроскопируют и изучают морфологические свойства. В положительном случае обнаруживают

грамположительные кокки диаметром 0,5-1,0 мкм, не образуют спор и капсул, располагаются единично, парами, в виде скоплений неправильной формы и гроздьев винограда.

*Выделение чистой культуры и идентификация.* Стафилококки относятся к факультативным анаэробам. Хорошо растут на обычных питательных средах при температуре 35-40°C, оптимум pH 7,2-7,4. На МПА образуют мелкие колонии S-формы различной пигментации: белые, чаще желтые. Рост на МПБ сопровождается обильным помутнением и образованием рыхлого осадка.

**Колибактериоз.** Возбудитель – *Escherichia coli* (кишечная палочка) – является комменсалом в естественной среде обитания. Вспышки пищевых токсикоинфекций, как правила, вызваны энтеропатогенными серотипами *E. coli*, обладающими соматическим О-антигеном. Заболевание характеризуется профузным поносом, энтеритами, энтеротоксемией, сепсисом (бактериемией). Источник – больные животные. Возникновению болезни сопутствуют ослабление иммунитета животных вследствие кормления некачественными кормами, водой, инвазия (кокцидиоз), гельминтозы и др. факторы.

*Морфология.* *E. coli* – полиморфные палочки с закругленными концами размером 0,3-0,6×1,0-3,0 мкм. Располагаются одиночно, по Грамму окрашиваются отрицательно, спор не образуют, подвижные (перитрихи), встречаются неподвижные.

*Культуральные свойства.* *E. coli* аэроб или факультативный анаэроб, оптимальная температура роста — 37-38°C, pH среды 7,0-7,4. Хорошо растет на обычных питательных средах: на МПА через 24 ч появляются сочные, круглые, с ровными краями серо-белые колонии; на МПБ появляется интенсивное помутнение среды и рыхлый осадок, легко разбивающийся при встряхивании (Госманов и др., 2017).

*Лабораторная диагностика.* Для бактериологического исследования используют свежий трупный материал, паренхиматозные органы, трубчатую

кость и т.д. Бактериологический диагноз на колибактериоз считают установленным при выделении культуры *E. coli* не менее чем из двух органов больного животного, патогенной для белых мышей.

**Пневмококкоз.** Возбудители – пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) – являются причиной крупозной пневмонии, ползучей язвы роговицы, различных сепсисов, ринитов, менингитов, отитов и других гнойно-воспалительных процессов как лабораторных, так и других видов животных и человека.

**Туберкулез.** Возбудитель – микобактерии (*Mycobacterium murium*). Заболевание характеризуется образованием в различных органах и тканях мелких специфических бессосудистых узелков (туберкул), приобретающих творожистый вид. Животные заражаются воздушно-капельным путем и через желудочно-кишечный тракт. Источник – больные животные, загрязненные корма и подстил.

**Морфология.** *M. murium* – прямые или слегка изогнутые, неподвижные, грамположительные палочки; спор и капсул не образуют. Размеры клеток могут значительно варьировать в зависимости от вида и возраста культуры, в среднем 0,2-0,5×1,5-5,0 мкм. В препаратах из патологического материала характерно расположение клеток в виде небольших скоплений. Микобактерии характеризуются высоким содержанием липидов, вследствие чего трудно окрашиваются анилиновыми красителями, но хорошо воспринимают краситель после обработки концентрированного карболового фуксина при подогревании (метод окраски кислотоустойчивых микобактерий по Цилю-Нильсену) (Госманов и др., 2017).

Для экспресс-обнаружения микобактерий используют люминесцентный метод, в основе которого лежит способность клеток окрашиваться люминесцентными красителями с желто-зеленым свечением под воздействием УФ, что позволяет обнаружить микобактерии при небольшом титре.

**Культивирование.** Микобактерии туберкулеза относятся к строгим аэробам. На элективных питательных средах растут медленно. Оптимальная температура 37-40°C.

**Листериоз.** Возбудитель – *Listeria monocytogenes*. Наиболее чувствительны к данному заболеванию белые мыши и кролики. Заболевание характеризуется поражением нервной системы, септическими явлениями, абортами и маститами. Источником заражения служат больные животные – передача через носовые истечения, мочу, кал, загрязненные корма, подстил, воду и инвентарь.

**Морфология.** *L. monocytogenes* – полиморфная палочка с закругленными концами 0,3-0,5×0,5-3,0 мкм; подвижная, грамположительная. В мазках палочки располагаются поодиночно или под углом в виде римской цифры V. Спор и капсул не образуют.

**Культивирование.** Факультативные аэробы. Оптимум роста на питательных средах с pH 7,2-7,4 составляет 36-38°C; способны к росту при температуре в диапазоне от 4 до 45°C. На МПА образуют мелкие росинчатые колонии. В МПБ вызывают незначительное помутнение среды с образованием слизистого осадка. Листерии хорошо растут на печеночных средах с добавлением 1% глюкозы и 2-3% глицерина. В качестве элективных сред используют МПБ с 0,05% теллурита калия или 0,01-0,02% теллурита калия в водном растворе глицерина и в растворе полимиксина. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона гемолиза (Госманов и др., 2017).

При микробиологической диагностике бактериальных инфекций используются бактериоскопические, бактериологические, серологические, биологические (биопроба) и другие методы исследования.

## **Микозы**

Заболевания, вызываемые грибами, называются микозами.

**Микроспороз (стригуций лишай).** Возбудитель – грибы из рода *Microsporum*, проникающий в волосяные фолликулы, в волос и поверхностные

слои кожи. Мицелий грибов прямой, разветвленный, септированный. По мере развития гриба распадается, образуя округлые, резко преломляющие свет споры 3-4 мкм в диаметре. На поверхности и внутри волоса споры располагаются беспорядочно в виде мозаики. Заболевание характеризуется повреждением кожных покровов, образованием безволосых ограниченных участков, расчёсами, зудом. Источник заражения – больные животные и зараженные предметы (клетки, корма, подстил, инвентарь). Возникновению и распространению способствуют антисанитарные условия содержания, корма низкого качества, скученное содержание, сырость.

*Диагностика.* С целью выявления грибов рода *Microsporum* используют люминесцентный метод: исследуемый материал рассматривают под УФ-лампой на расстоянии 20 см в затемненной комнате. Пораженные возбудителем микроспороза волосы дают яркое зеленоватое свечение.

*Устойчивость.* В пораженных волосах, кожных соскобах способны сохраняться до 2-5 лет. В сухожаровых камерах при 140°C погибает за 30 мин, при 80°C – за 2 ч, при кипячении – за 2-3 мин; под действием 3% раствора формальдегида и 5-8% раствор гидроксида натрия – в течение 20-30 мин. Спецодежду обеззараживают кипячением в 2% мыльно-содовом растворе в течение 15 мин или замачивают в 5% растворе хлорамина (3 ч), 5% растворе лизола (20 мин) (Колычев, Госманов, 2014).

*Аспергиллез (пневмомикоз).* Возбудители – плесневые грибы из рода *Aspergillus* (в основном *A. fumigatus*), характеризующиеся высокой устойчивостью к факторам внешней среды. Микромицеты данного рода относятся к микотоксинообразующим, способны вызывать тяжелые микотоксикозы. Заболевание характеризуется поражением органов дыхания и серозных оболочек. Источники – инфицированные корма, подстил, инвентарь. Заражение происходит вместе с зараженной пылью через дыхательные пути.

*Морфология.* В неокрашенных препаратах, приготовленных из гноя, некротических очагов, экссудата, под покровным стеклом обнаруживают бесцветные, септированные гифы мицелия с характерным спороношением, конидиеносцы, стеригмы, цепочки конидий. Микроскопировать можно препараты, окрашенные лакто-фуксином или метиленовой синью. В первом случае фон красный, а гифы мицелия синие, во втором – фон не окрашивается, гифы гриба голубые.

*Культивирование.* Для культивирования применяют среду Чапека и Сабуро. Температурный оптимум 20-25°C, pH среды 5,0-6,5. На среде Сабуро *A. fumigatus* образует белые пушистые колонии, приобретающие впоследствии зеленую или желтую окраску; на агаре Чапека – гладкие или звездчатые зеленые колонии (Колычев, Госманов, 2014).

### **Паразитарные болезни**

**Кокцидиоз** – протозоозное инвазионное заболевание, возбудитель – одноклеточные простейшие класса кокцидий (*Coccidia*). Заболевание характеризуется нарушением функций кишечника при не резко выраженных признаках интоксикации. Источниками кокцидий могут быть больные и скрытые носители. Болезнь передается через зараженные корма, воду, почву, подстил, инвентарь. Распространению болезни способствуют антисанитарные условия содержания, сырость, скученность, плохое кормление, резкая смена кормов.

**Пассалуроз.** Возбудитель – нематода (круглые черви), паразитирующая в толстом отделе кишечника. Заболевание характеризуется сильным зудом прямой кишки, лихорадкой, поносом, истощением. Источник заражения – загрязненные калом корма и питьевая вода. Распространению болезни способствует антисанитарные условия содержания лабораторных животных.

**Цистицеркоз.** Возбудители – личинки цестоды (ленточные черви). Заболевание характеризуется поражением кожи, подкожной клетчатки, мышц, головного и спинного мозга, глаз, реже внутренних органов и костей. Основной



источник заражения – собаки, которые выделяют вместе с калом яйца паразита и загрязняют корма и воду.

**Зудневая чесотка.** Болезнь вызывают чесоточные клещи. Клещи, внедряясь в кожу животных, вызывают воспалительный процесс и продвигаясь в коже вызывают сильный зуд, что приводит к сильным беспокойствам, потери аппетита, животное может погибнуть. Источник заражения – больные животные, инвентарь. Диагноз ставится по результатам микроскопических исследований соскобов кожи.

**Ушная чесотка.** Возбудитель – накожный клещ. Заболевание характеризуется зудом и появлением экземы в области ушной раковины. При осложнениях воспалительный процесс поражает барабанную перепонку, затем среднее, в последующем – внутреннее ухо. При поражении мозговых оболочек, появляются нервные припадки, травмы и животные погибают. Источник – больные животные, инвентарь, спецодежда обслуживающего персонала. Распространению болезни способствуют отсутствие дезинфекции, скученное содержание, повышенная влажность, плохое кормление и уход.

### **Профилактика инфицирования**

Пути заражения:

- *алиментарный* – через пищеварительный тракт;
- *аэрогенный* – через органы дыхания;
- *трансмиссивный* – через укусы насекомых;
- *конъюнктивальный* – через слизистые оболочки глаз.

Для предотвращения заражения инфекционными болезнями обслуживающий животных персонал должен использовать средства личной профилактики: халаты, нарукавники, фартуки, резиновые перчатки, маски, защитные очки, колпаки, косынки, противогазы, резиновые сапоги и др. По окончании работы спецодежда и обувь должна быть подвержена санитарной обработке. Хранение спецодежды осуществляется в специальных

индивидуальных шкафах. Выход из помещения с животными в спецодежде и спецобуви категорически запрещен.

Резко возрастает риск заражения инфекционными болезнями, общими для животных и человека (зооантропонозами), у лиц, постоянно контактирующих с животными и в случаях пренебрежения правилами работы с инфекционно-больными животными или патологическим материалом.

Профилактика заболеваний лабораторных животных включает жесткий контроль и строгое соблюдение всех санитарно-гигиенических правил, максимальное обеззараживание окружающей среды (помещений, воздуха, оборудования, кормов, подстила), создание оптимальных условий содержания животных, соответствующих их природно-физиологическим и экологическим особенностям, проведение карантинных мероприятий при перемещении животных в специальное помещение – изолятор, а также своевременную изоляцию больных животных и их уничтожение.

### **Незаразные болезни**

***Желудочно-кишечные заболевания.*** К этой группе болезней относятся тимпания (вздутие живота), метеоризм (вздутие кишечника), катары (катаральные воспаления слизистых оболочек желудка и кишечника).

***Пододерматит*** – заболевание характеризуется выпадением волос нижней поверхности лап, в большей степени задних конечностей, образуются сухие корочки, переходящие в мозоли («намины»), которые трескаются (под массой) и появляются язвы. При загрязнении последних стафилококками развиваются гнойные язвы и сепсис. В результате стафилококковой септицемии может наступить смерть животного.

***Болезни органов дыхания*** – воспаление слизистой носовой полости (ринит), бронхит, катаральное воспаление легких и плевры. Распространению болезни способствуют сквозняки, холодная сырая погода, неутепленность вивариев и питомников, резкие температурные колебания.

**Солнечный и тепловой удары.** Солнечный удар возникает при длительном воздействии прямых солнечных лучей в летние жаркие дни, а тепловой удар происходит из-за перегрева организма животных в жаркие дни при скученном содержании с повышенной влажностью в душных, плохо вентилируемых помещениях; при длительных транспортировках с отсутствием вентиляции.

**Обморожение** – под действием низкой температуры сужаются периферийные сосуды ушных раковин и конечностей, нарушается терморегуляция, что приводит к обморожению отдельных участков тела, а при длительном воздействии может привести к гибели из-за полного обморожения организма животных.

**Конъюнктивит** (воспаление слизистой оболочки век), заболевание, появляющееся из-за засорения глаз пылью, опилками, травмы, ушиба, а также связанное с недостатком в рационе витамина А. Конъюнктивит обычно протекает в двух формах – легкой, или катаральной (слизистой), и осложненной, или гнойной. Последняя приводит к изъязвлениям роговицы глаз, образованию бельма и кератитам.

**Рахит** возникает вследствие недостатка в кормах витамина Д, солей кальция и фосфора или нарушения фосфорно-кальциевого обмена организма. При этой болезни наблюдается искривление костей.

## **ОСНОВЫ РАСПОЗНАВАНИЯ И ОБЛЕГЧЕНИЯ БОЛИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Понятие «боль» определяется Международной ассоциацией по изучению боли (IASP, основана в 1973 году; Вашингтон) как «неприятное сенсорное и эмоциональное переживание, связанное с действительным или потенциальным повреждением тканей или описанное в терминах такого повреждения».

Исключительно животное, испытывающее ту или иную боль, способно оценить качество и интенсивность боли и, как следствие, степень страдания. Исследователь способен лишь предполагать, произошло ли эмоциональное переживание боли, испытываемое животным. Таким образом, это определение не адаптировано по отношению к животным и, как правило, исключается из определений боли. Более емкое определение понятия «боль» предложено американским ученым Марком Циммерманом: «неприятный сенсорный опыт, вызванный действительным или потенциальным повреждением, который вызывает защитные моторные и вегетативные реакции, приводит к избеганию и может изменять видоспецифичное поведение, включая социальное поведение».

Животные не обладают возможностями (языком), позволяющими передать человеку информацию об испытываемой боли. В сложившейся ситуации исключительно наблюдение исследователя за поведением животного способно предоставить разумное представление о степени боли, что повышает перечень требований, предъявляемых к исследователю.

По данным Комитета Национального исследовательского совета США по распознаванию и облегчению боли у лабораторных животных, боль испытывают многие виды животных.

## **Признаки боли, классификация степени тяжести боли**

Грызуны относятся к достаточно активным животным: в нормальном состоянии при отсутствии боли они передвигаются по клетке, ухаживают за собой (груминг), строят гнезда, потребляют пищу и воду, взаимодействуют друг с другом. У животного, испытывающего боль или стресс, происходит изменение поведения. Признаки боли у мышей и крыс: атаксия, изменение нормального группового поведения, снижение активности, поедание подстила, новорожденных, чрезмерное вылизывание, сгорбленная поза, потеря аппетита, пилоэрекция, нарушение или отсутствие груминга, необычно послушное или агрессивное поведение, вокализация.

Мыши и крысы склонны маскировать признаки боли, так как слабые животные в природе могут быть подвергнуты нападению хищника. Поэтому поведенческие признаки боли не всегда очевидны и для их оценки исследователю требуется время и практика.

Мыши и крысы, как и все животные, выражают эмоции, включая боль, с помощью мимики. Признаками боли в данном случае является прищуривание глаз, напряжение кожи вокруг носа и рта, а также прижимание ушей (рис. 8).

Знание степени боли, которую вызывает процедура на животном, необходимо для гуманного планирования, достижения максимальной значимости и правильного выбора конечной точки исследования с целью минимизации боли и страдания животного.

На основе накопленных практических данных процедуры на животных были подразделены на:

- процедуры, вызывающие минимальную боль;
- процедуры, вызывающие среднюю боль;
- процедуры, вызывающие сильную боль.

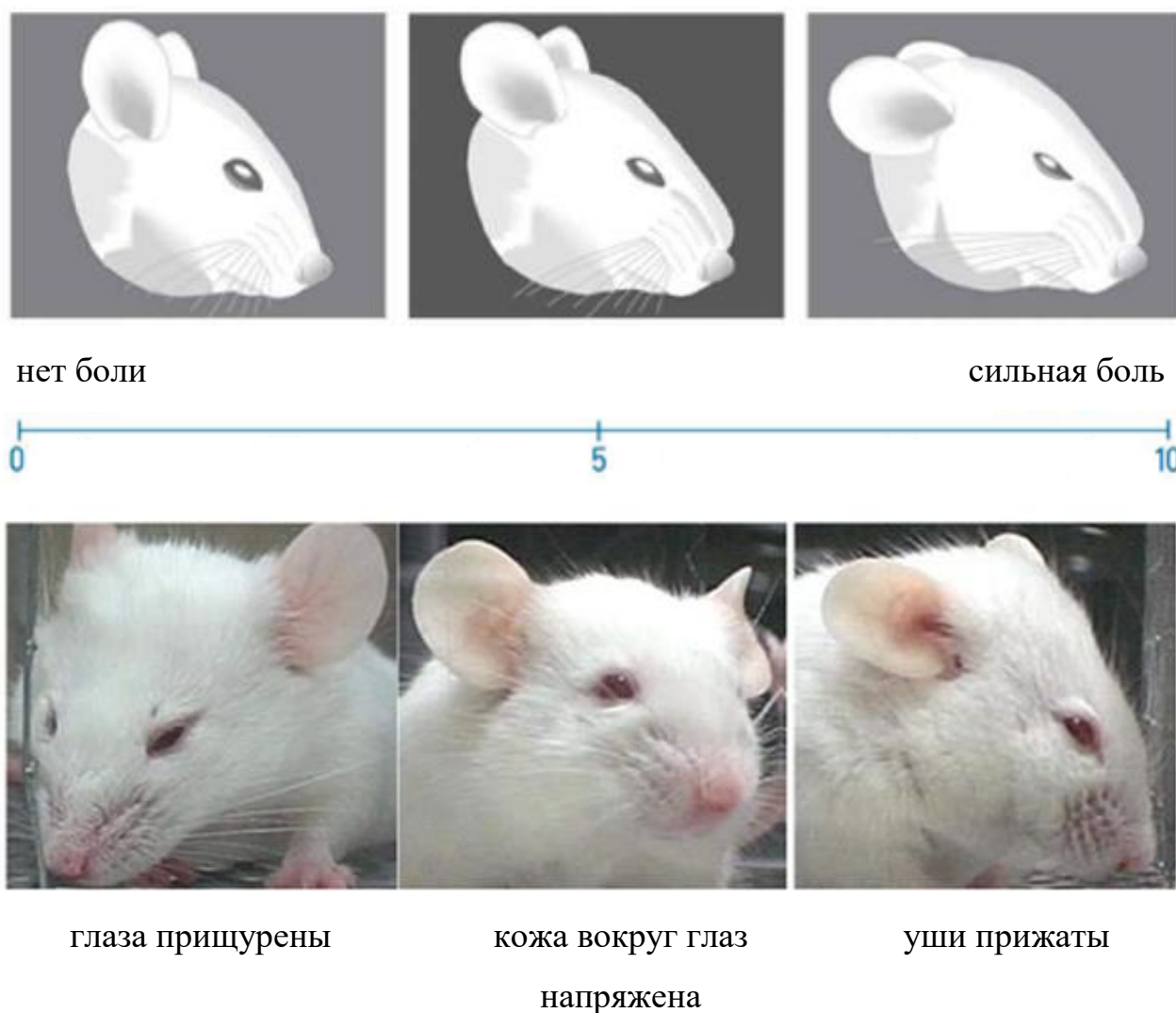


Рисунок 8. Внешнее проявление боли у грызунов (адаптировано из: Burkholder *et al.*, 2012).

*Процедуры, вызывающие минимальную боль* – это процедуры, в результате которых животные испытывают кратковременную легкую боль или стресс. Эти процедуры не вызывают существенного ухудшения самочувствия или общего состояния животных.

К процедурам, вызывающим минимальную боль, относят:

- введение анестезии;
- фармакокинетическое исследование (однократное введение дозы препарата, не вызывающее какого-либо неблагоприятного эффекта; допускается забор не более 10% от объема циркулирующей крови);

- неинвазивная визуализация животных (например, доплерография сосудов, магнитно-резонансная томография);
- прокалывание уха или хвоста;
- нехирургическая подкожная имплантация транспондера (чипа);
- введение веществ перорально, подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, если вещество оказывает не более чем слабое воздействие на животное;
- разведение генетически модифицированных животных, у которых фенотипические изменения проявляются с минимальными болевыми эффектами;
- применение особого режима питания, которое вызывает минимальные физиологические отклонения;
- кратковременное (не более 24 ч) удерживание в метаболических клетках;
- кратковременная изоляция.

*Процедуры, вызывающие среднюю боль* – это процедуры, способные вызывать среднее ухудшение самочувствия или общего состояния животных. К таким процедурам относят:

- многократное введение препаратов, вызывающих умеренные клинические эффекты и забор образцов крови более 10% от объема циркулирующей крови;
- исследование токсичности, канцерогенности с не летальными конечными точками;
- хирургические операции под общей анестезией и соответствующей анальгезией (табл. 7);
- хирургическая имплантация катетеров или биомедицинских устройств (например, телеметрических передатчиков, мини-насосов);

- модель подсаженных или спонтанных опухолей, вызывающие умеренную боль;
- облучение или химиотерапия, сопровождающиеся средними побочными эффектами (до 5 сут);
- разведение генетически измененных животных, которые предпологаемо будут иметь фенотип с умеренными клиническими дефектами;
- использование метаболических клеток, включающих умеренное ограничение движения в течение длительного периода (до 5 сут);
- отсутствие пищи в течение 48 ч (для взрослых крыс);
- вызывание реакций бегства и избегания, когда животное не может убежать или избежать стимул, что приводит к стрессу средней интенсивности.

*Процедуры, вызывающие сильную боль* – это процедуры, которые могут привести к серьезному ухудшению самочувствия или общего состояния животных. К таким процедурам относят:

- тестирование препаратов на токсичность, когда конечной точкой является смерть животного, или возможен летальный исход с тяжелыми патофизиологическими изменениями;
- облучение или химиотерапия в летальной дозе;
- модели индуцированных или спонтанных опухолей, которые связаны с длительной сильной болью, например, инвазивные опухоли костей, метастатические модели;
- хирургические вмешательства под общим наркозом, которые приводят к сильной послеоперационной боли или к тяжелому стойкому ухудшению общего состояния животных (например, торакотомия без адекватной анальгезии или травма, приводящая к полиорганной недостаточности);



- разведение животных с генетическими нарушениями, которые будут испытывать тяжелые нарушения общего состояния, например, болезнь Хантингтона, мышечная дистрофия, хронический рецидивирующий неврит;
- использование метаболических клеток, связанных с жестким ограничением движения в течение длительного периода (более 5 сут);
- многократный удар электрическим током (например, чтобы вызвать состояние беспомощности).

В Таблице 7 приведены наиболее частые процедуры на животных, связанные с экспериментальной работой, и соответствующие степени боли.

Исследователь должен заранее разработать шкалу степени тяжести боли для каждого конкретного исследования. Это позволит своевременно отследить ухудшение состояния животного или достижение конечной точки. Таблица 8 является примером шкалы степени тяжести боли.

Таблица 7. Болезненные процедуры на лабораторных животных

Минимальная или небольшая боль	Умеренная или средняя боль	Сильная боль
Установка катетера	Небольшие лапаротомические разрезы	Обширная лапаротомия/операции на органах
Обрезание хвоста	Тиреоидэктомия	Торакотомия
Насечки на ушах	Орхиэктомия	Гетеротопическая трансплантация органов
Имплантация поверхностной опухоли	Кесарево сечение	Процедуры на позвочнике
Взятие крови из орбитального венозного синуса	Перенос эмбрионов	Ожоговые процедуры
Поверхностная лимфаденэктомия	Гипофизэктомия	Травматические модели
Офтальмологические процедуры	Тимэктомия	Ортопедические процедуры
Вазэктомия (перевязка семявыносящих протоков)		
Имплантация сосудистых порт-систем		

Таблица 8. Соотношение степени тяжести боли и оценки состояния тела животного\*

Оценка боли и дистресса	Примеры	Оценка состояния тела
Признаки боли и дистресса отсутствуют	Животные проявляют груминг, активны, аппетит в норме	3-5
Минимальная боль и дистресс	Сниженный груминг, неуклюжая походка, внимание к ране или отстранение при дотрагивании до раны	2
Средняя боль и дистресс	Неровная шерсть, прищуренные глаза, медленные движения, сгорбленная или/и медленная походка, подавленность или умеренное возбуждение, зуд, беспокойство, дискомфорт, отказ от пищи и воды.	1-2
Сильная боль и дистресс	Взъерошенная шерсть, ввалившиеся глаза (сильное обезвоживание), замедление движений или неподвижность, сгорбленность, увеличенная брюшная масса	1

\* Адаптировано из: Burkholder *et al.*, 2012

## **Понятие об анестезии и анальгезии, основные препараты**

*Анестезия* (от греч. *aesthesia* – ощущение, боль, *an* – отрицание) – потеря чувствительности вследствие блокирования функции чувствительных клеток головного мозга или нарушения передачи импульсов в различных звеньях периферической нервной системы.

*Анальгезия* (от греч. *analgesia* – бесчувственность, невосприимчивость) – полная потеря болевой чувствительности.

В случаях, когда на момент планирования эксперимента вероятны предположения о причинении животным боли и дистресса вследствие реализации планируемых манипуляций, необходимо предусмотреть введение анестетиков, седативных препаратов и обезболивание. В послеоперативном периоде необходимо использовать анальгезирующие средства. При отсутствии предположений или данных в доступных источниках информации о вероятности причинения животному боли и/или дистресса, рекомендовано проведение предварительного эксперимента на малом числе животных и обследование на предмет обнаружения признаков боли и дистресса.

Для анестезии и анальгезии применяются препараты, зарегистрированные в Российской Федерации в установленном порядке. Согласно ФЗ №3-ФЗ, Статья 33: «В ветеринарии могут использоваться наркотические средства и психотропные вещества, внесенные в списки II и III» (списки из Постановления Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации», – прим. авторов) «и зарегистрированные на территории Российской Федерации в порядке, установленном законодательством об обращении лекарственных средств».

В таблицах 9-10 приведены способы применения и дозы допущенных к применению и наиболее часто используемых обезболивающих средств, в таблицах 11-13 – анестетиков и инъекционных анальгетиков.

Таблица 9. Названия и концентрация обезболивающих средств, применяемых при определённой степени тяжести боли у мышей\*

Минимальная – легкая боль	Легкая - средняя боль	Средняя – сильная боль
Локальная анестезия; Лидокаин/ Бупивакаин	Лидокаин/ Бупивакаин (дополнение к системной анальгезии)	Лидокаин/ Бупивакаин (дополнение к системной анальгезии)
Буторфанол 1-5 мг/кг, п/к каждые 4 ч	Бупренорфин 0,05-0,1 мг/кг, п/к каждые 8-12 ч	Бупренорфин 0,05-0,1 мг/кг, п/к каждые 8-12 ч
Карпрофен 2,5-5 мг/кг, п/к однократно	Карпрофен 2,5-5 мг/кг, п/к каждые 24 ч	Карпрофен 2,5-5 мг/кг, п/к каждые 24 ч
		Морфин ** 2-5 мг/кг, п/к каждые 2-4 ч

\* Адаптировано из: Perret-Gentil *et al.*, 2015.

\*\* Внесен в Список I Постановления Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации»; запрещен к использованию в ветеринарии в соответствии с законодательством РФ.

Таблица 10. Наименования и концентрация обезболивающих, применяемых при определённой тяжести боли у крыс \*

Минимальная – легкая боль	Легкая - средняя боль	Средняя – сильная боль
Локальная анестезия – Лидокаин	Локальная анестезия Лидокаин/ Бупивакаин (дополнение к системной анальгезии)	Локальная анестезия Лидокаин/ Бупивакаин (дополнение к системной анальгезии)
Буторфанол 2 мг/кг, п/к однократно	Бупренорфин 0,05 мг/кг, п/к каждые 6-12 ч	Бупренорфин 0,05 мг/кг, п/к каждые 6-12 часов
Карпрофен или кетопрофен 2,5-5 мг/кг, п/к однократно	Карпрофен или кетопрофен 2,5-5 мг/кг, п/к каждые 24 ч	Карпрофен или кетопрофен 2,5-5 мг/кг, п/к каждые 24 ч
Мелоксикам 1 мг/кг, п/к однократно	Мелоксикам 1-2 мг/кг, п/к каждые 24 ч	Мелоксикам 1-2 мг/кг, п/к каждые 24 ч
		Морфин ** 2,5-10 мг/кг, каждые 2-4 ч (сильная боль)

\* Адаптировано из: Perret-Gentil *et al.*, 2015.

\*\* Внесен в Список I Постановления Правительства РФ от 30 июня 1998 г. № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации»; запрещен к использованию в ветеринарии в соответствии с законодательством РФ.

Таблица 11. Рекомендуемые дозы инъекционных анестетиков для грызунов\*

Препарат	Вид	Способ и доза введения (мг/кг)	Длительность действия (мин)
Пентобарбитал	Мышь	в/б, 40-70	20-40
	Крыса	в/б, 30-50	15-60
Кетамин/Ксилазин	Мышь	в/б, кетамин 60-100 + ксилазин 5,0-7,5	20-25
	Крыса	в/б, кетамин 50-90 + ксилазин 5-10	60-80
Кетамин/Ксилазин/ Ацепромазин	Мышь	в/б, 25-30	20-35
	Крыса	в/б, 30-40	20-45
Кетамин/медетомидин	Мышь	-	-
	Крыса	в/б, кетамин 75 + медетомидин 0,5	15-60
Трибромэтанол	Мышь	п/к, в/б, 0,02-0,05	30-40
	Крыса	п/к, в/б, 0,04	15-20
Бупивакаин	Мышь	локально в место надреза, 0,5%	-
	Крыса	-	-

\*Адаптировано из: Flecknell *et al.*, 2009.

Таблица 12. Рекомендуемые дозы инъекционных анальгетиков для грызунов\*

Препарат	Вид	Способ и доза введения (мг/кг)	Интервал повторного введения, ч
Бупренорфин	Мышь	в/б, п/к, 0,05-0,1	6-12
	Крыса	в/б, п/к, 0,01-0,05	8-12
Буторфанол	Мышь	п/к, 1,0-5,0	4
	Крыса	п/к, 2,0-2,5	4
Флуниксин (Бенамин)	Мышь	п/к, 2,5	12
	Крыса	п/к, 1,1	12
Кетопрофен	Мышь	п/к, 5,0	12-24
	Крыса	п/к, 5,0	2-24
Карпрофен	Мышь	п/к, 10,0	12-24
	Крыса	п/к, 2,5-5,0	12-24
Парацетамол (ацетаминофен)	Мышь	п/о, 300	4
	Крыса	п/о, 100-300	4
Аспирин	Грызуны	п/о, 100-400	24
Мелоксикам	Грызуны	п/о, п/к, 1,0	24
Ксилазин	Грызуны	п/к, 5,0-12,0	2

\* Адаптировано из: Flecknell *et al.*, 2009.



Таблица 13. Рекомендуемые дозы комбинации препаратов золетил-ксилазин для анестезии лабораторных животных

Вид животных	способ и доза введения, мг/кг	Длительность анестезии	Примечание
Крысы	в/м, в/б, 20,0-40,0 + 5,0-10,0	20-30 мин	Для продолжения анестезии добавить 1/3 от первоначальной дозы
Мыши	в/м, в/б, 20,0-40,0 + 5,0-10,0	20-30 мин	Для более точного дозирования при введения мелким мышам необходимо предварительное разведение раствора в 5 раз (1 часть смеси золетил+ксилазин + 4 части воды для инъекций)

Необходимо отметить, что некоторые препараты чувствительны к свету, поэтому при хранении избегать попадания солнечных лучей и освещения. Разбавленные препараты подвергать утилизации через 30 сут после разведения. Для разведения препаратов используют очищенную воду (*milli-Q*) или стерильный раствор 0,9% NaCl.

### ***Анестетики***

Анестетики по способу введения подразделяют на:

- ингаляционные;
- инъекционные.

Преимущества использования ингаляционных анестетиков (изофлуран, севофлуран, галотан):

- способность контролировать глубину и продолжительность анестезии;

- быстрая, контролируемая индукция и восстановление после анестезии;
- возможность использования разновозрастных животных и животных с измененной функцией органов;
- кислородное насыщение.

Обязательным условием для применения ингаляционной наркотизации является использование специализированного оборудования для введения кислорода и препаратов. Из ограничений данного способа введения следует отметить достаточно высокую стоимость и существенный расход препаратов.

Преимущества использования инъекционных анестетиков (кетамин, ксилазин, диазепам, мидазолам, декседетомидин):

- относительно низкая стоимость;
- простота введения (п/к, в/б);
- низкий риск воздействия на организм человека;
- дополнительный анальгезирующий эффект.

Существенным ограничением инъекционных анестетиков является неспособность контролировать глубину или продолжительность анестезии, что, как следствие, приводит в случае необходимости повторного введения к повышению риска передозировки; нежелательно использовать для молодых или старых животных.

Анестетики, вызывающие тяжелые физиологические изменения — хлоралгидрат и  $\alpha$ -хлоралоза. Их применение должно быть регламентировано протоколом ухода за животными с обоснованием необходимости использования именно этих анестезирующих препаратов. Оба препарата считаются снотворными, а не анестетиками. Действие хлоралгидрата длится 1-2 ч,  $\alpha$ -хлоралозы — 8-10 ч. Эти препараты обладают слабыми обезболивающими свойствами, оказывают незначительное влияние на сердечно-сосудистую или дыхательную систему в гипнотических дозах (однако, эти дозы не вызывают анестезии).

Высокие дозы хлоралгидрата и  $\alpha$ -хлоралозы способны вызывать:

- тяжелое угнетение дыхания;
- резкое и существенное снижение артериального давления и сердечные аритмии;
- сильное воспаление брюшной полости при внутрибрюшинном введении (перитонит);
- кишечную непроходимость, что в совокупности может привести к летальному исходу.

К этой группе препаратов относится уретан – анестетик длительного действия (8-10 ч). Оказывает минимальное воздействие на сердечно-сосудистую систему. Канцерогенен и мутагенен для животных и человека, поэтому при обращении с препаратом как в порошковой, так и в жидкой форме необходимо соблюдать надлежащие меры предосторожности. Проникает через кожу, легкие и слизистые оболочки (проникает в костный мозг, преодолевает плацентарный барьер, способен индуцировать опухолеобразование и предопухолевые изменения в коже).

Необходимо также принимать меры предосторожности при обращении с тканями и кровью животных, анестезированных уретан-триброэтанолом – препаратом Авертин (способен вызывать кишечную непроходимость, некроз мышечной ткани и перитонит).

### ***Анальгетики***

*Опиоидные препараты* – сильнодействующие послеоперационные анальгетики, являющиеся компонентами многих схем хирургической анестезии. Препараты данной группы различаются как по своей эффективности, так и по продолжительности действия.

Фентанил, оксиморфон, бупренорфин и буторфанол являются наиболее часто используемыми опиоидами в уходе за лабораторными животными. Фентанил – наиболее сильнодействующий, но с коротким периодом действия.

Бупренорфин является длительно действующим веществом, применим в большинстве послеоперационных схем. Бупренорфин и буторфанол – смешанные агонисты/антагонисты опиоидных рецепторов; вызывают менее глубокое угнетение дыхания, чем полные агонисты, но имеют «потолочный эффект» в степени анальгезии, возникающей при увеличении доз. Основным способом введения опиоидов – инъекционный. Пероральное применение может быть эффективным в повышенных дозах вследствие катаболизма в органах желудочно-кишечного тракта.

Возможность одновременного применения опиоидных препаратов с ингаляционной или инъекционной общей анестезией снижает необходимую дозу анестетика для поддержания хирургической анестезии. В то же время опиоиды способны подавлять дыхание, повышать двигательную активность, вызывать нарушение пищевого поведения у крыс, в некоторых случаях – сонливость и замедление восстановления после общей анестезии.

*Инъекционные НПВП* применимы в случае необходимости введения точных доз, оптимальны для введения мелким грызунам. Однако при длительном применении НПВП способны снижать свертываемость крови, вызывать желудочно-кишечные расстройства, инициировать развитие заболеваний печени и почек. Рекомендовано ограничение длительности применения НПВП (не более 3 сут), за исключением случаев ветеринарного наблюдения. Запрещено использовать для обезвоженных животных или для животных с дисфункцией печени и/или почек.

*Местные анестетики/анальгетики* применимы во время операции и послеоперационно. Блокируют нервную проводимость (без исключения сознания) при местном применении в достаточной концентрации.

Общие требования к местным анестезирующим средствам:

- высокая избирательность;
- низкая токсичность;

- отсутствие раздражающего эффекта;
- стойкость при стерилизации;
- выраженный эффект обезболивания тканей при проведении длительных операций;
- сосудосуживающий эффект.

По химической структуре местные анестетики разделяют на две группы:

- сложные эфиры и амиды (новокаин, дикаин, бензокаин): нестойки, подвержены энзиматическому разрушению в тканях и крови, действие краткосрочно;
- амиды (тримекаин, лидокаин, бумекаин, мепивакаин, артикаин, бупивакаин): медленная биотрансформация (только в печени), медленная инаktivация, действие длительно.

По длительности действия местные анестетики разделяют на 3 группы:

- короткого действия – до 30-50 мин (новокаин);
- средней продолжительности действия – до 45-90 мин (лидокаин, тримекаин, мепивакаин, ультракаин);
- длительного действия – до 90 мин и более (бупивакаин).

Наиболее часто применяются лидокаин и бупивакаин. У более крупных животных лидокаин быстро проявляет обезболивающий эффект, сохраняющийся в течение 2 ч (у грызунов в среднем менее 1 ч). Бупивакаин проявляет действие спустя 20-30 мин после применения, но обеспечивает до 8-12 ч остаточной аналгезии у некоторых животных (у грызунов в среднем до 8 ч). Считается, что оба препарата обеспечивают меньшую продолжительность обезболивания у грызунов; могут быть введены п/к в операционное поле. Крем на основе лидокаина применяется местно на бритую, неповрежденную кожу перед венепункцией, однако для достижения полного эффекта необходим контакт с кожей в течение не менее 30 мин. Для хирургических процедур лидокаиновый крем не является заменой инъекционных местных анестетиков,

поскольку проникает исключительно в кожу и часто удаляется животным до инициации эффекта. Даже при общей анестезии рекомендуется местное или подкожное (в месте хирургического разреза) введение местного анестетика для обеспечения дополнительной послеоперационной аналгезии.

Для предупреждения инфицирования послеоперационной раны и развития воспалительного процесса в послеоперационном периоде рекомендуется применение антибиотиков и других противомикробных препаратов, такие как ампициллин, энрофлоксацин, тетрациклин.

### **Понятие об эвтаназии, способы эвтаназии**

Если животное испытывает сильную боль и дистресс, которые не могут быть купированы или облегчены, необходимо прибегнуть к эвтаназии. В ходе разработки протокола испытаний, исследователь должен разработать не только шкалу степени тяжести боли, но и определить точки гуманного вмешательства – перечень заранее определенных физиологических или поведенческих критериев, которые определяют точку, в которой должно быть осуществлено гуманное вмешательство (эвтаназия) для предотвращения продолжительной сильной боли и дистресса у исследуемого животного.

Критерии состояния животного, при наличии которых рекомендовано гуманное вмешательство (эвтаназия) исследователя:

- потеря более 20 % веса по сравнению с исходным (до начала эксперимента) или по сравнению с животными контрольной группы;
- при достижении оценки состояния тела  $\leq 2$  (для мышей и крыс);
- невозможность совершать животным перемещение по клетке, ограничивающая доступ к пище и воде;
- наличие дискретных опухолей, влияющих на передвижение или принятие нормальной позы, для мышей – диаметром более 2 см по любому измерению; для крыс – диаметром более 3 см по любому измерению;

- метастатические/диссеминированные опухоли: при достижении оценки состояния тела  $\leq 2$ ;
- выраженное затруднение дыхания;
- серьезные неврологические патологии, препятствующие нормальному употреблению пищи/воды;
- послеоперационные осложнения: расхождение или инфицирование операционного поля, признаки системной инфекции (Ullman-Culleré *et al.*, 1999).

Требования к проведению эвтаназии:

- минимизированная боль и страдания (метод эвтаназии должен обеспечить немедленное бессознательное состояние и смерть; возможно проведение терминальной анестезии)
- территориальная изоляция от других животных (запрещено проведение эвтаназии в присутствии других животных);
- квалифицированный исполнитель.

Методы эвтаназии:

- ингаляционный: 1) применение анестетиков (изофлуран, севофлуран, десфлуран, галотан, энфлуран, хлороформ или эфир), 2) газовый (CO<sub>2</sub>, инертные газы);
- инъекционный подход (рекомендована трехкратная передозировка барбитуратами);
- физический подход: 1) цервикальная дислокация (смещение шейных позвонков с разрушением спинного мозга), 2) декапитация (обезглавливание).

# СТАНДАРТНЫЕ МАНИПУЛЯЦИИ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

## Техника удержания животных

Для безопасности исследователя и благополучия животного следует использовать рекомендованные способы обращения и удерживания лабораторных животных. Применяя уверенные, отработанные движения и определенные приемы и способы, животное можно надежно удержать в руках, не причиняя боль. Ниже приведены основные приемы обращения с мышами и крысами для их удержания вручную.

При обращении с мышами следует учитывать, что регулярное общение животного с исследователем приводит к привыканию и успокоению животных в присутствии исследователя (Danneman *et al.*, 2001). Крысы послушнее мышей; при регулярном общении, повторяющемся бережном обращении крысы будут оставаться спокойными при их удержании (Donovan *et al.*, 2004).

### *Способ удержания мыши одной рукой*

1. Извлечь мышь из клетки, осторожно взявшись за основание хвоста. Поместить животное на крышку клетки из проволочной решетки (рис. 9 А). Избегать лишних звуков и резких движений, которые могут возбудить мышь. Незначительное оттягивание мыши кзади приведет к инстинктивному захвату решетчатой крышки клетки (рис. 9 Г).

2. Свободной рукой обхватить кожу на задней части шеи («взять за шкурку»). Плотно взять за кожу за ушами большим и указательным пальцами (рис. 9 Б, Д).

3. Поднять животное, развернув его к себе мордой (рис. 9 В, Е).

4. Перевести хвост под мизинец той же руки, которой держите животное (рис. 9 В, Е).



5. Проверить надежность захвата и удержания путем приближения к морде животного с правой и затем с левой стороны предмета, похожего на палец человека (например, карандаша). Животное, в случае правильно выполненного захвата, не должно свободно поворачивать голову.

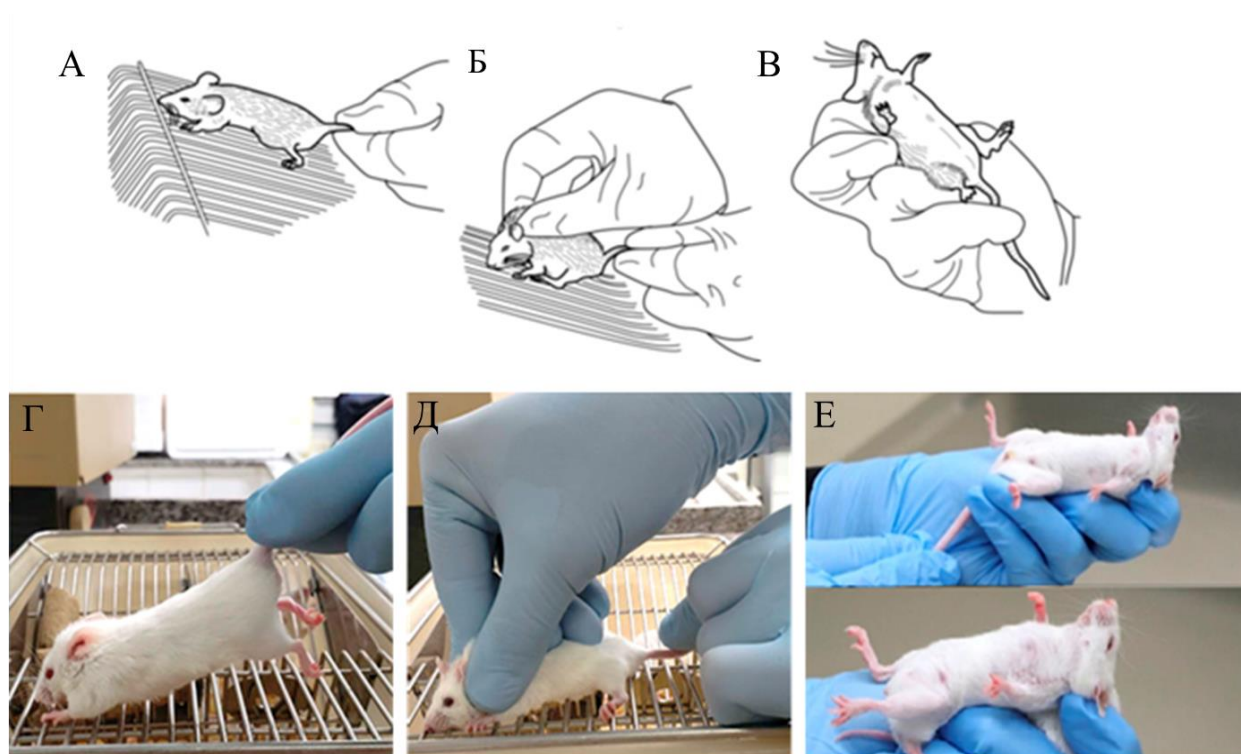


Рисунок 9. Схематическое изображение (А-В) и фотографии (Г-Е) способа удержания мыши одной рукой. Взять мышь за основание хвоста и слегка потянуть кзади (А, Г). Взять за кожу за ушами большим и указательным пальцами (Б, Д). Перевернуть животное и перенести хвост под мизинец руки (В, Е). Адаптировано из: Jove.com

Крысы обычно привыкают к рукам человека, поэтому перед захватом можно поместить руку в клетку, чтобы животное исследовало человека. Предварительное нежное поглаживание животного, с последующим осторожным захватом, предотвратит испуг и ответную агрессию животного. Крыс весом более 350 грамм поднимают из клетки, хватая за все тело, так как при подъеме за хвост можно снять кожу с хвоста. Это особенно вероятно при

подъеме за основание хвоста тяжелых крыс (весом > 450 г). С молодыми крысами можно обращаться как с мышами согласно вышеописанному алгоритму.

### ***Способ удержания крысы одной рукой***

1. Положить ладонь на спину крысы. Собрать кожу вдоль спины и задней части шеи. Большой и указательный пальцы используются для контроля головы, в то время как другие три пальца удерживают тело (рис. 10 А).

2. Поднять животное, развернув его к себе мордой (рис. 10 Б). Будьте осторожны, не сжимайте кожу слишком сильно, так как это может затруднить дыхание (Perret-Gentil, 2015).



Рисунок 10. Метод удержания крысы одной рукой. Адаптировано из: Perret-Gentil, 2015.

### ***Способ удержания крысы обхватив грудную клетку***

1. Взять крысу за основание хвоста с помощью большого и указательного пальца (рис. 11 А).

2. Другой рукой осторожно, но крепко обхватить крысу за грудную клетку, так, чтобы большой и указательный пальцы были над передними лапами, при этом оставшиеся пальцы скрещивали лапы животного, так, чтобы оно не могло

вывернуться (рис. 11 Б). В качестве альтернативы, большой и указательный пальцы могут находиться под передними лапами (рис. 11 В).

3. Заднюю часть крысы поддержать другой рукой или прислонить к поверхности стола.

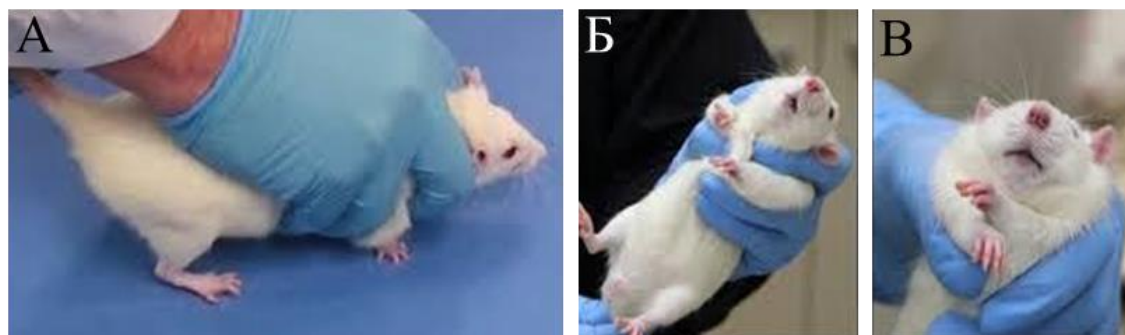


Рисунок 11. Способ удержания крысы двумя руками. Адаптировано из: Perret-Gentil, 2015.

#### ***Способ удержания крысы с помощью полотенца***

1. Накрыть животное полотенцем. Крыса предпочтет спрятаться в полотенце, как в укрытии. Зажать края полотенца с двух сторон от животного пальцами одной руки (рис. 12 А).

2. Животное готово к минимальному воздействию (например, подкожная, внутрибрюшинная или внутримышечная инъекция) (рис. 12 Б).

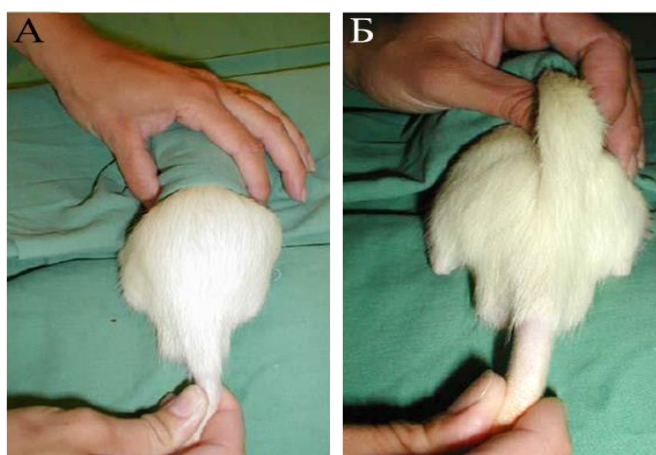


Рисунок 12. Способ удержания крысы с помощью полотенца. Адаптировано из: Perret-Gentil, 2015.

## Техника забора крови

Для забора крови из вены и проведения инъекций важно подобрать подходящую длину и диаметр иглы шприца. Слишком длинная или толстая игла может привести к повреждению вены. Слишком тонкая игла увеличивает риск гемолиза и свертывания крови в шприце (Barclay *et al.*, 1988). В Таблице 14 приведены рекомендованные размеры иглы шприца для различных видов инъекций.

Таблица 14. Рекомендуемый размер иглы при заборе крови

Вид инъекции	Размер иглы, G	
	Крыса	Мышь
Подкожно	25	25
Внутримышечно	25	27
Внутривенно	25-27	26-28
Внутрибрюшинно	23-25	23-27

Для забора крови рекомендовано использование одноразовых игл, что обусловлено их деформацией и затуплением при многократном применении, приводящем к боли и стрессу животного (рис. 13).

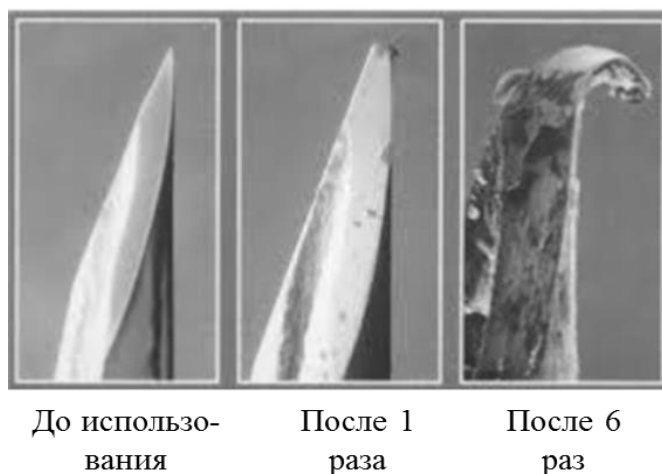


Рисунок 13. Микрофотография иглы шприца до и после использования.

Адаптировано из: prachensky.com



Небольшой объем крови (50-100 мкл) у животных может быть забран путем прокола поверхностных кровеносных капилляров небольшим острым стерильным объектом (скарификатором). Анестезия в данном случае не требуется, так как стресс и дискомфорт от укола шприцом будет больше, чем от укола скарификатора. Рекомендуемые участки для прокола: вены ушной раковины, хвостовые вены, боковая подкожная вена (рис. 14).

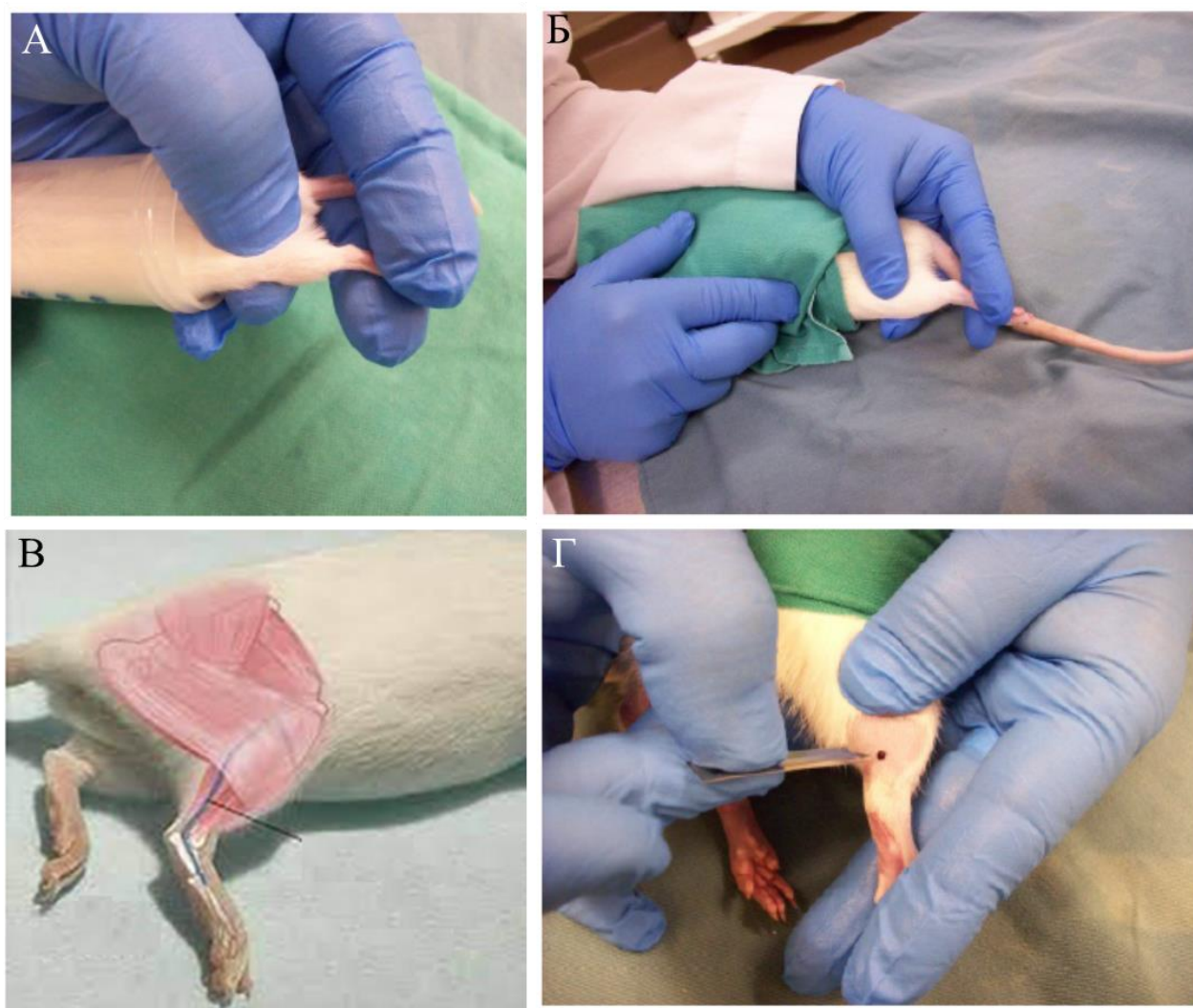


Рисунок 14. Схема удержания мыши (А) и крысы (Б) для забора крови из боковой подкожной вены (В, Г) (адаптировано из: SOP Blood Collection from the Lateral Saphenous Vein in Mice and Rats, 2015).

Перед забором крови следует удалить шерсть в месте прокола путем выщипывания, выстригания ножницами или сбривания с помощью машинки для стрижки. Для соблюдения требований асептики выстриженный участок кожного покрова обработать раствором 70% этилового спирта. После проведения процедуры удаления шерстного покрова у животных с непигментированной кожей (альбиносы) визуализируются подкожные кровеносные капилляры и более крупные сосуды (рис. 14). Проткнуть вену под углом  $90^\circ$  в наиболее четко визуализируемом близком к поверхности тела участке (рис. 14). Собрать кровь в капилляр. Для остановки кровотечения после забора крови аккуратно, но достаточно сильно прижать место прокола на 30 с.

Объем крови более 100 мкл отбирают из вены с помощью шприца. Перед взятием крови необходимо определить траекторию прохождения вены.

Для лучшей визуализации стимулируют расширение вены путем аккуратного надавливания и/или нагревания. Методом аккуратного надавливания пальцами зажимают вену по направлению тока крови после места предполагаемого прокола. При нагревании локально прикладывают грелку к месту предполагаемого прокола. У животных, находящихся под наркозом, также происходит расширение сосудов в результате действия анестетика.

После обработки поверхности кожи раствором 70% этилового спиртом, следующий этап – прокалывание кожи иглой с прикрепленным шприцем. На этом этапе важно учитывать толщину кожи, которая варьирует не только между видами, но и между различными участками кожи одного и того же животного (кожа дорсальной и боковой поверхности тела утолщены по сравнению с кожей на вентральной стороне тела). Повторный отбор проб крови в одном и том же участке приводит к утолщению кожи. При прокалывании кожи кончик иглы должен быть направлен скосом вверх, угол проникновения должен быть равен  $0-10^\circ$ , то есть почти параллельно вене. Чем больше угол проникновения, тем

выше вероятность проткнуть вену насквозь, что приведет к кровотечению, гематоме и стрессу у животного, вызванному некорректным обращением.

Следует обратить особое внимание на скорость забора крови из вены: слишком быстрое взятие крови с помощью шприца может привести к «схлопыванию» вены и гемолизу эритроцитов (проявляется как окрашивание сыворотки или плазмы крови), что нежелательно для последующих анализов. Для остановки кровотечения после забора крови аккуратно, но достаточно сильно прижать место прокола на 30 с. Если кровотечение не остановлено полностью или животное отходит от наркоза, следует отсадить его в отдельную клетку до полного восстановления.

Забор крови путем отрезания кончика хвоста не рекомендуется Федерацией европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA), так как это болезненный метод, ведущий к ампутации позвонков, осложнениям в виде развития гранулем и потери способности животного регулировать температуру тела.

Ретро-орбитальный способ забора крови (из орбитального венозного синуса) предполагает пункцию венозного синуса позади глазного яблока. Этот метод может быть применен исключительно под анестезией компетентными лицами и только в случае, если животное не планируется выводить из наркоза.

Забор крови из сердца выполняется под общим наркозом и только если животное не планируется выводить из наркоза.

Объем циркулирующей крови у лабораторных животных составляет: мышь – 60-80 мл/кг, крыса – 50-70 мл/кг. В таблице 15 представлены данные объемы забора крови, исходя из общего объема крови животных и веса, и соответствующий перевод в объемные единицы измерения (мл).

Таблица 15. Объемные показатели периферической крови лабораторных мышей и крыс в переведенных единицах измерения

Вид животного (масса)	Объем крови, мл				
	общий	забор крови			
		7,5%	10%	15%	20%
Мышь (25 г)	1,4-1,8	0,1	0,2	0,3	0,4
Крыса (250 г)	16	1,2	1,6	2,4	3,2

Забор около 10% от общего объема циркулирующей крови запускает гомеостатический процесс и восстановление в течение 14 сут (табл. 16). Забор 15-20% объема крови приведет к снижению сердечного выброса и артериального давления, период восстановления достигнет 4 недель (табл. 16). Забор или потеря 30-40% крови может вызвать геморрагический шок, более 40% – гибель 50% крыс животных (McGuill *et al.*, 1989). Многократный забор меньших объемов крови, как правило, сопровождается развитием анемии.

Таблица 16. Максимальные объемы забора крови и продолжительность периода восстановления

Однократный забор		Многократный забор	
% крови от общего объема	период восстановления	% крови от общего объема в течение 24 ч	период восстановления
7,5	1 неделя	7,5	1 неделя
10	2 недели	10-15	2 недели
15	4 недели	20	3 недели

Приблизительно 10% от общего объема крови можно забрать однократно у здоровых животных при адекватном питании с минимальными побочными эффектами (табл. 16). При этом процедура может быть повторена через 2-3



недели, эквивалентные периоду восстановления. При необходимости проведения многократного забора крови через короткие интервалы времени, объем забираемой крови не должен превышать 1% от общего объема крови животного каждые 24 ч (табл. 16) (Morton *et al.*, 1993).

Алгоритм расчета максимального объема забора крови для мышей: вес мыши 25 г, общий объем крови 1,5 мл, забираемый объем крови 0,15 мл (10% от общего объема крови), время восстановления составит 2 недели. Если забираемый объем крови 0,22 мл (15% от общего объема крови), время восстановления составит 4 недели. Для многократного забора крови - не более 10 мкл крови каждые 24 ч.

Расчет максимального объема забираемой крови для крыс осуществляется следующим образом: вес крысы 400 г, общий объем крови 25,6 мл, объем забора крови 2,56 мл (10% от общего объема крови), восстановительный период – 2 недели. Если забираемый объем крови 3,84 мл (15% от общего объема крови), период восстановления составит 3 недели. Для многократного забора крови – не более 250 мкл крови каждые 24 ч.

### **Способы введения исследуемых лекарственных средств**

Различают три основных пути введения и способа применения и лекарственных форм:

#### **1) энтеральный:**

- через рот (*per os*);
- под язык,
- через слизистые ротовой полости;
- через прямую кишку (*per rectum*);

#### **1) наружный:**

- на кожу;
- на слизистые: глаза, ухо, нос, во влагалище;

2) ингаляционный:

- через дыхательные пути;
- эндотрахеально;

3) парентеральный:

- внутрикожно;
- подкожно;
- внутримышечно;
- внутривенно;
- внутриартериально;
- в полости;
- в субарахноидальное пространство.

*Энтеральные пути введения*

Внутрижелудочное введение – это основной, наиболее часто используемый способ. Внутрижелудочное введение является аналогом пероральному способу введения. Введение осуществляется при помощи специального внутрижелудочного зонда, который через заднюю стенку глотки проводится до уровня желудка.



Рисунок 15. Внутрижелудочное введение (на примере крысы).

Адаптировано из: [gastroscan.livejournal.com](http://gastroscan.livejournal.com)

Ректальный способ введения также является целевым способом введения. Перед введением суппозиторную массу нагревают на водяной бане до температуры 39°C. После этого производят введение с помощью дозатора для соблюдения точности дозирования. Кроликам в зависимости от размеров суппозитория можно вводить без предварительного расплавления (Макаренко, 2013).

### ***Парентеральные пути введения***

Парентеральные пути введения (минуя желудочно-кишечный тракт) обеспечивают точность дозирования, высокую биодоступность и быстрое действие лекарственных средств. К ним относят все виды инъекций и введение лекарств через дыхательные пути. Путем инъекций вводят жидкие лекарственные формы, не оказывающие сильного раздражающего действия, с помощью шприцов, инъекционных игл при строгом соблюдении правил асептики и антисептики (стерильность вводимых лекарственных средств, используемого инструментария, обеззараживание места введения инъекции).

Способ и путь введения веществ определяется задачами эксперимента, видом животного, возможными эффектами конкретного способа введения на состояние животного и требуемой частотой введения. Эти факторы также влияют на выбор техники выполнения процедуры и места введения инъекции. Некоторые пути введения веществ приводят животных к стрессу, поэтому, по возможности, необходимо отдавать предпочтение наименее инвазивным и простым для исполнения техникам. Рассмотрим наиболее распространенные методы введения лекарственных препаратов.

Подкожное введение – наиболее распространенное в практике доклинических исследований и ветеринарной медицины. При введении растворов лекарственные вещества всасываются в кровь через 5-15 мин, а раздражающие – рефлекторно возбуждают ЦНС сразу после введения. Подкожное введение суспензии значительно замедляет всасывание

действующего вещества, создавая тем самым депо на определенный период (например, протамин-цинк-инсулин или гидрокортизон). Подкожное введение твердых форм дает возможность продлить их действие на недели и месяцы.

Замедлить всасывание, и, следовательно, продлить действие лекарств можно также с помощью сосудосуживающих средств (адреналин, норадреналин, эфедрин и др.), которые добавляют к растворам перед подкожным введением.

Крупным животным подкожно лекарственные вещества вводят в области средней трети шеи и за лопаткой, кроликам, собакам – в области лопатки или на внутренней поверхности бедра.



Рисунок 16. Подкожное введение лабораторным животным. Адаптировано из: Cherepah.ru.

*Внутримышечное введение* обеспечивает достаточно быстрое всасывание веществ из растворов. Этим способом можно вводить слабо растворимые вещества и масляные суспензии, например, антибиотики пролонгированного действия. Кроме того, внутримышечно можно вводить вещества с раздражающим действием, которые не вводят подкожно.

*Внутривенное введение* позволяет создавать необходимую концентрацию лекарственного вещества непосредственно в крови за очень короткое время. Этим путем вводят только водные и водно-спиртовые растворы веществ, действующих на сердце и сосуды, ЦНС, а также заменители крови, химиотерапевтические средства, некоторые антидоты, кальция хлорид и гипертонические растворы. Запрещается введение масляных растворов, суспензий, веществ, вызывающих коагуляцию белков крови и гемолиз эритроцитов. Как правило, внутривенное введение проводят медленно, а повторное – в зависимости от состояния сосудистой стенки. Для расширения вен при введении грызунам рекомендуют подогревание зоны введения (например, посредством опускания хвоста в теплую воду). Слишком быстрое внутривенное введение вещества в некоторых случаях способно привести к летальному исходу.

*Внутрибрюшинное введение.* Благодаря большой площади поверхности и обильной васкуляризации брюшины, данный способ введения характеризуется ускоренной абсорбцией вводимых соединений. Период всасывания большинства веществ всего на 25-50% больше, чем при внутривенном введении. Необходимо учитывать, что биотрансформация веществ, вводимых внутрибрюшинно, происходит в печени; также при многократном введении существует риск развития местной реакции в виде спаек. Для предотвращения возможности повреждения внутренних органов животное следует держать вертикально вниз головой (для опущения внутренних органов). Иглу необходимо вводить под острым углом, в нижнюю часть живота с небольшим отступом от срединной линии (рис. 17).



Рисунок 17. Внутрибрюшинное введение лабораторным животным (на примере мыши). Адаптировано из Slide-share.ru.

В таблице 17 представлены максимальные дозы вводимых препаратов при различных способах введения (Миронов, 2012).

Таблица 17. Максимальные дозы введения тестируемых препаратов

Вид	Вес, г	Внутри- брюшинно	Внутри- венно	Внутри- мышечно	Подкожно	Внутри- желудочно
Мышь	20-24	0,4/1,92	0,12/0,5	0,05/0,1	0,2/0,8	0,2/1
	25-30	0,5/2,32	0,125/0,5	0,2/0,5	0,25/1	0,25/1,25
	>30	0,6/2,4	0,15/0,5	0,2/0,5	0,3/1,2	0,3/1,5
Крыса	100-200	2/4	0,5/2	0,1/0,2	0,5/1	1/4
	200-240	2,4/4,8	1/4		1/2	2/8
	250-300	3/6	1,25/5		1,25/2,5	2,5/10
	> 300	3,1/6,2	1,5/6		1,5/3	3/12

В зависимости от размеров животных, используются внутрижелудочные зонды разных размеров. В таблице 18 представлены рекомендованные размеры внутрижелудочных зондов в зависимости от массы тела (Diehl, 2001).

Таблица 18. Рекомендованные размеры внутрижелудочных зондов

Вид животного	Масса тела, г	Размер, G	Длина зонда, см	Диаметр наконечника, мм	Форма
Мышь	14	24	2,5	1,25	Прямой
	15-20	22	2,5-4	1,25	
	20-25	20	2,5-5	2,25	Прямой/ изогнутый
	25-30	18	2,5-7	2,25	
Крыса	50-120	20-18	2,35-4	2,25	изогнутый
	120-200	18-16	5-7,5	2,25	
	200-300	16	7,5-10	3	
	300-350	14-13	7,5	4	

Более крупным лабораторным животным (например, кроликам) можно вводить препараты без механического разрушения с целью тестирования кишечнорастворимых таблеток, капсул и других форм (Макаренко, 2013)

*Эндотрахеальное введение* является аналогом ингаляционному способу введения препаратов. Для этого типа введения используют специальные эндотрахеальные зонды для точного и безопасного дозирования препаратов.

Известны специальные зонды фирмы Penn-Century Inc. (USA) для распыления жидких (модель IA-1C-M для мышей и хомяков; IA-1B-R для крыс и морских свинок) и порошкообразных веществ (модель IA-1C-M для мышей и хомяков; IA-1B-R для крыс и морских свинок).

Эндотрахеальное введение, как правило, осуществляется под общим наркозом или с применением местных анестетиков для профилактики причинения животному боли. Этапы введения: надавить на надгортанный хрящ; ввести зонд в трахею до уровня бифуркации; распылить препарат. При введении крысам и морским свинкам для контроля правильности введения зонда и подтверждения его локализации в трахее достаточно тактильного обнаружения зонда в проекции трахеи. При введении мышам и хомякам обязательна визуальная фиксация попадания, для этого после наркотизации животное фиксируют на специальном столике и мощным, направленным источником света подсвечивают кожу шеи в проекции гортани.

Распыление на заднюю стенку глотки осуществляется при помощи специальных аэрозолев. Животное фиксируют как для внутрижелудочного введения, производят распыление тестируемых веществ. Данный путь введения используется для изучения местного действия препаратов, применяемых в оториноларингологии.

*Интраназальное введение* осуществляется всем видам лабораторных животных вследствие простоты исполнения. Объем введения не должен превышать 100 мкл/кг для крыс и 500 мкл/кг для мышей. Для обеспечения полного попадания тестируемого объекта введение предпочтительно осуществлять в положении животного на спине. Важно вводить тестируемые препараты наркотизированному животному, так как бодрствующее животное в ответ на интраназальную стимуляцию начинает рефлексивно глотать и чихать, что приводит к 85% потере препарата (Yanlin, 2009).



Внутрисуставное введение является целевым способом доставки лекарственных средств как в клинике, так и в эксперименте. Применяется при необходимости оценки действия препаратов на патологические процессы в суставах. В связи с необходимостью использования игл малого размера (28G) и ограниченностью суставного пространства, введение подходит лишь для растворимых веществ в малых количествах.

*Внутрисердечное введение* проводится под наркозом. Используют иглы малого размера (28G). Нащупывают толчок сердца на 1-2 см выше мечевидного отростка и чуть влево от грудины вкалывают иглу, чтобы попасть в сердце через межреберный промежуток. Если игла введена правильно, в шприце появляется кровь. Материал вводят предельно осторожно.

*Конъюнктивальное введение* применяется для изучения офтальмологических средств. Можно осуществлять всем видам лабораторных животных. Введение целесообразно проводить с помощью дозатора для соблюдения точности дозирования (Макаренко, 2013).

# ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

## Роль моделей на животных в разработке новых лекарственных средств

Модели на животных – это классические фармакологические модели, используемые в качестве обязательного элемента в доклинических (токсикологических и фармакологических) исследованиях новых лекарственных средств. Классические фармакологические исследования включают последовательное тестирование новых веществ животного и растительного происхождения, продуктов химического синтеза сначала на изолированных органах, впоследствии – на животных моделях, в основном на крысах и мышах, а также на высших видах животных.

В последние годы все чаще происходит замена испытаний на животных моделями *in vitro*, однако ряд исследований остается обязательным в соответствии с современными руководствами по фармако-токсикологическим доклиническим исследованиям.

Исторически сложилось, что разработка новых лекарств – это длительный процесс, связанный с прогрессом в экспериментальной фармакологии – использованием изолированных органов, различных животных моделей и современных методов *in vitro*.

Немецкий ученый Пауль Эрлих (*Paul Ehrlich*; 1854-1915) был первым, кто испытал лекарство на одноклеточной парамеции (от лат. *Paramecium*). В результате эксперимента был введен сальварсан (также известен как арсфенамин) – антибиотик узкого спектра действия против широко распространенного в начале XX века сифилиса. Это открытие сделало Эрлиха основателем химиотерапии.

Фармакологические исследования были начаты в Европе во второй половине XIX века, когда основатели фармакологии Рудольф Бухгейм (*Rudolf Richard Buchheim*; 1820-1879) и Освальд Шмидеберг (*Schmiedeberg Johann Ernst Oswald*; 1838-1921) исследовали влияние лекарств на животных.

Фармакологическая оценка новых соединений для терапевтических целей стала особенно востребована с развитием методов химического синтеза.

В середине 1970-х годов произошло мощное развитие *in vitro* тестов, основанных на связывании рецепторов радиоактивно мечеными соединениями.

Современные подходы к разработке лекарственных средств связаны с развитием методов комбинаторной химии, геномики, фармакогеномики, протеомики и биоинформатики и других областей науки.

В настоящее время классический фармакологический подход с использованием экспериментальных животных весьма актуален. Это связано с тем, что в клинической практике обнаруживается множество дополнительных и/или побочных эффектов лекарственных средств. Например, мочегонное действие сульфаниламида и ацетазоламида как ингибиторов карбоангидразы; гипогликемический эффект производных сульфанилмочевины, изначально синтезированные как антибактериальные препараты; антипсихотическая активность фенотиазинов; антидепрессивный эффект изониазида и имипрамина; противосудорожные эффекты натриевой соли вальпроевой кислоты; эффект силденафила при эректильной дисфункции, изначально предназначенный для лечения симптомов стенокардии (Parvova *et al.*, 2011).

## Цикл разработки новых лекарственных средств

Процесс от создания лекарства до внедрения его в медицинскую практику длителен и включает доклиническую и клиническую стадии. Создание оригинального фармацевтического препарата обычно длится 10-12 лет.

Клинико-фармакологическая оценка потенциального лекарственного средства проходит четыре этапа; информация, получаемая по результатам предыдущего этапа, востребована для решения задач следующего этапа (рисунок 18).

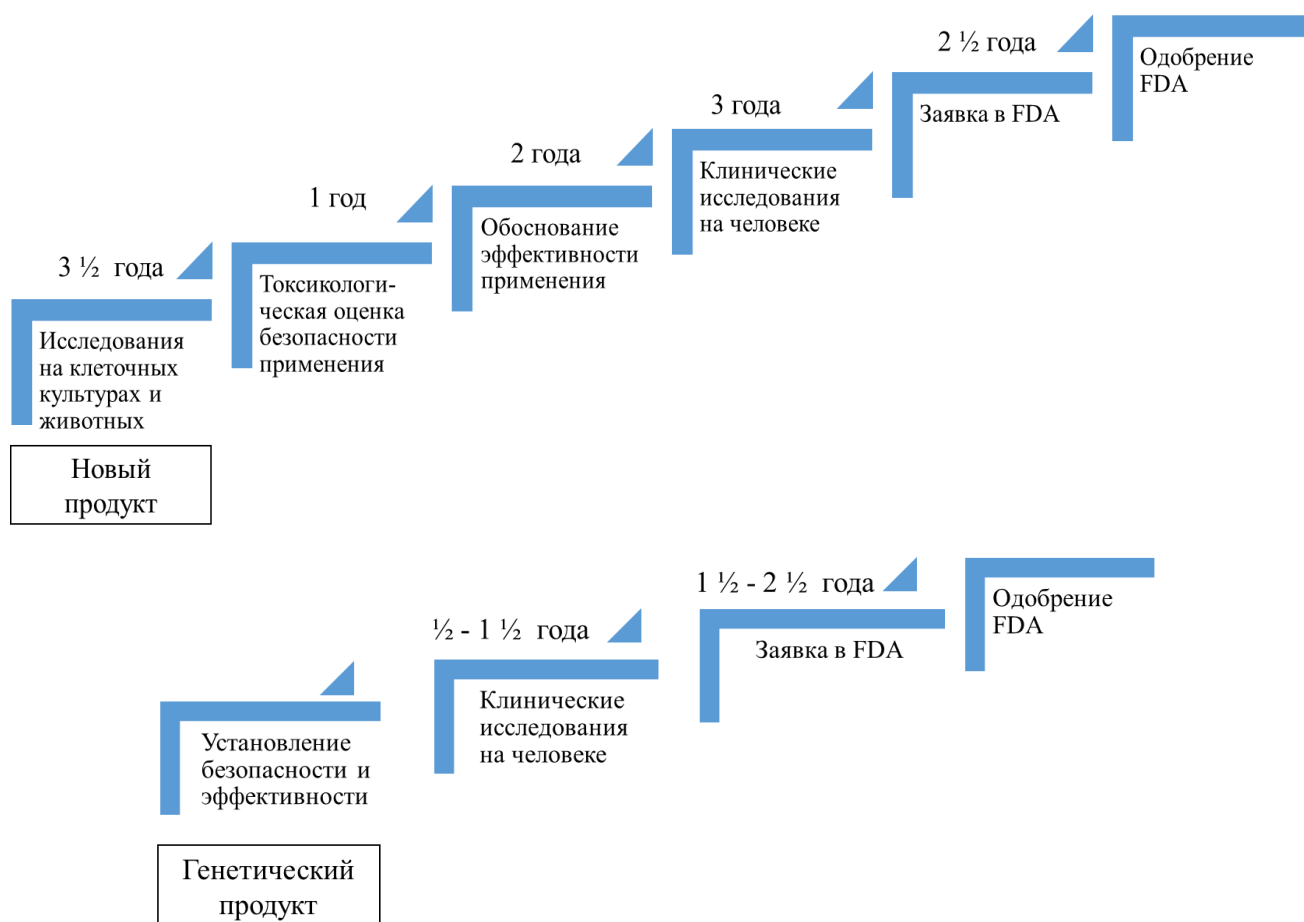


Рисунок 18. Основные этапы разработки препаратов и их продолжительность (адаптировано из: <https://www.fda.gov/>).

Доклинические фармакологические, токсикологические и фармакокинетические данные необходимы для проведения первой фазы клинических испытаний на организме человека.

Токсикологические исследования на здоровых животных имеют важное значение в доклинических исследованиях лекарственных средств. Они предоставляют информацию об условиях, при которых потенциально полезные для человека лекарства способны проявить токсичность. Токсикологические испытания также демонстрируют возможные побочные реакции и природу органа-мишени. Существуют тесты для определения диапазона дозировки, которые определяют: максимальную дозу, при которой не наблюдаются побочные эффекты; самый низкий уровень наблюдаемых побочных эффектов; максимально допустимая/переносимая доза, терапевтический индекс как соотношение между  $LD_{50}/ED_{50}$ .

### **Применение животных моделей для прогнозирования ответа организма человека**

Модели на животных широко используются в клинических испытаниях лекарственных средств, а также в токсикологии окружающей среды и изучении этиологии социально-значимых заболеваний. Модели *in vivo* особенно важны в доклинических исследованиях лекарственных средств, предназначенных для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и рассеянный склероз.

Тестирование на животных позволяет изучить механизмы заболевания и патогенетические стадии, что создает возможности для улучшения лечения и выявления новых терапевтических подходов.

Начиная с начала XX века в лаборатории Джексона (Бар-Харбор, Мэн, США), производство инбредных видов мышей и систематический сбор и описание встречающихся в природе мутантов составляет основу большинства современных испытаний с использованием экспериментальных животных.

*Справочно:*

*Лаборатория Джексона (сокращенно JAX) – это независимое некоммерческое биомедицинское исследовательское учреждение, являющееся онкологическим центром Национального института рака, и имеет центры передового опыта Национальной организации здравоохранения США в области старения и системной генетики. Лаборатория является мировым источником более 8000 штаммов генетически определенных мышей, базы данных информатики генома мышей и международным центром научных курсов, конференций, обучения и образования.*

Однако выявлено достаточное число примеров, показывающих, что модели на животных не во всех случаях могут предсказывать реакцию организма человека на лекарственное средство. Например, заболевания желчного пузыря человека не может быть исследовано на животных моделях лошадей и крыс – животных, у которых нет желчного пузыря. Еще более серьезной является проблема существенных различий в метаболизме лекарств и токсинов, встречающихся в организме человека – метаболизм лекарственных средств недопустимо изучать на высокоинбредных видах лабораторных грызунов.

Высокоинбредные виды лабораторных грызунов представляют собой экспериментальную однородную группу, в которой индивидуальные различия ограничиваются условиями индивидуальной окружающей среды и влиянием стохастических факторов. В таких случаях предполагается, что лабораторные животные, такие как крысы и мыши, стимулированные аналогичным образом, будут реагировать в большей или меньшей степени одинаково.

Существует ряд исследований, в которых проведено сравнение влияния лекарственных средств и химических соединений на организм человека и различные виды животных.

Примеры:

- вакцины против ВИЧ и/или SIV эффективны на обезьянах и шимпанзе, но не организме человека;
- большинство опухолевых образований у мышей представляют собой саркомы и лейкозы, в то время как большинство раковых опухолей человека являются карциномами.

В период 1976-1985 г.г. 209 новых лекарственных средств были разрешены после испытаний на животных для использования в США. Из них 198 наименований находились под контролем FDA на предмет нежелательных явлений и эффективности. Из этих 198 новых препаратов 52% были отменены или получили новые показания к применению из-за возникших острых и непредсказуемых побочных реакций, таких как фатальные аритмии, сердечный приступ, почечная недостаточность, судороги, дыхательная недостаточность, печеночная недостаточность и инсульт (Parvova *et al.*, 2011).

Тестирование канцерогенного потенциала противоопухолевых препаратов и химиотерапии на животных также не всегда успешно. Так, в частности, известно, что более 1600 химических веществ вызывают опухоли у грызунов, но только 15 из 1600 проявляют канцерогенность на клетки человека; изониазид и фенobarбитал вызывают опухоли у животных, в то время как они обычно используются для лечения заболеваний человека в клинической практике. Практически все применяемые в настоящее время препараты вызывают врожденные аномалии у некоторых видов животных. В исследованиях, проведенном в Национальном институте рака, большинство испытанных препаратов, которые были эффективны против опухолей человека, не оказали никакого воздействия на аналогичны опухоли человека, имплантированные мышам (Parvova *et al.*, 2011).

Для прогнозирования реакции человека предложена концепция причинно-аналоговых моделей. Для прогностической ценности причинно-аналоговой

модели не должно быть противоречий причинной релевантности между моделью и смоделированной системой.

До тестирования на человеке результаты моделей на животных позволяют сформулировать первичную гипотезу реакции человека.

### **Экстраполяция данных с модели на животных на организм человека**

Несоответствие между моделями на животных и исследованиями на человеке может быть связано с отклонением или неспособностью животных моделей имитировать соответствующие заболевания человека.

Ряд фармакологических моделей доказали эффективность, а именно: диабет, индуцированный стрептозоцином, у мышей; аритмии, вызванные дигоксином; экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит – модель рассеянного склероза; астма; артрит, индуцированного коллагеном; эпилепсия, вызванная химическими агентами или электрическим током.

Модели на животных занимают центральное место в аутоиммунных исследованиях, и существует множество данных, демонстрирующих преимущества этих моделей для определения механизма заболевания. Так, в частности, тромболизис тканевым активатором плазминогена столь же эффективен в моделях ишемического инсульта на животных, как и в клинических испытаниях на человеке. Введение стероидных гормонов до рождения снижает респираторный дистресс у новорожденных у животных и в клинических испытаниях на человеке (Parvova *et al.*, 2011).

Мета-анализ рандомизированных клинических испытаний на человеке показал эффективность нескольких лекарств в ряде заболеваний, связанных с невропатической болью. Большинство антидепрессантов, опиоидных анальгетиков, местных блокаторов натриевых каналов и противоэпилептических препаратов с различными механизмами действия продемонстрировали эффективность на животных моделях невропатической боли, что показывает



ценность этих моделей для прогнозирования положительных результатов на организме человека.

Несмотря на преимущественные характеристики, для животных моделей выделяют ограничения. В отличие от соответствующих животных моделей гипертонии, диабета и многих других заболеваний, создание моделей на животных, идентичных заболеваниям человека, в области психических расстройств, требует наибольших усилий. Некоторые симптомы, такие как искажения восприятия или психозы, сложно моделировать. Предполагается, что в последующие годы акцент сместится с создания поведенческих реакций животных, фенотипически напоминающих аспекты психических расстройств человека, на развитие экспериментальных животных, у которых молекулярные и клеточные аномалии идентичны причинам психических расстройств человека. С установлением соответствующих поведенческих критериев, используемых для замены эффектов у людей, животные модели становятся важным доклиническим инструментом, который можно использовать для открытия антипсихотических препаратов.

### **Определение дозы фазы I клинических испытаний**

Разработка лекарств – это поэтапный процесс, включающий оценку эффективности и безопасности как на животных, так и на человеке. Цели доклинической оценки безопасности включают:

- определение токсического воздействия на органы-мишени;
- дозовой зависимости;
- реакции на экспозицию;
- потенциальной обратимости.

Эта информация используется для первоначальной установки безопасной начальной дозы и диапазона доз для любого клинического испытания на человеке, а также параметров для клинического мониторинга возможных побочных реакций.

Предельные дозы для исследований острой, субхронической и хронической токсичности в 1000 мг/кг/день для грызунов и не грызунов считаются подходящими во всех случаях, кроме указанных ниже. В тех немногих ситуациях, когда доза 1000 мг/кг/день не приводит к 10-кратному среднему пределу воздействия при клиническом воздействии, а доза клинического воздействия превышает 1 г в день, дозировка в исследованиях токсичности должна быть ограничена 10-кратным пределом воздействия, или дозой 2000 мг/кг/день, или максимально допустимой дозой (по критерию наименьшего значения).

Каждые 3 из 10 новых молекул, которые проходят фазу I клинических испытаний на человеке, приостанавливаются вследствие негативной фармакокинетики или токсичности.

В 2004 году FDA опубликовал свои позиции по клиническим испытаниям с микродозами (<https://www.fda.gov/>).

Микродоза определяется как 1/100 дозы, которая, как предполагается, вызывает фармакологический эффект, но не более 100 мкг.

Определение первичной дозы для человека является важным элементом обеспечения безопасности участников фазы I клинических испытаний. При назначении дозы учитывается вся доступная информация, и первичная доза определяется индивидуально для каждого случая.

В последние годы были введены различные параметры, такие как «отсутствие наблюдаемых побочных эффектов» (NOAEL, от англ. «no observed adverse effect level»), определяемый наиболее чувствительными и релевантными моделями на животных в доклинических исследованиях, и минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта (MABEL, от англ. «minimum anticipated biological effect level»).

Последнее связано с внедрением высокотехнологичной и биотехнологической продукции. Экстраполяция данных с животных моделей на

людей может быть достигнута с помощью аллометрического моделирования, основанного на измерении массы тела, площади поверхности тела с помощью PK-моделирования или PK/PD-моделей.

Аллометрический подход – это метод прогнозирования фармакокинетики человека на основе доклинических *in vivo* данных. Аллометрическое моделирование связывает физиологические функции у разных видов с массой тела. Это простой и неточный количественный метод, который можно использовать с препаратами, выводящимися посредством почечной фильтрации. Первоначально метод предложен для объяснения взаимосвязей между размером органов и массой тела у млекопитающих. Несмотря на преобладание физиологических подходов, методы масштабирования на основе аллометрии для графического отображения межвидовых фармакокинетических данных являются наиболее широко используемыми вследствие простоты воспроизведения.

Экстраполяция данных на основе определения площади поверхности тела была впервые применена в медицинской онкологии для определения начальной дозы для фазы I клинических испытаний противоопухолевых препаратов на стадии доклинических исследований токсичности. FDA рекомендует точную экстраполяцию дозы экспериментального животного на дозу для человека на основе площади поверхности тела, выраженной в мг/м<sup>2</sup> (табл. 1).

Дозу для человека можно точно рассчитать по следующей формуле:

$$Y = \frac{X \times K_m}{K_m},$$

где  $Y$  – эквивалентная доза для человека, определяемая в мг на кг массы тела;

$X$  – доза для животного, определяемая в мг на кг массы тела;

$K_m$  – коэффициент пересчета; рассчитывается делением массы тела в кг на площадь поверхности тела в м<sup>2</sup> (Parvova *et al.*, 2011).

Таблица 19. Преобразование дозы для животных в начальную дозу для человека\*

Вид	Вес (кг)	Площадь поверхности тела, м <sup>2</sup>	K <sub>м</sub> человека
Человек			
- взрослые	60	1,6	37
- дети	20	0,8	25
Павиан	12	0,6	20
Собака	10	0,5	20
Обезьяна	3	0,24	12
Кролик	1,8	0,15	12
Морская свинка	0,4	0,05	8
Крыса	0,15	0,025	6
Хомяк	0,08	0,02	5
Мышь	0,02	0,007	3

Адаптировано из: Parvova *et al.*, 2011.

Коэффициент  $K_m$  (вес (кг), деленный на площадь поверхности тела (м<sup>2</sup>)), используется для пересчета дозы в мг/кг.

Дозы, полученные в исследованиях на животных, которые достигли LD<sub>10</sub>, используются для определения безопасной начальной дозы для человека в клинических испытаниях фазы I. Начальная доза для человека составляет 1/10 LD<sub>10</sub> для соответствующих видов животных, трансформированных аллометрически на основе площади поверхности тела.

В случае использования в фазе I испытаний начальных доз, рассчитанных на основе индивидуальной площади поверхности тела, возможно непрогнозируемых реакций на введение лекарственных средств. Это связано с тем, что при определении начальной дозы для человека на основе площади поверхности тела не учитывается механизм выведения лекарств. Таким образом,

возможна передозировка или субдозировка, и как следствие, снижение терапевтического ответа. Связи с этим, ряд исследователей отказались от этого подхода в пользу фиксированных доз лекарств, рассчитанных на основе среднего значения площади поверхности тела 1,86 м<sup>2</sup>. Такое «повышение» дозы может повысить терапевтический результат у отдельного пациента.

### **Фармакокинетическое моделирование**

В то время как эмпирические подходы информативны для клиренса, объема распределения и периода полужизни в плазме, моделирование фармакокинетики в интактной системе позволяет прогнозировать изменения концентрации лекарственного средства с течением времени.

Проспективное и ретроспективное моделирование фармакокинетики при пероральном приеме дает возможность определить полный фармакокинетический профиль каждого потенциального лекарственного средства (соотношение ткань/плазма, связывание с белками, липофильность, метаболический клиренс, микросомальный или гепатоцитарный клиренс *in vitro*, скорость и степень абсорбции,  $pK_a$ , растворимость, проницаемость, лекарственная форма).

### **Модели *in vitro* – альтернатива исследованиям на животных**

В последние годы наметилась растущая тенденция к ограничению использования лабораторных животных в исследованиях потенциальных и допущенных к применению лекарственных средств.

Ряд европейских директив и руководств рекомендуют ограничить использование экспериментальных животных на основании этических и научных правил и положений по защите животных.

Основываясь на современных научных знаниях, ограниченное использование лабораторных животных соответствует описанному ранее правилу «3R».

Сокращение означает:

- снижение вероятности повторения исследований;
- ограничение исследований на животных, результаты которых невозможно экстраполировать на организм человека;
- повышение качества тестов;
- повышение информативности тестирования на меньшем количестве животных.

Усовершенствование означает применение новых современных методов и повышение качества жизни лабораторных животных (необходимость снижения риска и степени их страданий).

Замена означает разработку *in vitro* методов и моделей на основе клеток млекопитающих, альтернативных экспериментам на животных.

При разработке моделей *in vitro* необходимо учитывать два основных фактора, которые не должны противоречить друг другу:

- 1) текущие научные разработки *in vitro* моделей, которые потенциально являются одним из наиболее эффективных способов сокращения или замены лабораторных животных;
- 2) информация о безопасности, полученная с помощью *in vitro* методов, должна быть по крайней мере эквивалентной информации, полученной при стандартном *in vivo* исследовании.

### **Фармакогенетика и фармакогеномика**

В настоящее время для фармакокинетического моделирования используются различные культуры клеток и компьютерное моделирование. Большинство заболеваний и разработка лекарств исследуются на уровне генов и генома.

Сравнительная геномика обнаруживает удивительное генетическое сходство, выходящее за рамки границ отдельных видов. Между двумя отдельными индивидуумами существует множество значительных медицинских

генетических различий. Эти генетические различия отражают разнообразные генетические изменения, которые включают однонуклеотидный полиморфизм; наличие нескольких копий одного аллеля; эффекты вырезания и вставки генетического материала. Подобные индивидуальные вариации возможно обнаружить и в популяциях диких животных.

Если разные виды обладают сходством генов, то способы их регуляции могут существенно различаться с медицинской точки зрения (например, для изучения развития организма и реакции на лекарства и токсины). Одно из открытий проекта генома человека – высокая частота встречаемости однонуклеотидного полиморфизма. Когда генетические продукты представляют собой ферменты, участвующие в метаболизме лекарств или токсинов, результатом вариации однонуклеотидного полиморфизма в человеческой популяции является вариация реакции на введение лекарственных средств. Кроме того, многокопийные аллели могут влиять на заболеваемость и фенотипические различия. Генетический полиморфизм ферментов, переносчиков, рецепторов и других мишеней лекарств, связан с индивидуальными различиями.

### **Принципы проектирования доклинического исследования**

По этическим и экономическим причинам важно правильно спроектировать экспериментальные модели животных, чтобы было возможно экстраполировать данные на организм человека и использовать минимальное количество животных для достижения научных целей. При этом количество используемых животных не должно быть занижено из-за риска понижения эффективности выявления биологически важных эффектов.

План исследования представляет собой технический документ, включающий все компоненты исследования, определены цели исследования и дизайн для проведения в лабораторных условиях. План должен быть одобрен директором лаборатории или назначенным лицом (назначенное лицо – лицо с

соответствующей квалификацией, обучением и/или опытом работы в качестве руководителя лаборатории) и должен включать подробную информацию о названии исследования, цели, полномочиях и ответственность, ключевые контакты, введение и предыстория, а также

*Основные принципы.* Каждый эксперимент должен быть задокументирован с указанием:

- 1) цели тестирования и/или гипотезы, подлежащей проверке;
- 2) обоснованием выбора конкретной *in vivo* модели животного;
- 3) вида, породы, источника используемых животных;
- 4) подробной информации о каждом эксперименте, включая дизайн и количество животных;
- 5) инструкции:
  - по сбору образцов, хранению и транспортировке;
  - оборудование и аналитические методы, которые будут использоваться;
  - референсные диапазоны;
- 6) методы статистического анализа.

Валидация модели на животных в качестве предиктора реакции человека зависит от того, насколько модель похожа на человека с точки зрения конкретных исследуемых характеристик. Таким образом, валидация каждой модели, включая математические модели, модели *in vitro* или низшие тест-организмы, должна рассматриваться индивидуально для каждого случая.

После выбора модели задача эксперимента – определить реакцию на применяемое лечение.

Модели чувствительны к исследуемому фактору воздействия, если тест-объекты реагируют и различия в реакции между объектами минимальна. Любое неконтролируемое изменение, независимо от причины – инфекция, генетические факторы, факторы окружающей среды, возрастные различия и прочее – снижает возможности эксперимента по определению терапевтических эффектов.



При использовании мышей или крыс следует учитывать изогенные штаммы вследствие их фенотипической однородности, в отличие от традиционно используемых беспородных животных.

*Дизайн исследования.* Каждый эксперимент включает несколько экспериментальных единиц – единиц статистического анализа, которые формируются методом случайной выборки.

В случае *per os* введения препаратов с пищей и одинакового режима кормления, клетка с животными представляет собой одну единицу. Иногда отдельные животные могут быть экспериментальными единицами, указанными для конкретного лечения. В перекрестном дизайне каждому животному лечение производится с помощью x-, y- или z-факторов последовательно и случайным образом.

В планах с разделенными клетками существует более одного типа экспериментальных единиц. Например, клетке с двумя мышами может быть проведена рандомизированная последовательность обработок, например, введение с пищей (клетка становится экспериментальной единицей для сравниваемых терапий) и мыши внутри клетки могут получать одну из двух инъекций витаминов (мыши становятся экспериментальными единицами для оценки витаминного эффекта).

*Рандомизация.* Лечение проводится таким образом, чтобы каждая экспериментальная единица имела известные, иногда равные возможности для получения определенного лечения. Этот процесс, называемый рандомизацией, является ключевым фактором, потому что иногда есть известные и неизвестные переменные, которые могут отклонить результаты.

*Ослепление.* Для снижения риска субъективной оценки после рандомизации до анализа данных кодируют животных разных групп и реализуемые обработки.

*Пилотные исследования.* Пилотные исследования чаще всего включают одно животное и необходимы для первичной проверки гипотезы и логики предполагаемого эксперимента. Более крупные исследования предоставляют оценку средних и стандартных отклонений и некоторые индикаторы вероятного ответа, которые могут служить для определения размера выборки последующих экспериментов.

*Факторный дизайн* подразумевает более одного типа лечения или независимых переменных (например, доза и пол животных). В данном случае цель заключается в выяснении реакции на введение лекарственного средства и зависимости от пола (взаимодействие факторов или их усиление). В ряде случаев эффективно изучить влияние значительного числа факторов, которые могут повлиять на результаты эксперимента, возможно с помощью более совершенных факторных планов.

*Масштаб эксперимента.* Решение о масштабах эксперимента имеет решающее значение с точки зрения этических последствий животных, участвующих в исследовании.

Наиболее распространенный способ определения размера выборки основан на математической связи следующих параметров:

- размер эффекта;
- стандартное отклонение;
- выбранный уровень значимости;
- выбранная мощность;
- альтернативная гипотеза;
- размер/объем/доза образца.

Исследователь обычно определяет первые пять характеристик, которые, в свою очередь, определяют размер выборки.

*Величина эффекта.* При сравнении только двух групп величина эффекта – это разница в способе (для количественных переменных) или величине

(качественные переменные), которую исследователь определяет с помощью тестирования.

*Стандартное отклонение.* Обязательным условием планового дизайна является определение стандартного отклонения количественных характеристик для экспериментальных единиц.

*Уровень значимости.* Ценность эксперимента заключается в возможности статистически значимого определения конкретной величины эффекта при заданном уровне значимости и стандартном отклонении. Уровень значимости – это вероятность получения ложноположительного результата из-за ошибки выборки (ошибка типа I). Обычно уровень значимости составляет 5%, однако возможно использование и более низких уровней.

*Количественные данные.* Количественные данные эксперимента могут быть обработаны параметрическими методами, t-тестом (тест Стьюдента) для одной или двух групп, или ANOVA – для нескольких групп. Параметрические методы предпочтительнее из-за их большей мощности и гибкости. Они основаны на предположении, что существует нормальное распределение переменных, различия примерно одинаковы в каждой группе, а наблюдения независимы друг от друга.

*Непараметрический анализ.* Когда допущения, необходимые для t-теста и ANOVA (одинаковые вариации в каждой экспериментальной группе при нормальном распределении) недействительны, и отсутствуют для коррекции неоднородности шкалы преобразования, можно использовать непараметрические тесты для сравнения однородности средних значений или медианы. При сравнении двух групп критерий Уилкоксона и критерий Манна-Уитни (эквивалентны) создают непараметрический эквивалент двухвыборочного t-критерия. Тест Краскала-Уоллиса эквивалентен одностороннему дисперсионному анализу при сравнении нескольких групп.

Окончательные данные. Окончательные данные, как правило, часто представлены в виде частотных таблиц и/или долей или процентов.

Доли или проценты должны сопровождаться доверительными интервалами (предпочтительно) или стандартным отклонением при заданном значении повторностей ( $n$ ). Обычный метод сравнения – случайный табличный анализ  $\chi$ -квадрат для проверки нулевой гипотезы с независимыми переменными. Тест Фишера можно использовать как альтернативу.

### **Требования к оборудованию для доклинических исследований**

Персонал лаборатории должен иметь регулярный доступ ко всему оборудованию, необходимому для выполнения анализов в рамках лаборатории. Должны существовать стандартные операционные процедуры (СОП) и подтверждающая документация, такая как журналы технического обслуживания, которые демонстрируют и предоставляют доказательства того, что все приборы и оборудование надлежащим образом проверены, находятся в эксплуатации, подвержены проверке, очистке, обслуживанию, проходят тестирование и стандартизированы для обеспечения качества результатов анализа. Все профилактические работы и калибровки должны быть запланированы и выполнены не реже, чем рекомендовано производителями оборудования, чтобы обеспечить постоянную точность и продленный срок службы оборудования. Работоспособность всех инструментов и оборудования следует проверять перед первым использованием, после капитального ремонта или обслуживания, а также после перемещения, чтобы убедиться, что они работают в соответствии со стандартами.

### ***Рекомендации по документации***

Лаборатория должна вести документацию по всем плановым профилактическим и внеплановым ремонтным работам, сервисным записям и

калибровкам на используемое оборудование. В перечень обязательной документации по техническому обслуживанию и калибровке входят:

- идентификационный номер оборудования;
- дата и время проведения технического обслуживания/калибровки;
- выполненные работы по техническому обслуживанию;
- результаты калибровки;
- идентификационные данные персонала, выполняющего работы по техническому обслуживанию;
- необходимые последующие действия по техническому обслуживанию/калибровке.

### ***Общие рекомендации к эксплуатации оборудования***

Персонал должен проводить все профилактические работы и обслуживание в соответствии со спецификациями производителя, соблюдая следующие правила:

- персонал должен содержать все оборудование в чистоте, избегая скопления пыли и разливов, которые могут оказать отрицательное воздействие на безопасность персонала, работу оборудования и, как следствие, достоверность полученных результатов;
- лаборатория должна соблюдать задокументированные ежедневные, еженедельные и/или ежемесячные планы планового обслуживания всего используемого оборудования и своевременно фиксировать выполнение этих задач в соответствующих журналах;
- для оборудования, которое не имеет стандартных требований к техническому обслуживанию и функциональных проверкам, лаборатория должна установить график и процедуру, которые объективно отражают рабочую нагрузку и эксплуатационные характеристики.

## **Стандартные операционные процедуры**

*Стандартные операционные процедуры (СОП)* – документально оформленные инструкции по выполнению рабочих процедур или формализованные алгоритмы выполнения действий, исполнения требований стандартов.

План контроля документации, обеспечивающий следующие важные элементы СОП:

- наличие основного списка СОП, используемых в настоящее время в лаборатории, который содержит названия всех документов (в электронной и бумажной форме), используемую версию и даты вступления в силу;
- точность и актуальность СОП с методологической точки зрения;
- пересмотр СОП ежегодно и документирование результатов проверки;
- создание системы для отслеживания всех изменений, внесенных в утвержденный СОП (все процедуры в рамках одного доклинического исследования должны быть проведены согласно утвержденным СОП без внесения изменений);
- отслеживание обновлений в ресурсных материалах, объявлениях организации и сообщениях производителя реактивов и расходных материалов, используемых в СОП.

### ***Категории СОП***

Исчерпывающие списки категорий СОП можно найти в справочной литературе. Общие категории СОП могут включать следующие позиции:

- калибровка и обслуживание оборудования;
- управление образцами и последовательность поставок: включает этапы транспортировки, обработки и хранения образцов, необходимые для сохранения качественных и количественных характеристик образцов;

- положительная идентификация образцов и контрольные журналы от места сбора до доставки результатов;
- процедуры тестирования: включают этапы, описывающие выполнение задач, процессов и анализов, отформатированные последовательно;
- контроль качества выполнения СОП;
- отчетность по тестам и управление процессом документирования лабораторных анализов;
- безопасность: описание инженерных средств контроля, средств индивидуальной защиты и мер по снижению рисков для личной безопасности в лабораторной среде;
- операции лабораторной информационной системы: пошаговое описание подробностей рутинных операций;
- помещения: описание процедуры обслуживания помещений для обеспечения оптимального качества работы и безопасности персонала и участников.

### **Контроль качества *in vivo* исследований**

Управление контролем качества должно включать процесс выявления и документирования аналитических проблем по мере их возникновения с конечной целью оценки точности и надежности процесса аналитического тестирования. Лаборатория должна установить и соблюдать письменные процедуры контроля качества для каждой тестовой системы, чтобы обнаруживать как немедленные ошибки, так и изменения, которые происходят с течением времени. Периодичность выполнения, количество используемых материалов, а также тип материалов для контроля качества должны определяться лабораторией. Все неудачные результаты контроля качества должны быть исследованы в соответствии с задокументированной программой контроля качества.

## ***Частота испытаний для контроля качества и типы контрольных материалов***

Образцы контроля качества должны тестироваться таким же образом, как исследовательские образцы, и персоналом, который регулярно проводит тестирование.

Для определения количества и частоты тестов контроля качества можно руководствоваться следующими рекомендациями:

- для количественных тестов использовать контрольные материалы более чем на одном уровне, например, «высокий» и «низкий» контроль;

*Примечание. Контроли должны подтверждать эффективность анализа на уровне результатов, на котором принимаются доклинические решения или решения по исследованию. Например, медицинские решения могут быть приняты для уровней глюкозы у участников исследования 45 мг/мл и 180 мг/мл; два уровня контрольных материалов должны быть репрезентативными для этих результатов.*

- для качественных тестов включать положительный и отрицательный контроли в каждый цикл;
- для окрашивания по Грамму красители требуют использования как грамположительных, так и грамотрицательных контрольных организмов один раз в неделю и при каждой смене номера партии любого компонента в процедуре окрашивания; возможен ежедневный контроль качества с использованием положительно реагирующего организма и отрицательного, который может включать образец животного;
- аналитический цикл, охватывающий временной интервал, в течение которого точность и прецизионность анализа будет сохранять стабильность, должен основываться на инструкции производителя, не должен превышать 24 ч, например, согласно инструкции



производителя, реагенты для глюкозы на их платформе стабильны в течение 8 ч; в этом случае необходимо провести контроль качества каждые 8 ч или 3 раза в сут, если прибор работает 24 ч/сут.

Ежедневный контроль качества рекомендуется в следующих ситуациях:

- если результаты используются для определения первичной конечной точки или критических определений безопасности.
- при изменении реагентов устройства, исследуемых животных и/или аналитов;
- при получении новой партии тест-наборов реагентов;
- если температура в зоне хранения тестового набора выходит за пределы рекомендованного производителем диапазона.

### **Валидация и проверка методов испытаний**

*Аналитическая валидация* – это процесс, используемый для подтверждения объективными доказательствами того, что разработанный и/или модифицированный метод тестирования или система тестов обеспечивает получение надежных достоверных результатов. От лабораторий требуется проводить аналитическую валидацию или верификацию каждого непроверенного теста, метода или системы инструментов перед использованием в доклиническом исследовании. Технические характеристики метода (т.е. применимые аналитические рабочие характеристики теста, такие как точность, прецизионность и т.д.) должны быть валидированы или проверены на месте тестирования.

*Аналитическая чувствительность* может быть проверена путем приготовления разведений контролей, стандартов или образцов и определения самой низкой точной концентрации. Значения аналитической чувствительности, которые меньше применимого стандартного отклонения метода, обычно являются ненадежными индикаторами.

Точность каждого теста должна быть установлена путем повторного измерения образцов при различных концентрациях или активности (например, при измерении с помощью ферментативных реакций).

Определение экспериментальной аналитической специфичности (аналитических помех) проводится для оценки систематической ошибки, вызванной неаналитическими материалами и факторами (такими как гемолиз, желтуха, липемия, химические соединения или лекарственные препараты), которые могут присутствовать в анализируемом образце.

### **Документирование и отчетность**

Вся дополнительная информация и документация, создаваемая в процессе проведения доклинического исследования, такая как отслеживание образцов, цепочка поставок, наличие нормальных диапазонов в отчетах и идентификация лабораторий-исполнителей, имеют решающее значение для подтверждения достоверности результатов испытаний.

По этой причине лаборатории, участвующие в тестировании образцов доклинического исследования, должны вести соответствующие записи и отчеты в соответствии со стандартами, включающие:

- формы отслеживания образцов;
- документы цепочки поставок;
- лабораторные отчеты;
- журналы обслуживания и ремонта оборудования (все записи, относящиеся к техническому обслуживанию, ремонту, мониторингу температуры, валидации, а также любая другая соответствующая документация).
- аналитическое сравнение результатов с эталонными интервалами (если применимо).
- документация источника исходных данных (лабораторные рабочие листы, записи, заметки или их точные копии), которые являются

результатом исходных наблюдений и действий доклинического лабораторного *in vitro* исследования и необходимы для формирования отчета текущего исследования;

- сохранение записей в архиве.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижение современного уровня медико-биологических исследований возможно лишь при унификации всех факторов, воздействующих на организм лабораторных животных, путем строгой стандартизации как условий содержания, так и самих животных. Введение в мировую практику стандартов GLP для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ предъявило еще более жесткие условия к проблеме стандартизации качества животных.

Применение *in vivo* моделей является важной частью процесса разработки новых лекарственных средств и терапевтических подходов. Выбор дизайна и методологии проведения биомедицинских/доклинических исследований становится чрезвычайно важным, особенно с разработкой и внедрением в клиническую практику моноклональных антител, иммунологических лекарственных средств, методов направленной доставки лекарств, биоактивных молекул, генов и инновационных терапевтических подходов при лечении сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний. Это требует оценки их влияния на физико-химические и биологические процессы, происходящие в живом организме на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях.

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

в/б – внутрибрюшинно

в/м – внутримышечно

п/к – подкожно

п/о – перорально

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЛЭК – локальный этический комитет

мм рт. ст. – миллиметр ртутного столба

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты

СОП – стандартная операционная процедура

ТНЗ – термонеутральная зона

BCS (от англ. body condition score) – шкала оценки состояния животного

ЕС – Европейский Союз

$E_v$  – интенсивность освещения

FELASA (от англ. Federation of laboratory animal science association) – Федерация европейских научных ассоциаций по лабораторным животным

FDA (от англ. Food and Drug Administration, букв. «Управление еды и лекарств») – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов –

G (от англ. gauge) – размер иглы

GLP (от англ. Good Laboratory Practice) – надлежащая лабораторная практика

GMP (от англ. Good Manufacturing Practice) – надлежащая производственная практика

HEPA (от англ. high-efficiency particulate air) – фильтр с высокоэффективным удержанием частиц из воздуха

IASP (от англ. International Association for the Study of Pain) – Международная ассоциация по изучению боли

MABEL (от англ. «minimum anticipated biological effect level») – минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта

NOAEL (от англ. «no observed adverse effect level») – отсутствие наблюдаемых побочных эффектов

per os – пероральное введение

SPF-животные (от англ. specific pathogen free) – животные, свободные от специфической патогенной микрофлоры

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдай, Е. А. Генетическое разнообразие экспериментальных мышей и крыс: история возникновения, способы получения и контроля / Е. А. Гайдай, Д. С. Гайдай // Лабораторные животные для научных исследований. – 2019. – Т.4. – С. 1-9.
2. Галушин, В. М. Международные и российские рекомендации по соблюдению принципов биоэтики / В. М. Галушин, Н. Н. Марфенин. – Тез. докл. Всеросс. конф. «Науки о жизни и образование». – Изд-во: МГУ, 2009. – С. 231-235.
3. Гильдеева, Г. Н. Актуальные проблемы доклинических исследований: переход к альтернативной *in vitro* токсикологии / Г. Н. Гильдеева. – Вестник Росздравнадзора. – 2015. – № 5. С. 59-62.
4. Госманов, Р. Г. Микробиология: учебное пособие / Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин, А. Х. Волков, А. И. Ибрагимова. – СПб.: Изд-во «Лань», 2017. – 496 с.
5. Горохов, Д. Б. Проблемы качества и эффективности применения Закона об ответственном обращении с животными / Д. Б. Горохов // Журнал российского права. – 2020. – № 4. – С. 153-171.
6. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология: учебник / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – СПб.: Лань, 2014. – 624 с.
7. Лещенко, Д. В. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома / Д. В. Лещенко, Н. В. Костюк, М. Б. Белякова, Е. Н. Егорова, М. В. Миняев, М. Б. Петрова // Верхневолжский медицинский журнал. – 2015. – Т.14. – С.34-39.
8. Макаренко, И. Е. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным / И. Е. Макаренко, О. И. Авдеева, Г. В.

- Ванатиев, А. В. Рыбакова, С. В. Ходько, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров // Международный вестник ветеринарии. – 2013. – Т. 3. – С. 72-78.
9. Макарова, М. Н. Требования к освещенности в помещениях вивария и питомника лабораторных животных / М. Н. Макарова, А. В. Рыбакова, К. Ю. Кильдибеков // Междунар. вестник ветеринарии. – 2017. – №3. – С. 138-147.
10. Макарова, М. Н. Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных / М. Н. Макарова, А. В. Рыбакова, Я. А. Гущин, В. В. Мужикян, В. Г. Макаров // Междунар. вестник ветеринарии. – 2016. – №1. – С. 82-104.
11. ОСТ 64-072-89 Средства лекарственные. Таблетки. Типы и размеры.
12. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств: часть первая // Под редакцией А. Н. Миронова. – Изд-во: ФГБУ ФГБУ «НЦЭМСП» Минсоцразвития, 2012. – 942 с.
13. Чумаков, В. Ю. Анатомия животных: учебное пособие / В. Ю. Чумаков. – М.: Литерра, 2013. – 848 с.
14. Barclay, R. J. The disturbance index: a behavioral method of assessing the severity of common laboratory procedures on rodents / R. J. Barclay, W. J. Herbert, T. B. Poole. – UK: Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, 1988. – 35 p.
15. Beynen, A. C. Nutrition and experimental results. In Principles of Laboratory Animal Science / A. C. Beynen, M. E. Coates, F. M. Bert, L. F. M. van Zutphen, V. Baumans, A. C. Beynen // Amsterdam: Elsevier Scientific Publishers. – 2001. – P. 111-128.
16. Blood Collection from the Lateral Saphenous. Vein in Mice and Rats. SOP Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines, 2015 (<https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACS-2012-Tech02.pdf>). Просмотрено: 10.04.2021.



17. Burkholder, T. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice / T. Burkholder, C. Foltz, E. Karlsson, C. G. Linton, J. M. Smith // Curr Protoc Mouse Biol. – 2012. – Vol. 2. – P. 145-165.
18. Code of practice for the housing and care of laboratory mice, rats, guinea pigs and rabbits / Victorian Government department of primary industries. Australia, 2004. – 70 p.
19. Convenor, M. M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units / M. M. Convenor Berard, R. Feinstein, A. Gallagher, B. Illgen-Wilcke, K. Pritchett-Corning, M. Raspa // Lab Anim. – 2014. – Vol. 48(3). – P. 178-192.
20. Danneman, P. J. The Laboratory Mouse / P.J. Danneman, M.A. Suckow, C. Brayton. – Boca Raton: CRC Press, 2001. – 184 p.
21. Balls, M. Rex Leonard Burch: Humane Scientist and Gentle Man / M. Balls // ATLA. – 2014. – Vol. 42. – P. 57–59.
22. DeSesso, J. M. Anatomical and Physiological Parameters Affecting Gastrointestinal Absorption in Humans and Rats / J. M. DeSesso, C. F. Jacobson // Food and Chemical Toxicology. – 2001. – Vol. 39. – P. 209-228.
23. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Text with EEA relevance, [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri = celex:32010L0063](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32010L0063).
24. Donovan, J. Handling and Restraint / J. Donovan, P. Brown // Current Protocols in Neuroscience. – 2004. – Vol. 27. – P. 1-6.
25. Diehl, K. H. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes / K. H. Diehl, R. Hull, D. Mopton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J. M. Vidal, C. van de Vorstenbosch // J. of Appl. Toxicol. – 2001. – Vol. 21 (1). – P. 15-23.

26. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Appendix A. – Strasbourg, 2006.
27. Flecknell, P. Laboratory Animal Anaesthesia / P. Flecknell. – USA: Academic Press Elsevier, 2009. – 325 p.
28. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The national academies press. Washington D.C., 2010. – 326 p.
29. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. USA: The National academies press, 2011. – 246 p.
30. Hickman, D. L. Use of a Body Condition Score Technique to Assess Health Status in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease / D. L. Hickman, M. Swan // J Am Assoc Lab Anim Sci. – 2010. – Vol. 49(2). – P. 155-159.
31. Kaliste, E. The Welfare of Laboratory Animals / E. Kaliste. – Finland: Springer, 2007. – 358 p.
32. Krause, J. Biodecontamination of animal rooms and heat-sensitive equipment with vaporized hydrogen peroxide / J. Krause, G. McDonnell, H. Riedesel // Contemp Top Lab Anim Sci. – 2001. – Vol. 40(6). – P. 18-21.
33. McGuill, M. W. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques / M. W. McGuill, A. N. Rowan // ILAR News. – 1998. – Vol. 31. – P. 5-18.
34. Morton, D. B. Removal of blood from laboratory mammals and birds / D. B. Morton, D. Abbot, R. Barclay, B. S. Close, R. Ewbank, D. Gask, M. Heath, S. Mattic, T. Poole, J. Seamer, J. Southee, A. Thompson, B. Trussell, C. West, M. Jennings // Laboratory Animals. – 1993 – Vol. 27 – P. 1-22.
35. Parvova, I. Animal models of human diseases and their significance for clinical studies of new drugs / I. Parvova, N. Danchev, E. Hristov // J. Clin. Med. – 2011. – Vol. 4(1). – P. 19-29.
36. Perret-Gentil, M. I. Recommended Surgical Analgesic Protocols for Mice and Rats. The University of Texas at San Antonio: Animal User Training Program

- (<http://research.utsa.edu/research-funding/laboratory-animalresources-center/training/>). Просмотрено: 31.03.2021.
37. Perret-Gentil, M. I. Rat bi methodology. The University of Texas at San Antonio: Animal User Training Program, 2015 (<http://research.utsa.edu/research-funding/laboratory-animalresources-center/training/>). Просмотрено: 31.03.2021.
38. Poole, T. Meeting a mammal's psychological needs / T. Poole, D. J. Shepherdson, J. D. Mellen M. Hutchins. – Washington: Smithsonian Institute Press, 1998. – P. 83-94.
39. Ritskes-Hoitinga, J. Nutrient Requirements, experimental design and feeding schedules in animal experimentation. / J. Ritskes-Hoitinga, A. Chwalibog, J. Hau, G. L. Hoosier. – Boca Raton: CRC Press, 2003. – P. 281-310.
40. Russell, W. M. S. The Principles of Humane Experimental Technique / W. M. S. Russell, R. L. Burch. – London: Methuen & Co. Limited, 1959. – 252 p.
41. Schlingmann, F. Behavioural differentiation of mice housed on different cage floors / F. Schlingmann, H. A. van de Weerd, H. J. M. Blom, V. Baumans, L. F. M. van Zutphen // Proceedings of the fifth FELASA symposium, Brighton UK, Royal Society of Medicine Press. – 1994. – P. 335-357.
42. Smith, E. Evaluation of cage microenvironment of mice housed on various types of bedding materials / E. Smith, J. D. Stockwell, I. Schweitzer, S. H. Langley, A. L. Smith // Contemp Top Lab Anim Sci. – 2004. - Vol. 43. – P. 12-17.
43. Stephans, M. L. Personal Reflections on Russell and Burch, FRAME, and The HSUS / M. L. Stephans // ATLA. – 2009. – Vol. 37. – P. 29–33.
44. Tuttle, A. H. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice / A. H. Tuttle, V. M. Philip, E. J. Chesler, J. S. Mogil // Nat Methods. – 2018. – Vol.15 (12). – P. 994-996.

45. Ullman-Culleré, M. H. Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice / M. H. Ullman-Culleré, C. J. Foltz // *Lab Anim Sci.* – 1999. – Vol. 49(3). – P. 319-23.
46. Van Loo, P. L. Modulation of aggression in male mice: Influence of group size and cage size / P. L. Van Loo, J. A. Mol, J. M. Koolhaas, B. M. Van Zutphen, V. Baumans // *Physiol Behav.* – 2001. – Vol. 72. – P. 675-683.
47. Wang-Fischer, Y. Manual of stroke models in rats / Ed. by Y. Wang-Fischer. – Taylor & Francis Group, 2008. – 352 p.

### **РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ**

Сайт Международной ассоциации по изучению боли (IASP). URL: <https://www.iasp-pain.org/> (дата обращения: 22.04.21).

Сайт Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA). URL: <https://www.fda.gov/> (дата обращения: 22.04.21).

Официальный WEB-сайт публичных документов Европейского Союза (ЕС), опубликованных на 24 официальных языках ЕС. URL: <http://eur-lex.europa.eu/> (дата обращения: 24.04.21).