

**ПРАВИЛА
ЭТИЧЕСКОГО ОБРАЩЕНИЯ
С ЛАБОРАТОРНЫМИ
ЖИВОТНЫМИ
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РАБОТ
В НАУЧНОМ ЦЕНТРЕ
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ**

СОДЕРЖАНИЕ

О правилах GLP	1
Валидность моделей.....	5
Обучение работе с лабораторными животными.....	6
Подготовка и переподготовка сотрудников.....	6
Информирование и обучение сотрудников.....	7
Обучение персонала.....	7
Программы обучения персонала	8
Категория А FELASA – 1-й уровень	9
Категория А FELASA – 2-й уровень	10
Категория А FELASA – 3-й уровень	11
Категория А FELASA – 4-й уровень	11
Программа обучения для категории А, 1-й уровень	12
Программа обучения для категории А, 2-й уровень	13
Программа обучения для категории А, 3-й уровень	15
Рекомендации FELASA по образованию и обучению лиц, проводящих эксперименты на животных (категория В).....	17
Категория С – лица, ответственные за руководство экспериментами на животных	23
Программа обучения для категории С	24
Директивы FELASA по образованию специалистов в области науки о лабораторных животных (категория D)	26
Учебный план	27
Категорирование животных	40
Классификация животных-моделей	41
SPF – животные биомодели	43
Гнотобиотные животные-биомодели	43
Мониторинг здоровья лабораторных животных	45
Контроль качества животных и учет	45
Микробиологический мониторинг	47
Бактериологические исследования.....	50
Генетический мониторинг	50
Стандартизация линий лабораторных мышей	51
Технология содержания лабораторных животных	52
Основные правила содержания лабораторных животных.....	52
Требования к содержанию животных	53
Требования к корму для SPF-животных.....	53
Размещение лабораторных животных, находящихся в эксперименте	54
Параметры окружающей среды	54
Корма	55
Вода.....	56
Подстилка	56
Разное оборудование для содержания/ухода и использования животных в эксперименте	57
Санитария	57
Очистка и дезинфекция помещений для животных	57
Контроль за наличием вредителей (грызунов, вредных насекомых)	60
Обеспечение ухода при авариях, в воскресные дни и время отпусков	61
Утилизация отходов	62
Устройство вивариев.....	62
Энергоснабжение и освещение.....	63

Контроль шума	63
Помещения для санобработки клеток	63
Безопасность	64
Режим работы	64
Кормление	67
Работа с популяциями	68
Методы идентификации каждого вида	68
Ведение постоянных индивидуальных записей	69
Ветеринарная помощь	69
Приобретение, транспортировка и карантинирование лабораторных животных	69
Документация и соглашения при покупке животных	69
Транспортировка лабораторных животных	70
Карантин лабораторных животных	72
Карантин, адаптация и распределение животных, находящихся в эксперименте	73
Прием и первоначальная оценка животных	73
Карантинные помещения и процедуры для специально выращенных животных	74
Карантинные помещения и процедуры для животных из случайных источников	74
Изоляторы и процедуры для больных животных	74
Периоды физиологической, психологической и пищевой адаптации	74
Программа разделения животных по видам, источникам приобретения и состоянию здоровья	75
Наблюдение, диагностика, лечение и контроль здоровья животных	75
Биобезопасность при работе с лабораторными животными	76
Помещения для лабораторных животных	76
Лабораторная практика	76
Уровни биологической безопасности	77
Идентификация опасных факторов и оценка риска	79
Биобезопасность при работе с лабораторными животными	80
Ответственность персонала	80
Основные принципы проведения экспериментов	81
Планирование эксперимента	81
Средства диагностики	83
Проведение эксперимента	83
Фиксация животных	86
Наркоз и обезболивание	86
Допустимые методы эвтаназии животных	87
Имплантации	88
Нейромускулярный паралич	88
Электроиммобилизация	88
Валидность моделей болезней	89
Изучение поведения животных и рисков	89
Эксперименты с генетическим материалом	89
Эксперименты с опухолями	89
Исследования центральной нервной системы	90
Содержание с ограниченным кормлением и поением	90
Эксперименты на эмбрионах	90
Исследование механизмов и облегчения боли	90
Исследования состояния здоровья животных	90
Боль, страдание, аналгезия и анестезия	91
Медикаменты, используемые для каждого из видов	91
Контроль за использованием анестетиков и аналгетиков	91
Подготовка и опыт персонала, осуществляющего анестезию и эвтаназию	92

Хранение и контроль медикаментов	92
Общий порядок хранения	92
Процедура ведения записей	92
Проверка медикаментов и материалов на срок годности	92
Стандартные операционные процедуры	92
Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственных средств и ксенобиотиков	95
Место, время и достаточность животных в фармакотоксикологии	96
Об оценке эффективности лекарственных средств	98
Принципы, порядок и технологии проведения фармакологических и токсикологических исследований на лабораторных животных	99
Подготовка животных к опыту и организация эксперимента	99
Условия и порядок проведения токсикологических (фармакологических) исследований	100
Параметры безопасности лекарств	103
Технология оценки безопасности субстанций и лекарств	104
Подготовка проекта ФСП	105
Изучение хронической токсичности	107
От оценки пользы и риска фармвеществ – к клиническим испытаниям	108
Современные тенденции оценки биомедицинской безопасности	111
Использование мини-свиней в оценке биомедицинской безопасности	112
Использование рыб в экспериментальной работе	114
Стандартизованные модели токсичности	115
Новые модели в токсикогеномике и канцерогенезе	119
Альтернативные модели гено- и эмбриотоксичности	121
Тесты на организмах, живущих в воде	122
Тест эмбриональных стволовых клеток (EST)	122
Клеточные линии человека и животных	122
Альтернативные батареи тестов	123
Новые стратегии сочетания животных и альтернативных моделей	124
Рекомендуемая литература	125

Совершенствование и развитие биомедицинских технологий, возрастающие требования к контролю качества лекарств, БАДов, нутриентов, ужесточение гигиенических норм для химических, биологических и физических факторов, предъявляют новые требования к качеству и разнообразию лабораторных животных. Потребность в исследованиях на животных растет по мере разработки и внедрения инновационных средств и материалов на основе клеточных технологий, нанобиотехнологий и т.д.

После выхода в свет книги У.Рассела и Р.Берча “The Principles of Humane Experimental Technique” в мир науки вошла концепция гуманного использования животных в экспериментах или более кратко “Концепция 3R”.

Наряду с принципами качественной экспериментальной практики, указанные авторы предложили новую терминологию *альтернативного моделирования*:

- ✓ *частичное замещение* – метод частично исключаящий эксперимент на животных;
- ✓ *батарея тестов* – серия методов, выполненных в рамках дополнительного многофакторного эксперимента;
- ✓ *стратегия последовательных тестов* – выбор каждого теста и их построение осуществляется в виде последовательного процесса, состоящего из серии (батарей) тестов.

Эти и уже многие другие научные подходы, активно разрабатываемые в настоящее время, составляют методологическую и материальную основу как бурно развивающегося альтернативного моделирования, так и биоэтической концепции.

Обучение персонала строится на общепринятых в мировом сообществе принципах категорирования в соответствии с директивами FELASA. Важнейшей проблемой взаимодействия человека с лабораторными животными, является биобезопасность при работе с ними, идентификация опасных факторов и оценка рисков, а также ответственность персонала. С марта 2010 г. в России введены в действие Принципы надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009), предусматривающие приведение всех доклинических, внеклинических и экспертных исследований в соответствие с международными стандартами GLP. Это в свою очередь предполагает унификацию дизайна экспериментов, гармонизацию получаемых результатов и их интерпретацию в рамках требований и стандартов ECVAM, FELASA, OECD, FDA, EPA и др. Это особенно важно в проведении международной кооперации по исследованию генетического полиморфизма человека и животных. В этих случаях, как и во многих других ситуациях, универсальным принципом межлабораторной и международной кооперации является использование стандартных операционных процедур (СОП) – документов, подробно описывающих процедуры манипуляций, которые, как правило, подробно не описываются в протоколах конкретных исследований.

О правилах GLP

Необходимость гармонизации отечественных норм и правил проведения доклинических исследований с международными документами требует стандартизации методических подходов и принципов, включая использование альтернативных моделей. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP) являются важнейшей интегральной системой для сопоставимости результатов оценки качества получаемых в разных отечественных и зарубежных учреждениях данных.

Современная нормативная база по проведению доклинических исследований на лабораторных животных более или менее полно отражена в документах международных организаций, законах и подзаконных актах отдельных зарубежных стран. В Российской Федерации она находится на начальном этапе. Поэтому необходимо руководствоваться

существующими стандартами и требованиями доклинического тестирования как национального, так и международного уровня. В настоящее время в Российской Федерации принят Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств", наряду с ним можно руководствоваться существующими отечественными и зарубежными документами:

- ✓ Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики";
- ✓ Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2005 г.;
- ✓ Документах OECD по гармонизированным принципам Надлежащей лабораторной практики («Principles of Good Laboratory Practice») с внесенными изменениями от 1997 г., инкорпорированные в Директиву ЕС 2004/10/ЕС.
- ✓ Кодекс федеральных регламентов FDA (Code of Federal Regulations, CFR), 1979 г.

А также разделом 21 в работе «Продукты питания и лекарственные средства» («Food and Drugs») и главой 58 «Надлежащая лабораторная практика для доклинических лабораторных исследований» («Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies»).

Вопросы, касающиеся проведения ветеринарного надзора, регламентируются в ФЗ РФ «О ветеринарии» № 4979-1 от 14.05.1993 г.

Существуют правила безопасности, производственной санитарии, охранно-карантинного и ветеринарно-санитарного режимов на предприятиях биологической промышленности, утвержденные руководителем департамента ветеринарии Минсельхозпрода России, Главным Государственным ветеринарным инспектором 7 июня 1999 г.

Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 года «Об утверждении правил лабораторной практики» даны определение и методология применения Стандартных операционных процедур (СОП). В то же время российские GLP не гармонизированы с соответствующими международными принципами, разработанными Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР или OECD), т.е. существующие на данный момент российские СОПы должны быть приведены с международными стандартами. С марта 2010 г. в силу вступил национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», полностью аутентичный принципам GLP/OECD. Следует отметить, что в результате многолетнего опыта работы НЦБМТ РАМН и ряда учреждений РАН уже наработаны основные пакеты СОПов и существует база для подготовки новых. Тем не менее, СОПы и иные нормативные документы, используемые в Российской Федерации должны соответствовать стандартам, предлагаемым OECD, Международным инженерным консорциумом (IEC), Международной организацией по стандартизации (ISO), Комитетом по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для того, чтобы результаты этих исследований адекватно воспринимались международными организациями.

В 1982 году Генеральной Ассамблеей ООН принята Всемирная хартия природы, а в 2000 году принята Декларация земли – первый международный документ, на основании которых всем формам жизни обеспечивается существование.

В соответствии с вышеизложенными позициями данная работа направлена на обеспечение:

- ✓ проведения контролируемых исследований на лабораторных животных и альтернативных моделях;
- ✓ получения достоверных и воспроизводимых экспериментальных данных в опытах с использованием лабораторных животных;
- ✓ нормального физиологического развития лабораторных животных и состояния их здоровья;
- ✓ стандартности лабораторных животных по генетическим параметрам и

условиям содержания;

- ✓ стандартных условий содержания лабораторных животных при их воспроизводстве в питомниках и проведении экспериментов в экспериментально-биологических клиниках (вивариях), включая соответствия этих условий требованиям надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP);

- ✓ унификации требований к профессиональной подготовке кадров специалистов по работе с лабораторными животными;

- ✓ унификации требований к ведению необходимой документации по содержанию лабораторных животных при их воспроизводстве и использованию в экспериментальных исследованиях и других видах деятельности;

- ✓ безопасности работы с лабораторными животными;

- ✓ уменьшения количества лабораторных животных, используемых в экспериментах;

- ✓ соблюдения принципа гуманного отношения к лабораторным животным;

- ✓ охраны окружающей среды;

- ✓ основы для введения государственного контроля за содержанием лабораторных животных при их воспроизводстве и использовании в экспериментальных исследованиях и других видах деятельности.

Важным элементом создания полноценной базы для проведения доклинических исследований, включая традиционные и наноинженерные вещества и материалы, их токсикологическую экспертизу и оценку безопасности, является международная аккредитация российских учреждений и лабораторий со стороны Ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC).

Биоэтика – это философски-прикладная область знания, охватывающая моральные, юридические и социальные проблемы, такие как отношение человека к диким и домашним животным, а также проблемы, возникшие в связи с бурным развитием биотехнологии и биомедицинских исследований.

Практически единственным методом контроля и экспертизы лекарств, а также изучения биологических реакций на воздействие экстремальных факторов являются экспериментальные исследования только на животных. Наиболее общие принципы, которыми необходимо руководствоваться при проведении контролируемых исследований на живых объектах следующие:

- ✓ убедительные основания в необходимости планируемых экспериментальных исследований и невозможности замены животного какой-либо моделью или альтернативным объектом исследования;

- ✓ минимизация количества привлекаемых к исследованию животных за счет стандартизации условий эксперимента, повышения информативности методических приемов, исключения факторов, увеличивающих разброс экспериментальных данных;

- ✓ принятие необходимых мер, исключающих страдания животных;

- ✓ обязательное обеспечение надлежащего ухода за животными с учетом особенностей их этологии;

- ✓ гуманное отношение к животным (студенческая лабораторная работа, учебно-научный эксперимент, тестирование лекарственного препарата и др.).

Право на использование животных в экспериментах имеют высшие учебные, научно-исследовательские и лечебные учреждения, которые имеют специальные лаборатории.

Экспериментальную работу с животными могут проводить только те специалисты, у которых есть разрешение руководства госучреждения, имеющего лицензию на проведение исследовательских работ с использованием животных. Кроме того, эти специалисты несут ответственность за соблюдение правил содержания и использования

животных. Исследователи, проводящие эксперименты и вспомогательный персонал должны иметь достаточный опыт. Сотрудники экспериментальной лаборатории, имеющие среднее медицинское, ветеринарное или зоотехническое образование, аспиранты и студенты должны быть ознакомлены с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977 г.».

При публикации результатов исследований, экспериментатор должен обязательно указать, что проведение данного эксперимента было санкционировано решением Комиссии по биологической этике (КБЭ). Получение разрешения ответственным исполнителем на проведение эксперимента на лабораторных животных, возможно, только после того, когда исполнитель представит в комиссию по биоэтике «Заявку на проведение биоэтической экспертизы», «Программу экспериментального исследования на животных» и «Обоснование необходимости использования животных в данном исследовании» по установленной форме.

Исследователь должен обязательно представить письменное описание эксперимента, в котором должна быть формулировка цели исследования, описание всех экспериментальных процедур и методических приемов, характер и степень дискомфорта и риск возможных осложнений. Описание должно включать физическую активность, диету, прием препаратов, проведение нагрузочных и функциональных проб и др. При планировании эксперимента на животных исследователь должен руководствоваться принципами «трех R» (*replacement* – замена болезненных для животных экспериментов опытами, не причиняющими страданий; *reduction* – уменьшение числа опытов с животными; *refinement* – улучшение методики с целью облегчения страданий подопытных животных). Во всех случаях следует рассмотреть возможность использования альтернативных методов.

Альтернативный метод – это метод, применяемый для уменьшения количества животных, улучшения условий содержания или замены использования экспериментов на животных в биомедицинских исследованиях и проведения тестов с квалификационной или образовательной целью.

Replacement (выбор и замена) – замена в опыте, когда это возможно, высокоорганизованных животных менее развитыми живыми объектами, альтернативными методами: экспериментами на культуре клеток и тканей, изолированными органами, физико-химическими и биохимическими системами, экспериментами на микроорганизмах и растительных объектах, компьютерными и математическими моделями. Возможно использование культур клеток тканей (методы *in vitro*) при определении общей токсичности химических соединений для человека и животных, оценки иммунотоксичности, нефротоксичности, гепатотоксичности, нейротоксичности, фототоксичности, экотоксичности, канцерогенности. Получены биополимеры эквивалентные человеческой коже.

Для медико-биологических экспериментов, в которых лабораторные животные служат *инструментом измерения активности* каких-либо веществ, препаратов, например, вакцин, сывороток или гормональных средств, генотип несущественен, вопросы экстраполяции необязательны, поэтому для «биопробы» можно использовать гибриды, как линейных животных, так и аутбредных.

Эксперименты, в которых предполагается *моделирование патологических состояний* (онкологические исследования, изучение процессов воспаления, иммунитета, мутаций) проводятся только на *определенных линиях*, так как важна роль генетических факторов в развитии изучаемого состояния. Для выполнения исследований влияния *различных веществ и факторов внешней среды*, можно ограничиться выбором одной линии или гибридной комбинации.

Reduction (адекватность и стандартизация) – это достижение воспроизводимых результатов с использованием минимального количества животных; адекватный выбор лабораторных животных; использование стандартных по микробиологическим,

генетическим и экологическим параметрам животных; оптимальное планирование и, что крайне важно, использование статистических методов не только при обработке полученных данных, но и на стадии планирования. Одним из наиболее надежных путей снижения количества животных, используемых в экспериментах, является дальнейшее развитие и осуществление стандартизации лабораторных животных по генотипу, микрофлоре и экологическим параметрам.

Refinement (уменьшение дистресса, боли и страданий) – это улучшение условий содержания лабораторных животных и использования их в экспериментах, уменьшение дистресса животных во время экспериментов и применение обезболивающих средств, но не в ущерб цели эксперимента.

С точки зрения внешних проявлений и физиологии, животные реагируют на непереносимые боль и дискомфорт так же, как и люди. Концепция исследования боли на животных включает в себя представления о том, что животное не должно подвергаться боли в большей степени, чем может выдержать человек.

Валидность моделей

Валидность модели означает, что модель и моделируемый объект подобны или модель правильно отражает действительность. Модель высокой точности отражает существенные моделируемые механизмы, низкой точности – в малой степени соответствует им. Соотношения между валидностью и проблемой оценки животных-моделей можно классифицировать следующим образом.

1. Животное-модель никогда не является полностью валидированной моделью. В окончательном анализе гипотезы должны быть пересмотрены относительно человека. Потенциальная эффективность модели заключается в ее функционировании, а не в подтверждении или оценке. Нельзя использовать животных для подтверждения гипотезы о недомоганиях у человека. Но можно и нужно изучать на модели гипотезы, касающиеся определенных нарушений здоровья.

2. Животное-модель, подтвержденные в качестве валидированной модели не всегда эффективны для экспериментальной работы. Валидность в данном случае является лишь отправной точкой для достижения цели. Можно достичь высокой точности модели, которая в результате не даст ничего нового в понимании тех или иных процессов.

3. Большинство животных-моделей в биомедицинских и психологических исследованиях не являются валидными.

Валидация (validation) – это крупномасштабное внутрилабораторное исследование, подготовленное в условиях независимости и организованное для получения более определенной оценки релевантности и надежности оптимизированного метода для практических целей.

В последние годы под эгидой Европейского Совета в Северной Италии был создан Европейский Центр по утверждению (валидации) альтернативных методов (ECVAM). Центр способствует разработке альтернативных (заменяющих эксперименты на животных) методов, проверяет и утверждает адекватность новых или уже имеющихся методов.

Валидация альтернативного метода – это процесс, при котором уместность применения и его надежность устанавливается для конкретной практической цели.

Новые методы тестирования должны проходить предварительный процесс *превалидации*, и только после признания того, что этот процесс прошел успешно, они проходят процесс официальной валидации.

Протокол и имитационная модель метода тестирования на первой стадии изменяется в пользу использования альтернативных методов (*refine*) в обычной лаборатории (с приоритетным экспериментом по использованию теста). Сделанная оценка на второй стадии вносится в протокол, передаваемый в следующую лабораторию с внесением любых необходимых изменений по использованию альтернативных методов в

протокол и имитационную модель. В третьей стадии оценивается ревалентность и надежность тестов в условиях независимости в трех или большем количестве лабораторий (две первые также включены в это число).

Превалидация (prevalidation) – внутрिलाбораторное исследование, имеющее незначительный масштаб, проводимое в три этапа для гарантии того, что протокол и имеющаяся модель метода тестирования достаточно оптимизированы и стандартизированы для включения в официальное изучение валидности.

Результатом превалидационных изучений является то, что в оптимизационный протокол вносится то, что может быть использовано в официальном валидационном исследовании. В превалидации и валидации могут принимать участие на этой стадии исследования различные национальные и международные институты с достаточным количеством знаний и опыта. В *стадии превалидированных продуктов (prevalidation)* описываются методы, которые следуют за превалидацией и дается представление о критериях для повторимости и прогнозирования результатов. *Стадия, предшествующая валидации (undergoing validation)*, включает статус метода, предшествующего официальной валидации.

Валидность модели означает, что модель и моделируемый объект подобны или модель правильно отражает действительность.

Валидность является следствием надежности: содержание проблемы, повторности и точности измерений, формируют степень того, что измерялось, и что должно было быть измерено. В терминологии моделирования надежность не является следствием подобия или точности соответствия модели объекту, а соответствием измерения соответствующих переменных модели.

Обучение работе с лабораторными животными

Работа с лабораторными животными, включая уход за ним и проведение экспериментальной работы, требует специальной подготовки. Материалы данной главы раскрывают основные требования к персоналу и программы подготовки сотрудников различных уровней.

Подготовка и переподготовка сотрудников

Работа с лабораторными животными и производство биологических образцов для опытов требуют специализированной подготовки. Особое значение имеет квалификация сотрудников питомников.

Персонал, не имеющий специального образования, должен пройти специальное обучение технологии содержания лабораторных грызунов, уходу и манипуляциям, а также регулярно проходить текущее обучение на семинарах и практических занятиях в соответствии с Программой обучения, принятой в Лаборатории и стандартным операционным процедурам (СОП). Лаборант допускается к самостоятельному выполнению какой-либо манипуляции на животном после ее освоения под руководством исследователя и сдачи экзамена комиссии, в состав которой входит руководитель исследования, представитель службы контроля качества и ветеринарный врач.

Исследовательский персонал, выполняющий работы на животных, должен иметь соответствующую квалификацию и обладать достаточным практическим опытом в этой области. Научные сотрудники, вновь поступившие на работу, и студенты допускаются к самостоятельной работе с животными только после прохождения образовательного курса, включающего в себя инструктаж с использованием специальной литературы, руководств и СОПов, и серию соответствующих обязанностям исследователя практических занятий под руководством опытного сотрудника.

Информирование и обучение сотрудников

Все сотрудники информируются и обучаются:

- о возможных воздействиях вредных производственных факторов (физических, химических и других);
- о способах определения присутствия паров химических веществ в рабочей зоне;
- о назначении знаков возможной опасности;
- мерам безопасности: соответствующим приемам работы, применению средств индивидуальной и коллективной защиты, последовательности действий в случае чрезвычайных ситуаций;
- способам оказания первой помощи пострадавшим.

Информирование сотрудников проводится до начала работы устно на семинарах, и с использованием материалов: инструкций и СОП.

Обучение персонала

1) Описание специальной подготовки и обучения для работы с применением опасных агентов на животных

Все сотрудники, приступающие к работе, проходят обязательный вводный инструктаж по охране труда у инженера службы охраны труда и техники безопасности. Вводный инструктаж включает в себя рассмотрение общих вопросов по безопасной работе (пожаробезопасность, электробезопасность, работа с вредными химическими веществами).

За проведение инструктажа на рабочем месте отвечает руководитель лаборатории. Инструктаж включает в себя ознакомление нового сотрудника с основными правилами работы в лаборатории с учетом специфики обязанностей. После инструктажа вновь принятый персонал проходит стажировку на рабочем месте. Допуск к самостоятельной работе происходит после специального обучения, которое включает в себя семинары, изучение СОПов, а также практический тренинг под руководством сотрудника, имеющего опыт выполнения той или иной операции.

Уже работающий персонал проходит текущее обучение в случае изменения технологии либо использования новых реактивов и оборудования, новым СОПам, а также в случае нарушения кем-либо из сотрудников правил техники безопасности.

Перед началом исследования проводятся семинары для информирования сотрудников о специфике процедур в исследовании, правилах безопасной работы, опасности применяемых веществ и способах защиты. Обучение проводится устно, а также согласно СОПам по технике безопасности и руководствам на вещества, используемые в исследовании.

2) Описание образовательных программ

Программа обучения персонала, осуществляемая в лаборатории, включает темы по профессиональной безопасности, в том числе по профилактике зоонозов и возникновения аллергий на лабораторных животных, безопасности работы с животными и персональной гигиене. Перед началом исследования и при необходимости с персоналом проводятся специальные семинары по правилам работы с конкретным видом лабораторных животных, используемыми в исследовании химическими веществами и материалами.

Программы обучения персонала

В мире существует сложившаяся практика подготовки и переподготовки персонала, работающего с лабораторными животными. В частности, FELASA (Federation of European Laboratory Animals Science Associations – Федерация европейских научных

ассоциаций по лабораторным животным), в которую входят Франция, Италия, Балтийские государства, Бельгия, Чешская Республика, Германия, Австрия, Греция, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии, Ирландия, Нидерланды, Скандинавские государства, Испания, Швейцария, разработали программы подготовки специалистов различных уровней.

В процессе детальной разработки данных требований FELASA выделила четыре категории лиц, имеющих отношение к экспериментам на животных (которые не являются взаимоисключающими), впоследствии одобренные Европейским Союзом [EU 1992] и Правлением Совета Европы по многосторонним консультациям [CE 1993]:

категория А – лица, осуществляющие уход за животными;

категория В – лица, проводящие эксперименты на животных;

категория С – лица, ответственные за руководство экспериментами на животных;

категория D – специалисты в области науки о лабораторных животных.

В основе рекомендаций FELASA лежат общие для каждой категории лиц задачи, обязанности и ответственность. Такой подход предпочтительней номенклатуры, которая может значительно различаться в зависимости от страны. Четыре учебных плана представляют перечень необходимых для изучения тем и объем подготовки. Для категорий А и D предусмотрено детальное профессиональное образование, в то время как для категории В и С предлагаются относительно короткие курсы.

Рекомендации не касаются вопросов глубины изучения предметов или квалификации преподавателей. Это будет представлено другими рабочими группам FELASA по аккредитации образования и обучения по всем категориям.

Практические, теоретические и этические аспекты формируют общую и фундаментальную основу образования и обучения в рамках всех категорий. Руководящими принципами являются: совершенствование методических приемов, сокращение количества используемых животных и их замена, где это возможно, методами без привлечения существ, обладающих сознанием и разумом.

В категории А степень компетентности персонала может быть отнесена к четырем уровням, достижение каждого из которых вместе с соответствующим опытом, где это уместно, может служить требованием к переходу на следующий уровень:

- 1-й уровень – основной уход за лабораторными животными;
- 2-й уровень – 1-й уровень плюс не менее чем 2-летняя практика;
- 3-й уровень – 2-й уровень плюс не менее чем 3-летняя практика;
- 4-й уровень – более высокая руководящая должность или специализация.

Обязанности и обязательства персонала на всех четырех уровнях и программа обучения для 1-3-го уровней изложены ниже. Своеобразие функций персонала 4-го уровня делает стандартную программу неподходящей, присвоение этого уровня, как правило, основано на признании личного опыта и способности к руководящей работе.

Программы содержат темы, необходимые для образования и обучения персонала, занятого уходом за животными, на каждом уровне, и представляют собой совокупность программы FELASA для категории С, изучаемой в соответствующих деталях, и соображений по управлению объектом и его планированию, относящихся к 3-му уровню. Темы, предусмотренные для одного уровня, могут изучаться более глубоко на другом уровне, например законодательные и этические аспекты.

Количество часов формального обучения на 1-3-м уровнях и соответствующий опыт работы (выраженный количеством лет), необходимый для получения квалификации, дающей возможность приступить к этому обучению, отличаются в странах, где уже имеются курсы. Это в значительной мере зависит от подхода к временному балансу между теоретическими и практическими занятиями и обязательности требований к владению формальными навыками, чтобы приступить к обучению на 1-м уровне. Практические навыки работы в течение 4-5 лет и внедрение системы обучения персонала, занятого уходом

за лабораторными животными, обычно достаточно для получения 1-го и 2-го уровней и дает возможность перейти на 3-й.

Переход с одного уровня на следующий не является автоматическим. Это связано с тем, что не все, успешно работающие на одном уровне, хотят или способны перейти на следующий. Этот факт может создать проблему для тех, кто остановился на 1-м уровне, где основным существенным компонентом выполняемых работ является уход за животными. Независимо от основных знаний необходимо продемонстрировать определенный уровень практической компетентности. Для соответствия этому критерию существующие схемы обычно требуют около года практической работы под непосредственным руководством; любое теоретическое обучение является либо приложением к этому, либо включается в практическое обучение, либо требуется и то, и другое.

Категория A FELASA – 1-й уровень

Все обязанности выполняются под непосредственным руководством опытного специалиста по уходу за животными.

Квалификация: точное выполнение установленного рабочего порядка и процедур, следование устным или письменным инструкциям, умение общаться устно, вести документацию.

На этом уровне обычно нет необходимости в получении академического или соответствующего профессионального образования, за исключением Нидерландов, где курс инструктажа является обязательным. Опыт работы не является столь существенным фактором (за исключением Нидерландов), как общий интерес к работе с животными и правильное выполнение рутинных процедур, связанных с правильным содержанием животных и уходом за ними.

Получить статус персонала этого уровня могут лица разных возрастных групп с различной рабочей квалификацией и академическими знаниями.

Возможные направления деятельности

ОБЩИЕ ОБЯЗАННОСТИ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ

1. Эксплуатация и ежедневное обслуживание оборудования, например, моющих машин для клеток/бутылок, оборудования для чистки и стерилизации.
2. Общая уборка и гигиена обслуживаемых площадок, коридоров и т.д.
3. Ликвидация отходов.
4. Сбор, разгрузка и складирование материалов.
5. Участие в процедурах общего микробиологического мониторинга, например, в сборе образцов воды и воздуха, обеспечении эффективного функционирования стерилизующего оборудования.

УХОД И РАЗВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

1. Чистка, кормление и поение экспериментальных, разводимых и других животных.
2. Компетентность в обращении с традиционными видами лабораторных животных.
3. Ежедневные наблюдения и осмотр животных в соответствии с условиями содержания (включая отметку принятия пищи/воды). Сообщение инспектору о любых изменениях.
4. Выполнение некоторых методов эвтаназии в соответствии с детально описанными процедурами, например, ингаляции углекислого газа.
5. Общее содержание помещения(й) для животных, очистка, пополнение запасов предметов потребления.
6. Регистрация показателей среды в помещениях для животных (температура, влажность и т.д.) и процедур, проводимых в помещениях (ежедневных действий). Доклад о любых отклонениях от указанных параметров.

БЕЗОПАСНОСТЬ

Соблюдение стандартных процедур, регулирующих безопасную работу в подразделении, грамотное обращение с веществами, защита от аллергенов животного происхождения, соблюдение личной гигиены, выполнение программы вакцинации и т.д. Осведомленность о личной и коллективной ответственности за безопасность работы.

ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВО ПО БИОЭТИКЕ

Осведомленность в вопросах контроля, определяемого национальным законодательством, и этики использования животных.

Категория A FELASA – 2-й уровень

Обязанности, перечисленные ниже, отражают развитие и расширение опыта и практических навыков, освоенных на 1-м уровне. Основным требованием является применение углубленных знаний при работе в различных специализированных учреждениях для животных, а также с возрастающим количеством видов животных, включая требующих специфических навыков разведения.

К этому уровню также относят способность работать более длительное время без прямого руководства, нести ответственность за ежедневные рутинные процедуры в выделенном(ых) помещении(ях) для животных и выполнять другие специфические обязанности в соответствии с утвержденным стандартом.

В общем, для перехода на этот уровень необходимы как минимум 2-летний предварительный стаж работы и наличие первой профессиональной квалификации. Также должно приниматься во внимание требование Нидерландов – посещение национально признанных курсов инструктажа.

Возможные направления деятельности и обязанности

УХОД И РАЗВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

1. Ответственность за рутинный уход за животными и поддержание режима в прикрепленных помещениях для экспериментальных, разводимых и других животных в конвенциональной, свободной от определенных патогенных организмов (SPF) и барьерной зонах, изоляторах из эластичной пленки, карантинных отделах и других системах содержания/изоляции.

2. Компетентное обращение, фиксация и определение пола (включая определение возраста на основании физических характеристик) у лабораторных животных традиционных и редко используемых видов.

3. Ежедневное содержание колоний разводки неинбредных и генетически определенных животных, включая: формирование под непосредственным руководством групп/линий разводки, отъем молодняка, ведение протоколов (компьютерных или письменных) разведения и подготовка данных по ходу разведения животных.

4. Квалифицированное выполнение разнообразных методов эвтаназии животных различных видов в соответствии с установленными процедурами и/или требованиями закона.

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ВЫПОЛНЯЕМУЮ РАБОТУ

1. ПОЛУЧЕНИЕ И ВЫДАЧА ЖИВОТНЫХ

Получение, контроль и размещение поступающих животных (выращенных на месте и полученных из коммерческих источников), выдача животных, ведение определенной документации и системы записей.

2. СОДЕЙСТВИЕ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПРОЦЕДУР

Послеоперационный уход за экспериментальными животными; помощь исследователям в обращении с животными и их фиксации; содержание животных по

специфическим экспериментальным проектам, включая запись наблюдений, например, за массой животного.

3. АУТОПСИЯ

Участие в проведении аутопсии, например, для экспериментальных целей, осуществления программ наблюдения за здоровьем животных.

4. ОБУЧЕНИЕ

Работа в непосредственном контакте, руководство и помощь новым сотрудникам, обучающимся уходу за животными, в освоении рутинных процедур в соответствии с предполагаемым стандартом.

5. Исполнение ДРУГИХ ОБЯЗАННОСТЕЙ

Способность брать на себя выполнение специфических задач в соответствии с указаниями в отсутствие прямого руководителя.

Категория A FELASA – 3-й уровень

Дальнейшее углубление знаний и опыта, а также освоение навыков руководства и управления формируют основу обязанностей специалиста этого уровня.

Персонал, переходящий на этот уровень, должен иметь 3-летний стаж работы на предыдущих уровнях (т.е. всего 5 лет) и получить дополнительную профессиональную квалификацию.

Возможные направления деятельности и обязанности

1. Организация рутинной работы по уходу за животными и их разведению и руководство ею.
2. Планирование ежедневных рутинных процедур и составление графика работы персонала.
3. Координация ресурсов для обеспечения потребностей.
4. Участие в управлении бюджетом подразделения.
5. Заказ животных, оборудования и других материалов.
6. Управление колониями разводки животных, включая программы их воспроизводства.
7. Организация отправки, транспортировки, получения животных. Знание национальных и международных требований к благосостоянию животных.
8. Рекомендации исследователям по обеспечению животными и размещению средств в соответствии с научными требованиями. Помощь в исследовательских проектах. Контроль за соответствием законодательству.
9. Руководство процедурами мониторинга среды и микробиологического мониторинга, включая программы наблюдения за здоровьем животных.
10. Содействие в обучении и профессиональном росте персонала.
11. Ответственность за дополнительные обязанности в соответствии с указаниями в отсутствие прямого руководителя.
12. Вклад в благосостояние животных (т.е. усовершенствование технологий).
13. Подготовка отчетов и т.д., требующих некоторых знаний статистики.

Категория A FELASA – 4-й уровень

Персонал этого уровня – старшие руководители с определенными навыками в управлении и руководстве виварием. Этот высокий уровень вместе с теоретическими и практическими знаниями в области науки о лабораторных животных, требующимися для

выполнения таких функций, может распространяться на категорию D FELASA, дающую определение специалиста по лабораторным животным.

Персонал может повышать свою квалификацию в области науки о лабораторных животных по общим или специальным направлениям.

Возможные направления деятельности и обязанности

1. Координация ресурсов для обеспечения нужд подразделения, в том числе организационных.

2. Введение, установление и реализация правил и процедур, применяемых в подразделении, а также теми, кто пользуется услугами подразделения.

3. Осуществление финансового контроля за бюджетом подразделения.

4. Руководство персоналом всех уровней по уходу за животными.

5. Организация программ обучения и профессионального роста для персонала, ухаживающего за животными.

6. Прием персонала на работу.

7. Сотрудничество с научным персоналом с целью обеспечения ресурсами исследовательских программ.

8. Участие в разработке и проведении экспериментов.

9. Осуществление в случае необходимости связи с вышестоящим руководством.

10. Планирование новых вивариев либо усовершенствование существующих зданий или площадей.

Программа обучения для категории А, 1-й уровень

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

Обращение с животными

Требуемые знания:

- причины и важность правильного обращения с животными;
- многообразие методов, используемых для безопасного и компетентного обращения с наиболее распространенными видами лабораторных животных, и умение выбирать подходящий метод, основываясь на физических показателях, поведенческих и индивидуальных признаках животных соответствующих видов.

Демонстрация на лабораторных животных наиболее распространенных видов (крыса, мышь, морская свинка, хомяк, кролик):

- умение брать и держать животное, используя наиболее безопасный и приемлемый способ, как для животного, так и для сотрудника;
- умение квалифицированно извлекать животное из клеток различного типа и помещать его обратно.

Уход и разведение

Требуемые знания:

- необходимость рутинных процедур при уходе за животными в соответствии с их биологическими и поведенческими потребностями;
- соответствующие программы содержания лабораторных животных наиболее распространенных видов, таких как крыса, мышь, морская свинка, хомяк, кролик;
- специальные требования к уходу, например, за разводимыми, экспериментальными животными;
- основные питательные компоненты диет для животных и их подача, в частности, необходимость специальной диеты для животных некоторых видов или разводимых животных;

- соответствующие режимы питания, способы обеспечения пищей;
- потребность в постоянном источнике воды, соответствующие способы ее подачи;
- цель размещения животных в клетках, признаки хорошего дизайна клеток в соответствии с видом животного и целью, с которой оно содержится;
- необходимость обеспечения животных подходящим подстилочным и гнездовым материалом, а также умение выбрать соответствующий материал;
- понятие обогащения среды обитания в свете благосостояния животных, решающие факторы режима ухода за животными и их содержания.

Рутинные процедуры в виварии

Требуемые знания:

- необходимость регулярной уборки помещений для животных и вспомогательных площадей, а также соблюдение определенного режима уборки в учреждении;
- правила использования и безопасного обращения с оборудованием для мойки и стерилизации;
- необходимость контроля микробиологических и других условий окружающей среды и их регистрация;
- необходимость личной гигиены и соблюдение определенных правил в работе и процедур для защиты персонала и животных.

Контроль за здоровьем животных

Требуемые знания:

- необходимость и важность контроля за здоровьем, признаки (как общие, так и специфические для соответствующих видов животных), которые могут указывать на отклонения от нормы, и действия, которые необходимо предпринять.

Эвтаназия

Требуемые знания:

- причины для проведения эвтаназии и ее дефиниция;
- наиболее широко используемые методы, в частности, ингаляция углекислого газа;
- факторы, учитываемые при выборе подходящего метода.

Законодательство и биоэтика

Осведомленность о национальных и европейских законах, контролирующих использование животных в научных целях, и связанных с этим этических аспектах.

Программа обучения для категории А, 2-й уровень

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

Содержание и уход

Требуемые знания:

- биологические потребности лабораторных животных в отношении практики ухода и содержания;
- стандарты по уходу и содержанию лабораторных животных с учетом их согласованности с национальными и европейскими правилами и практическими руководствами;
- концепция барьерной системы; рабочая практика поддержания целостности барьера при работе с животными с определенным микробиологическим статусом, неизвестным статусом здоровья и с животными, экспериментально

инфицированным потенциально опасным материалом; содержание животных в изоляторах.

Обращение

Демонстрация знаний и компетентности:

- обращение с лабораторными животными разнообразных видов; определение их возраста и пола различными методами;
- выбор соответствующих способов фиксации, связанных как с уходом за животными, так и с научными процедурами на животных.

Разведение

Требуемые знания:

- биология репродуктивной системы лабораторных животных широко используемых видов;
- системы разведения общего пользования, практические соображения по внедрению и поддержанию таких программ;
- мониторинг разведения, ведение записей, критерии отбора племенных сток;
- применение генетических принципов в получении генетически определенных линий, определение генетических линий, соответствующие программы разведения.

Эвтаназия

Требуемые знания:

- методы эвтаназии лабораторных животных определенных видов;
- законодательные ограничения или рекомендации по использованию данных методов; факторы, влияющие на выбор метода; констатация смерти.

Питание

Требуемые знания:

- возможности удовлетворения требований к питанию лабораторных животных, типы и состав диет;
- факторы, влияющие на выбор диет, и практика кормления; эффект специальной обработки питательного состава, например, облучения.

Мониторинг, ведение записей и отчет о состоянии здоровья

Требуемые знания:

- общие проблемы заболеваний лабораторных животных определенных видов, выявление признаков заболевания, зоонозы;
- важность профилактики заболеваний и контроля, роль микробиологического тестирования, реализация программ поддержания здоровья.

Безопасность

Требуемые знания:

- необходимость безопасной рабочей практики, применение местных протоколов и национального законодательства для контроля здоровья и безопасности на рабочем месте;
- меры против биологических, химических и других факторов риска; техника безопасности при эксплуатации оборудования и использовании других материалов; соблюдение личной гигиены; аллергия на лабораторных животных.

Законодательство

Демонстрация:

- детальные практические знания национального и европейского законодательства, контролирующего использование животных в научных целях; знание других соответствующих законодательств, национальных и международных практических руководств.

Требуемые знания:

- применение этических принципов при использовании животных в научных целях;
- использование альтернативных методов.

Экспериментальные процедуры

Требуемые знания:

- общие пути введения веществ экспериментальным животным; факторы, влияющие на выбор способа введения; подготовка дозированной дозы и частота введения;
- методы удаления и сбора жидкостей из организма; факторы, влияющие на выбор метода; объемы и частота сбора образцов;
- до- и послеоперационный уход; роль и ответственность персонала, занятого этим; соответствующие линии коммуникаций;
- принципы анестезии и аналгезии; признаки боли, дискомфорта и дистресса у животных соответствующих видов.

Программа обучения для категории А, 3-й уровень

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

Управление виварием

Требуемые знания:

- управление учреждением, эффективное использование ресурсов, управление бюджетом, производственные отношения в отделе и вне его, реализация процедур и правил для эффективной и безопасной работы вивария, подготовка отчетов, использование компьютерных программ управления;
- принципы управления персоналом; контроль за работой персонала, дисциплина, мотивация, развитие и назначение; прием на работу и интервьюирование; обучение и образование; постановка производственных задач.

Планирование вивария

Требуемые знания:

- роль дизайна, планирование и дизайн вивария в соответствии с определенными целями, соответствие законодательным требованиям, обеспечение сервиса, финансовый контроль.

Разведение

Требуемые знания:

- управление колониями разводки животных, получение и поддержание генетически определенных линий и аутбредных стоков, процедуры генетического мониторинга.

Питание

Требуемые знания:

- разработка практических и теоретических аспектов требований к питанию лабораторных животных; составление и обеспечение специальными диетами; варьирование состава диет; обеспечение тестирования качества; факторы, влияющие на хранение и использование кормов.

Уход / содержание животных

Требуемые знания:

- содержание, уход и разведение лабораторных животных наиболее редких видов, например, рептилий, амфибий.

Мониторинг среды

Требуемые знания:

- управление микро- и макросредой, контролирующее и регистрирующее оборудование, интерпретация результатов, обеспечение резервных систем.

Профилактика болезней и контроль

Требуемые знания:

- поведенческие и клинические признаки заболеваний;
- патология распространенных заболеваний лабораторных животных;
- профилактика заболеваний, контроль и лечение; влияние заболевания и медикаментов на интерпретацию результатов экспериментов, процесс разведения животных и т.д.; эффекты субклинических заболеваний;
- микробиологические процедуры, связанные с программами скрининга; интерпретация результатов; факторы, влияющие на принятые действия; схемы мониторинга здоровья.

Законодательство

Практические знания:

- национальные и международные акты, распоряжения, директивы, программы и кодексы, непосредственно относящиеся к управлению виварием.

Транспортировка

Практические знания:

- национальные и международные требования и документация; использование официально признанных агентов, вопросы благосостояния животных.

Анестезия и аналгезия

Требуемые знания:

- принципы проведения анестезии, выбор и введение анестетиков, видовая специфичность, оборудование для анестезии и контроля за ее ходом;
- премедикация, мониторинг и поддержание анестезии, осложнения, уход после анестезии.

Хирургия

Требуемые знания:

- принципы хирургии, асептическая техника, хирургические инструменты и уход за ними, материалы и техника для наложения швов, заживление ран;
- до- и послеоперационный уход, осложнения и восстанавливающие действия, распознавание инфекций и боли и контроль за ними;
- принципы работы диагностического и контролирующего оборудования,

например, радиографического, эндоскопического, для снятия электрокардиограмм и электроэнцефалограмм.

Планирование экспериментов

Требуемые знания:

- общие принципы планирования и проведения экспериментов, ведение протоколов экспериментов, статистический контроль экспериментов, ведение записей.

Здоровье животных

Требуемые знания:

- практические аспекты нормального и ненормального поведения животных; состояния комфорта, боли и дистресса; физиологические, иммунологические, биохимические и поведенческие аспекты стресса; типы стрессоров;
- роль внешней среды в поддержании здоровья животных.

Рекомендации FELASA по образованию и обучению лиц, проводящих эксперименты на животных (категория В)

Лица, проводящие эксперименты или принимающие в них участие, включая обязанности по надзору, должны иметь соответствующее образование и пройти надлежащее обучение. Ниже приведены рекомендации по образованию и обучению лиц категории В, которые отвечают за проведение экспериментальных и других научных процедур на живых животных.

Обязанности специалиста категории В

Специалист категории В должен:

- 1) знать европейские и национальные законы, касающиеся проведения экспериментальных и других научных процедур на животных;
- 2) знать и соблюдать принятые в обществе этические нормы, касающиеся исследований на животных;
- 3) понимать и учитывать общие правила, действующие в виварии, где проводятся процедуры;
- 4) понимать теоретическую основу поставленных задач с тем, чтобы сохранить здоровье животного и гарантировать актуальность полученных научных данных;
- 5) быть компетентным в обращении с животными и владеть другими техниками, которые предполагается использовать;
- 6) уметь распознавать боль и признаки дискомфорта и оценивать состояние здоровья подопытного животного;
- 7) знать, какие следует предпринять шаги для эффективного устранения неблагоприятных последствий, возникающих в ходе или после проведения процедуры;
- 8) быть хорошо информированным об использовании лабораторных животных и уметь принимать соответствующие меры по сведению до минимума факторов, влияющих на проведение процедуры.

Компетентность

В данном документе компетентность определяется не продолжительностью какого-либо особого периода обучения и образования, а скорее как способность специалиста выполнять свои обязанности. По мнению рабочей группы для выявления уровня достигнутой компетентности необходима ее оценка в конце периода обучения.

На практике было выявлено, что для получения новым кандидатом основного уровня компетентности будет достаточно курса продолжительностью около 40 часов, половину которого составляют практические занятия под непосредственным наблюдением соответствующего компетентного специалиста. В процесс обучения должны быть включены только те процедуры, которые по требованию лица, проходящего обучение, абсолютно необходимы. Содержание программ может быть изменено в соответствии с непосредственными задачами, при этом некоторые детали могут быть изъяты или добавлены. Таким образом, достижение компетентности может быть ограничено одним видом животных или группой видов, или группой процедур. Впоследствии уровень компетентности может быть повышен в процессе дополнительного обучения.

Учебный план

Л. Законодательство, этика и принципы 3R

Знание и понимание:

- 1) европейских и национальных законов, касающихся использования животных в научных целях;
- 2) важности ответственного отношения к использованию лабораторных животных;
- 3) принципов 3R – снижение (Reduction), уменьшение дистресса (Refinement), замена (Replacement);
- 4) пригодности и применяемости альтернативных и дополнительных методов.

Б. Основы биологии и содержание лабораторных видов животных

1. Основы биологии

- знание строения и функций основных органов и систем в объеме, достаточном для проведения процедуры;
- знание физиологии и биохимии в объеме, достаточном для проведения процедуры;
- знание границ физиологических параметров в норме, представление о биологической вариабельности;
- знание поведенческих и физиологических характеристик, относящихся к проведению процедур;
- компетентность в области разведения животных и использования соответствующих генетических методов (например, трансгенного и нокаутного методов), касающихся проведения процедур;
- знание о существовании циркадных ритмов и их практическом значении.

2. Содержание

- знание требований к параметрам окружающей среды, касающихся систем содержания животных, а также европейских и национальных постановлений, руководств и(или) сводов законов, регулирующих практическую деятельность;
- представление о взаимодействии животного с окружающей средой;
- осведомленность о путях обогащения окружающей среды, способствующих удовлетворению поведенческих и социальных нужд животного;
- освоение норм и установленного порядка по уходу за животными;
- классификация животных в соответствии с их микробиологическим статусом;
- осознание важности надлежащей гигиены в вивариях лабораторных животных в свете предупреждения и контроля заболеваний, а также ее значения для экспериментальных результатов и благосостояния животных;
- представление о взаимосвязи между микробным заражением и здоровьем животных и их влиянии на результаты экспериментов;
- информированность о требованиях к питанию животных и установленном

- порядке кормления;
- оценка пригодности различных рецептур, типов специальных диет и разных режимов питания;
- представление о воздействии характера питания на результаты экспериментов, включая изменения в составе диет, а также последствиях чрезмерного и недостаточного кормления;
- понятие о факторах, влияющих на выбор специальных диет и режимов питания;
- осознание необходимости постоянной подачи питьевой воды и различные способы обеспечения этого процесса;
- осведомленность о пригодности и применяемости различных типов подстила и используемых для этого материалов.

В. Обеспечение физиологических потребностей и уровня здоровья животных без ущерба научной достоверности исследования или процедуры

1. Физиологические потребности

- понимание, какие факторы следует учитывать при оценке здоровья животных;
- информированность о поведенческих и относящихся к окружающей среде потребностях животных в свете их здоровья;
- наблюдение и толкование особенностей поведения соответствующих видов животных;
- представление о путях максимального повышения здоровья соответствующих видов лабораторных животных в процессе их содержания.

2. Здоровье животных

- оценка уровня стресса, дистресса или испытываемого животным страдания;
- осознание важности регулярных контактов с человеком во избежание ненужного дистресса у лабораторных животных;
- понимание необходимости максимальной стандартизации животных как обязательного условия сокращения их количества и знание путей достижения этого в свете их здоровья;
- распознавание признаков ухудшения здоровья у животных соответствующих видов.

3. Научная достоверность

- информированность о потенциальном влиянии социального поведения животных на научную достоверность исследования;
- понимание важности адаптации лабораторных животных к установившемуся режиму содержания до начала эксперимента;
- осведомленность о важности мер, предпринимаемых в целях сведения до минимума стресса при размещении соответствующих лабораторных видов;
- информированность о влиянии комплекса факторов окружающей среды на биологическую вариабельность, а также отдельных животных;
- осознание важности состояния здоровья животного с учетом научной достоверности исследования;
- знание преимуществ животных, адаптированных к определенным условиям до начала экспериментальных исследований;
- представление о преимуществах использования обученных экспериментальных животных и путях достижения этого.

Г. Обращение с животными, использование основных техник и эвтаназия

1. Обращение и поведение

- понимание принципов и важности корректного обращения и нормального

- поведения в свете их предполагаемого применения;
- выбор подходящего способа фиксации;
- отбор и использование соответствующих методов идентификации (маркировки).

2. Введение веществ

- знание путей распределения и вывода из организма наиболее широко используемых соединений при различных способах их введения;
- введение соединений и выбор способа введения в зависимости от условий и целей эксперимента;
- владение правильной техникой (а также распознавание известных побочных эффектов) перорального, подкожного, внутримышечного, внутривенного и внутривенного введения соединений.

3. Способы забора образцов

- знание методов, используемых для забора образцов крови, жидких сред организма, фекалий и мочи;
- демонстрация правильного забора образцов крови, фекалий и мочи;
- осведомленность о причинах ограничения частоты сбора образцов и их объема;
- обсуждение преимуществ и недостатков этих методов;
- демонстрация правильных способов хранения биологических образцов.

4. Эвтаназия

- определение эвтаназии и перечень причин для ее проведения;
- характеристика наиболее часто используемых методов эвтаназии;
- отбор соответствующего (их) метода(ов) в соответствии с целью и условиями эксперимента;
- представление о неприемлемых методах эвтаназии;
- проведение эвтаназии и подтверждение смерти животного химическим или физическим методом.

5. Сбор данных

- составление протокола эксперимента с использованием животных;
- сбор и хранение данных в соответствии с принципами добротной лабораторной практики [Good Laboratory Practice (GLP)].

Д. Выявление недостатков в сфере благосостояния животных и других усложняющих факторов

1. Оценка здоровья

- наблюдение за состоянием здоровья и его оценка у используемых видов животных;
- представление о биологической вариабельности, присущей нормальным здоровым животным;
- ознакомление с литературными источниками, содержащими физиологические данные по используемым видам животных.

2. Распознавание боли, страдания и дистресса

- распознавание признаков боли, страдания и дистресса, представление о концепции гуманного умерщвления и необходимости их определения перед процедурами;
- знание главных стресс-факторов для используемых видов животных;
- оценка степени и понимание границы «жестокости» процедуры.

3. Распознавание заболевания

- распознавание признаков заболевания у используемых видов животных и предпринимаемые в данном случае действия;

- мониторинг здоровья и профилактика заболеваний в зависимости от используемых видов животных и процедуры;
- осознание важности заболеваний, протекающих в скрытой форме.

Е. Анестезия, аналгезия и основные принципы хирургии

1. Методы анестезии

- определение анестезии;
- знание показаний к проведению общей и местной анестезии;
- представление об основных методах проведения общей анестезии;
- осведомленность о препаратах, наиболее часто используемых для проведения анестезии, специфических показаниях и противопоказаниях к их применению.

2. Дооперационный уход

- осознание важности дооперационного физического осмотра и значения ограничения приема пищи;
- понимание важности премедикации как средства, обеспечивающего благополучие животного и более плавное введение в состояние наркоза;
- представление о наиболее часто используемых транквилизаторах, антихолинергических средствах и их правильном введении;
- подготовка животного к хирургическому вмешательству.

3. Наркоз

- оценка глубины наркоза у используемых видов животных;
- осознание важности контроля за ходом анестезии, поддержание и регистрация соответствующих показателей;
- представление об осложнениях, обычно возникающих при анестезии, и умение на них быстро реагировать;
- использование аппаратов для проведения анестезии;
- знание об основных препаратах, вводимых для выведения из наркоза.

4. Послеоперационный уход, аналгезия

- внимательное наблюдение за животным в послеоперационный период, контроль дыхания, пульса, температуры, области, где было проведено хирургическое вмешательство, и общего состояния;
- распознавание и быстрое устранение осложнений, возникающих после применения анестезии;
- представление о положительном влиянии аналгезии и введения анальгетиков;
- знание характеристик и осведомленность о продолжительности действия наиболее широко используемых анальгетиков.

5. Основные принципы асептической хирургии

- понимание важности поддержания стерильности в операционной и проведения асептических процедур;
- подготовка и правильное проведение стерилизации хирургических инструментов и тампонов, шовного и перевязочного материала.

Ж. Гигиена труда и безопасность

1. Зоонозы и опасные патогенные факторы

- представление о состоянии здоровья исследуемых животных, основных патогенных факторах, оказывающих на них влияние, и связанном с этим риском для человека.

2. Опасные химические соединения

- осведомленность об основных факторах риска, связанных с обращением с наиболее широко используемыми категориями газов, растворителей, кислот,

- щелочей и солей, применяемыми в биомедицинских исследованиях и тестировании;
- знание основных факторов риска, связанных с обращением с лекарственными препаратами и другими фармакологически активными тест-субстанциями;
 - правильное толкование символов и предупреждающих надписей на этикетках фармакологически активных субстанций;
 - осознание потенциальной опасности неправильного смешивания различных химических соединений.
3. Биологическая опасность
- представление о факторах риска, связанных с работой с вирусами и генетически измененными организмами;
 - знание факторов риска, связанных с материалами, инфицированными микроорганизмами;
 - представление о факторах риска, присущих биологическим материалам человеческого происхождения.
4. Аллергии
- представление о причинах возникновения аллергии;
 - распознавание ранних признаков, указывающих на развитие аллергии.
5. Меры предосторожности и защита персонала
- знание соответствующего европейского и национального законодательства, а также местных мероприятий по гигиене труда и обеспечению безопасности персонала;
 - осведомленность о программах по охране здоровья персонала, подвергающегося химической и биологической опасности;
 - знание основных принципов гигиены и асептики;
 - правильное обращение с защитными средствами и оборудованием (вытяжными шкафами, масками и т.д.);
 - принятие необходимых мер предосторожности для максимального снижения потенциального риска.
6. Первая помощь
- знание местных мероприятий, проводимых при несчастном случае;
 - представление о том, что может быть и что должно быть сделано до прибытия помощи.
7. Захоронение отходов и законодательство, направленное на охрану здоровья
- знание национального законодательства, связанного с окружающей средой и ее охраной;
 - представление о местных мероприятиях по захоронению отходов;
 - классификация различных видов отходов;
 - правильная обработка материалов до их захоронения;
 - знание местных мероприятий по правильному захоронению трупов животных.

Альтернативные пути достижения уровня компетентности категории В

Один из таких способов – прохождение отдельных курсов. В этом случае сложнее структурировать представленные материалы, а обучение практическим основам должно иметь индивидуальный подход. Такие курсы позволяют более эффективно использовать квалифицированных преподавателей.

Другая возможность – краткосрочные курсы повышения квалификации; в этом случае изучение теории сочетается с приобретением практических навыков непосредственно на рабочем месте.

Повышение уровня компетентности посредством непрерывного обучения

Любые знания, полученные в процессе обучения, если только они постоянно не используются и не совершенствуются, со временем устаревают. Должен существовать механизм, обеспечивающий поддержание компетентности на современном уровне в процессе дальнейшего соответствующего обучения. Государственные властные структуры, отвечающие за компетентность специалистов, должны поощрять выполнение этой задачи.

Оценка уровня компетентности

Присуждение признанного уровня компетентности недопустимо без тщательной оценки кандидата. В случае категории В необходима проверка не только теоретических знаний, но, даже в большей степени, полученных практических навыков. Дальнейшее обучение в соответствии с данными рекомендациями FELASA и результат, оцененный как успешный, должны подтверждаться дипломом, в котором будут подробно описаны теоретическая и практическая составляющие достигнутого уровня компетентности и который будет пользоваться европейским признанием.

Категория С – лица, ответственные за руководство экспериментами на животных

Ученые, ответственные за планирование или проведение экспериментов на животных, могут считаться компетентными специалистами при соблюдении двух требований:

1. Прохождение полного курса университетского образования с получением степени бакалавра или магистра (в зависимости от принятых национальных норм) или получение соответствующего образования по одной из биомедицинских дисциплин, таких как биология животных, медицина или ветеринария.
2. Прохождение основного курса по науке о лабораторных животных (не менее 80 часов) целиком или по частям, либо получение равноценного образования другим путем.

Базовое образование направлено на создание основы ответственного отношения к использованию животных и достижение высоких научных стандартов. Оно должно быть завершено до того, как ученый будет считаться компетентным для выполнения исследований на животных под свою ответственность. Дополнительные специальные знания по хирургии, отдельным методам и различным видам животных должны быть получены в тесном сотрудничестве с опытными исследователями и техниками по уходу за лабораторными животными или при посещении специализированных курсов. Лица, намеренные совершенствоваться в навыках и компетентном использовании с целью стать специалистами в области науки о лабораторных животных – категория D, являются объектом дальнейших рекомендаций. Лица, имеющие категорию D, очевидно, должны пройти дополнительное специальное обучение, о котором упоминалось выше.

Лицо, претендующее на получение категории С, должно обладать знаниями и практическим опытом в соответствии с темами, перечисленными в разделе «Уход и разведение животных» рекомендаций для 1-го уровня категории А:

1. Чистка, кормление и поение экспериментальных, разводимых и других животных.
2. Компетентность в обращении с традиционными видами лабораторных животных.
3. Ежедневное наблюдение и осмотр животных в соответствии с общими условиями содержания (включая отметку о принятии пищи/воды).
4. Выполнение некоторых методов эвтаназии в соответствии с детально разработанными процедурами.
5. Общее содержание помещений для животных.
6. Регистрация показателей среды в помещениях для животных и процедур,

проводимых в этих помещениях.

Краткое изложение рекомендаций для категории С

- Минимальное требование к персоналу категории С-образование по биомедицинской дисциплине на уровне бакалавра или магистра, а также прохождение основного курса объемом не менее 80 часов или равноценного в области науки о лабораторных животных.
- В базовое обучение должно быть включено 8 основных тем (подробное описание в приложенной программе):
 - а) биология и содержание лабораторных животных;
 - б) микробиология и болезни;
 - в) факторы риска для здоровья и безопасность работы в виварии;
 - г) планирование и проведение экспериментов на животных;
 - д) анестезия, аналгезия и экспериментальные процедуры;
 - е) альтернативы использованию животных;
 - ж) этические аспекты и законодательство;
 - з) анализ научной литературы.
- Лица, прошедшие курс обучения, по его окончании должны быть проверены в равноценных условиях, разработанных для других видов обучения.
- Соответствующим ведомствам Европейского Союза и Совета Европы рекомендуется разработать директивы в согласии с настоящими рекомендациями, обсудить вопрос о формировании комиссии экспертов для контроля над курсами в странах-участницах и обеспечения аккредитации данных курсов в случае необходимости. FELASA предлагает свою помощь в этой работе, что должно стать вкладом в гармонизацию, обучение и признание понятия «компетентное лицо» в соответствии с формулировкой Директивы Европейского Союза и Европейской конвенции.
- FELASA планирует привлечение и обучение квалифицированных инструкторов в области науки о лабораторных животных, составление реестра экспертов, и может обращаться за поддержкой в данной работе в ЕС и СЕ.
- Так как существует необходимость в учебном материале, FELASA хотела бы стимулировать и руководить подготовкой учебников, баз данных, видеофильмов и других визуальных материалов, а также собирать информацию по существующим курсам.

Программа обучения для категории С

ПРЕДЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

А. Биология и содержание лабораторных животных

1. Введение в науку о лабораторных животных, использование животных в различных областях исследований, история экспериментов на животных.
2. Биология лабораторных животных (сравнительная анатомия, физиология), воспроизводство и выращивание, уход и содержание, гомеостаз и стресс, благосостояние животных.
3. Этология (поведение) и обогащение среды.
4. Обращение с лабораторными животными и их транспортировка.
5. Питание, требования к питанию, состав диет, практика кормления, вариации состава диет и их влияние на состояние здоровья и результаты экспериментов, влияние добавок на прием пищи, преимущества и недостатки питания *ad libitum*.
6. Генетическая стандартизация; взаимодействия генотип-среда; инбредные линии; коизогенные, конгенные линии; трансгенные линии; рекомбинантные инбредные линии; гибриды F₁, рандомбредные линии и аутбредные стоки; генетическая характеристика;

контроль генетического качества; криоконсервация.

7. Распознавание, оценка и контроль боли, страданий и дистресса.

Б. Микробиология и болезни

1. Мониторинг здоровья и защита от болезней, карантин, гигиена, дезинфекция.

2. Гнотобиология; животные, свободные от определенных патогенных организмов (SPF); безмикробные животные; барьерное содержание; изоляторы; системы ламинарных потоков.

3. Болезни лабораторных животных, взаимосвязь заболеваний с экспериментами, последствия употребления лекарств.

4. Безопасность в работе с инфицированными животными.

В. Факторы риска здоровья и безопасность работы в виварии

1. Аллергия, зоонозы, патогенные организмы, карциногены, радиоактивные материалы, физические факторы риска и т.д.

Г. Планирование и проведение экспериментов на животных

1. Подготовка протокола эксперимента на животных; поиск литературы; выбор экспериментального животного (вид, линия, генетический статус, микробиологический статус); обеспечение животными и влияние транспортировки.

2. Модели на животных (спонтанные, индуцированные); возможности и ограничения экспериментов на лабораторных животных; экстраполяция на людей результатов экспериментов, проведенных на животных.

3. Планирование эксперимента (например, на основе факториального анализа по схеме латинского квадрата), power-анализ для вычисления количества животных в контрольной и экспериментальной группах, статистический анализ и интерпретация результатов.

4. Надежная лабораторная практика (GLP).

Д. Анестезия, аналгезия и экспериментальные процедуры

1. Ознакомление с методами анестезии, анестетики и аналгетики, местные аналгетики и общие анестетики.

2. Выбор анестетика в зависимости от вида животного и характера эксперимента, видоспецифичные вариации при введении анестетиков, влияние анестетиков на результаты экспериментов.

3. Осложнения, и уход за животными после эксперимента, безопасность и предосторожности.

4. Экспериментальные процедуры – демонстрация и практика; нехирургические процедуры, такие как инъекции, оральное введение, забор крови, мочи или кала; принципы хирургии, хирургический инструментарий, асептические методы, демонстрация некоторых хирургических процедур.

Е. Альтернативы использованию животных

1. Определение альтернатив; усовершенствование, замена или сокращение использования животных; обзор альтернатив; возможности и ограничения альтернатив; альтернативы в обучении и исследованиях.

Ж. Этические аспекты и законодательство

1. Отношение к животным, взаимоотношения человек-животное, истинная и

инструментальная ценность животных, аргументы «за» и «против» использования животных в научных целях, дискуссия по этическим аспектам использования животных, комиссии по этике.

2. Законодательные аспекты; обзор национального и европейского законодательства, касающегося использования животных в научных целях; лицензирование; компетентные лица; инспекция; регистрация.

3. Анализ научной литературы

1. Анализ опубликованных работ; тщательная проверка выбора вида или линии животного, количества и спецификации используемых животных; планирование эксперимента, хирургических или других экспериментальных процедур; обсуждение целесообразности представляемой работы.

Курс завершается экзаменом или подтверждением квалификации в другой форме.

Директивы FELASA по образованию специалистов в области науки о лабораторных животных (категория D)

FELASA определяет категорию D как руководство лабораторией и специализацию более высокого уровня, как лица, чья квалификация и опыт позволяют выполнять по крайней мере следующие обязанности:

1) управлять всеми животными, человеческими и физическими ресурсами учреждения, где содержатся лабораторные животные;

2) создавать условия для здоровья и благосостояния животных;

3) оказывать в случае необходимости помощь и содействие исследователям, работающим с лабораторными животными, а также обеспечивать практическую поддержку научно-исследовательских программ;

4) обеспечивать соответствие деятельности всем законам, правилам и директивам, касающимся разведения, содержания и использования лабораторных животных, а также управления виварием;

5) нести ответственность за разработку и представление образовательных программ для внутреннего и внешнего пользования по гуманному содержанию и использованию лабораторных животных, продолжающих развитие концепции 3R;

6) содействовать дальнейшему развитию нововведенных концепций гуманного содержания и использования лабораторных животных, включая проводимые исследования в области науки о лабораторных животных.

Уровень обучения

Образование и обучение специалистов в области науки о лабораторных животных должно предлагаться в виде последиplomного обучения.

Специфические требования

Основным требованием для получения дальнейшего образования в области науки о лабораторных животных должно быть наличие степени по биомедицинским или ветеринарным наукам или другой сертифицированной эквивалентной квалификации. Предполагается, что кандидат еще до начала курса обучения будет иметь соответствующий опыт в области науки о лабораторных животных.

Свидетельство об успешном окончании курса может быть получено только после сдачи экзамена или подтверждения квалификации в другом виде. Заключительная оценка или экзамен будут свидетельствовать о способности кандидата проводить научно-исследовательскую работу.

Примером такой оценки может быть:

1) публикация научной статьи в качестве главного автора на основе именно оригинального научного исследования (не истории болезни) в одном из рецензируемых журналов;

2) подготовленный определенным образом отчет в виде описания нескольких историй болезни;

3) разработка небольшого научно-исследовательского проекта и демонстрация использования научного метода (выполнение данного проекта в учреждении, имеющем непосредственное отношение к науке по лабораторным животным, не является обязательным условием).

Учебный план

Последипломное образование в области науки о лабораторных животных длится от одного года до четырех лет (см. таблицу). Данная рабочая группа рекомендует двухгодичное последипломное образования при обучении, занимающем полный рабочий день, или эквивалентное с частичной занятостью, предусматривающее рассмотрение всех тем и требований категории D. Оно должно включать шесть месяцев на подготовку научно-исследовательского проекта. Каждый из разделов от А до З должен преподаваться в аккредитованных учреждениях и контролироваться назначенным экспертом. В зависимости от имеющейся подтвержденной квалификации, образования или опыта может быть получено освобождение от части курса.

Подробный учебный план

А. Законодательство, благосостояние и этические аспекты

1. Законодательство

а) обзор международного законодательства и норм, касающихся использования животных

— *общее представление о данном предмете, поддержка важных действующих практик, например, Конвенции по международной торговле исчезающими видами растений и животных (CITES), надлежащей лабораторной практики (GLP), обеспечение исторической перспективы;*

б) европейские законы (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 1986 г. и Директива Совета Европы 86/609)

— *содействие проведению дискуссий и консультаций по данному вопросу с учеными из других стран;*

в) национальное законодательство

— *обеспечение соблюдения учеными законов;*

г) процедуры регистрации и выдачи лицензий; компетентные лица; должностные лица, занимающиеся вопросами благосостояния животных; виварии; минимальная площадь пола в клетках и т.п.; поставка лабораторных животных и источники их получения; положения, регулирующие практическую деятельность

— *руководство учреждением в рамках юридических норм;*

д) надзор со стороны органов управления и комиссии по этике

— *осуществление юридического и этического надзора за вивариями и экспериментами на животных;*

е) альтернативы экспериментам на животных, выбор вида животных и их количества в группе (юридические аспекты)

— *наличие у специалистов хороших практических знаний и понимание возможностей и ограничений применения альтернативных методов*

- *проведение научной экспертизы аспектов, касающихся планирования исследований на животных.*

2. Благополучие

а) филогенетические, генетические и онтогенетические аспекты поведения

- *понимание фундаментальных процессов, лежащих в основе поведения;*

б) изучение, коммуникация, социальная организация и взаимодействие с окружающей средой

- *получение знаний, необходимых для оценки встречающегося неадаптированного поведения и возможных его причин;*

в) этологические параметры как индикаторы основных требований к окружающей среде, обогащение окружающей среды и контроль экспериментальных переменных

- *развитие профессионализма и знаний, позволяющих принимать соответствующие корректирующие меры;*

г) поведенческие характеристики интактных и экспериментальных животных (экспериментальный стресс, спонтанные и индуцированные мутации)

- *приобретение навыков по установлению и диагностике нормального и измененного поведения;*

д) гомеостаз, способность к адаптации и ее ограничения, стресс и дистресс

- *понимание процессов, лежащих в основе стресса, его устранения и дистресса;*

е) патология поведения, здоровье

- *осознание того, что здоровье - это нечто большее, чем просто отсутствие болезни, боли и дистресса; проблемы при оценке состояния здоровья;*

ж) распознавание и оценка стресса и дистресса

- *получение знаний, позволяющих производить оценку случаев возникновения стресса и дистресса;*

з) контроль стресса и дистресса

- *развитие профессионализма и знаний, позволяющих принимать соответствующие меры*

3. Этические аспекты проведения экспериментов на животных

а) взаимоотношения между человеком и животными, исторические корни и религиозные аспекты, служащие примером развития библейских и греческих традиций; современные концепции – специализм (безразличие к страданиям животных), эгалитаризм, права животных; антропо- и биоцентрический подходы

- *понимание различных основных этических позиций и их исторических корней*
- *закладка основы для вдумчивого исследования моральных ценностей, невзирая на личные моральные принципы*
- *поощрение чувства ответственности;*

б) внутренние ценности и моральные аспекты использования животных

- *формирование личной этической позиции;*

в) этический диалог и этическая аргументация, ловушки в аргументации, этика общения

- *развитие навыков моральной аргументации и правильного отношения к использованию животных;*

г) различия в философских и научных взглядах на происхождение жизни (библейская версия сотворения мира в сравнении с концепцией эволюции) и проблема взаимопонимания философов и ученых; конфликт между этическими принципами благоговения перед жизнью и использования человеком животных в целях самосохранения

- *эффективное влияние на политические решения и регулирующие деятельность законы*
- *создание основы для проведения дискуссий в этических комиссиях;*

д) модели этической аргументации и этического оправдания научно-исследовательских проектов; этические принципы и руководства, касающиеся проведения научных экспериментов животных

- *убедительное отстаивание своей позиции при контактах с общественностью и средствами массовой информации.*

Б. Управление виварием и его ресурсами

1. Направление рабочих программ
 - а) развитие программ и практических руководств
 - *соответствие требованиям высокого качества содержания лабораторных животных, их биологическим и другим потребностям;*
 - б) развитие структуры персонала
 - *создание условий для выполнения всех административных, управленческих и технических функций;*
 - в) осуществление проверки
 - *создание условий для регулярной оценки деятельности и ее проверки по мере необходимости.*
2. Прием персонала
 - а) стандарты, касающиеся квалификации и опыта
 - *определение различных категорий труда;*
 - б) развитие трудовой иерархии
 - *организация работы персонала и его взаимодействие, описание трудовых обязанностей и целей управления, а также обеспечение программ профессионального роста;*
 - в) критерии и рассмотрение эффективности труда персонала
 - *обратная связь с персоналом и внедрение программ повышения производительности.*
3. Финансовый контроль
 - а) обеспечение бюджета
 - *обеспечение достаточного распределения по отдельным статьям, организация процесса своевременной фиксации индивидуальных расходов;*
 - б) политика закупок
 - *процедуры по проведению переговоров с поставщиками с целью заключения договора о наиболее выгодных ценах;*
 - в) оценка стоимости животных
 - *включение закупочной цены, расходов на содержание и персонал, накладных расходов как необходимых для полного или частичного отчета.*
4. Стратегическое руководство
 - а) стратегия планирования
 - *определение будущих потребностей и направления деятельности;*
 - б) влияние на политику и директивы учреждения
 - *выполнение данных положений и оценка результатов политики и деятельности учреждения.*
5. Компьютеризированные системы управления
 - а) содержание животных и информационная система
 - *содействие при заказе животных, проведение инвентаризации, хранение записей о состоянии здоровья животных и их истории, контроль качества и программы разведения;*
 - б) инвентаризация
 - *обеспечение эффективного снабжения и использования оборудования и материалов;*

- в) производственная бухгалтерия
 - *учет окупаемости использования животных, сооружений и оборудования; развитие основ сдерживания роста издержек;*
- г) контроль факторов окружающей среды
 - *обеспечение их соответствия директивам, правилам и требованиям, касающимся благосостояния животных;*
- д) системы, обеспечивающие соответствие использования животных требованиям законодательства
 - *контроль за легальным использованием животных и сбор статистических данных по их использованию.*
- в. Создание условий для обучения персонала
 - а) разработка и реализация программ
 - *поддержка эффективной работы администрации, руководящего и технического персонала*
- 7. Связи
 - а) внутренние связи
 - *обеспечение на должном уровне сервиса, руководство учреждением, хорошая осведомленность и понимание внутренних проблем;*
 - б) внешние связи
 - *обеспечение хорошего понимания обществом потребностей учреждения, например, формирование в обществе положительного восприятия организации; совершенствование внутренней деятельности на основе новой научной и коммерческой информации;*
 - в) связи с общественностью
 - *овладение навыками общения с широкой общественностью по таким вопросам, как цели, методы и положительные результаты научных исследований.*
- 8. Сотрудничество с научным персоналом
 - а) обеспечение ресурсами
 - *поддержка научных исследований и проведения экспериментальной работы, организация правильного ухода за животными экспертизы, создание условий для оказания помощи в ходе эксперимента и обучения манипуляциям с животными;*
 - б) проведение научных исследований
 - *в сотрудничестве с другими учеными*
 - *индивидуальная работа в какой-либо области науки о лабораторных животных и их благосостояния (см. также «Специфические требования» и «Учебный план»).*
- 9. Эксплуатация вивария
 - а) надлежащая гигиена в виварии
 - *включение всех процедур, поддерживающих те функции, которые касаются удовлетворения биологических и других нужд животных, а также процедур, отвечающих требованиям персонала, осуществляющего уход за животными, исследователей и руководства;*
 - б) хранение материалов и оборудования
 - *обеспечение целесообразного и регулярного снабжения и распределения;*
 - в) контроль и захоронение отходов
 - *осуществление в соответствии с инструкциями;*
 - г) мониторинг и хранение записей
 - *обеспечение эффективного проведения всех операций.*
- 10. Проектирование вивария
 - а) состав и деятельность конструкторской группы
 - *работа с архитекторами, инженерами, топографами и геодезистами,*

консультантами по эксплуатации, представителями финансовых структур, администрацией и заказчиком;

- б) рассмотрение вопроса о местоположении и размещении вивария
- *учет характеристик окружающей среды, влияния внешних факторов и взаимодействия с другими участками внутри данной структуры;*
- в) соображения, касающиеся животных
- *учет таких аспектов, как виды и количество животных, их разведение и(или) закупка, содержание животных и(или) проведение экспериментов, микробиологический статус животных и методы их содержания;*
- г) соображения, касающиеся сооружения
- *основной принцип и тип конструкции; стоимость; детальное планирование и спецификация помещений вивария, вспомогательных структур и их функций; взаимосвязь между виварием и вспомогательными структурами; транспортное обеспечение; обслуживание; окружающая среда и ее контроль; программы содержания животных.*

11. Здоровье и безопасность

- а) законы, инструкции и правила
- *обеспечение безопасности проводимых в виварии операций и их легального разрешения, охрана здоровья персонала.*

V. Биология лабораторных животных

1. Анатомия млекопитающих и других видов животных

- а) общая анатомия
- *описание строения и функций основных органов и систем наиболее часто используемых видов животных;*
- б) сравнительная анатомия
- *выбор наиболее подходящей модели на животных с точки зрения межвидовой экстраполяции данных.*

2. Физиология млекопитающих и других видов животных

- а) общая физиология
- *знание механизмов и физических / химических принципов, лежащих в основе жизненно важных процессов;*
- б) сравнительная физиология
- *выбор наиболее подходящей модели на животных.*

3. Иммунология

- а) общие принципы
- *знание клеточных и биохимические компоненты иммунного ответа;*
- б) животные с иммунодефицитом
- *характеристика наиболее используемых линий и видов.*

4. Сравнительная клиническая патология

- а) преданалитические факторы
- *влияние забора образцов, обращения и хранения на результаты анализа;*
- б) аналитическое оборудование и инструменты
- *выбор и подготовка наиболее подходящего лабораторного оборудования;*
- в) наиболее важные гематологические параметры; показатели коагуляции, агрегации, химический состав кров и анализ мочи
- *выбор наиболее подходящих для контроля анализов;*
- г) границы нормы: определение показателей нормы для различных видов животных и их колебания в зависимости от возраста, пола и линии
- *интерпретация аналитических данных и выбор наиболее подходящей модели на*

- животных;*
- д) программы контроля качества
 - *обеспечение качества аналитических процедур и результатов.*
 - 5. *Посмертное обследование*
 - а) вскрытие трупа
 - *владение наиболее подходящими методами проведения аутопсии;*
 - б) макроскопическая патология
 - *распознавание наиболее важных макроскопических изменений в органах и тканях;*
 - в) изъятие и фиксация органов
 - *надлежащее обращение с образцами до их дальнейшего изучения;*
 - г) гистопатология и гистохимия
 - *знание наиболее важных этапов и методов, используемых в гистопатологии и гистохимии.*
 - 6. *Различные аспекты сравнения с человеком*
 - а) адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция (adsorption, distribution, metabolism, excretion – ADME) и биологическая доступность экзогенных соединений
 - *выбор модели на животных, наиболее подходящей для испытания определенных классов соединений;*
 - б) моделирование на животных патологических состояний человека
 - *знание наиболее важных спонтанных и индуцированных моделей заболеваний человека;*
 - в) экстраполяция на человека данных, полученных на животных
 - *понимание значимости экспериментальных результатов для здоровья человека.*

Г. Содержание, разведение и генетика

- 1. *Содержание*
 - а) системы размещения животных
 - *обеспечение оптимальных условий и оборудования для содержания животных;*
 - б) обогащение окружающей среды
 - *ее соответствие поведенческим и социальным потребностям.*
- 2. *Микро- и макросреда*
 - а) температура, относительная влажность, вентиляция, относительное давление воздуха и его фильтрация, освещение, шум и другие контролируемые факторы окружающей среды
 - *понимание и практическое знание данных параметров и их контроль, поддержание факторов окружающей среды в режиме максимального соответствия потребностям животных и персонала, а также принятым нормам.*
- 3. *Питание и кормление*
 - а) составление диет
 - *влияние различных параметров корма и аспектов кормления на животных и научное исследование;*
 - б) источники энергии, волокна, витамины, минеральные вещества и др.
 - *определение потребностей организма в данных составляющих и соответствие им;*
 - в) режимы кормления
 - *оценка различий между кормлением без ограничения, с ограничениями и кормлением, предполагающим определение потребления корма животным в ходе эксперимента;*

- г) вариации в составе диет
 - *основания для вариаций и связанные с этим проблемы;*
- д) специальные диеты
 - *потребности в различные периоды жизни (отъемыши, молодые и старые животные) и для достижения определенных научно-исследовательских целей;*
- е) влияние копро- и цекофагии
 - *понимание биологического влияния и связанных с этим проблем;*
- ж) влияние диеты на результаты эксперимента
 - *влияние избыточного и недостаточного кормления, состава диеты, а также социальной депривации;*
- з) контаминанты и их контроль
 - *обнаружение и контроль химического загрязнения и заражения микроорганизмами и паразитами;*
- и) влияние методов стерилизации
 - *сравнение преимуществ и недостатков термической, химической обработки, облучения и использования этиленоксида;*
- к) хранение и контроль качества
 - *регулирование и регистрация температуры, влажности и вентиляции при хранении кормов; важность химического анализа.*
- 4. Подача воды
 - а) бутылки и устройства для автоматической подачи воды
 - *определение преимуществ и недостатков использования различных систем;*
 - б) рН, жесткость, микробиологические и химические примеси
 - *определение влияния на здоровье и результаты научных исследований;*
 - в) обработка и стерилизация
 - *определение эффективности и стоимости;*
 - г) лишение воды
 - *осведомленность об этиологии, необходимости обеспечения водой, объеме потребления и влиянии на здоровье.*
- 5. Подстил
 - а) типы подстила
 - *знание оптимальных требований, преимуществ и недостатков различных типов;*
 - б) загрязнители
 - *осведомленность о влиянии на здоровье и результатах экспериментов;*
 - в) обработка, стерилизация и хранение
 - *определение требований в зависимости от типа содержания;*
 - г) использование клеток со сплошным и сетчатым/щелевым полом
 - *определение условий, при которых использование подстила нецелесообразно.*
- 6. Гигиена
 - а) вирусы, бактерии, грибки и простейшие
 - *понимание влияние гигиены на микробиологическое окружение животных;*
 - б) химические примеси
 - *оценка источников химического загрязнения среды обитания животных;*
 - в) чистка, дезинфекция и стерилизация
 - *определение оптимальных условий обработки вивария, оборудования и вспомогательных средств при различных типах содержания животных;*
 - г) микробиологический, паразитарный и химический контроль
 - *организация и осуществление программ мониторинга, необходимых для высококачественного содержания животных;*
 - д) захоронение отходов

- *определение и использование соответствующих методов, соблюдение регулирующих данную деятельность требований.*

7. Разведение

а) размножение позвоночных: циклы изменения репродуктивной системы, окружающая среда и стимулы; видовые, линейные и сублинейные различия

- *понимание теоретических и практических аспектов размножения;*

б) методы разведения; продуктивность; групп постоянного и временного скрещивания; оборота стока разведения; программы скрещивания, предъявляющие различные требования к животным (количество, возраст, пол и т.д.); генетические характеристики и схемы разведения (бэккросс, интеркросс, рандомбридинг, контроль чистоты инбредных линий, генетический контроль влияние условий содержания и окружающей среды

- *получение теоретических и практических знаний, необходимых для выбора в различных ситуациях оптимального метода размножения*

в) статус здоровья животных в свете их разведения; влияние на продуктивность; методы оборудования, используемые для деконтаминации; содержание животных с определенным статусом здоровья; мониторинг здоровья

- *понимание важности состояния здоровья животных и знание методов, используемых для его поддержания и пригодных для уничтожения определенных патогенных организмов;*

г) организация и управление, анализ затрат

- *характеристика образовательных программ по организации вивария и эффективному и экономичному руководству.*

8. Генетика

а) введение, менделирующая наследственность полигенные признаки

- *ознакомление с теорией генетики;*

б) аутбредная колония: определение, преимущества и ограничения, ведение аутбредных колоний, стандартизация, дрейф генов

- *правильное поддержание и разведение аутбредного стока;*

в) инбредная колония, гибриды F1; определение, преимущества и ограничения

- *содержание и разведение инбредных, рекомбинантных линий и гибридов F1;*

г) генетические модели заболеваний на животных: полигенные модели, полученные селекцией; спонтанные мутации; трансгенные и нокаутные животные (определение, чрезмерная экспрессия гена, гомологичная рекомбинация, экспрессия и трансмиссия гена, валидация модели); влияние генетического фона

- *знание различных методов создания генетических моделей на животных;*

г) контроль генетической стандартности: фенотип, пересадка кожных трансплантатов, биохимические маркеры, иммунологические маркеры, маркеры ДНК

- *создание программ генетического мониторинга и обработка полученных данных,*

Г. Микробиология и заболевания

1. Микробиология

а) специальный обзор бактериологии, паразитологии и вирусологии лабораторных животных; понятия, включающие классификацию (таксономию), физические аспекты, характеристики, строение и резистентность к внешним условиям (физическим, химическим, биологическим); условия размножения и выживания; методы определения, включая микроскопические, культуральные, серологические и анализ ДНК

- *понимание этиологии и отличий от инфекционных заболеваний; элементарное представление о возможных методах лечения, применяемых штатными ветеринарами;*

б) микробиологический статус различных категорий животных: гнотобиотические, безмикробные, свободные от определенных патогенных организмов и конвенциональные животные; модифицированные животные (облученные, трансгенные или др.); микробиологические процедуры; программы скрининга

— *знание гигиенического и санитарного статуса некоторых определенных категорий лабораторных животных и осознание взаимодействий между животными и внешними факторами.*

2. Заболевания

а) неинфекционные заболевания, обнаруживаемые у лабораторных животных: физические, химические, радиационные и другие повреждения; естественные физиологические нарушения (проблемы, возникающие при беременности, рождении, в результате драк между животными, возрастные проблемы); врожденные заболевания; иммунологические заболевания; онкогенез; расстройства алиментарного происхождения (перекармливание, голодание, дефициты и т.д.); экспериментальная или непредвиденная интоксикация; аномальное поведение: тик, членовредительство, поведение, связанное со стрессом; хирургическая патология

— *знание основ их этиологии и отличий от инфекционных заболеваний, возможное лечение;*

б) инфекционные заболевания: болезни лабораторных животных; зоонозы, эпидемиология и специальные меры безопасности; общие и специфические симптомы отдельных заболеваний; диагностика; профилактика, лечение и его эффективность; особое внимание к индуцированным инфекционным заболеваниям

— *общее представление о стратегии выявления проблем, связанных со здоровьем, а также о методах диагностики основных заболеваний, определения возбудителей и соответствующих мерах, предпринимаемых штатным ветеринаром.*

3. Симптоматика клинических заболеваний

а) общие проявления: внешний вид, слабость, масса тела, температура, нарушения кожного покрова и т.д.; специфичные проявления со стороны различных систем организма: нервная система: боль, обмороки, парез, паралич; опорно-двигательный аппарат; сердечно-сосудистая и дыхательная системы; пищеварительная система; мочеполовая система; эндокринная система; показатели анализов, выходящие за пределы нормы, и соответствующие симптомы

— *общее понимание этиологии, симптоматики и влияния данных заболеваний на экспериментальные результаты;*

б) диагностика, принципы дифференциальной диагностики

— *понимание основ работы штатного ветеринара по контролю и ведению отчетности о статусе здоровья лабораторных животных, а также диагностике по клиническим проявлениям изменений состояния здоровья.*

Д. Планирование и реализация научно-исследовательских программ и экспериментов на животных

1. Определение цели исследования

а) обзор литературы

— *умение вести поиск в общих базах данных по биомедицине и ветеринарии (например, в MEDLINE, CAB-I, CSA, AGRICOLA) и специализированных базах данных (например, в PREX, T-BASE, TOXUNE)*

— *хранение литературы и организация поисковой системы;*

б) анализ необходимой информации и выдвижение гипотезы

— *отбор необходимой информации и определение цели и задач исследования на животных с учетом ограничений, обусловленных бюджетом, временем, оборудованием, оснащением и т.п.*

- *составление плана по проведению эксперимента на животных.*
- 2. Выбор модели на животных
 - а) разработка критериев
 - *получение ясного представления о требованиях, предъявляемых к модели на животных, и учет аргументов за и против использования альтернатив;*
 - б) специфические характеристики видов и линий
 - *поощрение поиска максимального соответствия между моделью на животных и требованиями эксперимента;*
 - в) требования к микробиологической стандартизации, животные с определенным микробиологическим статусом
 - *представление о влиянии микробиологического статуса животного на результаты экспериментов;*
 - г) требования к генетической стандартизации, модели с определенной генетической характеристикой (см. также разд. Г8)
 - *знание различных классов животных с определенной генетической характеристикой преимуществ и недостатков использования инбредных, коизогенных, конгенных, трансгенных линий, гибридов F1, аутбредных стоков и популяций гибридов;*
 - д) генетические модели в сравнении с индуцированными
 - *общее представление о различных категориях моделей на животных;*
 - е) приобретение (закупка, транспортировка, видовые особенности, обусловленная окружающими условиями продолжительность адаптации, карантин)
 - *знание практических и организационных аспектов приобретения животных для научных исследований;*
 - ж) видовые особенности требований к условиям окружающей среды
 - *ознакомление с требованиями и потенциальными проблемами, возникающими при содержании в виварии животных различных видов*
 - *представление о взаимосвязи между условиями содержания и благосостоянием животных.*
- 3. Планирование эксперимента
 - а) определение необходимого количества животных для экспериментальных и контрольных групп: power-анализ
 - *понимание важности консультации со статистиком перед началом эксперимента, например, для оценки валидности выборки и достоверности результатов, а также для принятия решения, одобрить данную гипотезу или отказаться от нее;*
 - б) выборка
 - *выработка стратегии получения типичной выборки данной популяции;*
 - в) рандомизация; планы опытов по схемам рандомизированных блоков, кроссовера (перекрещивания), латинского квадрата (решетка-квадрат) и сплитплота (расщепленных участков)
 - *ознакомление с различными подходами к планированию эксперимента в зависимости от поставленных задач;*
 - г) статистический подход
 - *знание основ статистического анализа в экспериментах на животных и возможностей статистики в сокращении необходимого количества животных;*
 - д) экспериментальные переменные
 - *их определение, описание, влияние на научные исследования и контроль статистическими методами.*
- 4. Воздействие на опытные и контрольные группы

- а) экспериментальные процедуры (см. также разд. Ж)
 - оценка уровня дискомфорта и степени его влияния на благосостояние животных и результаты экспериментов;
- б) возможности усовершенствования
 - стимуляция поиска совершенствующих альтернатив;
- в) использование плацебо/симуляции
 - выбор соответствующей контрольной группы;
- д) анестезия/аналгезия/хирургия
 - подтверждение отличия ответа на воздействие от эффекта используемых анестетиков/анальгетиков или проводимой хирургической процедуры.

5. Организационные и административные аспекты проведения экспериментов на животных

- а) представление протокола на рассмотрение
 - знание основных принципов, принимаемых во внимание при подаче протокола на рассмотрение комиссии по этике или другой контролирующей организации;
 - б) описание материально-технического обеспечения, компетентность персонала, сбор и обработка данных
 - получение информации, необходимой для эффективного проведения исследования, включая разделение функций между различными лицами, вовлеченными в эксперимент.
- #### 5. Отчет о результатах эксперимента
- а) устное представление исследования
 - представление научного доклада;
 - б) подготовка манускрипта в соответствии с требованиями международного журнала соответствующего профиля
 - публикация результатов исследования.

Е. Анестезия, анальгезия и эвтаназия

1. Физиология ноцицептивной чувствительности
 - а) периферическое восприятие боли
 - представление о современной концепции боли, видовых и индивидуальных различиях восприятия и ответа на острые и хронические болевые ощущения
 - знание локализации болевых рецепторов в коже и тканях животных и химической медиации ноцицептивной активности;
 - б) передача импульсов
 - знание видовых особенностей восходящих путей передачи болевых ощущений;
 - в) периферические и центральные механизмы распознавание боли
 - представление о разнообразии нервных и эндокринных механизмов восприятия острой и хронической боли, путях модуляции входящих сигналов;
 - г) болевой ответ
 - представление о нисходящих путях, местной и общей реакции на качественно и количественно различающиеся раздражители;
 - д) реакция животных различных видов на боль
 - знание видовых и индивидуальных различий восприятия боли.
2. Фармакология и фармакокинетика соединений, используемых для анестезии, анальгезии и эвтаназии
 - а) соединения, антагонисты, миорелаксанты
 - ознакомление с наиболее распространенными соединениями, их эффективностью и фармакокинетикой;
 - б) видовые различия
 - иллюстрация широкого диапазона ответов на введение соединений;

- в) экзо- и эндогенные факторы, влияющие на фармакокинетику
 - учет влияния окружающей среды (например, циркадных ритмов, температуры) и субъективных факторов (например, вида, пола, состояния здоровья, пищевого статуса, возраста);
- г) влияние на системы органов
 - обращение особого внимания гомеостазу и патологическому влиянию;
- д) влияние на эксперимент
 - идентификация факторов, оказывающих влияние на результаты эксперимента;
- е) безопасность персонала
 - оказание особого внимания безопасности в отношении тератогенного и индуцированного ферментами воздействия, предупреждение приема препаратов персоналом (наркомании).

3. Анестезия

- а) оборудование
 - применение оборудования, обслуживание и безопасность;
- б) до- и посленаркозные процедуры
 - осуществление на практике и видовые особенности ухода;
- в) общий и балансируемый наркоз
 - представление о теории и практике ингаляционного наркоза; анестезии, вызываемой инъекруемыми препаратами; принципах искусственной вентиляции легких;
- г) местная и региональная анестезия
 - понимание когда, где и как их следует проводить;
- д) проведение и контроль
 - оценка глубины наркоза и различных жизненно важных функций, поддержание показателей на уровне гомеостатического порога, предупреждение осложнений; действия в критических ситуациях.

4. Анальгезия

- а) оценка боли
 - распознавание и оценка этиологических и жизненно важных показателей острой и хронической боли;
- б) благосостояние животных
 - см, разд. А2;
- в) цель эксперимента
 - идентификация факторов, оказывающих влияние на результаты эксперимента;
- г) последствия
 - представление о влиянии веществ на гомеостаз, заживление ран, поведение и т.п.; схемы введения препаратов;
- д) привыкание и толерантность
 - специальный учет наркотических веществ и схем введения препаратов.

5. Эвтаназия

- а) законодательство
 - знание правовых аспектов и европейских рекомендаций;
- б) этика, цели и благосостояние
 - рассмотрение моральных аспектов эвтаназии, причин умерщвления животных и наиболее гуманных методов проведения эвтаназии;
- в) страх и дистресс у животных
 - учет и минимизация реакций отвращения у животных;
- г) эмоциональное состояние лица, проводящего эксперимент

- *учет эмоционального состояния человека с рассмотрением в первую очередь зооцентрической точки зрения, обсуждение эстетических аспектов в сравнении с этическими;*
- д) *оборудование*
- *ознакомление с его разновидностями, эксплуатацией, безопасностью и обслуживанием;*
- е) *метод*
- *представление о видовых особенностях, легкости выполнения, надежности и эффективности, быстроты и необратимости, влиянии на систему органов и экономичности.*

Ж. Хирургия и экспериментальные процедуры

1. *Хирургия*
 - а) *определение*
 - *понимание принципов и требований асептической техники, хирургии, предполагающей выживание организма или являющейся конечной процедурой, обширных и незначительных операционных процедур;*
 - б) *подготовка к операции*
 - *оценка и проведение всех необходимых процедур по подготовке животного, места хирургического вмешательства, инструментов и оборудования, а также оперирующего хирурга, специализирующегося на проведении различных операций;*
 - в) *анестезия*
 - *см. разд. Е;*
 - г) *операционные осложнения*
 - *приобретение и использование необходимого регистрирующего оборудования для обнаружения и коррекции во время операции возможных осложнений (гипотермии, обезвоживания, кровотечения, изменений кислотно-щелочного равновесия);*
 - д) *оперативные приемы*
 - *оптимальные линии надреза, обращение с тканями, гемостаз и закрытие раны у соответствующих видов животных.*
2. *Уход за животными, нуждающимися в хирургическом вмешательстве*
 - а) *предоперационная подготовка*
 - *оценка соответствия животного предполагаемой процедуре, проведение надлежащей адаптации, акцентирование внимания на адекватной гидратации и воздержании от пищи в соответствии с требованиями;*
 - б) *уход во время проведения операции*
 - *обеспечение и мониторинг правильного дыхания, адекватной деятельности сердечнососудистой системы, внутренней температуры тела, гидратации и других основных функций, когда это необходимо;*
 - в) *послеоперационный уход и ослабление боли*
 - *контроль за полным соответствием предварительно намеченных и основанных на клинической оценке элементов требованиям по сведению до минимума заболеваемости и смертности*
 - *проведение в случае показаний мероприятий по ослаблению боли.*
3. *Специфические хирургические приемы*
 - *выполнение различных хирургических процедур, как ниже перечисленных, так и не вошедших в данный раздел;*
 - а) *техники трансплантации, пересадка новообразований*
 - *представление об основах трансплантационного иммунитета:*

- гистосовместимость, отторжение трансплантата и области, наиболее подходящие для трансплантации;*
- б) искусственные имплантаты
- *оценка и пересадка наиболее часто используемых имплантатов (сердечно-сосудистых, стереотаксических, мочевых, желудочно-кишечных), знание основных принципов внешних соединений и телеметрических техник, основ ухода за трансплантатом;*
- в) эндокриноэктомии
- *знание основ и овладение навыками по их проведению на соответствующих видах животных, включая специальные соображения и последующий уход.*
4. Введение соединений
- а) обращение с животными и их фиксация
- *выполнение процедур с минимальным стрессом для животного и исследователя*
 - *требования, методы и уход;*
- б) общие аспекты
- *знание необходимых характеристик вводимых субстанций;*
- в) пути введения
- *представление об энтеральном и всех парентеральных путях введения для соответствующих видов животных;*
- г) техники введения
- *введение препаратов различными способами и оценка путей введения, вводимые объемы, видовые особенности.*
5. Забор образцов
- а) места для забора
- *описание и оценка различных мест для забора образцов у разных видов животных;*
- б) общие аспекты
- *знание количественных и качественных характеристик;*
- в) методы забора жидких сред организма
- *забор крови, мочи и экскрементов, содержимого желудочно-кишечного тракта, семенной жидкости, спинномозговой жидкости, молока, перитонеальной жидкости и клеток, экзокринных жидкостей, бронхоальвеолярный лаваж.*
6. Разные техники
- а) методы регистрации и физиологические данные
- *надежная регистрация показателей основных систем организма (например, сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной) как для наблюдения за пациентом, так и в научно-исследовательских целях;*
- б) образование антител
- *ознакомление с методами получения антител, связанными и не связанными с использованием животных;*
- в) методы перфузии
- *представление о перфузии in vivo (например, почек, кишечника) и с целью фиксации различных органов;*
- г) фиксация
- *представление о требованиях к использованию, методах и необходимом уходе.*

Категорирование животных

Получение надежных и воспроизводимых результатов медико-биологического эксперимента можно достигнуть лишь при соблюдении стандартности всех его слагаемых и условий проведения. В этом смысле лабораторное животное является наиболее уязвимым звеном в системе медико-биологического эксперимента. Его состояние как живого объекта, зависит от воздействия многочисленных как экзогенных, так и эндогенных факторов, влияние которых далеко не всегда бывает явным и легко регистрируемым. Среди них, прежде всего, следует отметить факторы инфекционной и инвазионной природы. Причем различные, в том числе даже патогенные представители вирусной и бактериальной флоры, не всегда вызывают клинически явную картину заболевания. Часто они протекают в латентной форме или же в виде носительства. В настоящее время актуальность приобретает так называемая оппортунистическая, эндогенная инфекция, активизирующаяся при иммунодефицитных состояниях.

Классификация животных-моделей

Достижение современного уровня медико-биологического исследования 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 требований системы GLP (Good Laboratory Practice) для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ предъявило еще более жесткие условия к проблеме стандартизации животных, состоянию их здоровья.

Основой этих критериев является принцип недопустимости носительства ряда патогенных и условно-патогенных агентов инфекционной и инвазионной природы: вирусов, бактерий, паразитов. Во многих странах разработаны стандарты различных категорий качества животных по состоянию здоровья. Они включают перечень возбудителей, носительство которых исключается. Чем выше категория качества животного, тем больше перечень недопустимых агентов. Однако, стандарты различных стран не идентичны. *Единой международной классификации лабораторных животных по категориям качества и соответствующих стандартов не существует.* В связи с этим, животные, именуемые как SPF (Specific pathogen free), не имеют четкой характеристики качества, и, полученные из разных источников, могут значительно различаться по своему статусу. 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.

Специалисты нашей страны совместно с зарубежными коллегами на основе мирового опыта также предприняли попытку создания требований к качеству лабораторных грызунов различных категорий, которые были приняты в 1989 г. на совместном совещании в Софии. Однако опыт работы по контролю состояния здоровья животных позволил видоизменить эти нормативы (Таблица).

Таблица 1

Классификация лабораторных животных по категориям и их использование в биомедицинских исследованиях

Категория	Характеристика	Метод получения	Барьер	Контроль	Использование
1	Конвенциональные (CV)	Случайный	Отсутствует (открытая система)	Стандарт 1 категории	В целях обучения (острые опыты)
2	Улучшенные конвенциональные (MD или Minimal Diseases)	От животных более высокой категории качества	Неполная барьерная система	Регулярный по стандарту 2 категории.	Рутинные исследования в кратковременных экспериментах
3	SPF (СПФ или свободные от патогенной флоры)	От животных, содержащихся в изоляторах и ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система	Регулярный по стандарту 3 категории	Изготовление стандартных препаратов, испытание на токсичность препаратов Хронические эксперименты длительностью 6 мес.
4	SPF или СПФ Максимально свободные от условно-патогенной флоры	От гнотобиотных или безмикробных животных, ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система высокой степени надежности	Регулярный по стандарту 3 категории, с использованием ПЦР	Получение культур клеток при производстве вакцин, поддержание штаммов бактерий и
5a	Безмикробные (аксенные GF)	Гистерэктомия Свободный от любой или известной формы жизни микроорганизмов	Изолятор	Регулярный на наличие ассоциированных микроорганизмов	вирусов перевиваемых опухолей, испытание новых фармакологических средств, проведение фундаментальных исследований иммунитета, воспаления и т.д.
5b	Гнотобиотные (категории GFX)	Используются для описания животных и систем, все формы жизни в которых известны	Изолятор со специальным контролем	Регулярный, с использованием ПЦР и др. специальных методов контроля	

Классификация основана на методе получения исходных для разведения животных, наличии и надежности барьера и глубине или уровне контроля статуса животного по соответствующему стандарту (требованию). Предлагается различать 5 категорий качества животных: конвенциональные, содержащиеся в открытой системе (категория 1); улучшенные конвенциональные, находящиеся в барьерной системе неполного типа. Исходными животными этой категории могут быть только животные более высокого класса качества (SPF). Эта категория качества животных соответствует категории, именуемой во многих странах MD (Minimal Diseases), или (категория 2); а также категории – SPF животные, содержащиеся в строгой барьерной системе (категория 3); гнотобиоты и 4) безмикробные или аксенные животные, содержащиеся в изоляторах (категории 4, 5a и 5b).

SPF – животные биомодели

Конвенциональные животные являются животными-носителями различных неизвестных микроорганизмов. Такие животные могут содержаться как в стерильных, так и в обычных условиях и являются потенциальными носителями патогенов.

Обычные лабораторные животные, используемые в биомедицинских исследованиях – просто здоровые особи. Использовать в исследованиях животных-гнотобиотов практически невозможно ввиду их чрезвычайной дороговизны, объяснимой необходимостью его содержания в изоляторе.

Противоположностью этому являются SPF-животные, которые, с одной стороны, являются носителями целого ряда неизвестных видов микроорганизмов, но, с другой, – свободно от одного или нескольких специфических патогенных микроорганизмов.

SPF-животные, микробиологический статус которых подтвержден, являются более экономичной альтернативой гнотобиотам. Однако гнотобиотные технологии представляют наилучший способ развития базовой линии SPF-животных.

Производство SPF-животных выглядит следующим образом. Первоначально безмикробных животных, с неразвитой системой иммунной защиты, ассоциируют с «коктейлем» аэробных и анаэробных микробов-симбионтов. Эта непатогенная микрофлора способствует развитию системы иммунной защиты, которая в свою очередь позволяет животным выжить вне изолятора в условиях обычного содержания. Ожидается, что животное получит из окружающей среды дополнительно некоторые непатогенные организмы, что завершит или стабилизирует кишечную флору.

Здоровью колоний лабораторных животных постоянно угрожают инфекции. Невозможно ограждать колонии животных от вторжения нежелательных организмов вечно. Для того чтобы как можно дольше или, по крайней мере, до окончания эксперимента поддерживать здоровую популяцию животных необходимы квалифицированные научные сотрудники и подготовленный персонал.

При надлежащем оборудовании и уходе можно поддерживать удовлетворительное состояние здоровья колоний SPF-животных на протяжении нескольких лет. Но даже в оптимальных условиях статус здоровья колонии будет постепенно снижаться и приведет к необходимости вновь создать популяцию животных из свежего биоматериала. Перед тем как приступить к воссозданию колонии, необходимо предварительно тщательно вычистить и продезинфицировать отсек, в котором содержались животные. Хорошо оснащенная и действенная шлюзовая система и навыки персонала являются основной гарантией снижения риска проникновения инфекции в отсеки размножения животных и содержания особей, предназначенных для эксперимента.

Как уже упоминалось ранее, для создания здоровой группы животных с подтвержденным микробиологическим статусом для получения племенного потомства требуются квалифицированные специалисты, оборудование и гнотобиотная технология. При проведении работ по возобновлению популяции лабораторных SPF-животных необходимо также наличие лаборатории, осуществляющей генетический контроль. Поскольку внутреннее пространство изолятора ограничено (и в него можно поместить лишь определенное количество пар для получения потомства), для воссоздания колонии необходимо отбирать животных с учетом генетического профиля имеющихся лабораторных линий и будущей колонии.

Гнотобиотные животные-биомодели

Гнотобиология (от греческих слов *gnotos*— известный и *bios* — жизнь) – раздел экспериментальной биологии, занимающийся получением и выращиванием стерильных животных (гнотобиотов), а также животных, микрофлора которых представлена одним

или несколькими видами микроорганизмов. Гнотобиоты используются в ветеринарии для изучения болезней, сельскохозяйственных животных с невыясненной этиологией, а также для выяснения роли микробов в патогенезе многих болезней. На основе использования гнотобиологической техники проводятся работы по предупреждению инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: создаются стада животных типа СПФ (без специфических патогенных факторов). Хозяйства, включающие СПФ стада, должны работать по типу закрытых предприятий со строгими ветеринарно-санитарными правилами режима хозяйства.

Безмикробные и гнотобиотические модели не являются альтернативой экспериментам с использованием обычных животных, это объекты, пригодные для специфических исследований.

Гнотобиология – это производство в научных целях биологических организмов – животных, растений и людей, наличие в которых полезных или нетипичных микроорганизмов полностью известно в пределах современной диагностики. Гнотобиотные животные могут быть:

безмикробными – то есть свободными от всех видов микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибов и паразитов), которые можно обнаружить современными методами диагностики;

моно-, ди- и полиассоциированными – в организме которых, присутствуют 1, 2 или несколько видов известных микроорганизмов (изначально безмикробное животное, заселенное одним или более видом известных микроорганизмов).

Животные-гнотобиоты должны выращиваться в изоляторах. Изолятор должен обладать некоторыми обязательными признаками:

- внутренняя поверхность и содержимое безмикробного пространства, клетки или помещения должны быть выполнены из безмикробных материалов и в нем должна поддерживаться безмикробная среда;
- к внутреннему пространству изолятора и его содержимому должен быть обеспечен зрительный доступ;
- необходимо наличие специальных приспособлений для манипуляций внутри изолятора, а также для помещения в него гнотобиотного содержимого извне без риска нарушения гнотобиотных условий;
- должны быть оборудованы шлюзы для перемещения безмикробных животных и материалов в и из пространства без нарушения внутренних гнотобиотных условий;
- во избежание нарушения безмикробных условий должна быть оборудована вентиляционная система, позволяющая проветривать пространство помещения и создающая внутри него положительное давление.

Производство безмикробных млекопитающих возможно благодаря тому, что эмбрион в чреве здоровой матери является микробиологически стерильным. Незадолго до окончания беременности плод может быть асептично извлечен посредством гистерэктомии или кесарева сечения и помещен в стерильный изолятор. Молодняк может быть вскормлен в изоляторе безмикробной приемной матерью или искусственным молоком по составу приближенным к натуральному. Данная процедура на сегодняшний день редко используется в лабораториях для получения гнотобиотных мышей и крыс, поскольку они есть в продаже. Популяции гнотобиотов должны включать в себя достаточное количество особей репродуктивного возраста для поддержания генетического разнообразия потомства.

Производственные масштабы, необходимые для поддержания стабильного приплода безмикробных крыс или мышей выходит за рамки бюджета большинства исследовательских лабораторий.

Безмикробные животные видов иных, нежели мыши или крысы, должны выращиваться самим потребителем. Не представляет особой сложности получение

безмикробных морских свинок, поскольку их детеныши достаточно развиты на момент появления, на свет и не требуют длительного, а иногда даже и вовсе, искусственного вскармливания. Низкие показатели выживания у кроликов. Кошек, собак и некоторые виды сельскохозяйственных животных можно вырастить безмикробными, но из-за их значительного размера, они представляют трудности для длительного содержания в изоляторах.

Мониторинг здоровья лабораторных животных

Оценка качества лабораторных животных в процессе содержания и эксперимента должен включать в себя микробиологический и генетический контроль, контроль внешней среды, заключающийся в мониторинге температуры, влажности, освещения, шума и т.д., и контроле питания.

Использование животных низкого качества может привести к необходимости увеличения количества животных для проведения эксперимента и даже полностью исказить результаты опыта.

Контроль качества животных и учет

В соответствии с *Европейской конвенцией* по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004 г.) следует придерживаться нормативов содержания лабораторных животных.

В особых случаях, для молодых или голых особей может требоваться содержание при более высоких температурах. Все ввозимые в страну животные должны пройти карантин согласно национальному законодательству. Сроки карантина в условиях лаборатории обычно определяются соответствующим лицом исходя из обстоятельств, этим лицом обычно является назначенный учреждением ветеринар.

Контроль качества должен проводиться на основе использования стандартных процедуры обращения с животными, касающихся размещения, питания, физического обращения, ухода и контроля состояния здоровья. Должны учитываться следующие факторы: размер клеточного оборудования, количество животных в одной клетке, методы их удерживания и перемещения, а также используемая система разведения. Другой важной переменной для качества животных является кормление. Основные показатели кормления должны быть проанализированы и зафиксированы для каждого эксперимента. Дополнительно следует проверять корм на наличие химического загрязнения.

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Агенты, в обычных условиях не вызывающие заболеваний, могут вызвать *проблемы* в ходе проведения эксперимента *из-за стресса*, испытываемом животными. Другие агенты, как например, лактатдегидрогеназа вируса мышей может не вызвать заболевания в процессе эксперимента, но исказить его результаты. Учитывая это, желательно использовать как можно более «чистых» лабораторных животных, с известным микробиологическим статусом.

Генетический профиль лабораторных животных может быть крайне важным для успеха эксперимента. Учреждения, занимающиеся лабораторным животноводством, должны уделять особое внимание генетической чистоте животных. В рамках этих учреждений должны действовать программы по предотвращению генетического загрязнения линий, по вине человека или в результате случайного спаривания, и раннему выявлению мутаций. Каждая линия имеет особый генетический профиль, определить который можно с помощью биохимических, иммунологических и морфологических

маркеров. Желательно проводить предварительный генетический контроль до начала эксперимента.

Важно вести письменный учет процедур, проводимых с животными; обычно для этих целей заводится специальный журнал. В журнал должны заноситься записи о ежедневных наблюдениях, проводимых процедурах и другая текущая информация. Следующие рекомендации, содержащиеся в Правилах лабораторной практики, желательно использовать для обеспечения контроля качества животных и ведения журнала.

В организации должны быть приняты стандартные правила обращения с животными, включая содержание, питание, удерживание и перемещение и уход:

- ✓ все новые животные, полученные из внешних источников, должны быть изолированы и пройти процедуру карантина согласно ветеринарным требованиям;

- ✓ на начало проведения доклинических испытаний все животные должны быть здоровыми и не являться носителями агентов, способных повлиять на результаты исследования. Если в ходе эксперимента животное заболело или стало носителем какого-либо агента, его необходимо изолировать. Данные животные могут получать лечение, если оно не повлияет на результаты исследования. Результаты диагностики, назначенное лечение и его описание, а также даты проведения лечения должны быть документированы и сохранены;

- ✓ теплокровные животные, за исключением грызунов, еще питающихся молоком матери, используемые в лабораторной практике, которых требуется вынимать из клетки, должны быть соответствующим образом идентифицированы (татуировкой, цветным кодом, сережкой, кольцом на ноге и т.д.);

- ✓ вся информация необходимая для идентификации особи, размещенной вместе с другими животными, должна быть доступна в местах содержания этих животных;

- ✓ при необходимости, животные различных видов содержат в разных помещениях. Животные одного вида, но участвующие в различных экспериментах, обычно также содержатся в разных помещениях во избежание искажения результатов эксперимента. Если же их смешение необходимо, должны быть приняты меры для их адекватной дифференциации;

- ✓ клетки, стеллажи и дополнительное оборудование должны очищаться и стерилизоваться с достаточной периодичностью;

- ✓ вода и корм для животных должны периодически проверяться для того, чтобы удостовериться, что уровень их естественного загрязнения не превышает показателей, определенных в протоколе, выше которых загрязнение может повлиять на результаты эксперимента. О результатах проверки должны проводиться записи;

- ✓ подстилки, находящиеся в клетках и загонях, не должны влиять на результаты исследования. Менять их нужно по мере необходимости для обеспечения животному сухости и чистоты;

- ✓ если используются какие-либо препараты против паразитов об этом необходимо делать запись в журнал. Препараты, способные повлиять на результаты исследования не используются.

Стандартность животных определяется мониторингом их статуса в соответствии с категорией. Регулярный мониторинг осуществляется с минимальной частотой: для животных 1-2 категории – 1 раз в 6 месяцев; для 3-4 категории – 1 раз в 2-3 месяца; для 5 категории – 1 раз в 6 месяцев.

Для контрольного обследования животные отбираются отдельно из каждой зоны обитания (корпуса). Минимальная выборка должна составлять не менее 10 животных, из которых 5 – в возрасте 10-12 недель, 5 – в возрасте старше 6 месяцев. При наличии у животных клинических признаков болезней выборка определяется эпизоотической ситуацией. При этом обязательно патогистологическое исследование.

Мониторинг проводится специалистами контрольно-диагностической лаборатории с использованием быстрых и надежных современных методов индикации инфекционных агентов. По результатам мониторинга определяется категоричность животных.

Унификация критериев оценки состояния здоровья лабораторных животных и стандартизация их при постоянном мониторинге статуса дает возможность получения надежных и сравнимых результатов медико-биологических экспериментальных исследований.

Микробиологический мониторинг

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Микробиологический контроль лабораторных животных посредством ПЦР-реакций, посева флоры на питательных средах, серологических и микроскопических исследований, преследует обычно 2 цели: диагностику заболеваний и контроль микробиологического статуса.

Основой диагностики заболевания является микробиологическое обследование, но в ходе ее также учитывается и другая информация, касающаяся клинической картины, репродуктивных функций и патологий. Образцы микробов и пробы, которые необходимо взять у животных, определяются соответственно клиническими и патологическими отклонениями. Время проведения контроля не фиксировано и зависит от проявления заболеваний.

Микробиологический мониторинг представляет собой процесс, призванный периодически подтверждать неизменность микробиологического статуса животного или группы животных по сравнению с ожидаемыми показателями.

В этих целях у случайно выбранных животных из общей популяции берутся пробы для выявления определенных видов микробов с целью выяснения микробиологического статуса животных. Таким образом, эти исследования могут проводиться с целью обнаружения как патогенов, так и непатогенов, то есть микробов, являющихся частью нормальной флоры. В микробиологический контроль необходимо также включать обследование на наличие паразитов.

Количество животных, у которых необходимо взять пробы для микробиологического контроля, зависит от уровня инфицирования популяции. Например, в случае, если показатель инфицирования превышает 50%, для обнаружения возбудителя достаточно взять анализы у нескольких животных, но, если уровень инфицирования ниже 20%, возбудителя можно найти, только обследовав, как минимум, 20 особей. В случае, если искомые патогены обладают средними и высокими показателями инфицирования 20-50%, способными повлиять на результаты исследования, достаточно обследовать 10 особей.

С другой стороны контроль колоний животных рекомендуется проводить каждые 2-3 месяца, поскольку высокий уровень антител в организме животного сохраняется в течение нескольких месяцев после инфицирования. Таким образом, исследование присутствующих антител является важной процедурой диагностики в микробиологическом контроле.

Микробиологическое обследование и контроль, а также диагностика заболеваний представляют ряд трудностей ввиду ограниченного доступа к необходимому оснащению лабораторий и реагентам, включая качественные питательные среды и антигены для серологических тестов, а также по причине недостаточного количества квалифицированных специалистов. Создание диагностических лабораторий во всех местах содержания лабораторных животных представляется нецелесообразным. Вместо этого целесообразно использовать те центры, которые проводили бы микробиологические обследования, консультировали по вопросам осуществления контроля качества животных

и осуществляли подготовку сотрудников для центров лабораторного животноводства. Обследование на присутствие паразитов может проводиться на месте, поскольку его осуществление проще и более экономично, чем тесты, основанные на посевах и серологических исследованиях, хотя возможно использование простых наборов для серологических тестов.

Таблица 2

Сравнительные методы микробиологической диагностики

Метод	Преимущества	Недостатки
Микроскопическое исследование	Простота. Прямое выявление патогенных микроорганизмов. Возможность различения микроорганизмов по морфологическим признакам	Трудоемкость, длительность. Низкая чувствительность. Невозможность различения сходных микроорганизмов. Необходимость высокой квалификации персонала для интерпретации результатов
Культивирование <i>in vitro</i> для иммунизации мышей	Обнаружение только жизнеспособных микроорганизмов. Возможность определения вирулентности и инфекционности.	Длительность анализа, высокая стоимость. Разные линии животных дают разные ответы. Потеря жизнеспособности в организме животного. Использование животных
Иммунохимические методы	Простота, непродолжительность анализа. Возможность автоматизации. Возможность тестирования большого числа образцов.	Не всегда специфичен. Невозможность разграничения острой и латентной форм инфекции
Полимеразная цепная реакция – ПЦР	Простота, быстрота, высокие чувствительность и специфичность. Прямое обнаружение ДНК возбудителя. Возможность различения разных видов патогенов. Независимость результатов от предыдущих инфекций. Не требует жизнеспособности патогенов. Возможность автоматизации	Невозможность различить живые и мертвые микроорганизмы. Возможность получения ложноположительных результатов

Для проведения микробиологического контроля могут применяться различные методики. В общем виде методы проверки могут быть сведены к некоторым обязательным моментам.

Использование животных-«индикаторов» с известным микробиологическим статусом. Животных помещают в ту же окружающую среду, в которой находится проверяемая популяция, и периодически их умерщвляют и обследуют. Голые (атимичные) мыши являются прекрасными индикаторами, поскольку у них присутствует иммунодефицит и они особенно подвержены воздействию патогенов. Но данные мыши не подходят для обнаружения изменений в серологическом титре, который может указывать на наличие вирусов, поскольку антигенный ответ у голых мышей отсутствует. Для определения серологического титра необходимо использовать животных с соответствующим иммунным статусом.

Выборка животных из популяции колонии для проведения лабораторных исследований. Это – общее посмертное, микробиологическое и гистологическое обследование, выявление паразитов, и т.д. Степень и детальность проводимой проверки зависит от величины расходов вида и качества оборудования. Частота проведения проверок и количество животных, используемых в ходе нее, зависят от многих факторов; шансы обнаружить инфекцию зависят от количества проверенных животных по отношению к общему количеству особей в колонии (в процентном выражении), а также от степени распространения инфекции среди животных.

Плановая проверка животных, которые умерли или были умерщвлены, включая особей, использовавшихся для экспериментов. Такая проверка позволит обнаружить инфекции или повреждения, угрожающие здоровью колонии и качеству, проводимых экспериментов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических участков молекулы ДНК. Их амплификация – иногда в миллионы раз – осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера, комплементарные соответствующим участкам ДНК-мишени; 2) ДНК-мишень длиной от 100 до ~35000 пар нуклеотидов; 3) термостабильный фермент ДНК-полимеразы, который осуществляет синтез новой цепи ДНК; 4) четыре дезоксирибонуклеотида.

Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении из следующих трех реакций. *Денатурация.* Образец ДНК выдерживают при температуре 95°C в течение, по крайней мере, 1 мин. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре дезоксирибонуклеотида. *Отжиг.* Температуру смеси медленно понижают до ~55°C, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК-мишени. *Синтез.* Температуру повышают до ~72°C – величины, оптимальной для работы ДНК-полимеразы. Начинается синтез новой комплементарной цепи ДНК, иницируемый праймерами. Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат (амплификатор). Смена температурного режима и его поддержание осуществляются автоматически. Каждый цикл длится 3-5 мин.

При диагностике различных заболеваний метод ПЦР все чаще используется наряду с такими традиционными методами, как бактериологический и иммунохимический, особенно в таких областях клинической диагностики, как: ранняя диагностика вирусных и бактериальных инфекций (в т.ч. хламидиоза, лептоспироза, листериоза, бруцеллеза, лейкоза); диагностика трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм патогенных микроорганизмов; диагностика хронических и латентных инфекций; идентификация возбудителей с высокой антигенной изменчивостью; идентификация внутриклеточных паразитов (в т.ч. возбудителя токсоплазмоза).

В последние годы ПЦР активно вытесняется современными протеомными, геномными и нанотехнологическими подходами и методами. Они, несомненно, дают

меньше ложноположительных откликов, но ограничиваются высокой стоимостью оборудования и реактивов.

Бактериологические исследования

Бактериологические исследования проводятся культуральными методами с использованием дифференциальных и обогащенных питательных сред с последующей биохимической идентификацией бактерий и серологическим типированием.

Среди паразитарных болезней можно выделить болезни, вызываемые клещами, гельминтами, простейшими и грибами. Данные заболевания относятся к антропоозоозам. Методы обнаружения эктопаразитов включают макроскопический осмотр, прямой стереомикроскопический осмотр, микроскопия соскобов кожи, идентификация обнаруженных паразитов. Методы исследования на наличие эндопаразитов включают полное вскрытие животного, макроскопический осмотр вскрытых органов и их содержимого, микроскопию нативных препаратов, метод декантирования, флотации, метод приготовления постоянно окрашенных препаратов и их микроскопию, идентификацию паразитов. С появлением полимеразной цепной реакцией (ПЦР) отпала необходимость в выделении возбудителя и очистке его ДНК – для анализа можно использовать очень небольшое количество неочищенного биологического материала хозяина. Преимущества и недостатки основных методов диагностики, используемых в современной клинической практике, приведены выше (Таблица 2).

Генетический мониторинг

Лабораторных животных используют для проведения исследований в области онкологии, токсикологии, вирусологии, иммунологии, трансплантологии, физиологии, сравнительной генетики и многих других областях биологии и экспериментальной медицины. Очевидно, что для решения таких разнохарактерных задач, необходимо иметь животных с определенными биологическими особенностями – для каждой задачи своими. Выведение инбредных линий позволило получить таких животных. Основным достоинством инбредной линии является то, что все животные внутри этой линии гомозиготны и однородны по генотипу. Использование инбредных животных в эксперименте позволяет получать воспроизводимые результаты и повышает эффективность и надежность биологических исследований.

Генетическая однородность животных в пределах одной инбредной линии поддерживается путем применения специальной методики разведения таких линий. Но, даже при тщательном соблюдении всех правил, при разведении инбредных животных существует опасность нарушения гомозиготности. Причиной этого могут быть спонтанные мутации или случайные скрещивания (генетическая контаминация). И если мутации приводят к образованию новых линий или сублинейной дивергенции, то случайное скрещивание ведет к необратимой потере гомозиготности, то есть к потере инбредного статуса и соответствующих фенотипических качеств каждого отдельно взятого животного. Опасность генетической контаминации особенно велика, когда в одном помещении содержатся несколько линий с одинаковой окраской шерсти.

Эффективным инструментом контроля генетической однородности животных инбредных линий являются ДНК-маркеры, основанные на методе полимеразной цепной реакции. Основными преимуществами таких маркеров является их высокая степень диспергированности по геному, независимость от возраста и физиологического состояния животного, а также простота, надежность и воспроизводимость лабораторных манипуляций, необходимых для выявления таких маркеров. При амплификации геномной ДНК мышей разных линий с определенными праймерами образуется уникальный для

каждой линии электрофоретический спектр продуктов амплификации, характеризующий геномную конституцию. Эти данные можно использовать для мониторинга генетической стандартизации инбредных линий. Микробиологический статус лабораторных животных необходимо строго контролировать. В настоящее время растет количество инфекционных агентов, которые можно диагностировать с помощью ПЦР, в том числе вирусы, бактерии, простейшие микроорганизмы.

Последовательность генома мыши была опубликована в декабре 2002 г. Это имеет большое значение, т.к. геном мыши составляет такое же число генов, как и геном человека, причем 99% этих генов, по-видимому, идентичны, а 96% расположены в том же порядке. Это значит, что гены болезней, идентифицированные у мыши, могут быть перенесены на генную карту человека. Можно провести экспериментальные скрещивания между мышами с различными признаками, а затем очень быстро начать изучение полученного потомства. Можно получить мутантных мышей с определенными генными дефектами, фенотип которых можно потом изучать.

За последние годы было получено большое количество мышей – мутантов, у которых мутации, вызывающие потерю или приобретение какой-либо функции, находились в специфических генах, представляющих интерес с точки зрения медицины. Эти так называемые «нокаут» – или «нокин» – мутанты были сконструированы методами генной инженерии. В результате мутации инактивируется один единственный ген. Так были созданы многие полезные модели моногенных болезней, включая синдром Леш-Нихана, кистозный фиброз, β -талассемию и синдром слабой X-хромосомы.

В других случаях с использованием антисмысловой РНК и аналогичных подходов был достигнут эффект утраты функции генов. Модель диабета была получена путем специфичной экспрессии рибозима, направленного против мРНК глюкокиназы в β -клетках поджелудочной железы мыши.

Болезнями, вызываемые доминантными мутациями, приводящими к приобретению функции, могут быть моделированы просто переносом гена с эквивалентной мутацией в геном мыши с помощью обычных технологий переноса генов. Например, мышинные модели болезни Альцгеймера были получены суперэкспрессией гена белка – предшественника амилоида, а модель синдрома Вернера (преждевременного старения) – путем экспрессии доминантно-негативного мутанта гена WRN. Одним из первых примеров моделирования болезни, связанной с приобретением функции, – экспрессия в мышцах мутантной формы прионного белка, моделирующая нейрогенеративный синдром Гершмана – Штресслера – Шейнкера (GSS).

Стандартизация линий лабораторных мышей

Широкое распространение инбредных линий мышей по лабораториям мира, а также создание новых линий потребовали разработки единых правил для их обозначения. В связи с этим был создан Международный комитет по стандартизации генетической номенклатуры мышей, куда вошли ученые разных стран. В 1952 г. Комитет впервые опубликовал правила стандартного обозначения линий мышей. Начиная с 1960 г., эти правила и списки инбредных линий мышей через каждые 4 года публикуются в журнале «Cancer research».

В соответствии с рекомендацией Комитета по стандартизации инбредная линия может быть зарегистрирована как стандартная, если животных этой линии размножали братско-сестринским инбридингом не менее 20 поколений; допускается скрещивание матерей с сыновьями или отцов с дочерьми.

Обозначения инбредных линий рекомендуется писать заглавными латинскими буквами, без снижений или повышений. При выборе символа для новой линии

желательны более короткие обозначения, которые необходимо сверять с опубликованными списками линий во избежание повторов.

В названии давно существующих линий мышей нет общих правил. Часто оно появляется в ходе работы по выведению линии, складывалось из символов мутантных генов окраски (DBA–dba), обозначения масти животного и индивидуального номера (C57BL). Название некоторых новых линий представляет собой символы мутантных генов (HRS, GLF), сокращенное обозначение места выведения линии и масти (NZB- и NZW- новозеландские черные и белые) или назначения линии (YT – юрловская тестерная). В большинстве же случаев перевод обозначений линий на русский язык не имеет смысла.

Технология содержания лабораторных животных

Получение надежных и воспроизводимых результатов эксперимента с использованием лабораторных животных возможно только при соблюдении всех правил их содержания.

Основные правила содержания лабораторных животных

Лабораторным животным в питомнике и ЭБК должны быть обеспечены:

- полноценное кормление и уход;
- поддержание нормального состояния здоровья;
- содержание в соответствующих для каждого вида нормативных условиях;
- возможность удовлетворения физиологических и поведенческих потребностей;
- ежедневный контроль условий содержания;
- быстрое устранение недостатков и факторов, могущих повлечь за собой стресс и страдания животных.

В каждом помещении питомника и ЭБК рекомендуется содержать животных только одного вида и участвующих в одном исследовании, за исключением отдельных случаев, предусмотренных условиями эксперимента, на каждой клетке (боксе, вольере) должна быть этикетка с указанием данных о животном и другой специальной информацией.

Обслуживание одним работником животных разного вида в питомнике не допускается. В случае обслуживания одним рабочим небольших групп животных разных видов в ЭБК следует соблюдать следующую последовательность при работе: морские свинки, мыши, крысы, кролики. Такая последовательность обслуживания обусловлена чувствительностью лабораторных животных к появлению возможной инфекции.

Таблица 3

Норма обслуживания конвенциональных животных I категории на одного работника

Вид животных	Количество голов	Количество клеток
Мыши	до 2000	200
Крысы	1000	100
Хомяки	1000	100
Морские свинки	500	100
Кролики	120	120
Собаки	25-30	25-30
Кошки	60-70	–
Мини-свиньи	25-30	–
Птицы	80-120	–

Норма обслуживания улучшенных конвенциональных II категории и СПФ животных на 1 работника

Вид животных	Вес тела	Тип содержания	Количество голов
Мыши	16-23 г	Клетки	1250
Крысы	180-220 г	Клетки	600
Хомяки	80 г	Клетки	600
Морские свинки	270-350 г	Клетки	415
Кролики	2-3 кг	Клетки	100
Собаки	<20 кг >20 кг	Боксы Боксы	24-18
Кошки	2-3 кг	Клетки Колония	50-60
Мини-свиньи	20-30 кг	Клетки Боксы	21-22
Птицы	1,5 кг	Индивид. содержание	80

Предпочтительно постоянное закрепление персонала за определенными помещениями и для выполнения определенных технологических процедур. За каждой секцией или однородной группой помещения назначается ответственное лицо, несущее административную ответственность за соблюдение правил содержания и режима работы.

Норма обслуживания зависит от системы содержания, вида животных, уровня механизации производства. Численность персонала может быть определена на основе норм (Таблица и Таблица 4).

Требования к содержанию животных

В соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004 г.) следует придерживаться нормативов содержания лабораторных животных.

Рекомендуемые температурные режимы и условия содержания лабораторных животных приведены в Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях¹. Мелкие лабораторные животные SPF-статуса должны содержаться в вентилируемых клетках-изоляторах для сохранения своего статуса.

Все ввозимые в страну животные должны пройти карантин согласно национальному законодательству. Сроки карантина в условиях лаборатории обычно определяются соответствующим лицом исходя из обстоятельств, этим лицом обычно является назначенный учреждением ветеринар.

Требования к корму для SPF-животных

Кормление должно осуществляться полнорационными гранулированными кормом, обеспечивающими физиологические потребности организма животного в питательных и минеральных веществах, витаминах, микроэлементах и энергии, и исключающих необходимость введения в корм дополнительных ингредиентов. Диеты рассчитываются с

¹ Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред Н.Н.Каркищенко и С.В.Грачева. М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.

учетом видовых и физиологических (разведение, рост, взрослое состояние) особенностей животных. Разрабатываются также диеты, учитывающие генетические особенности метаболизма отдельных линий животных. Кормление животных при их воспроизводстве и использовании в экспериментах должно производиться одинаковым кормом.

Перед скармливанием корм в обязательном порядке подвергается стерилизации в автоклаве с использованием вакуума при температуре 121-124°C, давлении 1,2 атм. в течение 20 мин. Корм можно также стерилизовать гамма-лучами. Гранулированный корм расфасовывается в двойные полиэтиленовые пакеты по 1,5-2,0 кг, которые герметично запаиваются и корм в таком виде подвергается облучению в дозе 2,5Мрад на кобальтовом облучателе. Этот вид стерилизации считается более щадящим и более надежным, но менее экономичным.

Размещение лабораторных животных, находящихся в эксперименте

Животные размещаются в групповых либо в индивидуальных (при возникновении агрессии друг к другу или при экспериментальной необходимости) клетках предназначенных для содержания грызунов с возможностью контроля кормления и поения

Размеры клеток и загонов определяются в соответствии с нормативами.

Параметры окружающей среды

В течение всего года, независимо от наружных климатических условий, в помещениях для лабораторных животных должны поддерживаться на требуемом уровне основные показатели микроклимата – температура и влажность воздуха, кратность воздухообмена, давление и скорость движения воздуха, содержание в нем загрязняющих веществ, уровень шума, освещенность, которые должны постоянно контролироваться и при необходимости – корректироваться, показатели приборов регистрируются в специальном журнале. В виварии должен быть предусмотрен резервный источник элетропитания.

Измерение параметров температуры, влажности, освещенности и шума должно осуществляться автоматической системой мониторинга. Датчики располагают в каждой комнате содержания животных. Разводка системы – проводная.

Для вентилирования комнат лаборатории используют систему принудительной вентиляции. Система обеспечивает 100% приток свежего воздуха, оснащена тремя ступенями фильтрации: фильтрами грубой, тонкой и ультратонкой очистки. Она обеспечивает в комнатах содержания лабораторных животных необходимые параметры среды независимо от параметров наружного воздуха. В зданиях барьерного типа и в ЭБК с экспериментально-инфицированными животными предусматривается система фильтров грубой и тонкой очистки воздуха, как на приточной, так и на вытяжной системах вентиляции. С помощью фильтров грубой очистки из воздуха удаляются 60-95% частиц размером более 5 мкм. Фильтры тонкой очистки задерживают до 99,97% всех аэрогенных частиц размером менее 5 мкм в питомниках и ЭБК при конвенциональном содержании лабораторных животных воздух должен очищаться как минимум фильтрами грубой очистки. При необходимости в помещениях может поддерживаться избыточное давление воздуха. Внутреннее давление в помещениях барьерного типа должно превышать наружное давление на 10-15 мм водяного столба. При работе с инфекционным материалом в помещениях с животными создается пониженное по отношению к смежным помещениям и коридорам давление воздуха до 5-10 мм водяного столба. В «грязном» коридоре предусмотрена только вытяжная вентиляция.

Комнаты содержания животных имеют 12-ти часовой цикл освещения с автоматическим включением света в 8:00 и выключением в 20:00. Освещенность – 325 лк на расстоянии 1 м от пола. Во время работы персонала интенсивность освещения можно увеличивать до 300-400 лк. Основное освещение выполняется посредством люминесцентных ламп. Окон в комнатах содержания животных нет (небольшие смотровые окна есть только в дверях). Помимо основного освещения в комнатах содержания животных предусмотрено аварийное освещение посредством осветительных приборов с лампами накаливания. Лампы основного и аварийного освещения расположены за пределами комнат – в зоне технологических помещений. Световой поток распределяется непосредственно в комнаты содержания животных через потолочные светофильтры из матового стекла, что позволяет беспрепятственно проводить аэрозольную дезинфекцию и внутреннюю уборку комнат.

В комнатах содержания животных шумовой фон создается самими животными, вентиляцией, персоналом при выполнении процедур и работе с животными. В присутствии персонала уровень шума в комнате с животными не должен превышать 85 Дб.

Для уменьшения излишнего шума в местах содержания животных система кондиционирования должна быть оборудована многоуровневыми шумоглушителями. Экспериментальные работы, сопровождающиеся шумовыми эффектами, ведутся вдали от комнат содержания животных. Обучение персонала направлено на уменьшение уровня шумового фона при выполнении процедур по уходу за животными.

Температура и влажность воздуха, кратность воздухообмена, давление и скорость движения воздуха должны ежедневно регистрироваться в специальных журналах.

Корма

Кормление лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков и др.) всех категорий должно осуществляться полнорационным гранулированным комбикормом, изготовленным в соответствии со стандартом «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных».

Гранулированный комбикорм следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, не зараженных амбарными вредителями и дикими грызунами складских помещениях, не имеющих посторонних запахов. Оптимальные условия хранения при температуре +5°C и влажности 50-60%. Показатели температуры и влажности в комнате регистрируются по показаниям термометра-гигрометра. Санитарная обработка комнаты проходит в соответствии с «Планом санитарных мероприятий в комнате хранения корма и подстила».

В зону содержания животных корм поступает только после автоклавирования. Двух-трех дневный запас проавтоклавированного корма может храниться в клетках в закрывающемся металлическом шкафу в «чистой» комнате. Непосредственно в комнатах содержания животных корм не хранится.

Помещения для приготовления кормов. Перед поступлением в зону содержания SPF-животных в комнате подготовки корма мешки с кормом вскрываются, корм засыпается в металлические поддоны и автоклавирется.

Раздача корма. Корм заносится в комнату содержания животных в клетках или на поддонах в количестве, необходимом для кормления. Для грызунов корм раздается (досыпается) в кормушки клеток из раздаточной емкости в соответствии с суточными нормами кормления или в соответствии с установленной исследовательским протоколом нормой. Во время еженедельной смены клеток с аксессуарами остатки корма вывозятся и утилизируются. Из клетки в клетку корм не переносится. Корм, упавший на пол, в кормушки не возвращается, выносится из комнаты и утилизируется.

Контроль качества корма. Периодически (один раз в 4 месяца) берутся пробы корма, находящегося в «чистой автоклавной» после автоклавирования на стерильность. Анализ осуществляется в лабораториях Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Заключение о проведении данного анализа должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Контроль за наличием паразитов осуществляется специализированным государственным предприятием системы санитарно-эпидемиологической службы по договору на проведение дезинфекционных работ. Заключение о проведении данного контроля должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Вода

В лабораторный корпус вода поступает из системы городского водопровода. Она фильтруется и собирается в резервуар системы. Система имеет две точки отбора воды в «чистой» автоклавной и точку отбора в моечно-стерилизационном блоке в конвенциональной зоне. В зоне содержания животных в «чистой» автоклавной вода наливается в стерильные питьевые бутылочки, которые закрываются стальными крышками с трубками-носиками, и на тележках развозится по комнатам содержания животных. Бутылочки меняются вместе с остатками воды не реже одного раза в 4 дня.

Контроль качества воды. С частотой, требуемой правилами эксплуатации системы фильтрации, проводится санация системы: промывка фильтра, замена либо обработка соответствующих картриджей, санитарная обработка. Проводится также профилактический осмотр инженером фирмы-производителя системы очистки воды. Проводимые процедуры документируются ответственным за поддержку системы инженером. Периодически (один раз в 4 месяца) проводится отбор проб воды из точек ее забора на чистоту. Этот анализ осуществляется в лабораториях Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Заключение о проведении данного контроля должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Подстилка

В лабораторном корпусе крысы и мыши содержатся в клетках прямого контакта с подстилкой. В качестве подстилки рекомендуется использовать опилки, стружки или мелкую щепу (длина 5-20 мм, толщина 1-2 мм) из экологически чистой древесины лиственных пород. Не допускается использовать подстилки из химически обработанной древесины, а также из древесины хвойных пород. Подстилка автоклавировается на поддонах при режиме 118°C в течение 30 мин.

Хранение подстилки и контроль паразитов. Бумага для подстилки хранится и режется в специальном вспомогательном помещении. Необходимое количество подстилки поступает в корпус в резаном виде в закрытых полиэтиленовых мешках. Мешки в закрытом виде складываются в комнате хранения корма и подстилки 3.3.2. Санитарная обработка комнаты проходит в соответствии с «Планом санитарных мероприятий в комнате хранения корма и подстилки». Контроль наличия паразитов в подстилке осуществляется специализированным государственным предприятием системы санитарно-эпидемиологической службы по договору на проведение дезинфекционных работ.

Контроль качества. Периодически (один раз в 4 месяца) берутся пробы подстилки после автоклавирования для анализа стерильности. Этот анализ осуществляется в лабораториях Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ.

Заключение о проведении данного контроля должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Разное оборудование для содержания/ухода и использования животных в эксперименте

Дополнительное оборудование и аксессуары должны соответствовать государственным стандартам или требованиям GLP.

Санитария

Частота смены подстилки. Содержание в клетках с неконтактной подстилкой не используется. Контактная подстилка в клетках содержания крыс и мышей меняется с периодичностью один раз в 7 дней. Загрязненная подстилка меняется вместе с клеткой. Чистая подстилка рассыпается в клетки из расчета 0,5 л. На 500 см²

Аксессуары клетки (решетка, разделитель для корма, карточкодержатели) и стеллажи также меняются еженедельно.

Исключением является смена подстилки у беременных самок в предродовом периоде (за 1-2 дня до родов) и в послеродовом периоде (первая неделя лактации). Такой регламент смены подстилки позволит уменьшить стресс у животных, не нарушая санитарные нормы.

Очистка и дезинфекция клеток с твердым полом проводится еженедельно. В отсеке моечного блока освобожденные от грязного подстилки клетки моются щеткой с погружением в металлическую ванну с синтетическими моющими средствами. После этого клетки тщательно промываются в чистой раковине под струей проточной воды до исчезновения мыльной пены. Вымытые клетки составляются стопкой вверх дном на сетчатые стеллажи для сушки и затем передаются в монтажный зал. Решетки клеток и аксессуары моются механически в моечных машинах с использованием моюще-дезинфицирующих средств

Ввиду разнообразия моющих и дезинфицирующих веществ, данные средства подбираются индивидуально. Производимые в России и импортируемые дезсредства можно посмотреть на сайте www.infodez.ru.

Очистка и дезинфекция помещений для животных

В комплексе санитарно-гигиенических мероприятий, проводимых в питомниках и ЭБК, большая роль принадлежит дезинфекции, целью которой является уничтожение в окружающей среде возбудителей инфекционных заболеваний. Под стерилизацией понимают абсолютный процесс разрушения всех живых микроорганизмов.

Проведение эффективной дезинфекции и стерилизации требует, прежде всего, тщательной очистки с целью удаления органических частиц и грязи с дезинфицируемых и стерилизуемых поверхностей. Фаза очистки включает механическое удаление частиц грязи с поверхностей при помощи щетки и последующее мытье с использованием мыла и детергентов.

В лабораторном животноводстве применяют следующие способы дезинфекции и стерилизации:

- дезинфекция путем протирания, при которой дезинфицируемый предмет с гладкой поверхностью протирается дезраствором. Методом протирания дезинфицируют поверхности стен, полов, дверей, стеллажей, окон, светильников, перфорированные воздухораспределители;
- дезинфекция путем распыления, при которой дезраствор наносится на

поверхность при помощи механических распылителей. Для этих целей используют ранцевые распылители. Дезинфекцию проводят в защитной маске и очках;

– дезинфекция путем замачивания, при которой дезинфицируемые материалы помещаются в дезраствор и выдерживаются в нем в течение не менее четырех часов. С помощью этого метода дезинфицируются все предметы, не подлежащие автоклавированию и на которые дезраствор не оказывает разрушающего действия (клетки и инвентарь из полипропилена, резиновые пробки и др.). Метод замачивания используют при проведении за барьер через гидрошлюз предметов, не подлежащих стерилизации в автоклаве и газовой камере (емкости с дезрастворами и др.);

– стерилизация путем газации (фумигация) используется для стерилизации помещений, а также предметов, не подлежащих влажной дезинфекции и автоклавированию (транспортные клетки, канцелярские принадлежности, обувь и др.). Для фумигации помещений используют газ формальдегид. Метод газации применяют при проведении предметов за барьер с использованием газовых камер (формалиновая, этиленоксидная);

– стерилизация путем автоклавирования, при которой через проходной паровой автоклав высокого давления в «чистую» зону проводятся постоянно используемые материалы (клеточное оборудование, подстилочный материал, санитарная одежда, корм и др.)

Ежедневно проводится влажная уборка полов в комнатах для содержания животных с использованием дезинфицирующего средства. Ежедневно проводится влажная уборка комнаты с мытьем стен, дверей, решеток воздухопроводов с применением дезсредств. Ежеквартально или по окончании исследования проводится генеральная уборка комнаты (в отсутствие животных в комнате). Все поверхности комнаты обрабатываются дезсредством при помощи распылителей.

Уборка коридоров в «чистой» зоне содержания животных производится с той же частотой и теми же методами, что и комнаты содержания животных. Ежедневно после окончания работ в чистой зоне в «грязном» и «чистом» коридорах и «чистой автоклавной» включается УФ.

Комната хранения корма и подстила обрабатывается. Один раз в 1,5 месяца проводится генеральная обработка комнаты.

Санитарную обработку пола в действующем санпропускнике проводят ежедневно в конце рабочего дня. Ежедневно проводят полную санитарную обработку пола, стен и поверхностей. Ежеквартально проводится генеральная уборка и смена санпропускников. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Обработка инвентаря. Швабры, находящиеся в комнатах содержания животных и во вспомогательных помещениях, ежедневно обрабатываются тем же дезраствором, который используется для санитарии данной комнаты. Ежедневно производят санитарную обработку всей поверхности швабр протиранием дезраствором. Ежемесячно все швабры выносят из «чистой» зоны в моечно-стерилизационный блок и подвергают обработке полным погружением в дезраствор. Дезраствор для мытья полов и поверхностей в зоне содержания животных наливается в клетки, используемые специально только для мытья. После использования клетки для мытья полов через грязный коридор выносятся на мойку, где моются и стерилизуются автоклавированием. Плоские мопы и тканевые салфетки ежедневно выносят из «чистой» зоны через «грязный» коридор после завершения рутинной санитарной обработки помещений. Мопы и салфетки стирают и стерилизуют автоклавированием.

Для уборки комнат содержания животных используются швабры с отжимом. В каждой комнате имеется своя швабра, которая не выносится в другие комнаты. В качестве емкости для мытья используются специально предназначенные для этого клетки, которые ежедневно вносятся в комнату из чистой автоклавной и выносятся из комнат через

грязный коридор вместе с использованным дезраствором. Отдельные швабры используются также в «чистой» автоклавной, в «чистом» и «грязном» коридорах.

Санобработка оборудования клеток. Специальные кормушки для клеток не используются. Решетки и разделители для корма обрабатываются еженедельно. Мытье осуществляется автоматически в моечной машине. Вымытые крышки клеток и их принадлежности сушатся на полке для сушки и затем автоклавируются.

Методы и частота обработки поилок. Поликарбонатные бутылочки меняются не реже одного раза в 4 дня, а при необходимости чаще. Поилки моются автоматически в моечной машине, или вручную ершиком с использованием моющего средства с дальнейшей промывкой в проточной воде. После мытья бутылочки сушатся в сетчатых корзинах и потом автоклавируются.

Санобработка клеток для транспортировки животных, оборудования и транспорта. Картонные транспортные коробки вторично не используются и уничтожаются.

Контроль эффективности санобработки клеток производится визуально. Температурный режим работы автоклавов контролируется ежедневно при помощи поверенного термометра и химических индикаторных полосок. Ежегодно эффективность работы автоклавов должна контролироваться с помощью биотестов лаборатории Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Кроме того, работа автоклавов оценивается по результатам проверки на стерильность корма и подстила.

Все работы по содержанию животных и уходу за ними независимо от их категорий качества должны проводиться с соблюдением профилактических гигиенических мер, направленных на защиту от занесения и распространения болезнетворных агентов.

Профилактические гигиенические мероприятия в производственных помещениях «чистой» зоны, в помещениях, приравненных к ним по санитарным требованиям (лаборатории, операционные и др.), в помещениях «грязной» зоны проводятся в соответствии с графиком, предусматривающим периодичность работ, а также последовательность выполнения отдельных рабочих этапов и процедур. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Режим уборки

Работы по уборке и дезинфекции помещений проводятся ежедневно и в конце каждой недели.

В помещениях для животных ежедневно перед началом работ проводится влажная уборка с использованием свежеприготовленного дезраствора. В течение рабочего дня поддерживается чистота пола.

В конце рабочего дня специально предназначенной для этого щеткой обметаются стеллажи, тележки, пол подметается щеткой, после чего производится влажная уборка – протираются дезраствором стеллажи, тележки, дверные ручки, поверхности оборудования, пол протирается влажной тряпкой, смоченной дезраствором. Затем все орудия чистки – щетки, швабры, совок для мусора окунают в дезраствор, затем дезраствор выливают в раковину, при этом раковина очищается и дезинфицируется.

В конце недели, помимо регулярной ежедневной уборки и дезинфекции, проводят более тщательную уборку и дезинфекцию, дополнительно к перечисленным процедурам тряпкой, смоченной дезраствором, протирают перфорированные заслонки вентиляционных каналов, поверхности стен, дверей, светильников.

Генеральная уборка, дезинфекция и стерилизация помещений для животных проводится один раз в 6-8 месяцев, из помещения удаляются все животные, выносятся все переносное оборудование. Помещение герметизируется (двери плотно закрываются, при необходимости щели заклеиваются клейкой лентой, задвижки приточной и вытяжной

вентиляции закрываются). Проводится тщательная уборка и дезинфекция помещения с заключительной его стерилизацией путем фумигации формальдегидом. Через 24 часа после начала фумигации следует открыть задвижки приточной и вытяжной вентиляции, после чего пары формалина вытягиваются из помещения в течение 48 часов. При этом одновременно происходит дезинфекция воздуховодов. Персонал, проводящий газовую стерилизацию, должен быть обеспечен противогазами и прорезиненной защитной одеждой. Животные заселяются в помещение только после получения результатов микробиологического контроля. При положительных результатах контроля процесс стерилизации повторяется.

Проведение уборки и дезинфекции «чистых» служебных помещений, расположенных внутри барьерной зоны, а также помещений «чистой» части шлюза для персонала (душевая, «чистая» раздевалка, туалет) является обязанностью работников «чистой» зоны. Эти работы выполняются работниками по графику. Ежедневная, еженедельная и генеральная уборка, дезинфекция и стерилизация служебных помещений проводятся так же, как и в помещениях для животных.

Уборка и дезинфекция помещений «грязной» зоны входят в обязанности работающего там персонала. Работы по уборке и дезинфекции проводятся ежедневно, еженедельно и один раз в 6-8 месяцев

Ежедневные и еженедельные работы предполагают подметание, сбор и вынос мусора, протирание полов, окон, дверей, оборудования, мебели дезраствором (например, 2-5% раствор гипохлорита натрия, 2-3% раствор хлорамина).

Полугодовые генеральные уборки административных, хозяйственных помещений, коридоров «грязной» зоны проводятся с обязательным смещением оборудования, мебели и обеспечением доступа ко всем местам, не подвергающимся ежедневной промывке и дезинфекции. Проводится комплекс мероприятий по уничтожению диких грызунов и насекомых. Все помещения подвергаются фумигации формалином.

Уборка и дезинфекция помещений системы вентиляции и кондиционирования воздуха проводится персоналом, обслуживающим эти помещения.

Кроме регулярной ежедневной уборки и дезинфекции один раз в 6-8 месяцев должна проводиться генеральная уборка со смещением всех передвижных устройств, оборудования и мебели, пыль в помещении удаляется при помощи пылесоса, пол протирается дезраствором. Стерилизация формальдегидом производится только перед пуском системы в эксплуатацию, а также в случае специальных распоряжений о проведении ветеринарно-санитарных гигиенических мероприятий. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Контроль за наличием вредителей (грызунов, вредных насекомых)

Дератизация и дезинсекция проводятся по графику государственным дезинфекционным предприятием по договору. Пестициды, хлор- и фосфорорганические препараты не применяются. Раз в месяц приманки раскладываются в следующих помещениях:

- подвал здания,
- моечно-стерилизационный блок,
- комната хранения корма и подстила,
- технологический этаж,
- места рядом с входами в здание.

Дезинсекционные мероприятия проводятся с помощью специальных средств. Для оперативного уничтожения летающих насекомых, проникших с улицы рядом с комнатой

хранения корма и подстила и на технологическом этаже установлены световые ловушки для насекомых.

Инструктаж сотрудников работающих с животными. Сотрудники предупреждаются о проведении дератизации и дезинсекции. Непосредственно в комнатах содержания животных родентициды и инсектициды не используются. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Обеспечение ухода при авариях, в воскресные дни и время отпусков

Уход в воскресные дни и время отпусков. Если протокол исследования требует ежедневного наблюдения за животными, рутинные мероприятия по уходу выполняются техническим персоналом согласно графику работы, невзирая на воскресные и праздничные дни. Если протокол исследования не требует ежедневного наблюдения за животными, то рутинные мероприятия по уходу в выходные дни не выполняются. Перед выходными днями животным в кормушки закладывается дополнительное количество корма (в соответствии с суточными нормами кормления). Рутинные мероприятия в праздничные дни проводятся техническим персоналом согласно графику работы, утвержденному ветеринарным врачом лаборатории. График работы в праздничные дни и график отпусков сотрудников составляется таким образом, чтобы рутинные мероприятия по уходу за животными выполнялись в полном объеме.

Координаты и телефоны руководителей исследований, ветеринарного врача известны техническому персоналу и находятся в доступном месте. Также у службы безопасности на центральном пульте наблюдения имеются предписания по поведению в аварийных ситуациях, список адресов и номеров телефонов ответственного персонала, включая персонал инженерной службы.

Контроль за работой механических систем, обеспечивающей поддержание параметров микроклимата в комнатах содержания животных, осуществляется дежурным охранной службы круглосуточно. Специальные звуковые и световые сигналы предупреждают дежурного охранной службы о возможности возникновения аварийных ситуаций. Дежурный незамедлительно ставит в известность об этом ответственный обслуживающий персонал инженерной службы.

Аварийные мероприятия. В корпусе должна быть автоматическая противопожарная система, включающая в себя систему предупреждения о задымлении и систему тушения огня. При срабатывании сигнализации пожарной тревоги на центральном охранном пульте дежурный охранной службы действует в установленном порядке – вызывает пожарную службу, информирует главного и дежурного инженера, заведующего лабораторией и службу охраны труда. Телефоны и координаты всех ответственных лиц и служб должны быть в доступном месте.

При возникновении очага возгорания в комнатах содержания животных, животные эвакуируются в другие помещения, если эти действия не опасны для жизни персонала. Сотрудники эвакуируются через ближайший выход.

При опасном воздействии токсических веществ сотрудники немедленно эвакуируются из зоны воздействия на открытый воздух. Информированы все ответственные службы. Устанавливается степень опасности, и предпринимаются меры защиты, при необходимости вызывается «скорая помощь». При необходимости животные также могут быть эвакуированы.

Утилизация отходов

Подстилка и мусор. Клетки с грязной подстилкой вывозятся из комнат содержания животных в «грязный» коридор и далее в моечный блок, где подстил ссыпается вручную в бумажные мешки для мусора. Закрытые мешки хранятся в специальном помещении и вывозятся на сжигание в крематорий один раз в неделю.

Трупы животных. Трупы животных помещаются в полиэтиленовые пакеты и хранятся в морозильной камере (-20°C) в комнате сбора отходов. Трупы, подлежащие вскрытию, помещаются в холодильник на +2 - +8 не более чем на 12 часов. Ежедневно трупы вывозятся на сжигание в крематорий.

Вредные/опасные отходы собираются и хранятся до вывоза на уничтожение в комнате сбора отходов согласно инструкциям отдела охраны труда и техники безопасности с соблюдением правил хранения соответствующих групп реактивов (использование герметичных промаркированных емкостей для отдельных групп отходов, вытяжных шкафов для летучих токсичных отходов). Вывоз отходов может осуществляться на промежуточный склад ежедневно, а затем со склада утилизироваться централизованно специализированной техникой. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Устройство вивариев

Корпус, в котором содержатся лабораторные животные, должен быть специально спланированным, в том числе и для проведения исследований на животных. В корпусе должна быть: двухкоридорная барьерная зона содержания животных, лабораторные и технологические помещения. Комнаты для содержания лабораторных животных располагают в «чистой» зоне, должна быть зона между «чистым» и «грязным» коридорами и комнаты для содержания лабораторных животных в краткосрочных экспериментах в конвенциональной зоне. Комнаты содержания лабораторных животных отделяют от лабораторных и технологических помещений системой коридоров и тамбуров.

Комнаты содержания животных должны иметь сообщение с «чистой» и «грязной» зонами. Полы покрывают композицией повышенной износостойкости. Стены выполняют специальными стеновыми панелями. Потолок – подвесной, алюминиевый в который встраивается решетка из нержавеющей стали приточной вентиляции, и светофильтры из матового стекла. Стыки стеновых панелей внутренних стен провариваются. Примыкание поверхности пола к стенам выполняется монолитно. Стыки потолочных панелей герметизируются универсальным герметиком. Для защиты поверхности стен от механических повреждений устанавливают ограничители (бампера).

Комнаты краткосрочного содержания животных в экспериментах, а так же «чистый» и «грязный» коридоры должны соответствовать выше описанным требованиям.

После окончания длительного исследования для эвтаназии и некропсии, а также для проведения кратковременных исследований животные транспортируются из комнат содержания барьерной зоны в процедурные комнаты. Транспортировка животных по коридорам общего пользования осуществляется в клетках содержания на стеллажах или передвижных тележках.

Двери в «чистый» и «грязный» оборудуются замками и медицинскими ручками.

В комнатах содержания животных водопровод и дренаж отсутствуют. В помещении моечного блока оборудуются дренажные люки, представляющие собой металлические решетки диаметром 30 см с затвором и стоком и отдельно стоящий канализационный слив для отходов. Водопровод в моечном блоке состоит из

трубопровода горячей воды и трубопровода холодной воды. Канализационные стояки – из литых чугунных труб с антикоррозийной защитой.

Стены в помещениях содержания животных и местах санобработок имеют специальное покрытие (водоотталкивающее, неабсорбирующее, резистентное к ударам) с проваренными швами. В помещениях моечно-стерилизационного блока стены такие же, как в комнатах содержания животных. В санпропускниках стеновые панели также покрыты пластиковым покрытием или керамической плиткой, устойчивыми к влаге.

Потолки в комнатах содержания животных – подвесные, выполненные из алюминиевых элементов с термоизоляцией, с встроенными осветителями, которые обслуживаются с верхней стороны, водонепроницаемые. Все соединения и примыкания к стенам герметизированы универсальным герметиком.

В моечно-стерилизационном блоке потолок может быть выполнен из сборных железобетонных плит, являющихся наполнителем конструкции здания. В санпропускниках – подвесные потолки из пластиковых элементов, герметично прилегающих к стенам и друг другу, со встроенными водонепроницаемыми осветителями.

Комнаты содержания животных, относятся к системе P1 вентиляции и кондиционирования воздуха. Система обеспечивает 100% приток свежего воздуха, оснащена тремя ступенями фильтрации класса EU3, EU7, EU12 (HEPA-фильтр) и поддерживает следующие параметры среды:

- Температура: 20-23°C
- Относительная влажность: 50-60%
- Избыточное давление воздуха в комнатах относительно «чистого» и «грязного» коридоров 2-10 Па.
- Кратность воздухообмена: 10-15 объемов помещений в час.

Энергоснабжение и освещение

Установленные розетки и выключатели выполняют в полугерметичном исполнении. Осветители находятся над подвесным потолком, герметично закрыты и подвержены влажной обработке. Корпус биомедицинских исследований должен быть подсоединен к аварийной дизель-генераторной установке, которая автоматически вступает в работу через несколько секунд после пропадания напряжения в основной сети. Это необходимо для предотвращения гибели животных вследствие нарушения электроснабжения.

Контроль шума

Материалы стеновых покрытий, потолка, дверей в комнатах содержания животных должны обладать повышенной звукопроницаемостью. Архитектурная конструкция коридоров и тамбуров с двойными дверями помогает уменьшить распространение звука. Все передвижные механизмы и тележки снабжены колесами с резиновым покрытием.

Помещения для санобработки клеток

Планировка моечно-стерилизационного блока должна позволить направить поток материалов в одну сторону и развести чистые и грязные потоки. Грязные материалы и оборудование вывозятся из зоны содержания животных через «грязный» коридор и промежуточную шлюзовую комнату в моечно-стерилизационный блок. Инвентарь

сортируется, грязный подстил собирается в мешки для отходов, которые помещаются в комнату сбора отходов. Стеллажи обрабатывают на месте, клетки и бутылочки поступают на мытье в соответствующие комнаты. Металлические аксессуары – на машинное мытье. Грязная одежда персонала – в комнату на стирку. Вывоз/вынос чистого материала осуществляется через другие выходы из этих комнат. Подстил и корм заносится из комнаты хранения в стерилизационный блок.

Безопасность

Территория, на которой расположен корпус биомедицинских исследований, должна быть ограждена и защищена от внешнего доступа. Порядок входа на территорию строго определен.

Наружный периметр корпуса биомедицинских исследований должен быть оборудован системой охранной сигнализации, исключающей не только проникновение посторонних лиц непосредственно в здание, но и осуществляющей санкционированный доступ сотрудников в помещения конкретных охраняемых зон (подвал, технологические помещения). Внутри здания установлена проводная система контроля и управления доступом. На дверях конкретных помещений здания установлены электромеханические замки с индивидуальными контроллерами, обеспечивающими управление замками по сигналам от центрального процессора после считывания информации с бесконтактных карт доступа.

Система регламентирует и обеспечивает пропуск сотрудников в отдельные помещения корпуса, осуществляя идентификацию по бесконтактным электронным картам, по принципу «доступ разрешен – доступ запрещен», с соответствующей регистрацией времени прохода. Система регистрирует все происходящие в ней события, как по факту, так и по времени, и позволяет получать отчеты о событиях в системе за интересующий период времени (проходы сотрудников, попытки нарушения режима контроля доступа, постановка и снятие помещений с охраны, тревожные события). Система энергонезависима и укомплектована источником бесперебойного электропитания.

Режим работы

Работа по уходу за лабораторными животными всех категорий строится в соответствии с распорядком дня и регламентом, утвержденными руководителем учреждения. Персонал, обслуживающий животных, должен систематически выполнять следующие виды работ:

- ежедневно до начала работ по уходу осматривать клетки с целью выявления заболевших или погибших животных, родов; регистрировать рождение и все случаи гибели животных в формах первичного учета;
- выбраковывать больных животных; погибших и выбракованных больных животных передавать на исследование в КДЛ;
- систематически выбраковывать племенных и подсосных животных, пополнять выбракованных племенных животных;
- проводить отъем от матки молодняка по окончании подсосного периода (мышы, крысы 28-31 день; хомяки 21-29 дней; морские свинки 27-29 дней; кролики 40-45 дней; кошки 52-56 дней; собаки 45 дней; миниатюрные свиньи 45 дней) и формировать по полу группы из отъемышей;
- еженедельно заменять грязные клетки на чистые (при необходимости чаще);
- заполнять свежей водой бутылки для поения с таким расчетом, чтобы

животные были постоянно обеспечены питьевой водой;

– заполнять кормом кормушки с таким расчетом, чтобы было обеспечено постоянное наличие кормов вволю;

– пересаживать, взвешивать, упаковывать животных в транспортные клетки для транспортировки в соответствии с планом реализации животных;

– ежедневно записывать показатели температуры и влажности воздуха в помещении;

– ежедневно проводить влажную уборку помещений с использованием дезсредств;

Таблица 5

Перечень оборудования, средств и материалов в помещении для животных

Наименование	Количество
Клетки в комплекте (в комплект одной клетки входят: – ванночка из полипропилена или поликарбоната; – крышка из нержавеющей стали с бункером для корма; – бутылка для поения; – канюля; – резиновая пробка; – держатель для этикетки из нержавеющей стали	Количество клеток определяется размерами помещений. Оно не лимитируется и зависит от технологической возможности обеспечить нормативные показатели микроклимата
Стеллажи настенные или передвижные	по размерам помещения и необходимости
бак для воды	1
стол для весов	1
весы	1
контейнер для кормов	1
кормораздаточная лопатка	1
ножницы	1
пинцет	1
ведро	1
швабра	1
совок	1
тряпка половая	1
тряпка для протирания пыли	1
щетка с ручкой	1
полотенце	1
дезковрик	1
термометр электронный для измерения минимальной и максимальной температур	1
психрометр	1
шариковая ручка	1
журнал для записи температуры и влажности воздуха	1
бланки, этикетки	по необходимости
дезинфицирующие растворы	по необходимости

- ежедневно дезинфицировать оборудование, используемое в работе: подсобные тележки, весы, ведра, баки для корма (после опорожнения), кормораздаточные лопатки, пинцеты и ножницы (после каждого использования);
- ежедневно заполнять этикетки и сводки о движении поголовья;
- в соответствии с планом проведения санитарно-гигиенических мероприятий участвовать в проведении дезинфекции помещений.

Помещение для животных должно быть обеспечено следующим оборудованием и материалами (Таблица 5).

Подстилка для лабораторных животных должна отвечать требованиям технических условий «Материал подстилочный из древесной щепы для лабораторных животных» ТУ 5313-001-1897639-92. В качестве подстилки могут использоваться опилки, стружки или мелкая щепа (может быть разной по форме, длина 5-20 мм, толщина 1-2 мм, влажность максимальная 8%) из экологически чистой древесины лиственных пород. В качестве подстилки для мелких грызунов может быть использована измельченная хлорированная бумага. Не допускается использование подстилки из химически обработанной древесины, а также из древесины хвойных пород. Допускаемый уровень загрязненности подстилки химическими веществами и тяжелыми металлами представлен в Таблица 6.

Таблица 6

Уровень загрязненности подстилочного материала

Виды загрязнений	Концентрация, мг/кг не более
Химические вещества:	
Гексахлоран	0,02
ДДТ	0,02
ДЦД	0,02
ДДЕ	0,02
Полихлорированные	0,02
Бифенилы	0,02
Тяжелые металлы:	
свинец	0,05
кадмий	0,01
ртуть	0,01

Количество пыли не должно превышать 1%. Поступившая подстилка проверяется на наличие пыли. В большом количестве мелкодисперсная пыль на частицах подстилки оказывает вредное влияние на организм животного, вызывая заболевания и даже падеж молодняка. Кроме того, пыль, распространяясь по воздуху, создает загрязнение помещения и отрицательно сказывается на работе оборудования, подстилка должна просеиваться как для освобождения от пыли (вне помещения питомника или ЭБК), так и от более крупных примесей (куски дерева, металла, бумаги и др.).

При поступлении из одного и того же источника подстилка подвергается лабораторному контролю не менее двух раз в год.

Перед употреблением подстилка в обязательном порядке автоклавировается при температуре 132°C и давлении 2 атм. в течение 20 минут с последующей сушкой в течение 30 минут, что обеспечивает надежную стерилизацию.

После охлаждения и сушки подстилка рассыпается в стерильные клетки, толщиной не менее 1 см., в которые пересаживают животных из грязных клеток.

Для улучшенных конвенциональных и СПФ животных воду необходимо стерилизовать в автоклаве при температуре 121°C и давлении 1,2 атм. в течение 45 минут, для стерилизации бутылки без пробок, заполненные водой, расставляют в проволочные

корзины и помешают в автоклав, пробки автоклавируются отдельно. При смене все старые бутылки заменяются. Доливать старую бутылку свежей водой не допускается.

Кормление

Кормление рекомендуется осуществлять полнорационным гранулированным комбикормом, обеспечивающим физиологические потребности организма в питательных, минеральных веществах, витаминах, микроэлементах и энергии и исключающих необходимость введения в корм дополнительных ингредиентов. Диеты рассчитываются с учетом видовых и физиологических (разведение, рост, взрослое состояние) особенностей животных. В мировой практике производятся и используются стандартные полнорационные гранулированные корма специально для каждого вида животных. Для кормления мышей и крыс обычно используется один и тот же корм, который допустимо использовать для кормления хомяков. Используются также диеты, учитывающие генетические особенности метаболизма отдельных линий животных. Кормление животных при их воспроизводстве и использовании в экспериментах должно производиться одинаковым кормом.

Кормление лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кошек, собак) всех категорий должно осуществляться полнорационным гранулированным комбикормом, изготовленным в соответствии со стандартом «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных». Гранулированный комбикорм следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, незараженных амбарными вредителями и дикими грызунами складских помещениях, не имеющих посторонних запахов. Оптимальные условия хранения при температуре +5°C и влажности 50-60%.

Перед скармливанием корм в обязательном порядке подвергается стерилизации в автоклаве с использованием вакуума при температуре 121°C и давлении 1,2 атм. в течение 20 мин. Корм автоклавируется в специальных металлических контейнерах с перфорированными стенками. Из контейнеров корм в теплом состоянии во избежание слипания гранул пересыпается в транспортные клетки со специальными емкостями. В кормушки корм раздается дозировочной кормораздаточной лопатой, переносить корм из одной клетки в другую запрещается. При смене клеток оставшийся корм использованию не подлежит. Запрещается также класть в кормушки упавший на пол корм.

Кормление мышей, крыс и хомяков всех категорий производится полнорационным гранулированным кормом ПК 121-10 (ГОСТ-Р 50258-92) или аналогичного иностранного производства с предварительной стерилизацией.

Кормление морских свинок и кроликов I и II категории в связи с отсутствием производства корма в соответствии со стандартом ГОСТ-Р50258-92 временно допускается гранулированным комбикормом ПК 120-5 или аналогичного иностранного производства с предварительной стерилизацией.

Кормление кошек и собак производится сухими сбалансированными кормами, изготовленными из натуральных ингредиентов.

Кормление мини-свиней осуществляется стандартными полнорационными гранулированными комбикормами, изготовленными для кормления пользовательских пород свиней (племенное разведение). С учетом массы, физиологического состояния и половозрастной принадлежности животных, в комбикорм добавляется мясокостная мука, сухое молоко, корнеклубнеплоды. При необходимости сухие корма автоклавируются, корнеклубнеплоды отвариваются.

Кормление кур осуществляется по рецептурам, утвержденным МСХ СССР и РФ (ГОСТ 18221-72) и нормативам затрат в соответствии с приказом МЗ СССР №1179 от 10.10.1983 г, и рекомендациями МСХ РФ с использованием:

– Для взрослых кур-несушек комбикормов ПК-1-2 и ПК-1-5 и премикса П-1-Л. Норма кормления – 190 г в сутки на голову.

– Для молодняка в возрасте 1-150 дней ПК-2-3 и Пк-3-2 и премикса П-2-1. Норма кормления – 28-90 г в сутки на курочку и 31-100 г в сутки на одного петушка, в неограниченном количестве даются мел, ракушка, гравий перед употреблением корма автоклавируются.

Контроль качества корма. Поступающий корм должен иметь на каждом мешке сертификат с указанием названия и адреса производителя, номер ГОСТа и рецептуры корма, даты изготовления. Контроль качества корма производится на его соответствие показателям рецептуры и в целом требованиям ГОСТ производимого корма для всех видов лабораторных животных по показателям и с использованием методов в соответствии с приложением. Сроки хранения кормов определяются согласно рекомендациям изготовителя.

Гранулированные комбикорма следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, не зараженных амбарными вредителями и дикими грызунами складских помещениях, не имеющих посторонних запахов. Оптимальные условия хранения при температуре +5°C и влажности 50-60%.

Гарантированный срок хранения гранулированного комбикорма ПК 121-10 при температуре помещения:

+6-+ 10°C – 6 месяцев;

+11-+18°C – 4 месяца.

Гранулированный комбикорм для морских свинок и кроликов ПК 120-5 при температуре +10°C хранится 3 месяца.

Работа с популяциями

При работе с лабораторными животными необходимо правильно их маркировать, а также регулярно вести индивидуальные записи по состоянию здоровья, проводим манипуляциям и т.п.

Методы идентификации каждого вида

В качестве методов идентификации крыс и мышей может использоваться маркировка ушей иссечением фрагмента ушной раковины или ее перфорированием или цветные метки на теле (бриллиантовым зеленым, раствором фукарцина или специальным нетоксичным маркером).

Идентификационная карточка на клетках с животными, не участвующими в исследовании, содержит следующую информацию:

Вид/Линия

Пол

Номер клетки

Дата получения

Возраст при получении

Предназначение (номер исследования, резерв или др.)

Количество животных

Идентификационная карточка на клетках с животными, во время исследования, содержит следующую информацию:

Вид/Линия

Пол

Номер клетки

Код исследования
Номер протокола КБЭ
Руководитель исследования
Группа
Номера и метки животных в клетке

Ведение постоянных индивидуальных записей

В листе рутинных манипуляций, выполняемых в комнате содержания животных, отмечаются отклонения в состоянии здоровья животных, о чем ставится в известность ветеринарный врач и руководитель исследования. Кроме этого, во время проведения исследований проводится индивидуальный клинический осмотр животных с регистрацией показателей в «карте клинических признаков заболевания». В зависимости от требований протокола исследования может вестись индивидуальная карта наблюдения за животным, в которую заносится вся информация о животном и его состоянии здоровья при получении, во время карантина и во время исследования. За ведение индивидуального наблюдения за животным отвечает руководитель исследования и ветеринарный врач. Все данные индивидуального наблюдения за животными хранятся в соответствующем разделе документации по исследованию.

Ветеринарная помощь

В виварии должна быть предусмотрена возможность оказания ветеринарной помощи, включая выходные и праздничные дни. Должен быть план ветеринарных мероприятий. Ежедневно животных должен осматривать ветеринар.

Компоненты ветеринарной помощи:

- необходимое оборудование, персонал и службы для обеспечения основных принципов содержания;
- использование соответствующих методов для предупреждения заболеваний и контроля здоровья лабораторных животных;
- наличие службы оповещения в праздничные и выходные дни;
- ежедневный ветеринарный осмотр;
- способность исследователей оказать ветеринарную помощь, использование правильных методов удержания, иммобилизации, анестезии, анальгезии и эвтаназии при выполнении научных манипуляций;
- адекватная премедикация, хирургическая и после операционная помощь.

Приобретение, транспортировка и карантинирование лабораторных животных

Для проведения экспериментальной работы лабораторных животных закупают и транспортируют в соответствии с ветеринарными и биоэтическими требованиями.

Документация и соглашения при покупке животных

Покупка животных питомниками (вивариями) должна производиться только из известных источников. Все животные должны иметь сертификаты качества. При покупке

животных за рубежом необходимо соблюдать международные соглашения по продаже и покупке животных, а также ветеринарные требования при пересечении границы. Все закупаемые животные должны проходить карантин.

Транспортировка лабораторных животных

Транспортировка является стрессовым фактором и существенно повышает риск инфекционного заражения лабораторных животных и поэтому должна выполняться в соответствии с нижеизложенными правилами.

При транспортировке лабораторных животных продолжительностью не более 12 часов используются транспортные клетки, изготовленные по специальной технологии из многослойного картона. Размеры клеток для мышей 400 × 140 мм, хомяков 400 × 280 × 180 мм. Для других видов животных используются клетки большего размера, на противоположных концах клетки имеются отверстия для обмена воздуха, которые закрепляются пластмассовой сеткой, вставленной между внутренними стенками клетки. При транспортировке животных СПФ категории воздушные отверстия клеток покрываются воздухофильтрующим материалом – фильтром высокой очистки, аналогичном по эффективности действия фильтрам, используемым для очистки воздуха при производстве СПФ животных. При транспортировке улучшенных конвенциональных животных воздушное отверстие следует закрывать фильтром грубой очистки. При продолжительности транспортировки более 12 часов используются пластмассовые транспортные клетки. Воздушные отверстия клеток закрываются металлической сеткой и надежной фильтровальной тканью. При сборке клетки скрепляются специальными скрепками, щели заклеиваются клейкой лентой.

Нормы размещения лабораторных животных в транспортных клетках представлены ниже (Таблица 7).

Таблица 7

Нормы размещения лабораторных животных в транспортных клетках

Вид животных	Вес, г	Максимальное количество животных в 1 клетке	Площадь пола на 1 животное, см ²	Высота клетки, см
Мыши	15-20	25	20	10
Крысы	20-35	25	26	13
	35-50	25	40	13
	50-150	25	52	13
	выше 150	12	100	13
Хомяки	30-50	12	32	13
	50-60	12	66	13
	60-100	12	136	13
Морские свинки	170-280	12	90	15
	260-420	12	160	15
	выше 420	12	230	15
Кролики (кг)	менее 2,5	4	770	20
	2,5-5,0	2	970-1160	25
	выше 5,0	1	1400	30

Заготовки картонных клеток хранятся в виде сложенных листов в обычном складском помещении. В «чистую зону» они передаются через формалиновую камеру стерильными, в складе «чистой» зоны хранить большее количество клеток, чем требуется на одну неделю, запрещается. После сборки в клетку помещается стерильная стружка слоем 1-2 см., на клетки наклеивается этикетка, в которой указывается:

- фамилия заказчика;
- наименование и адрес потребителя;
- символ линии или популяции транспортируемых животных, пол, весовая категория или возраст;
- количество животных;
- сертификат качества;
- дата упаковки и транспортировки;
- фамилия упаковщика или знак упаковочного цеха;
- адрес и наименование поставщика.

В подготовленную и снабженную этикеткой клетку помещаются животные в соответствии с нормой посадки. Если наружная температура выше +27°C или температура салона машины не отрегулирована и может достигать 27°C, то в клетку помещается только половина от нормативного количества животных.

При транспортировке продолжительностью более 12 часов в клетку помещается стерильный брикет в количестве суточной нормы, а в стерильную марлю или фольговый мешочек упаковывается брикетная смесь, увлажненная питьевой водой.

При транспортировке продолжительностью более 24 часов в клетку помещается корм в количестве 1,5 суточной нормы, а для удовлетворения животных в воде кладутся очищенные от кожицы простерилизованные яблоки или картофель.

После помещения животных транспортная клетка закрывается крышкой, все возможные щели заклеиваются клейкой лентой, и передается через воздушный шлюз водителю транспортной машины, одновременно водителю передаются накладные в трех экземплярах, в которых указывается количество и качество животных.

Погрузка клеток производится водителем и работником по отправке животных в отапливаемом и проветриваемом гараже или отправочной. Салон автомашины должен быть тщательно очищен и продезинфицирован. Клетки в салоне размещаются так, чтобы воздушные отверстия оставались свободными. Во время транспортировки в салоне автомашины поддерживается температура 17-27°C (оптимально 19±2°C). Салон постоянно проветривается, летом транспортировка проводится по возможности рано утром.

В одном салоне допускается совмещение следующих видов животных по группам: одна группа – мыши, морские свинки, кролики, другая – крысы, хомяки.

Передача животных СПФ-категории в «чистую» зону ЭБК или питомника производится через воздушный шлюз с УФ облучением. Поверхность клетки тщательно протирается губкой, смоченной дезинфицирующим раствором. Клетки предварительно проверяются на наличие повреждений, животные из поврежденных клеток не принимаются.

Дверка шлюза отворяется с наружной стороны («грязной»). Клетка помещается внутрь шлюза и закрывается его наружная дверка, открывается дверка шлюза, ведущая в «чистую» зону. Пинцетом, смоченным в дезинфицирующем растворе, открывается крышка клетки. Другим пинцетом животных по одному перемещают в заранее подготовленные клетки, клетки с животными помещаются в отдельную комнату «чистой» зоны для прохождения карантина, пустые транспортные клетки удаляются через наружную дверь шлюза и в него помещается очередная продезинфицированная клетка с животными, таким образом, проводится шлюзование до распаковки последней транспортной клетки.

Использованные транспортные клетки передаются в моечно-дезинфекционное отделение и сжигаются, повторное использование транспортных клеток категорически не допускается.

Для транспортировки лабораторных животных используется специальная автомашина с установленным оборудованием для поддержания в салоне микроклимата (температура, вентиляция) на требуемом уровне, салон оборудуется полками для

размещения транспортных клеток. Автомашину, предназначенную для транспортировки животных, запрещается использовать для других целей.

Чистка и дезинфекция автомашины для перевозки животных являются обязанностью водителя, чистка и дезинфекция осуществляются после каждой транспортировки животных, как конвенциональных, так и СПФ категории.

Пол салона автомашины очищается с помощью швабры или пылесоса. Стены и пол салона для груза, так же как и пол кабины водителя, промываются и дезинфицируются влажной тряпкой, смоченной в дезрастворе.

Загрязнения маслом и жиром удаляются раз в неделю раствором моющего средства

Один раз в квартал или после перевозки инфицированных животных автомашина подвергается, кроме мойки и дезинфекции путем протирания, обработке парами формалина.

Пол в гараже ежедневно протирается раствором моющего средства и промывается водой, один раз в квартал гараж обрабатывается парами формальдегида.

Работа гаража должна регистрироваться в контрольном журнале, водитель должен заносить в контрольный журнал следующие данные:

- дата проведения дезинфекции;
- номер автомашины;
- время начала и конца проведения дезинфекции;
- использованные дезсредства и их концентрации;
- подпись водителя;

– подпись ответственного ветеринарного врача учреждения. Кроме записи в контрольный журнал, водитель должен занести те же данные в бортовой журнал автомашины.

Качество работ по чистке и дезинфекции транспортных средств и гаража должно не менее одного раза в неделю проверяться ветеринарным врачом учреждения, результат проверки следует занести в контрольный журнал с указанием даты и подписью.

Водители автомашин для перевозки животных обязаны при погрузках предъявлять бортовой журнал ответственному ветеринарному врачу, который обязан проверить санитарное состояние автомашины и результат проверки занести в бортовой журнал. Ветеринарный врач имеет право, при серьезных недостатках в санитарном состоянии, запретить погрузку животных до их устранения и распорядиться об удалении автомашины с территории учреждения.

Машинам, принадлежащим другим учреждениям, въезд на территорию питомника ЭБК не разрешается.

Карантин лабораторных животных

Конвенциональные животные, поступившие в питомник или ЭБК, предварительно содержатся в специальном карантинном отделении, помещение отделения должно быть изолировано от других помещений и должно иметь самостоятельную систему воздухообеспечения. Санитарно-гигиенические требования к карантинному отделению стандартные.

В питомниках и ЭБК барьерного типа обязательно предусматриваются карантинные отделения.

Карантинирование преследует следующие цели:

- регистрацию возможных проявлений инфекционных заболеваний животных, клинической манифестации латентно текущих процессов после стрессовой ситуации, каковой является транспортировка и т.д.;

– в случае возникновения инфекционного заболевания – диагностическое обследование животных, обеспечение безопасности персонала, основного поголовья животных и окружающей среды.

Для вновь поступивших животных общепринятыми являются следующие сроки карантина: мыши, крысы, хомяки, морские свинки – 5-15 дней; кролики, кошки, собаки, мини-свиньи – 20-30 дней. Продолжительность карантина может быть увеличена руководителем карантинного отделения, в том числе и в случае подозрения на заболевание или выявления заболевания.

Уход за животными в карантинном отделении осуществляется персоналом, закрепленным за данным отделением и соблюдающим соответствующие меры предосторожности (работа в респираторах, перчатках, в спец. обуви). Вход в карантинное отделение посторонним лицам и работающим в других помещениях категорически запрещается.

Животные в карантинном отделении содержатся в общепринятых стандартных клетках и в соответствии с нормативами плотности посадки. Запрещается содержание в одном помещении животных разных видов и разных сроков поступления.

Чистка, мойка клеток и другого инвентаря из карантинного отделения может производиться в общем дезинфекционно-моечном отделении только после предварительного обеззараживания, отходы также должны обеззараживаться и сжигаться.

В период карантина животные подвергаются ежедневному ветеринарному клиническому осмотру, результаты которого документируются в специальном журнале с указанием поставщика (название, адрес), даты поступления животных, их клинического состояния, состояния транспортных клеток.

Животные с подозрением на инфекционное заболевание подвергаются всестороннему лабораторному обследованию. В случае лабораторного подтверждения инфекционного заболевания животные данного поступления уничтожаются. В отношении собак, кошек, мини-свиней в зависимости от установленного заболевания сроки карантина могут продлеваться. Трупы обрабатывают дезинфектантами и сжигают.

Помещения карантинного отделения, оборудование, инвентарь после каждого случая выявления инфекционного заболевания подвергаются дезинфекции, после чего смывы с поверхностей стен, полов, окон, оборудования, а также воздух подвергают микробиологическому обследованию. В случае обнаружения возбудителей дезинфекцию повторяют до получения отрицательного результата.

При обнаружении инфекционного заболевания руководитель карантинного отделения письменно информирует об этом поставщика и региональную ветеринарную службу.

Карантин, адаптация и распределение животных, находящихся в эксперименте

Лабораторные животные, приобретенные для экспериментальных исследований, должны пройти карантин, адаптацию, осмотр ветврача, и только после этого на них будет возможно проведение исследований.

Прием и первоначальная оценка животных

Животные поступают в корпус биомедицинских исследований, заранее обработанные специальным дезраствором, например, 0,5% раствором «Глютекса» и УФ. Картонные контейнеры обрабатываются со всех сторон 0,5% раствором «Глютекса» или «Аэродезином 2000». Персонал, получающий животных, переодевается в стерильную

одежду: куртка, брюки, шапочка, маска, перчатки. Обработанные контейнеры заносятся в комнату с передаточным шлюзом, где вскрываются. Животные пересаживаются в чистую проавтоклавируемую клетку, которая передается через передаточный шлюз. С обратной стороны (в «чистой» зоне), животные пересаживаются в подготовленные клетки содержания и помещаются в «карантинную» комнату (комната содержания животных, отведенная для адаптации). Разные виды животных помещаются в разные комнаты. Разные партии животных по возможности также содержатся в разных комнатах.

Карантинные помещения и процедуры для специально выращенных животных

После поступления животных в «чистую» зону содержания, их размещают в комнатах, предназначенных для адаптации животных. Крысы и мыши разных партий помещаются в разные комнаты. Для животных, поступивших из собственного питомника период адаптации (период от приема до использования животных в исследовании) составляет не менее 3 дней, специальные карантинные мероприятия не проводятся. Микробиологический контроль прибывших животных не проводится. Состояние здоровья оценивается по внешнему виду и проявлению клинических признаков заболевания.

Для животных, поступивших из других источников, порядок и длительность карантинных мероприятий определяются ветеринарным врачом лаборатории по согласованию с ветеринарной службой.

Карантинные помещения и процедуры для животных из случайных источников

Животные из случайных источников с неустановленным статусом здоровья в «чистую» зону не поступают. SPF-статус животных подтверждается документально поставщиком.

Изоляторы и процедуры для больных животных

Если появляются клинические признаки заболевания у животных, находящихся в условиях адаптации в «чистой» зоне, то животные немедленно выводятся из «чистой» зоны и подвергаются эвтаназии. Специальные изоляторы для больных животных не используются.

Периоды физиологической, психологической и пищевой адаптации

Перед началом исследования животные проходят период физиологической, психологической и пищевой адаптации не менее 3 суток при условиях содержания, описанных в Протоколе исследования.

Программа разделения животных по видам, источникам приобретения и состоянию здоровья

Животные SPF-статуса содержатся в барьерной зоне содержания животных. Животные разных видов содержатся в разных комнатах. Основной принцип размещения животных – отдельное исследование – отдельная комната.

Животные для краткосрочных исследований содержатся в специально отведенных комнатах конвенциональной зоны.

Наблюдение, диагностика, лечение и контроль здоровья животных

Повседневное наблюдение за животными. Осмотр состояния здоровья животных проводится визуально персоналом, ухаживающим за животными. При наличии отклонений в состоянии здоровья животных, потреблении корма и питья, делается отметка в Листе рутинных манипуляций по комнате и Протоколе обнаруженных отклонений в здоровье животных, о чем информируются ветеринарный врач и руководитель исследования.

Обеспечение ветеринарной помощью. Животным (крысам и мышам) с клиническими признаками заболевания ветеринарная медицинская помощь не оказывается. Если появляются клинические признаки заболевания у животных, находящихся в условиях адаптации в «чистой» зоне, то животные немедленно выводятся из «чистой» зоны и подвергаются эвтаназии. Если появляются клинические признаки заболевания у животных, находящихся в исследовании, такие животные изолируются в отдельные клетки, помещаются на отдельный стеллаж в помещении для исследования и находятся под наблюдением до принятия решения об их участи (наблюдение до исчезновения клинических признаков болезни, лечение, эвтаназия). Решение об участи животных принимается руководителем исследования с учетом рекомендаций ветеринарного врача и утверждается заведующим лабораторией. Животные с признаками боли, дистресса, в тяжелом состоянии подвергаются немедленной эвтаназии. Могут быть проведены патоморфологические и/или бактериологические исследования павших или заболевших животных.

При проведении экспериментального исследования, в случае необходимости, животным оказывается медикаментозное лечение препаратами, разрешенными для применения в ветеринарии (кроме случаев, когда протоколом исследования не предусмотрено иное).

Ведение медицинских записей. При появлении клинических признаков заболевания стандартные записи включают:

- запись в Протоколе отклонения здоровья животного;
- записи осмотра животного ветеринарным врачом, описание клинических признаков заболевания и диагноз;
- записи дальнейшего наблюдения за животным, динамика проявления клинических признаков заболевания;
- запись о решении дальнейшей судьбы животного;
- запись о проводимом лечении;
- данные об эвтаназии и некропсии животного.

Программы профилактической медицины для каждого вида. Для содержащихся в «чистой» зоне животных превентивная программа заключается в следующем: раздельное содержание разных видов и партий животных, размещение прибывших животных в «карантинную» комнату, наличие барьерной системы: вход персонала через санпропускник, соблюдение однонаправленного потока людей и материалов по

направлению «чистый коридор - комната содержания животных – грязный коридор», использование дезинфектантов и соблюдение программы санитарии. При проведении длительных исследований в комнату с экспериментальными животными помещаются дополнительные животные (sentinels), которые затем отправляются на проверку статуса здоровья.

Мониторинг состояния здоровья животных. Мониторинг здоровья лабораторных животных включает в себя: серологические, бактериологические, паразитологические, патоморфологические исследования, которые выполняются на базе контрактных лабораторий.

Биобезопасность при работе с лабораторными животными

Большое значение в получении лабораторных животных высокого качества и проведении экспериментов на них имеет подготовка персонала. Необходимо уделять особое внимание тому, чтобы было достаточное количество людей, обслуживающих животных в питомниках, экспериментально-биологических клиниках (вивариях), проинструктированных правильному обращению с животными. Кроме соблюдения правил гуманного обращения с животными необходимо соблюдать и правила личной безопасности.

Помещения для лабораторных животных

При проектировании помещений для лабораторных животных следует предусмотреть их изоляцию от персонала лаборатории в случае необходимости, а также возможность деконтаминации и дезинфекции.

Таблица 8

Лабораторные животные и уровни биологической безопасности, свод правил работы и перечень безопасного оборудования

Группа риска	Уровень безопасности	Лабораторная практика	Оборудование, обеспечивающее безопасность
I	1	Ограниченный доступ, защитная одежда и перчатки	Средства личной защиты и гигиены
II	2	Ограниченный доступ и знаки биологической опасности; защитная одежда и перчатки; деконтаминация отходов и клеток перед уборкой	I и II классы боксов биологической безопасности (БББ) для видов работ, сопровождающихся образованием аэрозолей; средства личной защиты
III	3	Контролируемый доступ; специальная защитная одежда; остальное, как для уровней 1 и 2	I и II классы БББ для всех видов работ; средства личной защиты
IV	4	Строго ограниченный доступ; 3-й уровень деятельности плюс помещения для переодевания и душевые; все отходы деконтаминируются перед удалением из помещения	Класс III БББ или ламинарные костюмы с положительным давлением

Проектирование помещений для животных, так же как и лабораторий, должно осуществляться с учетом степени опасности исследуемых микроорганизмов; здесь также выделяют четыре уровня биологической безопасности. Во внимание принимаются и иные факторы, такие как объем и концентрация исследуемого патогенного агента, путь заражения животного и возможный путь выведения агента из организма животного. Учитывают особенности животного: его агрессивность или способность кусать или царапать, его природных экто- и эндопаразитов, зоонозные заболевания, которым подвержено данное животное, а также возможное распространение аллергенов.

Определенные требования существуют и к оснащению лаборатории, ее проектированию, причем меры предосторожности усиливаются по мере возрастания уровня биологической безопасности лаборатории (Таблица 8).

Уровни биологической безопасности

Уровень биологической безопасности 1

К этому уровню биологической безопасности относится большинство лабораторных животных (за исключением приматов), а также животных, зараженных инфекционными агентами группы риска 1. При работе с ними требуется хорошая микробиологическая техника (ХМТ).

Уровень биологической безопасности 2

Сюда относится работа с лабораторными животными, зараженными инфекционными агентами группы риска 2. Необходимо соблюдение следующих предосторожностей.

- на дверях и в соответствующих местах должны вывешиваться знаки биологической опасности;
- проектирование должно предусматривать эффективную очистку и уборку помещений;
- двери должны открываться и легко закрываться;
- отопление, вентиляция и освещение должны быть адекватными;
- при механической вентиляции она должна быть приточной и обеспечиваться путем выброса воздуха в атмосферу. Воздух не должен рециркулировать в остальных помещениях, т.е. используется система «тотального выброса»;
- доступ разрешается только ограниченному кругу лиц;
- содержаться должны лишь животные, используемые в эксперименте;
- должна быть программа наблюдения за членистоногими и грызунами;
- необходимо использовать средства защиты от насекомых;
- после использования рабочие поверхности следует деконтаминировать соответствующими дезинфектантами;
- боксы биологической активности уровней 1 и 2 должны быть приспособлены для работы с образованием аэрозолей;
- автоклав должен быть расположен в помещении или рядом с ним;
- подстилки из клеток животных удаляются с минимальным образованием аэрозолей или пыли;
- перед удалением подстилки все использованные материалы подлежат деконтаминации;
- материалы для автоклавирования или сжигания транспортируются в безопасных закрытых контейнерах;
- после использования клетки животных подлежат деконтаминации;
- трупы умерщвленных животных подлежат сожжению;
- должны быть предусмотрены устройства для мытья рук. Персонал должен мыть руки перед уходом из помещений, где содержатся животные;

- в помещении следует носить защитную одежду, снимаемую при уходе из лаборатории. Следует предусмотреть наличие перчаток;
- все травмы, даже незначительные, должны быть запротokolированы;
- в помещениях, где содержатся животные, запрещаются, прием пищи и воды, курение, использование косметики.

Уровень биологической безопасности 3

Относится к работе с лабораторными животными, зараженными патогенными агентами группы риска 3. Приемлемы все рекомендации, разработанные для лабораторий, уровней биологической безопасности 1 и 2:

- доступ в лаборатории должен быть строго ограничен;
- помещения, в которых содержатся животные, должны быть отделены от остальной части лаборатории и вивария воздушным шлюзом с двумя дверями;
- при входе в помещения устанавливаются раковины для мытья рук и душ;
- должна быть предусмотрена механическая вентиляция с поступлением воздуха во все комнаты. Отработанный воздух фильтруется через ВД-фильтры перед выбросом в атмосферу («полный выброс»). При проектировании системы предусматриваются устройства, препятствующие случайному обратному току воздуха и его нагнетанию ко всем клеткам с животными;
- в помещении устанавливается автоклав;
- сжигатель должен находиться в помещении и быть легкодоступным. Его можно заменить иным аналогичным прибором с согласия соответствующих служб;
- животные, инфицированные патогенными агентами группы риска 3, помещаются в клетки, изолированные от остального помещения, или в лаборатории перед вытяжными отверстиями вентиляции;
- подстилки для животных при использовании должны образовывать минимальное количество пыли;
- в помещении носится защитная одноразовая одежда. При выходе из помещения она снимается и автоклавируется перед уничтожением;
- следует обеспечить регулярную иммунизацию персонала.

Уровень биологической безопасности 4

Работа в данном помещении обычно тесно связана с работой в максимально изолированной лаборатории – группа риска 4. Поэтому правила, разрабатываемые национальными и местными органами здравоохранения, должны соответствовать обоим типам лабораторий. Применяются все правила работы с лабораторными животными, разработанные для уровней биологической безопасности 1, 2 и 3:

- доступ строго контролируется (наличие ключей), вход возможен лишь лицам, имеющим разрешение директора данного учреждения;
- персоналу не разрешается работать в одиночку: используется правило «работы вдвоем»;
- персонал должен иметь прекрасную подготовку по микробиологии и знать все факторы риска, сопряженные с работой, а также необходимые меры предосторожности;
- если рабочее помещение не является частью максимально изолированной лаборатории – с обозначением «уровень биологической безопасности», то оно должно быть расположено в отдельном здании;
- вход в помещение осуществляется через воздушный бокс, перед входом в который с «чистой» стороны располагаются раздевалки и душевые;
- помещение вентилируется через ВД-фильтры вытяжной вентиляцией, обеспечивающей отрицательное давление;
- при проектировании вентиляционной системы должна быть ликвидирована случайная возможность обратного тока воздуха, а также создания в помещении положительного давления;

- в комнате рядом с лабораторным помещением должен находиться автоклав с двумя дверцами;
- при входе в лабораторию персонал обязан снять уличную одежду и надеть защитную одежду одноразового использования. После окончания работы одежда снимается и помещается в специальные емкости для автоклавирования и уничтожения; персонал обязан принять душ;
- для поступления материалов используется воздушный бокс;
- все манипуляции с животными производятся в боксах 3 класса биологической безопасности;
- все животные должны находиться в изоляторах;
- перед удалением из лаборатории все отходы и подстилки для животных автоклавировуются;
- иммунизация персонала и медицинский контроль осуществляются в соответствии с указаниями и международными правилами.

Идентификация опасных факторов и оценка риска

Определение опасных факторов

Определение возможной опасности воздействия вредных производственных факторов оценивается в соответствии со следующими нормативными документами (Государственными Стандартами и Санитарными правилами и нормами):

- ГОСТ 12.0.003–74 ССБТ «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация»
- ГОСТ 12.1.005–88 ССБТ «Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования»
- ГОСТ 12.1.007–76 ССБТ «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»
- ГОСТ 12.1.008–76 ССБТ «Биологическая опасность. Общие требования»
- СанПиН 2.2.4.548-96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений»
- СанПиН 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности и гельминтами»
- СанПиН 2.1.7.1322-2003 «Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления»
- Руководство Р 2.2.755-99 «Гигиенические критерии оценки и классификация условий труда по показателям вредности и опасности факторов производственной среды, тяжести и напряженности трудового процесса»

Кроме того, используются обновляемые перечни химически опасных веществ. Опасность известного химического вещества определяется также из MSDS на это вещество. Новое вещество или препарат считаются опасными, и при работе с ним соблюдаются все меры безопасности если:

- вещество относится к известному классу опасных веществ;
- если воздействие вещества на организм человека не было изучено;
- если структура вещества сходна со структурой заведомо опасного вещества.

Биобезопасность при работе с лабораторными животными

Содержание лабораторных животных в питомниках и ЭБК создает потенциальную возможность взаимного инфицирования человека и животных (антропозоозы), а также перекрестного инфицирования животных, во избежание чего необходимо строгое соблюдение правил личной гигиены работников.

Сотрудники, работающие с лабораторными животными, должны ежегодно проходить медицинское обследование по правилам, действующим для пищевой промышленности, носители патогенной для животных флоры, включая антропозоозы, как и больные люди, к работе с животными не допускаются.

Рекомендуется проводить раз в 3 года медицинское обследование персонала, сходное с проводимым при приеме на работу, включающее сдачу образцов сыворотки.

Персонал питомника и ЭБК должен быть обеспечен требуемым количеством спецодежды, санитарная одежда должна быть персонально маркирована. Ее количество на одного работника «чистой» зоны в питомниках и ЭБК барьерного типа должно позволять стирку не реже, чем через 1 день и ежедневное автоклавирование. Комплект спецодежды для персонала предбарьерной (конвенциональной) зоны имеет тот же набор одежды, но в количествах, обеспечивающих возможность стирки не реже двух раз в неделю. Необходим утвержденный обязательный перечень спецодежды для работников «чистой» и «грязной» зон. Необходимый перечень спецодежды, а также комплектов первой помощи приведены в Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям.²

Вход персонала в «чистую» зону помещения барьерного типа производится через санпропускник, работник снимает одежду, кольца, цепочки, серьги и др. и оставляет их в шкафу «грязной» раздевалки санпропускника, тщательно принимает душ, используя мыло, мочалку, банную щетку, вытирается досуха полотенцем и одевается в полный комплект стерильной одежды. Очки протираются дезраствором. *В течение рабочего дня работник из чистой зоны не выходит.* В случае экстренного выхода процедура входа в «чистую» зону через санпропускник полностью повторяется заново. Таким же образом входят в чистую зону сотрудники, выполняющие эксперимент на животных и при необходимости технические работники. Рабочий инструмент подвергается автоклавированию или дезинфекции и проводится через шлюзы.

Ответственность персонала

Работа с лабораторными животными требует соблюдения норм биобезопасности, так как существует опасность инфицирования человека болезнетворными бактериями и микроорганизмами. Человек может являться носителем микробов, способных передаваться животным.

На сотрудников возлагаются определенные обязанности по охране труда и технике безопасности, определяемые Правилами внутреннего трудового распорядка, с которыми сотрудники знакомятся при поступлении на работу. Сотрудник должен ознакомиться с инструкциями по охране труда и технике безопасности, стандартными операционными процедурами (СОП), выполнять правила безопасности и информировать руководителя и службу охраны труда о возникновении аварийной ситуации и случаях производственного травматизма, а также о не соблюдении правил техники безопасности другими сотрудниками.

² Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред Н.Н.Каркищенко и С.В.Грачева. М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.

В обязанность Руководителя лаборатории входит обеспечение информированности персонала по всем вопросам безопасности, поддержание связи со службой охраны труда и техники безопасности, принятие мер к выполнению рекомендаций данной службы.

Основные принципы проведения экспериментов

Проведение экспериментов на лабораторных животных должно соответствовать общемировым принципам гуманного обращения с животными, тщательно планироваться, результаты эксперимента должны тщательно фиксироваться и храниться.

Планирование эксперимента

Выбор животных. Исследователь должен быть уверен, что выбранные животные наилучшим образом соответствуют целям эксперимента. Необходимо учитывать генетические характеристики, отсутствие болезней, факторы содержания и кормления, а также другие факторы, способные оказать влияние на результаты эксперимента. После выбора биологического вида, необходимо убедиться, что животных достаточно для проведения эксперимента. При проведении эксперимента животные не должны испытывать боли и страданий, поэтому после отбора соответствующих видов и экземпляров животных для эксперимента, необходимо обратить внимание на все аспекты, включая поведенческие характеристики животных.

Стандартные операционные процедуры (СОП). Все действия и манипуляции как рутинные так и в рамках проведения исследования должны производиться в соответствии со стандартными операционными процедурами организации (СОП). Конкретные примеры СОПов приведены в Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях³. Общие правила при составлении СОПов следующие. СОПы организации должны разрабатываться, храниться, распространяться и обновляться надлежащим образом в соответствии с принятыми стандартами организации.

Необходимый перечень СОПов при проведении доклинического исследования должен включать следующие позиции.

- *Животные:* транспортировка, прием, идентификация, рандомизация, маркировка, обращение, взятие проб, наблюдение, эвтаназия, обращение с мертвыми животными.
- *Приборы:* эксплуатация, техобслуживание, калибровка, очистка, допуск в эксплуатацию.
- *Реактивы:* приготовление, маркировка, хранение, учет.
- *Записи:* сбор данных, обработка данных, подготовка отчетов, архивирование.
- *Тест-система:* подготовка помещений, условия окружающей среды, прием, передача материалов, размещение, установление характеристик, идентификация, уход, наблюдение, уничтожение.
- *Образцы:* сбор, идентификация, обращение, вскрытие, гистопатология.
- *Лабораторные испытания:* методы, валидация.
- *Управление и организация:* система документооборота, обучение персонала, аудит и инспекции, архивирование.
- *Компьютерные системы:* проверка, эксплуатация, безопасность, резервирование, валидация.

³ Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред Н.Н.Каркищенко и С.В.Грачева. М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.

Мониторинг. Ежедневно необходимо осуществлять наблюдение за здоровьем и поведением животных. Должны соблюдаться правила биобезопасности при работе с животными.

Записи. Исследователь должен ежедневно вести дневник экспериментальной работы, включающий детальное описание рутинных ежедневных процедур, условий окружающей среды и других факторов, не относящихся к эксперименту, но которые могут влиять на результаты. Записи должны обеспечить возможность статистической обработки результатов эксперимента.

Консультации. При необходимости должны проводиться консультации с участием других научных сотрудников, ветеринаров, специалистов по лабораторным или диким животным. Участие ветврача необходимо в следующих случаях:

- использование транквилизаторов, анальгетиков и анестезии;
- премедикация, хирургия и после хирургическая помощь;
- использование паралитиков с анальгезией;
- длительное использование транквилизаторов, анальгетиков и анестезии.

Контрольный лист. После завершения планирования эксперимента исследователь должен перепроверить протокол для адекватного отражения следующих вопросов:

- Отвечает ли проект этическим и научным принципам?
- Могут ли быть достигнуты поставленные цели без использования животных?
- Есть ли какие-либо еще эксперименты, которые могут быть проведены параллельно для снижения количества используемых животных?
- Все ли средства и компетентный персонал имеются в наличии?
- Весь ли персонал оповещен о проведении эксперимента?
- Отобраны ли наиболее подходящие виды животных?
- Является ли подходящим биологический статус животных (генетический, микробиологический статус, способ кормления, общее состояние здоровья) для данного эксперимента?
- Подходят ли внешние условия (включая тип клеток, шум, освещение, температуру, влажность, вентиляцию, плотность содержания и социальную структуру)?
- Будут ли получены статистически достоверные результаты с минимальным количеством используемых животных?
- Если эксперимент связан с болью и дистрессом, то могут ли они быть минимизированы?
- Весь ли персонал обладает необходимой квалификацией для проведения манипуляций?
- Участвуют ли в эксперименте студенты и проинструктированы ли они?
- Какие мероприятия должны быть проведены для мониторинга состояния животных и их реакция на манипуляции?
- Если подобные эксперименты уже проводились, то зачем проводить данный эксперимент?
- Если животные используются повторно, то, как минимизировать кумулятивный эффект?
- Могут ли быть использованы какие-либо другие методы без животных для получения аналогичных результатов?

Средства диагностики

Клиническая лаборатория. Исследования по клинической биохимии и гематологии проводятся согласно протоколу конкретного исследования, и не используются для диагностики заболеваний в программе мониторинга здоровья.

Некропсия и гистопатология. Патоморфологические исследования проводятся для диагностики патологических изменений органов и тканей животных, находившихся в конкретных исследованиях, где они запланированы в протоколе. При выявлении патоморфологических изменений органов контрольных животных исследователь сообщает результаты исследований ветеринарному врачу лаборатории.

Мониторинг здоровья животных проводится следующими методами:

- серологические исследования на антитела к вирусам – методами ELISA и IFA;
- микробиология взятых при вскрытии животных – методами ПЦР и рутинными культуральными исследованиями;
- паразитология – микроскопическое исследование на наличие экзо- и эндопаразитов, патоморфологические исследования.

Проведение эксперимента

Ограничение боли и страданий. Боль и дистресс у животных не могут быть оценены теми же методами, что у человека. Поэтому решение о самочувствии животных принимаются исследователем, исходя из предположения об их отсутствии. Необходимо предпринимать следующие меры:

- использование наиболее подходящих и гуманных методов;
- использование всех технических навыков и компетентного персонала;
- использование анальгезии;
- адекватное мониторирование появления боли и дистресса;
- составление четкого плана для устранения нежелательных последствий от манипуляций;
- использование незамедлительных мер для предотвращения боли и дистресса;
- использование анестезии, анальгезии и транквилизаторов, подходящих для выбранного вида животных и целей эксперимента;
- разработка плана эксперимента, снижающего боль и дистресс;
- проведение эксперимента в наиболее сжатые сроки;
- использование подходящих методов эвтаназии.

Использование общей или местной анестезии, анальгезии или транквилизаторов должно соответствовать виду животных, а также критериям, принятым в медицине, ветеринарии или практике лабораторного животноводства.

Эксперименты, результаты которых могут быть искажены, могут быть проведены без анестезии. Дистресса в ряде случаев можно избежать без медикаментозного вмешательства. Например, за счет хорошей адаптации животных к внешним условиям до момента начала эксперимента.

Мониторинг животных во время и после эксперимента должен быть постоянным и адекватным боли и дистрессу. Если боль или дистресс во время эксперимента становятся нестерпимыми, то необходимо немедленно оказать необходимую помощь. Если исследователь не может оказать помощь самостоятельно, то необходимо немедленно вызвать ветврача.

Если в процессе эксперимента произошла незапланированная гибель животного, об этом необходимо оповестить ветврача и отразить это событие в протоколе эксперимента.

Исследователь должен знать, каким образом животное, участвующее в эксперименте, сигнализирует о боли и дистрессе. Любые изменения в сне, кормлении, поении, почесывании, поведении должны быть описаны, оценены и учтены в будущем.

Мониторинг состояния животного. Необходимо постоянно наблюдать, не появилась ли острая боль или дистресс у животных. Это может выражаться следующим образом:

агрессивное и/или ненормальное поведение (некоторые виды становятся слишком тихими);

- ненормальная стойка или движение;
- ненормальные звуки;
- изменение сердечно-сосудистой и/или респираторной функций;
- ненормальный аппетит;
- быстрое снижение веса;
- снижение температуры тела;
- рвота; ненормальная дефекация или мочеиспускание.

Точки окончания эксперимента должны быть определены исследователем заранее. Смерть не должна изначально планироваться как точка окончания эксперимента. В качестве точек окончания эксперимента обычно принимают:

- если потери веса от первоначального превышают 20%;
- если произошла потеря в весе более чем 10% за 24 часа;
- если рост опухоли более чем на 10% превышает вес животного;
- если развился абсцесс;
- если температуры тела резко упала;
- если животное само себя покалечило;
- если животное не способно самостоятельно есть или вести нормальный образ жизни.

Все животные, отвечающие таким требованиям, должны быть подвергнуты эвтаназии, для избавления от боли и страданий.

Повторное использование животных в эксперименте. Обычно животных используют только в одном эксперименте. Однако в некоторых случаях можно повторно использовать животных, чтобы снизить общее количество животных в проекте и оградить от боли и страданий других животных. В этих случаях животных используют в процедурах, не связанных с болью и страданиями, или процедурах с небольшим биологическим стрессом, например изучение корма со взятием крови или неинвазивных процедурах. От одного эксперимента до следующего должно пройти достаточное количество времени для восстановления животного.

Длительность эксперимента ограничена целью исследования и должна быть максимально краткой, если связана с болью и страданиями животных.

Лист наблюдения за поведением животных

Вид животного _____ - Дата наблюдения эксперимента _____
 Начальный вес _____ Исследователь _____
 Объем бутылочки для воды _____

Дата						
День недели						
Время						
ВИЗУАЛЬНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ						
Активность						
Сутулая поза						
Нахохливание						
Частота дыхания						
Описание дыхания*						
ИЗМЕРЕНИЕ						
Вес животного, г						
% изменения веса тела						
Исследовательская активность						
Диарея						
Дегидратация						
Издаваемые звуки						
Захваты и конвульсии						
ЕДА И ПИТЬЕ						
Поедание корма**						
Количество воды в полной бутылочке						
Количество воды в бутылочке на дату наблюдения						
Раны**						
Кровотечения						
Другие нарушения***						
Швы, рубцы						
СОДЕРЖАНИЕ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТА						
Обезболивающие препараты						
Доза						
Дополнительные разрезы, жидкость, мл						
ПОДПИСЬ ПЕРСОНАЛА						

* – Описание дыхания: Б – быстрое, М – медленное, З – затрудненное, Н – нормальное.

** – поставьте ОК, если все нормально

*** – Другие нарушения: В – видимое улучшение, Г – гной

Фиксация животных

Обездвиживание животных представляет собой комплекс мер физического или фармакологического воздействия, направленный на сдерживание естественной подвижности животного в целях проведения необходимых действий по уходу, обследованию или проведению экспериментальных действий, включая анестезию. Правильное обращение и обездвиживание может дать животному ощущение безопасности и таким образом уменьшить его боль и испуг. Это не только позволяет в некоторых случаях провести эксперимент без анестезии, но и удовлетворяет принципу гуманного обращения с животными. Правильное обращение с животными обеспечивает также безопасность персонала и исследователей, поскольку успокаивает животное.

Персонал должен быть обучен правильному обращению с животными, поскольку физический контакт с ними является частью их ежедневной работы по уходу за животными и их размножению. Исследователи также должны иметь опыт обращения с животными, так как именно они проводят большинство экспериментов. В противном случае желательно, чтобы обученный сотрудник ассистировал исследователю при проведении эксперимента.

Для того чтобы не испугать животное, не причинить ему вред или боль, движения при обращении с ним, должны быть осторожными и мягкими. Во многих случаях целесообразно использовать сети и другие специальные приспособления для поимки и обездвиживания животного.

Фиксация животных. В исследованиях на животных возникает вопрос надежной фиксации отдельных частей их тела или всего животного в целом. Без фиксации у собак или других крупных лабораторных животных трудно или невозможно проводить длительные внутривенные введения. Для иммобилизации животных их прикрепляют к столу или специальному устройству в положении на спине. В таком положении трудно проводить манипуляции на животном. Пребывание животных в таком неестественном положении является стрессорным фактором.

Наркоз и обезболивание

Всякое болевое раздражения вызывает у живого организма глубокую перестройку многих функций, в первую очередь центральной нервной системы, сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, а это приводит к искажению полученных результатов.

Эксперименты, проводящиеся хирургическими методами должны проводиться только после обезболивания, причем до иммобилизации животного.

Расчет обезболивающего лекарственного средства проводится на килограмм или грамм массы тела лабораторного животного. И вводимое вещество, и время действия обезболивающего средства обязательно фиксируется в протокол эксперимента или в наркозную карту. Если острый опыт заканчивается смертью животного, его умерщвляют до окончания действия обезболивающего вещества.

Наркоз у животных проводят различными фармакологическими средствами и различными путями (ингаляционный, интратрахеальный, внутривенный, внутримышечный, ректальный). Чаще всего пользуются комбинированным наркозом.

Комбинированный наркоз является наиболее распространенным и общепринятым видом обездвиживания, выключения сознания и обезболивания у лабораторных животных. Этот вид наркоза является наиболее оптимизированным подходом в клинической анестезиологии, что, в свою очередь, делает его приемлемым в необходимых случаях биомоделирования лабораторных животных.

Так, например, при комбинированном наркозе у средних и мелких животных лучше начинать с этилового эфира. Внимательно следят за дыханием и тонусом животного, так как в этих условиях легко передозировать наркотик. В состоянии наркоза фиксируют животных к операционному столу и в дальнейшем, по мере дают наркоз который следует проводить с осторожностью, поскольку барбитураты потенцируют эффекты морфина в отношении дыхательного центра. Лучше применять этаминал натрия (нембутал) внутривенно или подкожно в виде 5%-го раствора по 40-60 мг/кг. Наркоз наступает через 10-15 мин после введения.

Для проведения недолгих операций (5-10 мин) на мелких лабораторных животных (мышь, крысы) используют специальные ингаляционные анестезиологические камеры. Для крупных животных целесообразно использовать инъекционный наркоз.

Исследователи должны безусловно соблюдать все требования законов и директивных документов, регламентирующих оборот наркотических и психотропных средств, а животные-модели не должны при этом испытывать боль, дистресс и страдания.

Следует особо подчеркнуть, что перед дачей наркоза, а во многих случаях и перед началом эксперимента, абсолютно необходима премедикация или лекарственная подготовка.

Допустимые методы эвтаназии животных

Существует несколько методов эвтаназии экспериментальных животных – это *физические и химические*. Физические методы включают оглушение, декапитацию и перелом шейных позвонков. Химические методы включают ингаляционные средства (такие как CO, CO₂), летучие обезболивающие средства (галотан, энфлуран и др.) и снотворные (барбитураты и ряд др.).

Самый оптимальный метод умерщвления животного – это передозировка наркоза. В острых случаях животное умерщвляется до окончания действия наркоза. В тех случаях, когда умерщвление осуществляется углекислым газом CO₂, следует помнить, что его высокая концентрация может вызвать стресс у экспериментальных животных и использовать необходимо только сжатый CO₂. Наименее эффективен CO₂ для крыс и мышей по сравнению с *галотаном* для крыс и *энфлураном* для мышей. Ряд авторов считают, что CO₂ должен применяться при эвтаназии или анестезии мелких грызунов только в сочетании с галотаном. Оба газа (CO и CO₂) перед бессознательным состоянием вызывают легочное кровотечение. Кроме того, CO₂ при концентрациях больше чем 50% может вызвать припадки, носовые кровотечения, вставание на лапки, дефекацию, сильное слюнотечение. С большой осторожностью необходимо подбирать метод эвтаназии для новорожденных лабораторных животных.

Оценка гуманности метода эвтаназии всегда сложная, она должна для оценки включать обязательно ЭЭГ, на которой определяются спонтанные или вызванные потенциалы и распознаются поведенческие реакции животного.

Поведенческие сигналы распознаются по следующим показателям: звуки голоса; мочеиспускание/дефекация; потливость; борьба; защитная или переадресованная агрессия; расширение зрачков; тахикардия; слюнотечение.

При декапитации грызунов измерение уровня *кортикостерона* более полезно при оценке потенциального стресса, но ЭЭГ является наиболее общим средством для оценки гуманности декапитации. Не менее важно учитывать и сторонних наблюдателей при оценке гуманности метода эвтаназии животных, которые подвергались некорректной эвтаназии или те, которые откликнулись медленнее или неправильным образом (абберантнее) на примененный метод. Например, в исследовании по изучению мозговых импульсов при декапитации крыс среднее время ЭЭГ составило 13-14 секунд, а у одного животного это время составило 29 секунд.

Эвтаназия *мышей* осуществляется углекислым газом в течение 10 мин., шейной дислокацией, фентобарбитон 5% раствор 0,5мл и/п. Умерщвление *мышей* производят также эфиром, хлороформом, пропусканием через головной мозг электрического тока.

Эвтаназия *крыс* осуществляется углекислым газом в течение 15-20 мин., шейной дислокацией, фентобарбитоном 5% раствор 0,5мл и/п, гильотиной. *Крыс* умерщвляют также хлороформом, эфиром, помещая их в небольшую закрытую посуду, или пропусканием электрического тока через головной и спинной мозг.

Эвтаназия *морских свинок* осуществляется углекислым газом, фентобарбитон 90мг/кг и/п. *Морских свинок* умерщвляют также хлороформом, эфиром, вводя их ингаляционно, внутрибрюшинно и в толщу легких, а также пропусканием электрического тока от городской сети через головной и спинной мозг.

Эвтаназия *кроликов* осуществляется фентобарбитоном 100 мг/кг в/в или и/п. *Кроликов* можно умерщвлять нанесением удара по основанию черепа (при этом держат их за задние конечности вниз головой), внутривенным введением хлороформа, эфира или воздуха, а также пропусканием электрического тока из городской сети через спинной и головной мозг (один электрод в виде зажима Пеана накладывают на угол рта, другой в виде иглы вводят под кожу в области крестца). Время воздействия тока – 3-5 сек.

Эвтаназия крупных лабораторных животных (*мини-свиньи, собаки, кошки и др.*) осуществляется введением в толщу легких или кровь хлороформа (5-7 мл), эфира (15-20 мл) или пропусканием электрического тока из городской сети через центральную нервную систему.

Установление смерти. Оценка наступления смерти проводится по одному или нескольким факторам. Обязательно делают запись о смерти животного с указанием количественных факторов, ее установивших.

Имплантации

Исследователи должны быть готовы к дополнительным асептическим мероприятиям при имплантации инородных тел. Часто после проведения терапии антибиотиками усложняется удаление протеза. Иногда образуются фистулы. Поэтому после операционное наблюдение особенно важно.

Нейромускулярный паралич

Нейромускулярные блокирующие агенты должны использоваться в сочетании с адекватной общей анестезией. Иммобилизация животных не требуется. Необходим контроль частоты сердечных сокращений, давления крови, насыщенность крови кислородом, ширины зрачка, электроэнцефалограммы.

Электроиммобилизация

Электроиммобилизация не может быть альтернативой аналгезией или анестезией.

Валидность моделей болезней

Валидация животных-моделей для изучения болезней должна проводиться с точки зрения ее соответствия проявлениям патологических процессов у человека. Животное должно использоваться только в случае, если модель достаточно достоверна. Нельзя забывать о том, что животные будут испытывать те же боль и страдания, что и человек при соответствующей болезни. Целью и точкой окончания эксперимента, если это возможно, нельзя ставить гибель животного. Тесты на животных проводят только тогда, когда их нельзя выполнить другим способом. Эксперимент должен быть прекращен, как только выявляется токсичность, с минимальным ущербом для животного. Количество животных в эксперименте должно быть минимальным.

Изучение поведения животных и рисков

При изучении поведения животных надо избегать биологических стрессов, нельзя использовать лишение животных еды и питья, а также болевых стимулов. Стресс и боль относятся к категории рисков для здоровья и жизни животных. В качестве источника риска могут также изучаться: вирусы, бактерии, грибы, паразиты, радиация, радиоактивность, субстанции, вызывающие коррозию, токсины, аллергены, карциногены, рекомбинантные ДНК, газы для анестезии, физические повреждения. Все эксперименты нужно проводить в соответствии с руководством и требованиями национальных Комитетов по охране животных, Министерства здравоохранения и другими видами законодательных актов. Протоколы экспериментов должны включать детальные описания рисков, а также мер предосторожности для исследователей, студентов и преподавателей. Инфицированные животные должны быть изолированы, чтобы избежать риска для заражения людей.

Эксперименты с генетическим материалом

Все эксперименты с генетическим материалом, зародышами или эмбрионами требуют дополнительного согласования и проводятся в соответствии с существующим законодательством по охране животных. Все манипуляции с генетическим материалом являются потенциально опасными для состояния здоровья животных, поэтому возможно проявление побочных эффектов, о которых необходимо ставить в известность IACUC. Существует достаточное количество линий животных с врожденной патологией, которые могут быть получены обычными процедурами по разведению. Прежде чем планировать эксперименты такого рода, надо быть абсолютно уверенным в их необходимости.

Эксперименты с опухолями

Эти эксперименты, как потенциально вызывающие боль и страдания, поэтому перед планированием такого эксперимента необходимо изучить все альтернативные возможности его замены. При проведении эксперимента надо особенно тщательно осматривать животных, следить за возможной потерей веса. Эвтаназию надо проводить до того, как животное начало испытывать нестерпимые боль и страдания. Также необходимо следить за количеством асцитной жидкости, которая становится источником дистресса животного. Точкой окончания эксперимента не должна быть смерть животных.

Исследования центральной нервной системы

Анатомические или химические повреждения ЦНС широко применяют для изучения ее функционирования в здоровом и больном организме. Такие эксперименты требуют особых согласований, так как приводят к нарушениям двигательной активности, потери чувствительности, температуре, болям, потере аппетита и другим нарушениям. Для работы могут понадобиться специальные клетки и приспособления для постоянного мониторингования животного.

Содержание с ограниченным кормлением и поением

Эксперименты с ограничением кормления и поения или совсем без корма и воды не должны быть продолжительными. Необходимо следить за балансом жидкости и/или потерей веса животного, все показатели должны быть тщательно задокументированы.

Эксперименты на эмбрионах

Когда проводят эксперименты на эмбрионах или неонатальные хирургические вмешательства, они не должны сопровождаться болью и страданиями, эвтаназия должна применяться немедленно после рождения, чтобы избежать боли и дистресса.

Аналгезия и анестезия при экспериментах на эмбрионах должны быть применены как ко взрослым животным. При хирургических вмешательствах в организм матери анестезия должна быть сделана и эмбрионам. Яйца должны быть разрушены до вылупливания птенцов, если только само вылупливание не является целью эксперимента.

Исследование механизмов и облегчения боли

В таких экспериментах должны быть тщательно подобраны меры боли. Исследователь должен быть уверен, что:

- причиняемая боль находится на допустимом пределе;
- причиняемая боль является минимальной в соответствии с целями эксперимента;
- есть средства для облегчения боли, если это необходимо.

Исследования состояния здоровья животных

Когда изучают возможности улучшения здоровья животных, исследователи нуждаются в условиях, которые можно повторить, например, рана, травма, нарушения питания, болезнь, физические повреждения или стресс. В этих случаях боль и дистресс также можно повторить. В таких экспериментах исследователь должен быть уверен, что:

- цель эксперимента – забота о здоровье животного;
- альтернативные методы, например, уже травмированное животное, не могут быть использованы;

- предприняты все шаги для уменьшения боли и дистресса;
- эксперимент не приведет к дистрессу или гибели животного, как его окончания. Будут применены все средства для избавления животного от полученного увечья. Если это невозможно и эксперимент с неизбежностью приводит к гибели животных, то количество погибших животных должно быть минимально.

Боль, страдание, анальгезия и анестезия

IACUC определена 3-х уровневая шкала боли.

Отсутствие боли (категория «С») – исследования, не сопровождающиеся причинением животным боли или страданий сверх того, что можно ожидать при сравнительно мягком и кратковременном воздействии типа инъекции, глубокой пальпации и т.п.

Облегчаемая боль (категория «D») – процедуры с использованием наркоза или обезболивания в целях облегчения боли и страданий. Примерами могут служить общий наркоз при операциях, а также применение анальгетиков или противовоспалительных средств.

Не облегчаемые боль или страдания (категория «E») – процедуры, где в силу определенных веских причин облегчение боли и страданий служит противопоказанием, например, вследствие риска искажения результатов в случае применения обезболивающего препарата.

Степень боли и страдания и соответствие процедур и манипуляций указанной категории оценивает ветеринарный врач.

Медикаменты, используемые для каждого из видов

Мыши – кетамин гидрохлорид, ксилазин, дроперидол, ацепромазин, бупренорфин, трамадол, ибупрофен, аспирин.

Крысы – кетамин гидрохлорид, ксилазин, ацепромазин, хлоралгидрат, бупренорфин, трамадол, ибупрофен, аспирин.

Контроль за использованием анестетиков и анальгетиков

Анестетики и наркотические анальгетики хранятся в специальной комнате, в которой эти препараты хранятся в металлическом сейфе. Однодневный запас, необходимый для проведения текущих исследований хранится в корпусе биомедицинских исследований в металлическом сейфе в специальной комнате с ограниченным доступом.

Работа с контролируруемыми веществами осуществляется только лицами, имеющими специальный допуск. Допуск лиц на работу с контролируруемыми веществами утверждается Государственным комитетом РФ по контролю за оборотом наркотических средств и психотропных веществ. Выдача контролируемых веществ осуществляется по требованию, подписанному руководителем лаборатории.

Выдача и контроль использования препаратов осуществляется провизором, который ведет соответствующую документацию по учету препаратов.

Подготовка и опыт персонала, осуществляющего анестезию и эвтаназию

Анестезия и эвтаназия проводится персоналом, имеющим соответствующую квалификацию. Изучение техники эвтаназии входит в программу обучения персонала, работающего с животными.

Хранение и контроль медикаментов

Медикаменты должны храниться в специальном помещении с соответствующими записями в журналах учета.

Общий порядок хранения

Неконтролируемые вещества хранятся в зависимости от использования и от условий хранения – по рабочим зонам Лаборатории, на стеллажах, в шкафах и в холодильниках. Токсические вещества хранятся в закрытых металлических шкафах. Летучие вещества – в вытяжных шкафах.

Полученные для исследования вещества хранятся в провизорской комнате с ограниченным доступом с соблюдением правил хранения – в холодильнике, морозильнике или при комнатной температуре.

Однодневный запас контролируемых веществ также хранится в металлическом сейфе провизорской комнаты. Кроме этого контролируемые вещества хранятся в металлическом сейфе в специально оборудованной охраняемой комнате.

Процедура ведения записей

Ведется журнал регистрации операций, связанных с оборотом наркотических средств и психотропных веществ, где указывается дата получения, количество упаковок, текущий расход с указанием исследования, исследователя, выданного количества, использованного количества, оставшегося количества. Журнал пронумеровывается, прошнуровывается, скрепляется печатью организации и подписью руководителя лаборатории.

Проверка медикаментов и материалов на срок годности

За контроль срока годности веществ отвечает исследователь, который использует эти вещества, а также провизоры, которые контролируют все манипуляции с веществами, поступающими на доклинические исследования безопасности. Годность вещества определяется по дате на упаковке, соблюдению условий хранения, данным в других документах на вещество (паспорт, инструкция использования, сертификат качества).

Стандартные операционные процедуры

Стандартная операционная процедура (СОП) – это документ, детально описывающий процедуры манипуляций, которые, как правило, подробно не описываются в протоколах конкретных исследований. Написание СОП осуществляется

квалифицированными в данной области специалистами. СОП утверждается руководством исследовательской организации и подлежит строгому исполнению, так как формирует правильное и пошаговое представление о процедуре или манипуляции, что уменьшает вероятность допущения ошибок, тем самым, гарантируя высокое качество работы. Все отклонения от СОП документируются как первичные данные, они подписываются руководителем исследования или ответственным исполнителем. Кроме этого рассматривается вопрос о влиянии данного отклонения от СОП на качество получаемых данных.

При написании СОП на первой странице обычно указывается следующая служебная информация.

- Название исследовательской организации.
- Название СОП.
- Порядковый номер СОП.
- Номер версии СОП.
- Номер страницы из общего количества страниц.
- Дата введения СОП.
- Ф.И.О. и должность автора СОП.
- Ф.И.О. и должность сотрудника утвердившего СОП.
- Форма обучения СОП (чтение или практическое занятие).

На каждой последующей странице в верхнем колонтитуле указывается номер СОП, номер версии, дата введения СОП в действие и номер страницы. В содержательной части СОП приводится цель данного документа, а также персонал, которому он предназначен. Описание процедуры должно быть достаточно полно, но в то же время кратко, не перегружая документ излишней информацией. При необходимости СОП может содержать данные о правилах техники безопасности при выполнении описанной процедуры, а также может включать в себя ссылки на другие СОП, книги, статьи, руководства и прочие источники.

В качестве приложений к СОП могут выступать различные бланки, которые будут использоваться для регистрации данных, полученных при выполнении процедуры. Бланк должен содержать (в виде колонтитула) следующую информацию: номер приложения, номер СОП, номер версии, дата введения СОП в действие.

СОП подлежит своевременному пересмотру. Очередной пересмотр обычно проводят один раз в 2 года. Если СОП утрачивает актуальность в связи с изменением методики или заменой оборудования, все копии документа изымаются из обращения, и оригинал передается в Архив. Содержание СОП может быть изменено, дополнено или сокращено до наступления периода пересмотра, если это необходимо для работы. В этом случае оформляется поправка к СОП. При пересмотре учитываются все имеющиеся поправки. После пересмотра СОП также утверждается руководством исследовательской организации. Оригиналы устаревших версий СОП сохраняются в Архиве.

Согласно международным принципам надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practices – GLP), разработанным организацией экономического сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD) исследовательская организация должна иметь Программу СОП, отражающую весь спектр проводимых работ. Программа СОП должна включать в себя, но не ограничиваться, описание следующих видов деятельности.

1. *Тестируемые и стандартные объекты исследования.*
Поступление, идентификация, маркировка, манипуляции при работе, отбор проб, хранение.
2. *Приборы, материалы и реактивы.*
 - а) *Приборы.*
Использование, обслуживание, уход, калибровка.
 - б) *Компьютерные системы.*

Валидация, порядок работы и обслуживания, порядок доступа к информации, контроль над внесением изменений, создание резервных копий.

в) *Вещества, реактивы и растворы.*

Приготовление и маркировка.

3. *Текущие записи, отчетность, хранение и извлечение информации.*

Система обозначений, сбор данных, подготовка докладных (актов, донесений, служебных записок), методы индексации, обработка информации (в том числе компьютеризированная).

4. *Тест-системы.*

а) подготовка помещений и создание условий для размещения тест-систем;

б) получение, транспортировка, размещение, характеристика и идентификация тест-систем, уход за ними;

в) подготовка тест-систем, наблюдения и осмотры до, во время и после исследования;

г) обращение с тест-системами, умирающими или умершими во время исследования;

д) сбор, идентификация и порядок работы с образцами, включая некропсию и патоморфологические исследования;

е) размещение тест-систем на исследовательских площадках.

5. *Программа обеспечения качества.*

Планирование и составление графика проверок, проведение проверок и отчетность по ним.

В исследовательской организации программа СОП по лабораторным животным может включать в себя несколько разделов. Первый раздел программы, например, может быть посвящен приемке, содержанию, уходу и контролю здоровья животных. Конкретные СОП могут иметь следующие названия.

- Основные принципы работы в комнате содержания животных.
- Рутинные манипуляции по уходу за грызунами.
- Карточки на клетках.
- Умершие животные.
- Ежедневный осмотр состояния животных.
- Доклад об обнаружении отклонений здоровья животных.
- Признаки нарушения здоровья животных.
- Лишение корма.
- Размещение лабораторных животных в клетках.
- Хранение и подготовка подстила.
- Хранение и подготовка корма.
- Прием животных, карантин, адаптация.
- Инвентаризация животных.
- Проход персонала в чистую зону содержания животных.
- Поступление материалов и оборудования в чистую зону.
- Правила содержания грызунов в барьерной зоне.
- Содержание грызунов в конвенциональных комнатах.
- Перемещение и вынос животных.
- Заказ животных.
- Беглые животные.
- Использование резервных животных.
- Санитарная обработка клеток и аксессуаров для содержания животных.
- Программа контроля здоровья животных.
- Санитарная обработка уборочного инвентаря.

В этих СОП содержится информация о том, как осуществляются транспортировка, прием, первоначальная оценка здоровья животных и карантин; как проводят ежедневное наблюдение за животными, ветеринарную медицинскую помощь, лечение и изоляцию больных животных; как выполняют мониторинг состояния здоровья животных, который включает в себя серологические, бактериологические, паразитологические, патоморфологические и другие исследования; какие используются клетки и стеллажи; как контролируются условия окружающей среды в комнатах содержания животных; какие используются корма, подстил и вода; как происходит кормление и поение. Особое внимание уделяется вопросам, которые связаны с описанием работ с животными в выходные и праздничные дни, а также, что делать в случае обнаружения нарушений в здоровье животного или в случае его смерти. Кроме этого, в СОП описывается, как часто моются и подвергаются санитарной обработке клетки, какие дезинфицирующие и очищающие агенты для этого используются, как часто и с использованием каких дезинфектантов выполняется влажная уборка комнат содержания животных, как обрабатывается уборочный инвентарь, где хранятся отходы, и как часто они удаляются из помещений.

Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственных средств и ксенобиотиков

Решение проблем обеспечения эффективности и безопасности лекарственных средств, унификации и стандартизации нормативной документации происходит на этапе доклинического исследования лекарственного средства, включающего изучение фармакологических, токсикологических и фармацевтических физико-химических свойств изучаемых веществ и/или их комбинаций и разработка и исследование готовых лекарственных форм.

Целью доклинических исследований лекарственных средств является получение научными методами оценок и доказательств эффективности и безопасности лекарственных средств. Их выбор, широта и глубина исследований определяется рекомендациями и требованиями соответствующего государственного (федерального) органа (Минздрав, Минздравмедпром, Минздравсоцразвития, Росздравнадзор и т.д.), отвечающего в соответствии с Конституцией страны за здоровье нации.

Для качественного проведения классических доклинических исследований новых медицинских лекарственных средств существует спектр необходимых и достаточных экспериментальных методов.

Гарантии эффективного и безопасного применения лекарственного средства обеспечивают *разработчик-производитель*, который должен выполнить действующие требования, и *уполномоченный государственный орган*, разрешающий новый препарат к применению. Доклинические исследования безопасности (общетоксическое действие и специфическая токсичность) потенциального ЛС проводятся *in vitro* и *in vivo* (на животных). При изучении общетоксического действия используют физиологические, фармакологические, биохимические, гематологические, патоморфологические и другие методы исследования. Исследования токсических эффектов на двух видах животных при однократном (острая токсичность) и повторном (1 нед., 1, 3 и 6 мес. – хроническая токсичность) введении необходимы для того, чтобы оценить действие препарата на центральную и вегетативную нервную систему, сердечно-сосудистую систему и на желудочно-кишечный тракт, на дыхательную, выделительную и эндокринную системы. Лекарственные средства, предназначенные для постоянного применения, исследуют более длительно. Исследования специфической токсичности включают в себя оценку

потенциальных мутагенных, аллергизирующих, иммунотоксических, канцерогенных свойств, а также изучение репродуктивной токсичности.

Важной особенностью доклинических исследований лекарственных средств является то, что результаты исследований являются не только научной ценностью, но и лежат в основе решений, принимаемых государственными регулирующими органами, по допуску лекарственных средств к клиническим исследованиям или медицинскому применению.

Место, время и достаточность животных в фармакотоксикологии

Количество используемых лабораторных животных следует ограничивать до минимума, необходимого и достаточного для достоверной оценки риска применения нового препарата. Программы исследований оригинальных, инновационных и воспроизведенных лекарственных средств различаются. Однако исследования на животных даже широко использующихся в медицинской практике лекарственных средств могут выявить их новые свойства и риск использования препарата может быть снижен (повышен). Данная информация должна быть внесена в инструкцию по применению. Поскольку лекарственные средства являются особым видом товаров, оценка эффективности и безопасности (в большей степени безопасности) проводится на стадиях доклинических и клинических исследований и предрегистрационной доклинической и клинической экспертизы.

К экспериментальным животным для токсикологических исследований применяют здоровых половозрелых животных, прошедших карантин не менее 10-14 дней. Необходимо указать питомник, из которого получены животные. Не контролируемые питомниками пользоваться не следует.

У животных разных видов токсичность фармакологических веществ может сильно отличаться, поэтому необходимо проводить исследования на нескольких видах животных, причем наряду с грызунами обязательно использовать не грызунов. Из грызунов наиболее удобны для токсикологических экспериментов мыши и крысы. Можно применять также кроликов, морских свинок собак, а также мини-свиней и обезьян.

Токсикологические исследования можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию (штамм, линия) животных, поскольку чувствительность к фармакологическому веществу может меняться и внутри вида в зависимости от линии.

Эксперименты проводят на животных обоего пола, учитывая полученные данные отдельно для самок и самцов.

Следует указать возраст животных, т.к. в зависимости от возраста может измениться фармакокинетика и, в связи с этим, – токсичность фармакологического вещества. Для того чтобы избежать большого разброса в исследуемых показателях, рекомендуется использовать животных одного возраста. Динамика массы тела животных зависит от многих факторов, в том числе и от исходной величины, поэтому разброс по исходной массе не должен превышать $\pm 10\%$.

Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Следует учитывать, что чувствительность животных к фармакологическому веществу может изменяться под влиянием ряда внешних факторов (температура, влажность, освещенность и кратность воздухообмена помещения, состав подстилок, загрязненность помещения ксенобиотиками и др.).

Существенное действие на чувствительность животных к фармакологическому веществу может оказать состав пищи. Рекомендуется давать животным стандартную

диету в соответствии с действующими нормами. Кормление и поение следует производить в фиксированное время, т.к. прием пищи может изменить чувствительность животных к фармакологическому веществу. В аналогичных условиях должны содержаться контрольные животные.

Действие фармакологического вещества может изменяться под влиянием ряда физиологических факторов. Кроме факторов, упомянутых выше, при проведении токсикологических исследований необходимо учитывать суточные и сезонные ритмы деятельности организма. В связи с этим рекомендуется вводить фармакологические вещества в фиксированное время суток и указывать время года, когда проводились эксперименты.

Фармакологические вещества, предназначенные для детей, следует дополнительно изучать на новорожденных и неполовозрелых растущих животных (по специальным методическим рекомендациям), а вещества для геронтологической практики, дополнительно изучают на старых животных. Учитывая изменение реактивности организма при беременности, фармакологические вещества, специально рекомендованные для беременных женщин, исследуют на животных в разные периоды беременности.

Обязательным является проведение токсикологических исследований на здоровых животных, хотя наличие патологии может изменить чувствительность животных и позволяет в ряде случаев получить дополнительную информацию о токсичности фармакологического вещества. Однако широкое использование животных с искусственными, спонтанными или генетическими заболеваниями в настоящее время не может быть рекомендовано при токсикологических исследованиях, поскольку ценность данных, полученных в таких условиях эксперимента, требует дальнейшего изучения и подтверждения.

Фармакологические вещества, предназначенные для детей, следует дополнительно изучать на новорожденных и неполовозрелых растущих животных (по специальным методическим рекомендациям), а вещества для геронтологической практики, дополнительно изучают на старых животных. Учитывая изменение реактивности организма при беременности, фармакологические вещества, специально рекомендованные для беременных женщин, исследуют на животных в разные периоды беременности.

Обязательным является проведение токсикологических исследований на здоровых животных, хотя наличие патологии может изменить чувствительность животных и позволяет в ряде случаев получить дополнительную информацию о токсичности фармакологического вещества. Однако широкое использование животных с искусственными, спонтанными или генетическими заболеваниями в настоящее время не может быть рекомендовано при токсикологических исследованиях, поскольку ценность данных, полученных в таких условиях эксперимента, требует дальнейшего изучения и подтверждения.

При оценке эффективности фармвеществ число животных в каждой группе должно быть достаточным для того, чтобы оценить характер и частоту проявления токсических эффектов и позволить подвергнуть результаты опытов статистической обработке. Вместе с тем статистический анализ не должен маскировать случайные биологические наблюдения, если даже они статистически недостоверны.

Острую токсичность следует изучать на нескольких видах животных, причем обязательно использовать тот вид, на котором был показан терапевтический эффект фармакологического вещества и на котором будет исследована токсичность при длительном введении. Обычно используют 2-3 вида грызунов и не грызунов (мыши, крысы, морские свинки, кролики или др.). Группы самцов и самок подопытных животных формируют отдельно. Для мелких грызунов каждая группа должна содержать не менее 5-6 самок и такое же количество самцов.

Количество собак, мини-свиней или обезьян в группе может быть 3-5. Общее количество мелких грызунов, использованных в опыте, должно обеспечить возможность

вычисления ЛД₅₀. Если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить ЛД₅₀, следует указать максимальную дозу, которая была введена животным.

Хроническую токсичность изучают не менее чем на 2-х видах животных. Желательно использовать животных, на которых был получен терапевтический эффект. Обычно хронические эксперименты проводят на крысах, кроликах, морских свинках и собаках.

Если воспроизведенное фармакологическое вещество исследуют параллельно с его оригинальным фирменным аналогом (стандартное лекарственное вещество), изучение хронической токсичности можно ограничить экспериментами на грызунах (крысах, кроликах и др.). Группы подопытных животных формируют отдельно из самок и самцов. Группы мелких лабораторных животных должны содержать не менее 10 особей, крупных животных – не менее 4-х.

Об оценке эффективности лекарственных средств

Доклинические **фармакологические** исследования включают в себя изучение **фармакокинетики** (изучение пути поступления, распределения и метаболизма лекарственных веществ в организме, а также их выведение), **фармадинамики** (изучение совокупности эффектов, вызываемых лекарственным веществом, а также механизмы его действия).

Исследования подразделяются на изучение общей (влияние на центральную нервную систему, сердечно-сосудистую систему и др.) и специфической фармакологической (терапевтической) активности лекарственного средства, например, активность при экспериментальной патологии, лиганд-рецепторное взаимодействие и специфичность действия.

К фармакологическим исследованиям относятся также и исследования по оценке безопасности (например, специальные исследования для изучения иных, не имеющих терапевтическую направленность, фармакологических эффектов).

Изучение фармакологических свойств лекарственного средства складывается из следующих основных этапов: изучение общего действия фармакологического вещества на интактных лабораторных животных, исследование токсического действия фармакологического вещества и характера изменений, приводящих к гибели животных, избирательного исследования фармакологической активности, базирующегося на данных, полученных в ходе изучения общего действия и токсичности фармакологического вещества, проведения специальных тестов для выявления активности, не обнаруживаемой при изучении острой токсичности и общем скрининге. Эти этапы первичного фармакологического исследования составляют начальную стадию изыскания и изучения новых лекарственных веществ. Оценка общего действия фармакологических веществ осуществляется по данным поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости, вегетативным эффектам и др.

В качестве примера научно-методического подхода к экспериментальному изучению эффективности лекарственных средств можно привести стратегию доклинического изучения антибиотиков и синтетических антибактериальных препаратов. Так, целью методического документа является унификация исследований по оценке спектра антимикробной активности и химиотерапевтического действия с использованием комплекса стандартных методов. По результатам исследования должна быть установлена активность нового препарата в отношении определенных групп возбудителей, рекомендованы показания к применению, ориентировочные режимы лечения на период клинических испытаний.

Принципы, порядок и технологии проведения фармакологических и токсикологических исследований на лабораторных животных

Руководитель и ответственный исполнитель работы перед ее началом составляют протокол, включающий полную информацию о целях и задачах исследования, сроках его проведения, экспериментальных моделях, регистрируемых показателях, методах статистической обработки и расчетов относительных показателей. Протокол экспериментальных исследований подписывают руководитель и ответственный исполнитель работы, утверждает руководитель учреждения, своей подписью удостоверяющий правильность определения объема материалов и методов исследования, а также соблюдение правил работы с животными при выборе количества экспериментальных моделей и количества животных в группах.

Подготовка животных к опыту и организация эксперимента

В подготовительный период постановки токсикологического (фармакологического) эксперимента производится подбор и подготовка животных, прошедших карантин и клиническое обследование. Продолжительность периода определяется задачами исследования, выбором объекта научного эксперимента, обстановкой в которой будут проводиться опыты и другими условиями. В течение этого периода животных следует приручать к исследователю и проведению простейших манипуляций.

Исходный период постановки эксперимента условно подразделяют на этапы:

- подбор требующихся по условиям опыта животных;
- наблюдение (карантин) и выбраковка животных;
- определение исходных величин исследуемых показателей (фон);
- выбраковка животных с ярко выделяющимися величинами исследованных (фоновых) показателей;
- распределение животных по группам;
- статистическая проверка отсутствия межгрупповых различий.

Таблица 9

Сравнительная видовая характеристика некоторых анатомо-физиологических параметров

Показатель	Вид животного				
	Мыши	Крысы	Морские свинки	Кролики	Кошки
Продолжительность жизни, лет	1,5-2	2-2,5	6-8	4-9	10-12
	1,5-3	3	7	4-9	10-15
Масса половозрелого животного, г	15-18	120-150	250-300	В зависимости от породы	
Масса взрослого животного, кг	0,02	0,25	0,8-1,0	То же	
	0,02	0,2	0,4	2,5	3,0
Поверхность тела, м ²	0,006	0,030	0,048	0,18	0,20
Отношение поверхности тела к массе, м ² /кг	0,3	0,15	0,12	0,072	0,066
Объем тела, л	-	0,264	0,527	3,16	-

В опытах используют грызунов, зайцеобразных, копытных и приматов, полученных только из специализированных питомников и прошедших карантин не менее:

- для крыс и мышей – 10 суток;
- для морских свинок и кроликов – 21 суток;
- для собак и мини-свиней – 30 суток.

При распределении животных по группам соблюдается принцип однородности по ряду показателей (генетическая однородность, пол, возраст, масса тела и пр.). Распределение животных на опытные и контрольные группы осуществляется произвольно.

Показателем возраста животных служит их вес (Таблица 9).

В опытах используются клинически здоровые животные обоего пола в равном соотношении, с массой тела (Таблица 10).

Таблица 10

Масса тела животных, используемых в эксперименте

Вид животного	Масса тела, кг
Белые мыши	0,018...0,024;
Белые крысы	0,18...0,30;
Морские свинки	0,38...0,62;
Кролики	1,80...3,40;
Кошки	2,00...4,00;
Собаки	6,00...17,00;
Свиньи	20,0...45,0;
Овцы	25,0...45,0;
Обезьяны (макаки бурые, макаки резус, макаки лапундер, павианы, гамадрилы)	4,0...40,0;

Масса тела подопытных животных определяется с погрешностью взвешивания не более $\pm 1\%$. Отклонения массы тела животных в пределах одной экспериментальной группы не должны превышать 10% от средней величины.

Выбор определенного вида или нескольких видов животных для использования в эксперименте определяется целью и задачами конкретного токсикологического (фармакологического) исследования.

Условия и порядок проведения токсикологических (фармакологических) исследований

Эксперименты по определению параметров токсичности биологически активных химических соединений, эффективности антидотов на животных проводятся в лабораторных условиях при температуре воздуха + 18...24°C, относительной влажности воздуха 60...75% и скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0...1,5 м/с.

Рекомендуемое количество животных на дозовую точку при исследовании острой токсичности составляет: для грызунов и зайцеобразных – от 6 до 12 особей каждого пола; для кошек, собак и других крупных животных – не менее 4 особей каждого пола; для обезьян – не менее 2 особей каждого пола. При исследовании подострой токсичности

образцов биологически активных химических соединений используют животных не менее трех видов, один из которых не относится к отрядам грызунов и зайцеобразных.

В зависимости от цели и задач исследования количество животных в экспериментальных группах может варьировать в соответствии с решением руководителя и ответственного исполнителя работы.

Образцы биологически активных химических соединений в установленной паспортом вещества форме (раствор, эмульсия, аэрозоль, пар и др.) вводят животным путём, обеспечивающим наиболее точное определение введенной дозы (внутривенный или внутримышечный – для крупных лабораторных животных; внутривенный, внутримышечный или внутрибрюшинный – для грызунов). В зависимости от задач исследования используют также подкожный, перкутанный (накожный), пероральный, ингаляционный виды аппликации.

Внутривенное (внутримышечное) введение растворов вещества подопытным животным осуществляется в удельном объеме (мг/кг): белым мышам – 5,0; белым крысам и морским свинкам – 0,5; кроликам, собакам, свиньям, овцам, обезьянам – 0,05; крупному рогатому скоту – 0,005.

Значения максимально допустимого количества жидкости для наиболее часто используемых в эксперименте видов лабораторных животных с учётом пути поступления в организм приведены в Таблица 11.

Таблица 11

Максимально допустимые количества жидкости (мл) для некоторых видов лабораторных животных в зависимости от пути введения

Вид животного	Вес, г	Пути введения				
		В желудок	Под кожу	В/м	В/в	В/б
Мышь	20-24	0,5	1,0	0,5	0,2-0,5	1,0
	25-30	0,8				
	>30	1,0				
Крыса	100-190	3,0	10,5	5,0	2,0	5,0
	200-240	4,0-5,0				
	250-300	6,0				
	>300	8,0				
Морская свинка	250-300	4,0-5,0	15,0	5,0	5,0-8,0	5,0
	>300	6,0				
Кролик	2000-2400	100,0	30,0	15,0	20,0	20,0-30,0
	2500-3000	150,0				
	>3000	200,0				

При исследовании острой токсичности образцов биологически активных химических соединений наблюдение за животными осуществляют в течение 6 часов непрерывно, затем – периодически, не менее чем в течение 3-х суток. Сроки наблюдения могут быть увеличены, в зависимости от особенностей механизмов действия исследуемых веществ и конкретных целей задач исследования.

При исследовании подострой токсичности образцов биологически активных химических соединений продолжительность наблюдения составляет 28 суток.

В период непрерывного наблюдения у подопытных животных с точностью до минуты регистрируется время проявления основных симптомов интоксикации. После окончания срока наблюдения группы подопытных животных расформировываются. Выживших животных по окончании эксперимента, как правило, подвергают эвтаназии.

Оцениваемыми токсикометрическими показателями биологически активных химических соединений являются:

медианно-эффективные (ED_{50}), минимально-эффективные (ED_5) и максимально-эффективные (ED_{95}) дозы вызывающие регистрируемый целевой токсический эффект у подопытных животных при конкретном виде аппликации;

быстродействие (Δt^s) – время проявления регистрируемого целевого эффекта при воздействии биологически активных химических соединений в медианно-эффективной дозе, выраженное в минутах (часах).

При регистрации гибели животных во время испытания подострой токсичности рассчитывают индекс кумуляции – отношение величины медианно-смертельной дозы (LD_{50}) при однократном введении к суммарной величине LD_{50} при повторных введениях.

Расчёт медианно-эффективных доз (токсодоз) образцов исследуемого вещества для грызунов и зайцеобразных выполняют методом пробит-анализа. Для собак и других крупных животных допустимо применение экспресс-методов.

Для характеристики безопасности применения образцов биологически активных химических соединений рассчитывают широту токсического действия (ШТД) в соответствии с формулой (1):

$$ШТД = \frac{LD_{50}}{ED_{50}} \quad (1)$$

и индекс Брокка-Шнайдера в соответствии с формулой (2):

$$I_{БШ} = \frac{LD_{10}}{ED_{90}} \quad (2)$$

В ходе наблюдения за подопытными животными после воздействия изучаемых образцов биологически активных химических соединений определяют параметры зависимости «доза-время-эффект», регистрируют продолжительность целевого эффекта и клинические особенности проявления токсического процесса.

Исследование специфической активности биологически активных химических соединений проводят с использованием комплекса методик, позволяющих всесторонне оценить выраженность, скорость формирования и продолжительность целевого эффекта в зависимости от дозы (токсодозы) введенного вещества, а также соотнести уровни различных категорий токсодоз. Перечень применяемых методик определяется исходя из необходимости оценки характера и выраженности целевого эффекта.

Все павшие в течение периода наблюдения животные подлежат вскрытию с морфогистологическим описанием изменений состояния внутренних органов.

При оценке специфической активности антидотов регистрируются и рассчитываются следующие показатели:

- коэффициент защиты – отношение медианно-эффективной дозы химического соединения по целевому эффекту без применения антидота к медианно-эффективной дозе на фоне применения антидота;
- антидотная мощность – отношение максимально-эффективной дозы химического соединений по целевому эффекту без применения антидота к медианно-эффективной дозе на фоне применения антидота;
- индекс гарантированной защиты – отношение количества максимально-эффективных доз химического соединения по целевому эффекту без применения антидота к минимально-эффективной дозе на фоне применения антидота.

Наряду с выраженностью специфической активности антидотов оценивают:

- время наступления защитного эффекта и его продолжительность;
- спектр антидотной эффективности (универсальность), характеризующий групповую специфичность антидота;

- полноту защитного действия, характеризующую способность антидота купировать максимальное количество морфофункциональных изменений при интоксикациях.

При исследовании фармакокинетики образцов биологически активных химических соединений у животных отбирают пробы биоматериала в сроки, позволяющие фиксировать: не менее трех точек, приходящихся на фазу нарастания концентрации; не менее трех точек, описывающих пик концентрации; не менее пяти точек, характеризующих фазу снижения концентрации исследуемого вещества вплоть до регистрации следовых количеств. На основании экспериментального материала рассчитывают следующие показатели:

b – постоянная убывания на хвосте распределения (мин);

C_{\max} – максимальная концентрация (мкг/мл);

AUC – полная площадь под кривой (мин мкг/мл);

C_{\max}/AUC – скорость всасывания (мин⁻¹);

MRT – среднее время удерживания (мин);

V_0 – центральный объем распределения (мл/кг);

Cl – общий клиренс (мл/мин/кг);

V – стационарный объем распределения (мл/кг);

$T_{\text{эфф}}$ – эффективная длительность процесса (мин).

Протокол эксперимента. Все результаты экспериментов протоколируют в соответствии с требованиями Приказа Министра здравоохранения РФ от 19 июня 2003 года № 267.

Параметры безопасности лекарств

Установление характера и выраженности повреждающего действия фармакологического вещества на организм экспериментальных животных служит мерой оценки его безопасности.

Токсичность – свойство или способность химических веществ, действуя на биологические системы немеханическим путем, вызывать их повреждение или гибель, или токсичность – свойство лекарственного средства вызывать нежелательные биологические эффекты в дозах, больших, чем лечебные, или, другими словами, токсичность – свойство вещества при попадании в определенных количествах в организм человека, животных или растений вызывать их отравление или гибель.

В основу суждения о токсичности вещества для человека (при отсутствии точных клинических данных) положены результаты опытов на животных, разнообразие и число которых в отдельных случаях должно быть увеличено.

Развитие химико-фармацевтической промышленности последних десятилетий привело к созданию большого количества новых высокоэффективных лекарственных средств. Это существенно расширило возможности лечения различных заболеваний и создало предпосылки резкого увеличения числа **нежелательных побочных эффектов** на лекарственные препараты при их широком медицинском применении.

Большинство нежелательных побочных эффектов лекарственных препаратов выявляется при их доклиническом токсикологическом изучении в эксперименте на лабораторных животных. В связи с чем в последние годы резко возросла роль доклинического изучения безопасности разрабатываемых препаратов. Токсикологические исследования существенно расширились, стали сложными и дорогостоящими; их объем, адекватность используемых методов и биологических моделей, а также качество проводимых исследований строго регламентируется и контролируется органами здравоохранения большинства стран.

Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение **общетоксического действия** и исследование специфических видов токсичности (аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность, канцерогенность).

Изучение общетоксического действия позволяет определить переносимые и токсические дозы фармакологического вещества и выявить наиболее чувствительные к изучаемому фармакологическому веществу органы и системы организма, характер и степень патологических изменений в них, а также исследовать обратимость вызываемых повреждений.

Исследование общетоксического действия подразделяется на изучение **острой токсичности** (токсическое действие вещества, введенного в однократной дозе или в многократных дозах в течение не более 24 часов, которое может выражаться в расстройстве физиологических функций или в нарушении морфологии органов экспериментальных животных, а также гибели животного), **подострой/субхронической токсичности** (совокупность функциональных и/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения в течение 2-12 недель) и **хронической токсичности** (совокупность функциональных и/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения в течение 3-6-12-18 месяцев). Продолжительность введения лекарственного средства при изучении хронической токсичности определяется предполагаемым курсом клинического применения.

В качестве классического примера проведения доклинических исследований лекарственных средств можно привести методологические подходы к изучению общей токсичности изложенные в Методических рекомендациях по изучению общетоксического действия фармакологических веществ (Арзамасцев Е.В. и др., 2005).

Технология оценки безопасности субстанций и лекарств

Токсикологические исследования обязательны как для субстанции, так и для всех лекарственных форм фармакологического вещества. При проведении исследования субстанции в полном объеме изучения лекарственной формы вещества может быть сокращено. Если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т.п.), неразрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из этих веществ исследуют отдельно. При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают токсичность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

При изменении соотношения ингредиентов в комбинированной лекарственной форме или увеличении дозировки, для решения вопроса о необходимости проведения токсикологических исследований следует провести переоценку новой комбинации с точки зрения безопасности ее применения.

Необходимо проведение токсикологических исследований воспроизведенных препаратов (дженериков) в следующих случаях:

- препараты, не имеющие разрешения к медицинскому применению в стране-производителе, и отличающиеся по составу лекарственной формы от аналогичных зарегистрированных в России;
- препараты, не отличающиеся по составу лекарственной формы, но содержащие ингредиенты нефармакопейного качества или с изменением состава оболочки;
- препараты, полученные на основе биотехнологии (в любых случаях).

Минимальный объем токсикологических исследований дженериков должен включать:

- сравнительное изучение острой токсичности на грызунах при том способе введения, который указан в инструкции по применению препарата;
- сравнительное изучение субхронической токсичности на животных (крысы, кролики, собаки или др.) при введении препарата не менее 2-х недель, при способе применения, указанном в инструкции, в дозах, вызывающих токсический эффект, с обязательным гистологическим исследованием внутренних органов и области введения препарата.

Подготовка проекта ФСП

Характеристика субстанций и лекарств для проведения токсикологического изучения необходимо иметь характеристику субстанции (предварительную нормативную документацию) фармакологического вещества, согласно которой оно идентифицируется, устанавливаются пределы содержания примесей, определяется его стабильность. Дается также характеристика (проект ФСП) лекарственной формы и вспомогательных веществ, использованных при ее получении (растворители, наполнители, стабилизаторы и др.). Если характеристика фармакологического вещества меняется, например, в результате модификации способа получения субстанции или лекарственной формы, следует оценить влияние этого изменения в связи с данными, полученными при токсикологическом изучении исходного фармакологического вещества.

Физико-химические свойства. Следует иметь данные о растворимости, гидрофобности или липофильности фармакологического вещества, размере и форме кристаллов. Если по условиям эксперимента субстанцию исследуют в виде раствора или взвеси с использованием ингредиентов, не указанных в соответствующих лекарственных формах фармакологического вещества, необходимо привести характеристику этих ингредиентов и данные о стабильности используемого раствора. При исследовании хронической токсичности применение дополнительных растворителей не рекомендуется.

Терапевтическая активность. Для проведения токсикологических исследований должны быть представлены данные, характеризующие терапевтическую активность фармакологического вещества в эксперименте на животных с указанием вида животных, использованных моделей, доз и путей введения. Следует также указать предполагаемые направления клинического изучения фармакологического вещества, рекомендуемые дозы, способы и длительность применения.

Острая токсичность – вредное действие препарата, проявляющееся после его однократного применения или повторного введения через короткие (не более 6 часов) интервалы в течение суток.

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных.

Основные параметры острой токсичности лекарственного средства могут быть вычислены с помощью любых статистических методов, однако предпочтительнее пользоваться методами, позволяющими провести сравнительную оценку исследованных параметров для 2 или более фармакологических веществ, например, методом Литчфилда и Уилкоксона. Используемый метод должен быть обязательно указан в отчете.

Пути введения. У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества обычно исследуют при нескольких путях введения, причем обязательно использовать тот путь, при котором была показана терапевтическая активность фармакологического вещества, и путь, который предполагается для

клинического изучения. Фармакологические вещества, предназначенные для системного введения, вводят внутрь и парентерально (внутрибрюшинно, если они не растворимы в воде, внутривенно и подкожно, если они растворимы). Следует учитывать, что при определении токсичности имеет значение концентрация и объем вводимого фармакологического вещества, а при внутривенных инъекциях также скорость введения. Фармакологические вещества, предлагаемые для местного применения, наносят или вводят в соответствующую область согласно способу, предлагаемому для клиники. Кроме того, дополнительно изучают их токсичность при системном применении.

Фармакологические вещества, предлагаемые для приема внутрь, следует вводить через зонд, закладывая на корень языка, исключение могут составить полимеры, которые можно давать с пищей.

Фармакологические вещества, рекомендованные для ингаляции, изучают, помещая мелких лабораторных животных в затравочные камеры, снабженные специальными затравочными устройствами.

Оценка параметров токсичности. При разных путях введения могут быть получены ориентировочные данные о скорости и степени всасывания фармакологического вещества, а сопоставление прямых, отражающих зависимость величины токсического эффекта от дозы, позволяет судить о сходстве или различии в механизмах, вызывающих летальный исход при разных путях введения.

Контроль состояния животных. Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности должна составлять не менее 2-х недель, причем в первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением.

Регулярно фиксируют общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, тонус скелетных мышц, реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, окраску слизистых оболочек, размер зрачка, положение хвоста, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи, потребление корма и воды, изменение массы тела и другие показатели, которые могут быть использованы для выявления токсического эффекта. Для отдельных фармакологических веществ целесообразно исследовать некоторые гематологические показатели (морфологические, биохимические, свертываемость крови).

Весьма существенным является регистрация сроков развития интоксикации и гибели животных. Целесообразно проводить макроскопическое исследование внутренних органов погибших животных, а в случае отсроченной гибели животных и микроскопическое исследование (степень кровенаполнения органов, наличие кровоизлияний, изъязвлений слизистых оболочек и др.).

Результаты следует представлять в таблице (Таблица 12).

Таблица 12

**Контроль состояния животных при исследовании острой токсичности
фармпрепарата**

Вид животных	Пол	Дозы, мг/кг	Число погибших животных	ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀ (с доверительными границами)	ЛД ₈₄

Исследование кумуляции. При выборе доз для исследования хронической токсичности фармакологического вещества следует учитывать его кумулятивное действие. Поэтому до проведения хронических токсикологических экспериментов рекомендуется определить индекс кумуляции фармакологического вещества, т. е. отношение ЛД₅₀ при однократном введении к ЛД₅₀ при кратном введении. Для этой цели можно использовать различные методы, основанные на учете гибели животных при повторном введении фармакологического вещества.

Предпочтение следует отдать изучению кумуляции методом Lim'a с соавторами, позволяющим оценить не только кумулятивные свойства, но и привыкание (Таблица 13).

Схема изучения кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у с соавторами следующая.

Таблица 13

Схема изучения кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у с соавторами

Дни введения	Число животных (n=10)	Доля от ЛД ₅₀
1-4		0,1
5-8		0,15
9-12		0,22
13-16		0,34
17-20		0,50
21-24		0,75
25-28		1,12

Суммарная доза за 24 дня = 12,8 ЛД₅₀, максимальная продолжительность эксперимента 24±4 дня.

$$K_k = \frac{LD_{50}n}{LD_{50}1},$$

где K_к – коэффициент кумуляции, ЛД₅₀ n – средняя смертельная доза при n-кратном введении, ЛД₅₀ 1 – средняя смертельная доза при однократном введении.

При этом K_к < 1 говорит о кумуляции, K_к > 1 – характеризует привыкание.

Изучение хронической токсичности

Целью хронических фармакотоксикологических экспериментов является характеристика степени повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование степени обратимости вызываемых им повреждений.

Таблица 14

Продолжительность введения фармакологического вещества экспериментальным животным в зависимости от длительности его применения у человека

Длительность применения препарата у человека	Длительность введения фармакологического вещества животным
Однократное введение	5-7 дней
2-6 дней	14 дней
7-14 дней	1 месяц
15-30 дней	2-4 месяца
1-6 месяцев	6-12 месяцев

Продолжительность введения фармакологического вещества при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности при применении в клинике (Таблица 14).

Пути введения фармвещества. Основным способом введения фармакологического вещества является способ, рекомендованный для клинического изучения. Фармакологическое вещество, предназначенное для применения внутрь, вводят лабораторным животным через зонд в желудок или закладывают на корень языка, т. к. это обеспечивает более точное дозирование, чем добавление фармакологического вещества в корм. Количество фармакологического вещества, получаемого животным за один прием, рассчитывают на единицу массы тела животного в пересчете на действующее вещество, (можно вести расчет на единицу поверхности тела). Фармакологическое вещество вводят в виде субстанции и той лекарственной формы, которая будет передана в клинику.

Исследуемые дозы. Хроническую токсичность фармакологического вещества при его системном применении исследуют в двух-трех (как правило, в трех) дозах. При выборе доз руководствуются результатами, полученными при исследовании острой токсичности фармакологического вещества, его способностью вызывать кумулятивный эффект, а также максимальными суточными дозами, в которых фармакологическое вещество рекомендовано для клинического изучения.

Введение высшей дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов и гибель части животных. Эта доза может быть рассчитана с учетом ЛД₅₀, полученной при изучении острой токсичности исследуемого вещества для данного вида лабораторных животных. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения. Третья доза является промежуточной. При постановке экспериментов обязательно наличие контрольной группы животных, содержащихся в таких же условиях, как и подопытные, и получающих вспомогательные ингредиенты, входящие в состав исследуемой лекарственной формы фармакологического средства, тем же способом, при котором изучают токсичность самого вещества.

Фармакологические вещества, предназначенные для ежедневного применения у человека, вводят экспериментальным животным 7 дней в неделю.

От оценки пользы и риска фармвеществ – к клиническим испытаниям

На протяжении всего опыта животные должны находиться под ежедневным наблюдением; отмечают потребление корма и воды, состояние волосяного покрова и слизистых оболочек, поведение. 1 раз в неделю животных взвешивают, регулярно (в опыте продолжительностью до 1 мес. – не менее 2 раз, при более длительном исследовании – не менее 3 раз) исследуют функциональное состояние сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной, выделительной и пищеварительной систем, изучают морфологические и биохимические показатели крови. Методы исследования для оценки функционального состояния органов и систем организма выбирает исследователь: они должны быть современными и достаточно чувствительными, чтобы обеспечить регистрацию признаков возможного повреждающего действия изучаемого фармакологического вещества.

Все животные, погибшие в течение опыта, подвергаются вскрытию для установления характера повреждающего действия фармакологического вещества. После окончания введения фармакологического вещества проводят максимально полное обследование экспериментальных животных с помощью гематологических, биохимических и физиологических тестов. Часть животных из каждой группы забивают для патоморфологических исследований. Определяют массу органов и проводят их гистологическое исследование. За животными, оставленными в живых, проводят наблюдение в течение 1 месяца, после чего их обследуют в том же объеме, что и

животных, забитых сразу после окончания введения фармакологического вещества. Для исследования динамики развития возможной интоксикации периодически определяют изучаемые параметры. Опыты на мелких лабораторных животных проводят с таким расчетом, чтобы полученные результаты можно было подвергнуть статистической обработке.

При оценке изменений, наблюдаемых у животных в хроническом токсикологическом эксперименте, необходимо исключить возможность влияния всех побочных факторов, не связанных с приемом препарата (заболевание животных, их питание, содержание и т. п.).

Могут возникнуть спонтанные изменения гемограмм, биохимических показателей и анатомических характеристик, которые следует учитывать при объяснении результатов. Не следует пренебрегать необъясненными данными, их надлежит подвергнуть дальнейшему изучению.

В ряде случаев в дополнение к указанным выше методам может потребоваться применение электронной микроскопии, гистохимических, автордиографических и других методов исследования.

Патологические изменения, возникающие у животных после введения высоких доз фармакологического вещества, дают ценную информацию для характеристики его токсических свойств, однако эта информация должна быть подвергнута тщательному анализу и полученные результаты следует рассматривать в качестве предупреждения, а не противопоказания для клинических испытаний.

При решении вопроса о возможности передачи препарата на клиническое изучение исследователь должен учесть следующие факторы:

- терапевтическую широту фармакологического вещества, т. е. соотношение минимальной токсической и терапевтической доз.
- характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение должно содержать суждения исследователей о степени опасного острого и хронического отравления на основании проведенных исследований, прогноз возможных побочных реакций и необходимых ограничений, при клинических испытаниях.

Результаты доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества являются частью материалов, оцениваемых в аспекте пользы и риска при разрешении клинических испытаний.

При изучении **аллергизирующих свойств** оценивают способность лекарственного средства вызывать при введении в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсбилизация), в основе которой лежат различные иммунопатологические механизмы.

Основная задача доклинического изучения влияния потенциальных лекарственных средств на иммунную систему состоит в том, чтобы в эксперименте на животных доказать или исключить возможность развития **иммунотоксического действия**, вызванного фармакологическим средством или его метаболитами.

Изучение **репродуктивной токсичности** – влияния лекарственных средств на генеративную функцию, развитие плода и потомства – является обязательной частью доклинического изучения их безопасности, поскольку по статистике до 80% женщин применяет какие-либо медикаменты во время беременности и около 3% новорожденных имеет родовые дефекты или аномалии развития. Этиология более чем половины врожденных дефектов у человека неизвестна. Определенную долю в этой части составляют лекарственные препараты. Лекарственное вещество может обладать эмбриотоксическим действием, оказывая прямое токсическое действие на плод после проникновения через плацентарный барьер либо воздействуя на плаценту или материнский организм. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной гибели (эмбриолетальное действие), так и в виде анатомических,

гистологических, цитологических, биохимических, нейрофизиологических отклонений от нормы (тератогенное действие), проявляющихся до или после рождения. Эмбрио- и фетотоксичность может проявляться в изменении массы тела, краниокаудального размера плода, задержке оссификации скелета (общая задержка развития), увеличении смертности. Могут наблюдаться различные отклонения в развитии потомства. Выявление в эксперименте такого рода отдаленных эффектов лекарств имеет большое практическое значение в антенатальной охране здоровья детей. Изучение воздействия фармакологических веществ на отдельных стадиях репродукции позволяет не только избежать отрицательных моментов, связанных с длительным введением препаратов, но и приблизить экспериментальные условия к клиническим.

Исследование **мутагенности** (действие вещества, способное вызвать изменения генетического аппарата клетки и приводящее к изменению наследственных свойств) предусматривает оценку способности лекарственных средств к индукции различных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках и делает необходимым использование для оценки мутагенных свойств лекарств комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах. Это учет хромосомных aberrаций или микроядер в клетках костного мозга млекопитающих и учет генных мутаций с использованием в качестве тест-объекта микроорганизмов или дрозофилы.

При изучении **канцерогенности** (действие вещества, способное вызывать развитие опухолей) лекарственные средства подразделяют на принципиально новые, не имеющие химических аналогов, вновь синтезируемые в известном химическом ряду и воспроизводимые. Подходы к решению вопроса о тестировании на канцерогенность указанных групп различаются. Обязательному тестированию на канцерогенность в хроническом эксперименте должны подвергаться вновь синтезируемые лекарственные средства, рекомендуемые: в качестве профилактических, лечебно-косметических, репеллентных средств и контрацептивов; для применения в течение всей жизни длительными (более 15 дней) курсами; для использования без назначения врача среди широких слоев населения; для применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и кормящих матерей.

Основные задачи токсикологического исследования лекарственных средств:

- описать токсическое действие лекарственного средства;
- определить его зависимость от дозы, длительности и пути введения;
- определить роль метаболитов;
- выявить наиболее чувствительные органы-мишени и/или системы органов-мишеней;
- выявить клинические признаки токсического действия;
- определить параметры специфической токсичности лекарственного средства — его возможное алергизирующее, иммунотоксическое, мутагенное, канцерогенное действие и репродуктивную токсичность;
- определить опасность вещества для окружающей среды;
- дать рекомендации по клиническому применению препарата.

При комплектовании групп экспериментальных животных для хронического токсикологического эксперимента надо иметь в виду необходимость исследования динамики возможного токсического эффекта исследуемого фармакологического вещества, для чего следует производить поэтапный забой животных в процессе введения препарата и в различные сроки после окончания его введения с целью выявления обратимости наблюдаемой патологии.

В Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005 г.) представлены материалы, охватывающие практически весь спектр экспериментальных методов, необходимые для качественного проведения доклинических исследований эффективности и безопасности новых

перспективных лекарственных средств, но недостаточно полно даны характеристики видов и линий животных, а также технологий их использования.

Современные тенденции оценки биомедицинской безопасности

Международное научное сообщество находится в активном поиске новых путей оценки биомедицинской безопасности с использованием как новых перспективных моделей животных-млекопитающих, так и альтернативных моделей. Практически ежегодно осуществляется пересмотр и ревизия новых методов исследования и оценки безопасности веществ и материалов. Это тем более важно, что последние достижения в области нанотехнологий выявили неготовность биомедицинских технологий в этом направлении. Требуется создание единого информационного ресурса по вопросам безопасности наносубстанций, наномедпрепаратов и нановакцин, а так же накопление и учет физико-химической, токсиколого-гигиенической, эколого-токсикологической информации об исследованных наносубстанциях, нанопрепаратах и нанолечествах.

В настоящее время в России пока отсутствуют учреждения, проводящие доклинические исследования, полностью соответствующие и аккредитованные по международной системе GLP. Несмотря на введение с марта 2010 года в действие Национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики – GLP» (ГОСТ Р 53434-2009), в стране отсутствуют единые принципы и требования проведения доклинических исследований, гармонизированных с международными стандартами. Поэтому мы сочли необходимым отразить в нашем Руководстве некоторые важнейшие принципы и подходы, соответствующие мировым тенденциям.

Определяющим принципом при оценке биомедицинской безопасности лекарств, вакцин и других веществ и материалов является минимизация количества животных при исследовании химических, биологических или минеральных соединений. *Общепринятый прием* оценки LD₅₀ в соответствии с Системой глобальной гармонизации (Globally Harmonised System – GHS), предусматривает интервалы достоверности, ранжирования и классификации субстанции. *Базовым методом* является *процедура фиксированной дозы*, с общепринятым обозначением TG 420 (Test Guideline, Руководств по тестам), для условий перорального введения веществ.

Острая токсичность – это когда введенное в однократной или многократных дозах в течение 24 ч вещество нарушает функции, морфологическую картину органов, гибель животных.

В соответствии с тестом TG 420 в исследование включают группы животных, предпочтительно одного пола, обычно самок, получающих дозы препарата в ступенчатой процедуре. Предпочтительный вид грызунов – крыса, которой проверяемая субстанция вводится в одинарной дозе через желудочный зонд. Допускается дробное введение субстанции небольшими частями, в течение периода, не превышающего 24 часа. Используются фиксированные дозы по 5, 50, 300 и 2000 мг/кг, а в отдельных случаях может быть исследована доза в 5000 мг/кг.

Первоначальный уровень дозы выбирают, исходя из ожидаемого уровня, при котором наблюдаются сразу несколько симптомов токсичности без причинения явных эффектов отравления или летального исхода, и основанного на данных *in vivo* или *in vitro*. Если такой информации нет, то стартовая доза принимается равной 300 мг/кг. Следующие группы животных могут получать более высокие или низкие дозы, в зависимости от наличия или отсутствия симптомов отравления. Эта процедура продолжается до тех пор, пока не будет определена доза, вызывающая отравление.

Животные наблюдаются ежедневно в течение 14 дней, в течение которых фиксируются изменения кожи и меха, глазных и слизистых мембран, дыхательной,

кровеносной, вегетативной и центральной нервной системы, соматомоторной активности и поведения особей. Отмечается явление тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сонливости и комы. В эксперименте должны быть учтены принципы и критерии, включенные в документ «Human Endpoints Guidance Document». Вес каждого конкретного животного, включенного в эксперимент, должен быть определен до и после введения субстанции. Обязательным условием должно быть проведение патоморфологических исследований.

Использование мини-свиней в оценке биомедицинской безопасности

Биоэтическая парадигма ориентирует на ограничение использования в биомедицинских технологиях целого ряда животных (обезьяны, собаки и т.д.) и поиску других животных-моделей.

В начале 1990-х гг. мини-свиньи были введены в эксперименты по токсикологии как альтернатива видам не грызунам. Основной причиной для введения была реализация многих биохимических, анатомических и физиологических черт, схожих с человеком, относительно других видов не грызунов. Мы считаем необходимым дать более подробную характеристику использования мини-свиней, как принятых в международной биомедицинской практике животных-моделей.

Фармакокинетические исследования легко проводятся на мини-свиньях с повторяющимся забором образцов крови или образцов других видов жидкостей из тела или тканей.

Администрирование доз и техника взятия проб – это оральные процедуры с использованием желудочного зонда или дозировки диеты с добавлением медикаментов в корм. Дозирование с помощью желудочного зонда у конвенциональных животных может вызвать стресс у животных. В виду анатомических и физиологических сходств кожи у человека и мини-свиньи весьма полезны для исследований кожи. Эта процедура используется в токсикологических исследованиях кожи для острой токсичности и в процедуре повторяющихся доз, исследованиях дермальной абсорбции, исследованиях фототоксичности и исследованиях фоточувствительности. Парентеральные дозы могут быть применены в виде инъекций внутримышечно, подкожно, внутрикожно и внутривенно. Последнее может быть выполнено или с помощью введения большого количества жидкости (болюсов), или как продолжающиеся внутривенные инфузии. Детально продолжающиеся внутривенные инфузии были описаны, также как и хирургическая подготовка для применения продолжающихся внутривенных инфузий. Другие процедуры, такие как носовые дозировки или дозировки ингаляций также были успешно применены на мини-свиньях.

Наблюдения, требуемые в тестах на токсичность, такие как клинические симптомы, вес тела, офтальмоскопия и электрокардиография являются рутинными процедурами в тестах на токсичность, проводимых на мини-свиньях.

Репродуктивная токсикология. Как известно, в тестах на репродуктивную токсичность обычно используют два вида животных: грызуны и не грызуны. Обычно используют крыс и кроликов. Мини-свиньи могут быть альтернативным видом в тератогенетических и репродуктивных исследованиях, когда традиционные виды, такие как мыши, крысы, кролики, являются неподходящими. Нечеловекообразные обезьяны имеют ограничения по количеству и сохранности и, главным образом, из-за того, что они приносят только одного детеныша. Мини-свиньи соответствуют SPF-стандартам, относительно недороги и имеют сходные с человеком анатомические и физиологические особенности. Репродуктивные характеристики светлогорских мини-свиней были описаны совместно с протоколом тератогенетических тестов и записями контрольных данных. Протокол тестирования может быть кратко описан следующим образом. Половой зрелости светлогорские мини-свиньи достигают в 8-месячном возрасте. Обычно самый

хороший возраст для включения в эксперимент 8-12 месяцев. Тератогенетические исследования делятся от начала имплантации (день 11) до закрытия жесткого неба (день 35), включая беременность.

Могут быть использованы различные процедуры наблюдения. Наиболее широко применяют оральные процедуры, но может быть также применена процедура продолжающихся внутривенных вливаний. Беременность может контролироваться ультразвукографией на 4-5 неделе беременности. Свиной забивают на 110-112 день беременности. Так как вес плода составляет 300-450 г, возможно, провести полную аутопсию эмбрионов. Обычно протокол включает эмбриональные исследования после изъятия из матки и окраску скелета. Для изучения скелета можно добавить рентген, так как кости скелета и плотность костей лучше визуализируются, чем при окрашивании ализарином. Светлогорские мини-свиньи весьма подвержены тератогенетическим эффектам третиноина с пороками развития, похожими на тератогенетический эффект ретиноловой кислоты у людей.

Светлогорские мини-свиньи полезны как модель изучения эффектов мужского оплодотворения. Показано, что самцы мини-свиной более подвержены химическим воздействиям с побочными (вредными) эффектами на способность оплодотворения, чем самцы крыс. Мини-свиньи имеют большее сходство с человеком в норме оплодотворения, проценте морфологически ненормальной спермы, проценте спермы со способностью к движению и вероятностью крипторхизма.

Ювенильные исследования были введены в доклинические программы, так как некоторые лекарства являются проблемными для детей без проверки безопасности их использования в аналогичной возрастной группе. Стандарт доклинических исследований должен включать профиль безопасности для всех педиатрических групп, особенно в реакциях развивающегося мозга, дыхательной системы, почек, репродуктивной и иммунной систем. Это послужило мотивировкой в США и Евросоюзе по разработке руководства для доклинических исследований на ювенильных животных для фармацевтики педиатрических показателей. Традиционно, крысы и собаки, но не свиньи являлись видами, выбираемыми для исследований.

Оценка годности мини-свиной для такого рода исследований была проведена учеными разных стран. Протоколы для проведения ювенильных исследований включают подсадку всех животных к одной матери для того, чтобы избежать эффекта случайности. Подсадка молодняка мини-свиной для подготовки ювенильных токсикологических исследований является важной практикой подготовки для последующего содержания в лаборатории тестирования. На ювенильных мини-свиньях проводят такие исследования, как оральное или парентеральное дозирование, офтальмоскопия, ЭКГ и повторяющийся забор проб крови для клинической патологии и токсикокинетики. Имплантация венозных портов для ежедневной внутривенной дозировки была удачной, начиная с 7 дня и далее. Клинико-патологические данные очень важны, так как многие стандартные параметры изменяются с возрастом.

Правовые вопросы. Свиньи и мини-свиньи, как модель в тестах на токсичность фармацевтических и других химических веществ, в настоящее время принята в Японии, ЕС и США. Свиньи и мини-свиньи особенно упоминаются как потенциальный вид негрызунов в руководствах Японии и Канады. Свиньи и мини-свиньи внесены в руководство OECD 409.

Таким образом, мини-свиньи являются полезным видом негрызунов в исследовании безопасности лекарств. Однако, отбор наиболее подходящих видов, является комплексным. Многие фармацевтические предприятия содержат собак, как первый выбор и исходят от собак при своих оценках. Мини-свиньи могут быть коммерчески неподходящими животными в основном из-за живого веса, так как они требуют большего количества тестов. Светлогорские мини-свиньи выращиваются в соответствующих условиях, которые обеспечивают в результате должный

иммунологический статус. Реальной отдачей для фармакологии и токсикологии является то, что выбор мини-свиней для оценки лекарств имеет биоэтические, аллометрические, таксономические и экстраполяционные преимущества.

Использование рыб в экспериментальной работе

В настоящее время ЕРА продолжает использовать тесты *in vitro* для оценки острой токсичности у рыб. Одна из альтернатив, была описана в TETRATOX, в которой используется *Tetrahymina*, как биологический маркер в оценке экологического риска загрязнения воды. Биохимия и физиология *Tetrahymina* была изучена еще в 1950-х гг., и *Tetrahymina*, и особенно, *T.pyriformis*, широко используется с 1970-х гг. для определения токсичности в тестах воды. Более того, геномы организмов хорошо изучены. Популяция *T.pyriformis* растет в тесте быстро, инэкстенсивно и широко. Данные, полученные в TETRATOX демонстрируют высокую степень соответствия данным, полученным в исследованиях рыб.

Последние годы интенсивно развиваются исследования на рыбах *Danio rerio* и теляпиях, в том числе для оценки токсичности лекарств и ксенобиотиков. В мире существует примерно 20000 видов рыб, это примерно половина от всех живущих на Земле позвоночных. Рыбы сильно варьируют по своим размерам, таксономии, морфологии, генетике, поведению, физиологии и экологии. Поэтому невозможно дать одно руководство по их содержанию и разведению. Однако можно выделить отдельные общие принципы.

Отбор видов рыб, независимо от того, морские, пресноводные или рыбы солоноватой воды, сопровождается необходимостью организации системы поддержки жизнедеятельности.

Приобретение рыб возможно только в легальных источниках. Если в работе используют рыб, выловленных в открытых водоемах, то требуется заключение ветеринарной службы. Отлов рыб для клинических испытаний проводят в соответствии с существующими стандартами и законодательством.

Транспортировка рыб должна проводиться только с соблюдением требований по снижению стресса. В США и Канаде перед транспортировкой рыб не кормят за 2-4 дня до перевозки, чтобы снизить вероятность загрязнения воды, и столько же дней дают ограниченное количество корма, чтобы затем перейти на обычный рацион.

Научно-исследовательский и обслуживающий персонал должен обладать соответствующей квалификацией по содержанию рыб, чтобы предотвратить стресс и возможные ранения рыб при их вынимании. В руках рыб надо держать как можно более короткое время. Сети и другое оборудование, которое применяют для отлова рыб, должно быть мягким, неповреждающим кожу рыбы. При необходимости можно использовать химические средства для обездвиживания.

Акклиматизация рыб должна проводиться с минимальным стрессом. Температура воды в танках для содержания рыб должна быть такой же, как и в транспортных контейнерах и в природных водоемах. Рыбы лучше переносят понижение температуры, чем ее повышение. В первые дни рыб лучше не тревожить.

Карантин необходим для новых партий рыб, кроме случаев, когда рыб получают из тех же источников. Практикуется полное отделение рыб. Для минимизации вероятности получения патогенов может быть проведена стерилизация: химическим способом, озонацией или ультрафиолетом.

Танки и другое оборудование для перевозки должны иметь такую конструкцию и быть изготовлены из таких материалов (пластик или фибра), чтобы минимально травмировать рыб. Размеры и конкретная конструкция подбираются в соответствии с видом рыб. Конструкции не должны содержать медь, никель, кадмий или латунь. При

использовании поливинила надо следить за тем, чтобы он не выделял ацетона, метилэтиленкетонов и тетрагидрофуранов.

Качество воды должно определяться в процессе биологической, механической и химической фильтрации и дезинфекции. В течение дня необходимо контролировать pH, содержание кислорода, азота, аммония, окиси углерода, солей и твердых примесей.

Температура воды влияет на репродуктивные способности, здоровье, поведение, особенности кормления рыб. Температура зависит от вида рыб и подбирается в процессе акклиматизации.

Освещение как естественное, так и искусственное зависит от вида рыб. Хотя большинство рыб нормально себя чувствуют при 12-часовом дне и 12-часовой ночи, для большинства рыб достаточно 8-10-часового дня, 12-14-часовой день необходим для тропических рыб. Для установления циклов освещенности используют таймер. В аквариумах обычно ставят флуоресцентные лампы для искусственного освещения.

Плотность поголовья рыб и движение воды зависят от их вида. Слишком большие пространства могут быть нежелательны для самочувствия рыб. Оптимальное количество рыб в аквариуме зависит от многих факторов, включая качество, движение и температуру воды. При более высокой температуре снижается содержание кислорода, что может потребовать снижения количества рыб. Воды должно быть достаточно, чтобы рыбы могли плавать свободно.

Кормление рыб. Некоторые виды рыб являются травоядными, некоторые – плотоядными, некоторые – всеядными. В соответствии с этим подбирается тип кормления. Можно использовать приготовленные промышленным способом корма. Кормление осуществляют 1 или 2 раза в день в течение 5 рабочих дней, хотя может потребоваться и более частое кормление, а также кормление в выходные дни. Кормление с рук при соблюдении всех гигиенических требований приветствуется, так как позволяет выявить возможные проблемы.

Программа контроля здоровья осуществляется ветеринаром или квалифицированными работниками, знакомыми с особенностями лечения рыб. Персонал необходимо обучить и снабдить необходимым оборудованием для мониторинга здоровья рыб.

Аналгезия, анестезия и инвазивные процедуры проводятся квалифицированным персоналом в случаях, когда необходимо успокоить, обездвижить или обезболить рыбу, особенно при инвазивных процедурах. После применения анестезии рыбы должны быть помещены в аквариумы, обогащенные кислородом без анестезии.

Эвтаназия, если она необходима, должна быть гуманной. Методы эвтаназии включают гипотермию, электрошок, большие дозы Tricaine Methanesulfonate (Finquel, MS-222) или диоксид углерода, или отсечение головы острым ножом. MS-222, введенный в дозе 500 мг/л может вызвать боль и стресс. При использовании химических средств в процессе эксперимента можно применять физические методы эвтаназии. Во всех случаях надо проконсультироваться с ветеринарной службой.

Опасные виды и зоонозы. В процессе работы надо избегать возможных травм персонала при работе с опасными видами, а также возможности заражения болезнями, переносимыми рыбами. Надо применять правила техники безопасности для снижения этих рисков.

Стандартизованные модели токсичности

Программа OECD обеспечивает механизм развития новых или обновления существующих *Руководств по использованию тестов TG (Test Guideline)*. OECD TG широко используется мировым научным сообществом и признана авторитетами в странах-членах OECD и не-членах OECD. Совместное совещание Химического Комитета

с Работавшей группой по химикатам, пестицидам и биотехнологии, выработало политику по дальнейшему улучшению *TG*.

Разработанные новые методы проходят процедуру включения в *Руководство по использованию тестов*. Описание метода подается в Рабочую группу, которая рассматривает метод с точки зрения его целей, технического содержания, этических принципов при использовании животных, стоимости, соответствия национальным политическим требованиям. Затем Рабочая группа выносит метод на Общее обсуждение, которое проводится в среднем 1 раз в 8 месяцев. Вынесенное решение возвращается в Рабочую группу. При необходимости метод дорабатывается и вновь выносится на Общее обсуждение. Общее время, необходимое на внесение нового метода в Руководство, существенно варьирует, но в среднем оно занимает примерно 18 месяцев (Таблица 15).

Таблица 15

Процедуры TG для краткосрочных и долгосрочных токсикологических тестов (по данным OECD Guidelines for the testing of Chemicals)

TG	Наименование и комментарий
401	Острая пероральная токсичность (исключен). Принят 12.05.1981. Дата исключения: 20.12.2002 г.
402	Острая дермальная токсичность. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24 февраля 1987 г.: учтено требование уменьшения количества животных в эксперименте, по сравнению с оригинальным методом снижения уровня используемых доз.
403 ТнЖ**	Острая ингаляционная токсичность. Принят 12.05.1981.
404 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия кожи. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия снижения количества животных и очистки от использования животных в соответствии с требованиями OECD* TG, включая тесты <i>in vitro</i>
405 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия глаз. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия снижения количества животных и очистки от использования животных в соответствии с требованиями OECD TG, включая тесты <i>in vitro</i> .
406 ТнЖ	Чувствительность кожи Принят 12.05.1981. Подтвержден 17.07.2002 как стратегия снижения количества животных до 50% по сравнению с оригинальным OECD TG.
407 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в повторяющихся дозах в течение 28-дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 27.07.2002 как стратегия очистки от использования животных по сравнению с оригинальным OECD TG, больше информации о практике дозировки, больше информации о таких же животных.
408 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в течение 90-дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
409 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у не-грызунов в течение 90-дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
410 ТнЖ	Дермальная токсичность. Принят 12.05.1981.
411 ТнЖ	Субхроническая дермальная токсичность в течение 90-дней. Принят 12.05.1981.
412 ТнЖ	Ингаляционная токсичность тест повторяющихся доз в течение 14/28 дней. Принят 12.05.1981.
413 ТнЖ	Субхроническая ингаляционная токсичность в течение 90-дней. Принят 12.05.1981.

414 ТнЖ	Изучение развития пренатальной токсичности. Принят 12.05.1981. Подтвержден 22.01.2001, дает снижение количества животных по сравнению с оригинальным OECD TG до 20%, больше информации об аналогичных животных.
415 ТнЖ	Изучение первого поколения репродукционной токсичности. Принят 12.05.1983.
416 ТнЖ	Изучение второго поколения репродукционной токсичности. Принят 26.05.1983. Подтвержден 22.01.2001.
417 ТнЖ	Токсикокинетика. Принят 04.04.1984. Подтвержден 17.07.1995.
418 ТнЖ	Задержка нейротоксичности фосфорорганических субстанций, следующих за острыми проявлениями. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
419 ТнЖ	Изучение задержки нейротоксичности фосфорорганических субстанций в повторяющихся дозах в течение 28 дней. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
420 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – процедура фиксированной дозы. Принят 17.07.1992. Подтвержден 17.12.2001, использован метод снижения и очищения от использования животных по сравнению с условиями метода TG 401, меньше страданий, меньшее количество животных в эксперименте.
421 ТнЖ	Тест скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 27.07.1995, метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, обеспечивая необходимую информацию с минимальным количеством животных.
422 ТнЖ	Комбинированное изучение токсичности в повторяющихся дозах с тестом скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 22.03.1996. Метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, комбинирует новые скрининговые тесты на репродукционную токсичность с TG 407, и еще больше снижает количество животных до абсолютного минимума при комбинации точек окончания эксперимента
423 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – Класс методов острой токсичности (АТС). Принят 22.03.1996. Подтвержден 17.12.2001. Метод снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, используется значительно меньше животных (10% от требующихся в TG 401).
424 ТнЖ	Изучение нейротоксичности у грызунов. Принят 21.07.1997.
425 ТнЖ	Острая пероральная токсичность: процедура вверх-и-вниз. Принят 21.09.1998. Подтвержден 17.12.2001. Тест снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, требуется меньше животных, обеспечивающих точность оценки LD ₅₀ как в методах TG 420 и 423.
426 ТнЖ	Изучение развития нейротоксичности. Планируется в новом руководстве.
427 ТнЖ	Впитывание кожей: метод <i>in vivo</i> . Принят 13.04.2004.
428	Впитывание кожей: Метод <i>in vitro</i> . Принят 13.04.2004. Хорошая альтернатива методу <i>in vivo</i> , для полной замены метода TG 427
429 ТнЖ	Чувствительность кожи: исследование местных лимфатических узлов. Принят 24.04.2002. метод, снижающий и очищающий от использования животных по сравнению с TG 406, обеспечивает большим количеством информации и служит причиной меньших страданий
430	Коррозия кожи <i>in vitro</i> : Тест транскожной электрической устойчивости. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, использует метод замены животных в части

	коррозии теста TG 404.
431	Коррозия кожи <i>in vitro</i> : Модель теста на коже человека. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, использует метод замены животных в части коррозии теста TG 404.
432	Тест фототоксичности <i>in vitro</i> 3Т3. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест. Полная замена, поскольку нет аналогичных тестов OECD TG на животных.
433 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций: Процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 403, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий
434 ТнЖ	Острая дермальная токсичность: Процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 404, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий
435 ТнЖ	Коррозия кожи <i>in vitro</i> . Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 404, для специфических целей, только для изучения кислот и оснований.
436 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций: Класс токсичности (АТС). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 403, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий
451 ТнЖ	Изучение канцерогенности. Принят 12.05.1981.
452 ТнЖ	Изучение хронической токсичности. Принят 12.05.1981.
453 ТнЖ	Комбинированное изучение хронической токсичности и канцерогенности. Принят 12.05.1981 как комбинирование исследований в тесте TG 453 может снижать количество животных по сравнению с использованием только TG 451 и TG 452

* – OECD = Organization for Economic Cooperation and Development (Организация по экономической кооперации и развитию)

** – ТнЖ = тест на животных

Метод определения класса острой токсичности TG 423 аналогичен по выбору животных, целям и условиям выполнения методу TG 420 и состоит из последовательной процедуры с использованием трех животных одного пола (обычно самок) на каждом шаге. Отсутствие или наличие летальных исходов от определенной дозы вещества определяет следующий шаг, при котором дальнейшее тестирование больше не нужно, а необходимы три дополнительных особи для тестирования с той же самой дозой или по три дополнительных особи для тестирования с более высокой или более низкой дозы. Стартовая доза выбирается из четырех фиксированных уровней в 5; 50; 300 или 2000 мг/кг. Конечной дозой является та, которая с наибольшей вероятностью приведет к летальному исходу у некоторых из тестируемых животных. В случаях, когда такой информации нет, то стартовая доза принимается равной 300 мг/кг.

Процедура вверх-и-вниз TG 425 аналогична целям и условиям TG 420, но содержит прогрессию из одинарных доз, которые проверяются преимущественно на самках крыс в одно и то же время. Первое животное получает дозу на шаг ниже уровня LD₅₀, а если информация по предварительной оценке отсутствует, то стартовая доза берется равной 175 мг/кг. Если животное выживает, то доза следующего животного увеличивается в 3,2 раза от первоначальной дозы; если умирает, то доза следующего животного уменьшается в соответствующей прогрессии.

Оценка *острой токсичности ингаляций TG 403* дает информацию о возможности возрастания токсических эффектов при кратковременных аэрозольных воздействиях. Этот тест является основой для классификации и маркировки по параметрам средней летальной концентрации LC_{50} , полученных в острых экспериментах. В течение определенного времени для тестирования субстанции, по меньшей мере, в трех заданных концентрациях. Несколько групп крыс по 10 особей (5 самцов и 5 самок) используются для оценки минимум трех заданных концентраций, по одной концентрации на одну группу. Условия эксперимента должны предусматривать содержание не менее 19% кислорода, стабильное атмосферное давление и 12-15-кратный воздухообмен в час. Животных наблюдают ежедневно в течение 14 дней. Особое внимание уделяется изменениям глазных и слизистых оболочек, дыхательной, кровеносной систем, кожи и меха. Остальные процедуры выполняются в соответствии с тестом TG 420.

В токсикологических исследованиях комплексная оценка химических рисков основывается на предположении, что эффект, наблюдаемый на лабораторных животных, будет наблюдаться и у человека.

В соответствии с соглашением между странами-членами OECD в июне 2004 г. предложена *процедура фиксированной дозы TG 433* как альтернатива оценки острой ингаляционной токсичности по методу TG 403. Различие между TG 403 и новым тестом TG 433 заключается в том, что процедура фиксированной дозы применяется позже со стратегией аналогичной используемой в TG 420. В комбинации с использованием появления симптомов отравления как точки окончания тестирования вместо летального исхода были достигнуты значительные улучшения, касающиеся минимизации страданий животных и уменьшения использования лабораторных животных в эксперименте.

Касаясь достоверности и корректности методов оценки острой токсичности, следует отметить, что субстанции, использование которых может привести к задержке летального исхода, должны быть исследованы по методике TG 425, в которой продолжительность тестирования будет существенно длиннее по сравнению с другими методами тестирования. Однако, внутри методов TG 420 и TG 423, нахождение периода задержки летального исхода может потребовать дополнительно более низких уровней доз для практического использования или повторения исследований. Сравнительный статистический анализ показал, что при всех трех методах корректность результатов исследования зависят от выбора уровня стартовой дозы по значениям LD_{50} . Поскольку TG 420 использует в качестве *точки окончания эксперимента*, развитие отравления вместо летального исхода, он не может быть принят в качестве достоверной информации о токсическом эффекте близком к летальным дозам. Только использование всех трех тестов повысит уровень надежности полученных результатов.

Этические нормы и концепции защиты животных, выдвигаемые в последние 20 лет, также как и текущие изменения регулирования охраны окружающей среды, делают очевидным необходимость поиска новых подходов. Очевидно, что необходима замена тестов на животных для оценки безопасности химических средств и продуктов на альтернативные.

Новые модели в токсикогеномике и канцерогенезе

Необходимость полной замены животных в тестах моделями систем в области токсикокинетики, метаболизма и зародившейся области токсикогеномики предполагает расшифровку механизмов генотоксичности и мутагенеза, которые должны помочь в развитии подходящих моделей *in vitro*. Прогресс будет зависеть от ряда факторов, таких как развитие тестов *in vitro* в области токсикокинетики и метаболизма, развитие тестов *in vitro* для исследований годности лекарств, дальнейший прогресс в области

токсикогеномики. Гибкий подход к тестам *in vivo*, уже сегодня может способствовать снижению количества используемых в тестах животных.

Использование линий клеток далеко не всегда соответствует изучаемым *целевым органам*. По этим причинам разрабатывается новая стратегия тестирования, состоящая из четырех стадий. На *стадии 1* оценивается изучаемая субстанция на основе существующих данных и знаний, главным образом, на основе существующей информации об изучаемых токсикантах и химических веществах. На *стадии 2* проводится батарея тестов *in vitro* для определения рисков. *Стадия 3* включает моделирование цели системы *in vitro*, но моделирование проводится в тех ситуациях, когда один или большее число тестов на *стадии - 2* дали положительный результат. *Стадия 4* включает тесты на животных, когда один или большее число тестов на *стадии - 3* дали положительный результат. *Стадия 2* включает в себя тесты, разрешенные для проведения в регуляторных целях (см. ниже TG 471; TG 480; TG 476; TG 473) и/или оптимизированные тесты *in vitro*. *Стадия 3* должна включать модели целевых органов/систем *in vitro*, которые необходимо развивать и валидировать (эксперты рекомендуют использовать клетки кожи или модели первой стадии исследований для тестирования косметических продуктов. Окончательно, *стадия 4* проводится только в тех случаях, когда это необходимо, но тогда она включает в себя тесты *in vivo*.

С 2005 г. осуществляется международный интегрированный проект развития стратегий тестирования *in vitro* для оценки системной острой токсичности препаратов у человека, которые могли бы полностью заменить тесты определения острой токсичности на животных, применяемых в настоящее время с целью систематизации. Проект включает сбор, оценку и разработку данных *in vitro* и *in vivo* для сравнительного анализа; определения таких параметров, как кинетика, метаболизм и токсичность для органов. Целью проекта является установление корреляции между изменениями концентраций веществ *in vitro*, дозами токсичности *in vivo*; описание новых инструментов и клеточных систем для определения диапазона эксперимента, стратегий для предварительного определения и имитационного моделирования острой токсичности у животных и человека (Таблица 16).

Таблица 16

Рекомендации OECD TG для токсикогеномных тестов

TG	Наименование и комментарий
471	Тест на профиль бактериальных мутаций. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Тест <i>in vitro</i> для точек мутаций. ^a Альтернативный тест как часть общей стратегии тестирования.
472	Токсикогеномика: <i>Escherichia coli</i> . Исследование не было валидировано. Принят 26.05.1983. Дата исключения 21.07.1997, метод поглощен TG 471.
473	Тест аберрации хромосом млекопитающих <i>in vitro</i> . Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Альтернативный тест, часть батареи тестов; он не полностью замещает тесты <i>in vivo</i> .
474 ТнЖ ^b	Тест микронуклеусов эритроцитов млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Снижено количество животных по сравнению с версией 1983 г., используется меньше животных.
475 ТнЖ	Тест аберрации хромосом костного мозга млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997.
476 ТнЖ	Тест мутации генов клеток млекопитающих <i>in vitro</i> . Принят 04.04.1984. Подтвержден 21.07.1997.
477	Токсикогеномика: Тест на летальность рецессивного гена пола у <i>Drosophila melanogaster</i> . Принят 04.04.1984. Альтернативный тест, так как мухи являются беспозвоночными. Замечание: Directive 86/609/ЕЕС определяет животных как

	любое живое нечеловекообразное позвоночное.
478 ТнЖ	Токсикогеномика: Тест на летальность доминант грызунов. Принят 04.04.1984.
479	Токсикогеномика: Исследование <i>in vitro</i> сестринских хроматоидных изменений в клетках млекопитающих. Принят 23.10.1986. Тест <i>in vitro</i> изменений ДНК между сестринскими хроматидами, определение генетической токсичности. ^a Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования
480	Генетическая токсикология: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Исследование генной мутации. Принят 23.10.1986. Тест <i>in vitro</i> генной мутации <i>Saccharomyces</i> . ^a Альтернативный тест является частью стратегии тестирования.
481	Токсикогеномика: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Исследование митотических рекомбинаций. Принят 23.10.1986. Тест на генотоксичность <i>in vitro</i> митотических рекомбинаций у <i>Saccharomyces</i> . ^a Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования.
482	Токсикогеномика: Повреждение и исправление ДНК, неописанный синтез ДНК в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> . Принят 23.10.1986. Альтернативный тест является частью батареи тестов, он не полностью заменяет тест <i>in vivo</i> .
483 ТнЖ	Тест сперматогониальной аберрации хромосом млекопитающих. Принят 23.10.1986. Подтвержден 21.07.1997.
484 ТнЖ	Токсикогеномика: Тест мышиноного пятна. Принят 23.10.1986.
485 ТнЖ	Токсигеномика: Тест наследования транслокации у мышей. Принят 23.10.1986.
486 ТнЖ	Тест неописанного синтеза ДНК на клетках печени млекопитающих <i>in vivo</i> . Принят 21.07.1997.
487	Тест микронуклеусов <i>in vitro</i> . Планируется в новом руководстве. Альтернативный тест является частью батареи тестов; не полностью заменяет тест <i>in vivo</i> .

^a Все тесты *in vivo* генетической токсикологии являются частью стратегии тестирования, которая проводится на животных только в случае необходимости (в случае полученных двусмысленных результатов)

^b – ТнЖ = тест на животных

Альтернативные модели гено- и эмбриотоксичности

Специальным соглашением по использованию тестов *in vitro* для оценки генотоксичности в перечень исследовательских методов были включены тесты Ames / бактериальной противоположной мутации, также как и тесты *in vitro* для хромосомной аберрации, мутации генов клеток и изменений в сестринских хроматидах (OECD TG 471, 473, 476 и 479, соответственно). Использование этих приемов, самих по себе или в комбинации, дает высокочувствительные тесты определения генетической токсичности (11-12). Научные и этические соглашения по использованию методов *in vitro* для нахождения точки окончания эксперимента, тесты на определение генетической токсичности *in vivo*, послужили отправной точкой для валидации.

В соответствии с рекомендациями Агентства по защите окружающей среды США (EPA – Environmental Protection Agency) были предложены тесты по оценке острой токсичности на рыбах, икре рыб, *in silico*. ECVAM валидировала использование эмбриональных стволовых клеток для эмбриотоксичности, а также использования культуральных клеток животных и человека.

Тесты на организмах, живущих в воде

Существует тест ECOSAR (ecological structure-activity relationships), в моделях *in silico* при определении химической токсичности для организмов, живущих в воде, рекомендован к использованию в программе HPV руководством EPA. Модель дает возможность предсказать эффекты ряда таксономических групп, включая рыб, беспозвоночных и водоросли, при изучении как острой, так и хронической токсичности лекарственных средств.

Другое обещающее исследование *in vitro* – исследование икры рыб, которое показывает очень ранние стадии развития эмбриона при концентрациях изучаемой субстанции. Этот тест используется в настоящее время в Германии как замещающий рыб тест при оценке загрязнения воды и может быть признан замещающим тестом во всех случаях использования рыб в тестах на острую токсичность лекарств.

Тест эмбриональных стволовых клеток (EST)

Тест EST валидирован ECVAM для выявления эмбриотоксичности. Он определяет критические параметры и наличие развивающейся токсичности. Тест использует стволовые клетки крыс, которые помещены в культуру и обладают способностью к дифференцированию. Эмбриотоксичность определяется по концентрации тестируемых химических веществ, необходимых для подавления 50% дифференциации, вместе с ростом ингибции на 50% относительно контроля. Этот валидированный тест идеально подходит для немедленного использования как меры уменьшения на основном, скрининговом уровне программы типа EPA's HPV Challenge – где химические вещества, которые получили положительную оценку в тесте на эмбриотоксичность, должны быть классифицированы как вероятно развивающие токсичность, без продолжения тестирования другими методами. Несмотря на то, что метод признан снижающим использование животных в виду его высокого потенциала, который может спасти жизнь более чем 30% животных, используемым в обычных пренатальных определениях развивающейся токсичности, в соответствии с OECD 414 – EPA и другие участвующие компании пока отказались использовать этот тест в программе HPV.

Клеточные линии человека и животных

Предлагаются методы оценки острой системной токсичности *in vitro*, включающие два основных метода определения цитотоксичности, с использованием обычных кератиноцитов человека *NHK* и клеточных линий фибробластов мышей *Balb/c 3T3*. Эти тесты являются наиболее подходящими для немедленного использования как снижающая мера для вычисления стартовой дозы *in vivo*. Предполагается, что вследствие этого возможно снижение использования животных на 40%. EPA также рекомендует участникам программы включать данный метод в программы определения острой токсичности. Тем не менее, исследователи часто игнорируют рекомендованные методы определения острой цитотоксичности методами *in vitro*, когда в тестах используют нетоксичные материалы и вещества.

Альтернативные батареи тестов

Одной из основных проблем альтернативного моделирования является выбор правильной стратегии тестирования для новых химических веществ и инновационных лекарств, по которым еще нет данных о потенциальной токсичности их молекул. Только некоторые исследования вносят новые данные в проблему поиска и валидации общепринятых методов. Исследования *in vitro* позволяют сформировать общую стратегию тестирования. Для этого необходима новая техника использования культур клеток, которая обеспечит уровень функционирования системы или органа в целом, что позволит вычленив в *in vitro*-моделях функциональные свойства *in vivo*-органа в целостном организме. Общепринятым подходом является использование нескольких параллельных исследований на клеточных культурах, которые условились обозначать как *батарею тестов*.

Батарея тестов (test battery) представляет собой мультиметодическое использование серии тестов, проводимых обычно в одно и то же время или в тесной связи друг с другом. Каждый тест внутри последовательности строится для получения дополнительной информации от предыдущего и для измерения различий дополнительного многофакторного токсического эффекта.

Определение максимально толерантной дозы *in vitro* осуществляется на основе определения минимальной концентрации лекарств *in vitro*, которое приводит к изменениям в клеточной морфологии. Лактатдегидрогеназа (LDH) уменьшает или повышает до 50% смертность клеток (СТ₅₀), что предполагает соответствие этой дозы лекарств дозе *in vivo*. Она дает повышение до первоначальных или слабых проявлений токсичности, т.е. до тех пор, пока минимальная концентрация лекарств *in vitro* не приведет к гибели более 90% клеток (СТ₁₀₀) и не будет соответствовать дозе *in vivo*, которая в свою очередь дает повышение маркированных клинических показателей. Значения СТ₅₀ и СТ₁₀₀ (мг/мл) трансформируются в мг/кг/день для порога *in vivo*.

Следует подчеркнуть, что первичные культуры гепатоцитов крысы более чувствительны, чем многие другие типы клеток. Они используются для прогнозирования значений *in vivo* у собак. Клетки MDBK (почки крупного рогатого скота, телят) менее чувствительны и используются для получения прогнозируемых данных *in vivo* у крыс. Клетки McCoу эпителия человека служат в качестве контроля *in vitro*. Такие параметры роста и морфологии как площадь поверхности, занятая растущими линиями клеток, изменения в размерах и форме клеток, наличие цитоплазматических вакуолей, деление клеток, гибель и умирающие клетки, учитываются после экспозиции для гепатоцитов – 24 часа, для остальных клеточных линий – 24, 48 и 72 часа. Ниже мы приводим некоторые, наиболее распространенные, батареи тестов для альтернативного моделирования *острой токсичности*.

Тест А Hep G2 cell/protein content основан на использовании линии клеток гепатомы для тестирования субстанций. Цитотоксичность измеряется как изменение содержания белка по методу, описанному Lowry и др. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами **В-Д** (см. ниже) или в комбинации только с тестом **В**, для уменьшения количества животных в опытах по изучению острой токсичности при применении препаратов *per os*.

Статус валидации оценен в Multicentre Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity (MEIC – мультицентр по оценке цитотоксичности *in vitro*) по *релевалентности цитотоксичности* тестов *in vitro* для оценки острой токсичности у человека. Результаты MEIC показали соответствие тестов, проведенных на клеточных культурах человека для определения базальной цитотоксичности. В батарею тестов, для улучшения общих результатов моделирования, должны быть включены два вида тестов: тесты *in vitro*, имеющие соответствие по токсикокинетике и тесты *in vitro*, целью которых является определение токсичности для органов. Тесты были разработаны для оценки летальных концентраций в

крови человека и их, в противовес концентрации в крови, необходимо комбинировать с данными по поглощению в соответствии с предполагаемыми проверяемыми дозами. Тест осуществляется в течение 24 часов.

Тест В HL-60/АТФ content основан на использовании указанных клеток острой миелолейкемии человека для тестирования субстанций. Содержание АТФ измеряют с помощью Lucifer-LU плюс оборудование для биолюминисценции из энзимной люцеферин-люцеферазной реакции. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами **А**, **С** и **Д** (см. ниже) или в комбинации только с тестом **А**. Тест разработан и оценен по программе МЕИС для определения летальной концентрации в крови человека. Результаты, в противовес концентрациям в крови, должны быть рассмотрены в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз. Тест осуществляется в течение 24 часов.

Chang liver cell-тест С основан на использовании клеток печени Chang'a, культивированных в запечатанных парафином чашках с 96 ячейками для микротитрования. Недостаток развития веретенообразных или веретеновидных клеток является критерием цито-ингибирования. Культуры затем культивируются в течение 7 дней и используются в тесте **Д**. Оценен по программе МЕИС для использования в батареях тестов **А**, **В** и **Д**. Тест разработан для оценки летальной концентрации в крови человека. Результаты должны быть рассмотрены в противовес концентрациям в крови, в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз.

Тест D Chang cell/pH основан на использовании культуры из теста **С**. Через 168 часов цвет рН индикатора фенол красный, включенного в среду, записан. Фиолетовый цвет является показателем *полного ингибирования*, в то время как наличие небольшого количества основного красного, как и не являющегося нормальным оранжевого цвета говорят о *частичном ингибировании*. Используется в батареях тестов **А**, **В** и **С**.

Тест E BALB/c 3T3 (NRU) используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках указанной линии мышей для испытания выживания и жизнеспособности, определяемой по способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (NRU). NR аккумулируется в лизосомах. Изменения поверхности клетки является результатом снижения поглощения и связывания NR. Тест валидирован и широко распространен. Тест является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*.

Тест F NRU на линии человеческих кератиноцитов используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках человека по показателям выживания и жизнеспособности, определяемой по способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (NRU). NR аккумулируется в лизосомах. Тест валидирован, широко распространен и является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*. Тест осуществляется в течение 48 часов.

Новые стратегии сочетания животных и альтернативных моделей

На данном этапе развития научных исследований, оценка хронической токсичности и ее разновидностей возможна *исключительно с использованием животных*.

Токсикологический и канцерогенный потенциал химических веществ обычно определяют в последовательности экспериментов: *токсичность острую, подострую* (14 дней), *субхроническую* (90 дней) и *хроническую* (2 года) – на крысах и мышах обоих полов. В разных странах существуют требования проверки хронической токсичности на более крупных животных (кролики, кошки, собаки, мини-свиньи).

Общепринято, что уровни доз для 14-дневного эксперимента по токсичности обычно оцениваются по данным литературных источников, если такие существуют.

Информация о токсичности из 14-дневного эксперимента используется для выбора доз для 90-дневного опыта. Протокол 14-дневного эксперимента включает 5 доз и контрольные группы, по 5 животных в группе каждого пола и вида. Всего используют 120 животных на опыт.

В настоящее время, в дополнение к очистке текущих протоколов тестирования, оцениваются потенциальные методы тестирования *in vitro* для частичного или полного отказа от 14-дневных исследований токсичности, особенно для химических веществ, где используется процедура нанесения на кожу. В исследовании *in vitro* с использованием EpiDerm™ для оценки раздражения кожи, используют нейтральный красный NRU для оценки системной токсичности и используют цитотоксичность на первичных гепатоцитах крыс для оценки гепатотоксичности. Обычно тесты EpiDerm и NRU дают хорошую оценку, соответствующую тестам *in vivo*. Однако необходимо большое количество баз данных для принятия окончательного решения соответствия результатов *in vitro* результатам *in vivo*.

Модели хронической токсичности – это основы оценки функциональных и морфологических нарушений у экспериментальных животных при применении веществ от 6 до 12-18 мес.

Более полно хроническую токсичность можно определить как *последовательность дисфункций* или прогрессивно ухудшающихся функций клеток, органов или систем множественных органов, в результате длительного воздействия химических веществ. Предложены реперные точки эксперимента и разрабатывается интегрированный подход к тестированию, основанный на альтернативных методах при наличии моделей *in vitro*. Определены пять наиболее общих мишеней токсичности для оценки повторяющихся доз: *печень, почки, ЦНС, легкие и гематопозитическая система*.

Разработанные методы используются сегодня на всех исследовательских уровнях, но ни один не может быть назван не только идеальным, но хотя бы приемлемым для оценки цели любой токсичности для органов. Необходимо предпринять попытки оптимизировать существующие модели и найти соответствующие модели *in vitro* в тех случаях, когда имеется несколько моделей, например, для легких, печени и так далее. В общем случае рекомендуется провести дополнительное исследование для обеспечения лучшего понимания патогенеза хронических болезней.

Необходимы дополнительные попытки для оценки NOEL (no observable adverse effect level) отсутствия у рассмотренных уровней побочных эффектов *in vitro*. Требуется большое число исследований и подтверждений оценок применения подходов моделей QSAR для установления хронической токсичности и для включения их в *батарейку тестов* и *стратегию рядов*. Для валидации существующих и вновь разработанных альтернативных моделей понадобится, по-видимому, не менее 10 лет, а достижение *полной замены животных* в регулярных тестах и стратегиях зависит от уровня исследований, адекватной расстановки приоритетов, попыток установления и координации действий ученых разных стран.

Рекомендуемая литература

1. Болотских Л.А., Лушникова З.С. Усовершенствованный способ получения гнотобиологических животных // *Биомедицина*, 1, с.114-117, 2006.
2. Брайцева Е.В. Введение в GLP // *Биомедицина*, 1, с.122-125, 2005.
3. Брайцева Е.В. Фундаментальные основы GLP (Часть 1. Основные положения качественной лабораторной практики) // *Биомедицина*, 2, с.140-143, 2006.
4. Вейко Н.Н., Малашенко А.М., Соколова Е.В., Тишкина Н.Л. Нелинейные мыши Kv:SHK как адекватная модель для исследования эффекта противораковых препаратов (пилотный опыт с альфа-аманитином). *Биомедицина*, 2 с. 37-40. 2008.
5. Верстакова О.Л., Арзамасцев Е.В. Качественное доклиническое токсикологическое исследование фармакологических веществ на разрешительной стадии – основа

- безопасных клинических испытаний и медицинского применения лекарственных средств // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. – 2006. - № 1. – С.28-33.
6. Горшкова Ю.В., Трегубов А.В., Сарвилина И.В. Новый программный продукт для клинической фармакологии. *Биомедицина*, 1 с.54-60. 2008.
 7. Гуськова Т.А. Лекарственная токсикология на рубеже веков // *Очерки отечественной фармакологии*. – Сост. акад. РАМН Сергеев П.В., акад. РАМН Петров В.И., чл.-корр. РАМН Шимановский Н.Л. – Волгоградская медицинская академия. - Москва. – 2001. – С.360-373.
 8. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В., Насонова Т.А., Есауленко И.Э., Попов В.И. Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. – М. Воронеж: ИСТОКИ, с.232. 2004.
 9. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах. *Биомедицина*, 2, с.40-51, 2006.
 10. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини-свиней // *Биомедицина*, 6, с.70-80, 2006.
 11. Капанадзе Г.Д., Е.Л.Матвеевко, А.О.Ревякин, С.В.Огнев Качественная лабораторная практика (GLP): здания и сооружения НЦБМТ РАМН // *Биомедицина*, № 1, 2010, с.78-87.
 12. Карих Т.Л., Байбаков В.И., Молокеев А.В. и др. Исследование возможности получения животных высокого качества в конвенциональных условиях содержания. – *Baltic J. Lab. Anim. Sci.*, 1999, № 3 149-154.
 13. Каркищенко В.Н., Мартынов В.В. Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей // *Биомедицина*, № 4, 2006, с.83-85.
 14. Каркищенко В.Н., Шмидт Е.Ф., Брайцева Е.В. Исследователи предпочитают мышей BALB/c // *Биомедицина*, № 6, 2007, с.57-70.
 15. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 340 с., 2007.
 16. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 448 с., 2007.
 17. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, с 607, 2004.
 18. Каркищенко Н.Н. Через критерии подобия и аллометрии к валидации и экстраполяции в биомедицине. *Биомедицина*, 6, с.5-28. 2007.
 19. Корзая Л.И.; Латин Б.А.; Кебурия В.В.; Лазарева И.Я. Частота выявления антител к вирусу гепатита Е у обслуживающего персонала и у макак Адлерского питомника обезьян // [Вопросы вирусологии](#), 2007; Т.52, N 1. - С. 36-39.
 20. Крышкина В.П., Малашенко А.М. Исследование генетической изменчивости нелинейных лабораторных мышей с помощью линий-анализаторов. – *Генетика*, 1973, т. 9, № 5, с. 52-55.
 21. Крышкина В.П., Малашенко А.М. Сравнение уровня эмбриональной смертности у гомо- и гетерозиготных лабораторных животных. – В кн.: *Лабораторные животные в медицинских исследованиях: Тез. Докл. Конф. М.: 1974, с. 16-17.*
 22. Крышкина В.П., Малашенко А.Н. Генетическая изменчивость белых нелинейных мышей. – *Генетика*, 1972б, т. 8, № 11, с. 76-82.
 23. Крышкина В.П., Малашенко А.Н. Сложные гибриды мышей СВВА – новая модель для медико-биологических исследований. – *Бюл. Эксперим. Биологии и медицины*, 1975, №11, с. 118-119.
 24. *Лабораторное животноводство*. – М.: Россельхозиздат, 1980.
 25. *Лабораторные животные (Положение и руководство)* / под ред. и при участии чл.-корр. РАМН Н.Н.Каркищенко. – М.: Межкадаемическое изд-во «ВПК», 138 с., 2003.

26. Латин Б.А., Джакидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Инфекционная патология обезьян: краткая характеристика, возможности экспериментального изучения, биобезопасность для человека при содержании обезьян в приматологических питомниках и лабораториях // *Вестник РАМН*, № 4, 43, 2004.
27. Латин Б.А.; Чикобава М.Г. Эпидемиология обезьяньего вируса SV-40 в разных регионах Российской Федерации. [Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009; Т.148, N 12.](#) - С. 687-689
28. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука, 1983.
29. Машиковский М.Д. Лекарства XX века. – М. – ООО «Издательство Новая волна». – 1998. – 320 с.
30. Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды / Под ред. Ю.А. Рахманина. – М., 2007.
31. Об утверждении нормативных затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения (*утверждены МЗ СССР, приказ №1179 от 10.10.1983 г.*).
32. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. ВОЗ, Женева, 1994.
33. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. – М.: Профиль-2С, 358 с., 2010.
34. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У.Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. – ОАО «Издательство «Медицина». – 2005. – 832с.
35. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), (*утверждены главным санитарным врачом СССР 06.04.1973 г., приказ № 1045-73*).
36. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. – М.: Техносфера, 2007.
37. Теоретические и практические основы гнотобиологии. – М., Колос, 1983, 254 с.
38. Шевелев Н.С., Афанасьев Г.Д., Грушкин А.Г. Биоэтика в сельскохозяйственных физиологических экспериментальных исследованиях на животных. – М., 2005. С.76.
39. American Veterinary Medical Association. Report of the AVMA Panel on Euthanasia // *JAVMA*. 1993, p.202, 229-249.
40. Brooks D., Horner R.L., Kozar L.F., Waddell T.K., Render C.L., Phillipson E.A. Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure // *J Appl Physiol*. 81: 1012-1018, 1996.
41. Bulthuis R.J.A., Bergman A.F., Nijessen S., Schlingmann F., Tolboom J., Remie R., Van de Weerd H.A., Van Loo P.L.P., Baumans V., Van Zutphen L.F.M. Automated behaviour classification: the LABORAS project. Harmonisation of Laboratory Animal Husbandry, edited by O'Donoghue PM. Basel: RSM Press, 1996, p. 17-18.
42. Bunag R.D. Facts and fallacies about measuring blood pressure in rats // *Clin Exp Hypertens* 5: 1659-1681, 1983.
43. Butz G.M. Davisson R.L. Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool // *Physiol Genomics*. 5: 89-97, 2001.
44. Carbone, Larry. What Animals Want: Expertise and Advocacy in Laboratory Animal Welfare. Oxford University Press, 2004.

45. Carlson N.R. The Physiologie of Behavior. 5th ed. - Boston: Allyn and Bacon, 2006/
46. CFR (Code for Federal Regulations). Title 9 (Animals and Animal Products), subchapter A (Animal Welfare). Office of the Federal Register. Washington D.C. Internet site <http://www.nal.usda.gov/awic/legislat/regspage.htm>, 2003.
47. Dawkins V.S. Unravelling Animal Behaviour. - Marlow: Longman, 2006.
48. Federation of European Laboratory Animal Science Associations. FELASA guidelines for education of specialists in laboratory animals science (Category D) // *Lab. Anim.* 1999, 33, p.1-15.
49. FELASA recommendations for the education and training of persons carrying out animal experiments (Category B). Report of the Federation of European Laboratory Science Associations Working Group on Education of Person carrying out animal experiments (Category B) – Nevalainen T. et. Al. *Laboratory animals*, 2000, 34 № 3, p. 229-235.
50. FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep, and goats. Report of the Federation of European Laboratory Animal Association (FELASA). Working Group on animal health: Reh binder C. et. Al. *Laboratory animals*, 2000, 34 № 4, p. 329-350.
51. Festing M.F.W. Good experimental design and statistics can save animals, but how can it be promoted? // *ATLA*, vol. 32, suppl. 1A, pp.133-136, 2004.
52. Festing M.F.W. Inbred strains of mice and rats. – http://www.informatics.jax.org/external/festing/search_form.cgi.
53. Festing M.F.W. Inbred Strains in Biomedical Research. // *ATLA* 26, 283-301, 2002.
54. Festing M.F.W. International index of laboratory animals. – Carshalton: MRC Lab. Anim. Centre, 141, 1980.
55. Festing M.F.W. Reducing the use of laboratory animals by better experimental design. // *Baltic J. Lab. Anim. Sci*, 2002, 12, 1, p. 7-16.
56. Festing M.F.W., Blackmore D. Life span of specified-pathogen-free MRC category 4 mice and rats. // *Lab. Anim.*, No. 5, 179-192, 1971.
57. Hooijmans, C.R., Leenaars M., Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animals studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible // *ATLA* vol. 38, No. 2, pp. 167-182, 2010.
58. Hudson M., Balls M. European experimental animal use declines ever so slightly // *ATLA* vol. 38, No. 6, pp. 529-532, 2010.
59. Iwakuma T., Lozano G. Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models // *Oncogene*, vol. 26 issue 15 pp. 2177-84. 2007.
60. Kinter L.B. Valentin J.P. Safety pharmacology and risk assessment // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 16: 175-182, 2002.
61. Kinter L.B., Johnsen D.K. Remote monitoring of experimental endpoints in animals using radio-telemetry and bioimpedance technology. / In: *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. – London: RSM, 1999, p. 58-65.
62. Klerman G.L. Depression and related disorders of mood (affective disorders) / In: A.M. Nicholi (ed) *New Harvard Guide to Psychiatry*. – Cambridge, MA: Harvard University Press, 2006.
63. Kostomitsopoulos N.G. New trends on laboratory animal facility management. *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* 2001, 11, p. 17-22.
64. Krause J., Mc Donnel G., Riedesel H. Biodecontamination of animal rooms and heat-sensitive equipment with vaporized hydrogen peroxide. *Contemporary topics in laboratory animal science*, 2001, 40, № 6 p. 18-21.
65. Silla V.C.B., E.C.DE Oliveira Sans, molento C.F.M. An estimation of the extent of animal use in research in Brazil, as determined by bibliographic sampling from journals published in the State of Paraná // *ATLA*, vol.38, No.1, 2010, pp. 29-38.
66. Staphens U.K. Educational programs for animal care technical personnel in the United States. *Baltic J. Of Laboratory Anim. Sci.* 2002, 12 № 3, p. 214-219.

67. *Thomas S.* Physiologically-based pharmacokinetic modeling for the reduction of animal use in the discovery of novel pharmaceuticals // *ATLA*, vol. 38, suppl. 1, 2010, pp. 81-86.
68. *Trexler P.C.* Gnotobiotic Technology: Introductory remarks // *Recent advances in germfree research* / Ed. *S. Sasaki, A. Ozawa, K. Hashimoto.* – Tokyo: Takai Univ. Press, 1981. – p.33-37.
69. United Nations Economic Commission for Europe (UN/ECE). Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 6 pp. – *New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland: United Nations, 2003.*
70. "Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research", Institute for Laboratory Animal Research. – *The National Academies Press, 1988.*
71. *Varga O.E., Hansen A.K., Sandoe P., Ollsson I.A.S.* Validation animal models for preclinical research: a scientific and ethical discussion // *ATLA*, vol.38, No.3, 2010, pp.245-248.
72. *Yamamuro Y.* [Social behavior in laboratory rats: Applications for psycho-neuroethology studies](#) // *Animal Science Journal*, 77, pp. 386-394, 2006.
73. *Yarri D.* The Ethics of Animal Experimentation. – *Oxford University Press U.S., 2005.*

Интернет ресурсы

<http://www.jax.org/>
www.nal.usda.gov/awic/legislat/usdaleg1.htm
<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/bulletin.shtml>
<http://stroy.databases.ru/Data1/52/52003/index.htm>
<http://www.aaalac.org/>
<http://www.felasa.eu/>
<http://www.iclas.org/>
<http://web.research.colostate.edu/acp/>
<http://www.primatetreeprogress.org/>